



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERIA BIOQUÍMICA



Extracción y microencapsulación, de carotenoides con actividad antioxidante a partir de *Daucus carota*.

Trabajo de Titulación, modalidad de proyecto de investigación, previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Henry Alexis Fiallos Yánez

Tutor: PhD. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Junio - 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Orestes López Hernández

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 09 de abril 2019



PhD. Orestes López Hernández

C.I. 175478486-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Henry Alexis Fiallos Yánez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Henry Alexis Fiallos Yánez

C.I. 1804109914

AUTOR

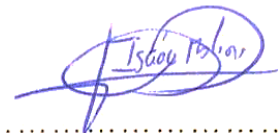
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato y Biotecnología.

Para constancia firman:



Presidente del tribunal



Mg. Ing. José Isaac Molina Sánchez
1803752300



Dra. Dayana Cristina Morales Acosta
1804135570

Ambato, 31 de abril 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....

Henry Alexis Fiallos Yánez

C.I. 1804109914

AUTOR

DEDICATORIA

“La gloria de un hombre está en ser grande
y ser útil”.

Simón Bolívar.

Este trabajo de titulación está dedicado a mis padres que han sido un apoyo fundamental en mí vida, siempre en las buenas y las malas.

A ti Cristina Guevara, mi Gxtita, gracias por llegar a mi vida siempre mi amor eterno e inolvidable.

A mi tutor Dr. Orestes López que desde su experiencia me ha dado buenos consejos, siempre con su apoyo y guía para ver un futuro mejor, como un amigo que nunca falla gracias totales amigo mío.

A cada uno de los integrantes de la barra Luto Rojo, que nuestro colegio nos unió y nunca más nos separó.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por dar ese apoyo en todo sentido y lograr culminar así un paso más en mis estudios, gracias padre y madre es para ustedes.

Agradezco a mi Tutor, Docente y amigo Orestes López que desde las aulas, laboratorios y congresos a los que asistimos, me ha dado la mano con su voz de la experiencia, siendo así una persona ejemplar de la cual llevo presente siempre.

Agradezco a mis amigos Emiliano Suarez, Jonathan Vásquez y Cristian Pérez, que en la universidad hemos avanzado un escalón más, de ustedes me llevo sus consejos de seguir adelante nunca rendirnos ya que la vida es eso, luchar y alcanzar nuestros sueños, gracias amigos me dieron grandes consejos y hoy más que nunca los llevo donde este.

Agradezco a Henry Vargas y Marcelo Solís, en verdad amigos míos estamos tan lejos por situaciones que nos puso la vida, pero la buena amistad, una cerveza fría y la buenos recuerdos nos unen y eso nunca cambiara.

Agradezco a mis hermanos, Byron Miranda, Diego Montenegro, Andrés Sisalema, Santiago Llambo, Lenin Cruz, David Cruz, Xavier Arias, y Roberto Montenegro, hemos estado en las buenas y malas unidos por el Centenario que nos vio crecer, de ustedes me llevo la fuerza de seguir a pesar de todo y firmes para lo que se venga en esta corta vida, gracias en verdad, aguante Luto Rojo.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	X
INDICE DE ECUACIONES.....	XI
INDICE DE ANEXOS.....	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT.....	XIII
INTRODUCCIÓN	14
CAPITULO I	15
EL PROBLEMA.....	15
1.1. Tema de investigación.....	15
1.2. Justificación	15
1.3. Objetivos	16
1.3.1. Objetivo general	16
1.3.2. Objetivos específicos.....	16
CAPÍTULO II	17
MARCO TEÓRICO.....	17
2.1. Antecedentes investigativos	17
2.1.1. <i>Daucus carota</i>	17
2.1.2. Compuestos fitoquímicos en <i>Daucus carota</i>	18
2.1.3. Proceso oxidativo	19
2.1.4. Mecanismo de acción de un antioxidante	19
2.2. Hipótesis	20
2.2.1. Hipótesis nula.....	20
2.2.2. Hipótesis alternativa	20
2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis	20
2.3.1. Variables dependientes	20
2.3.2. Variables independientes.....	20
CAPÍTULO III.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Materiales, equipos y reactivos	21
3.1.1. Materiales.....	21
3.1.2. Equipos.....	21
3.1.3. Reactivos	21
3.1. Métodos.....	22
3.2.1. Trabajo de campo	22
3.2.2. Preparación de materia vegetal.....	22

3.2.3. Obtención extractos líquidos	22
3.2.4. Análisis de los extractos obtenidos	23
3.2.5. Análisis Estadístico	24
3.2.6. Microencapsulación.....	24
3.2.7. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	24
3.2.8. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vivo</i>	25
CAPÍTULO IV.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Resultados	26
4.1.1. Extracción de metabolitos	26
4.1.2. Análisis espectroscópico de carotenoides microencapsulado	28
4.1.4. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> del microencapsulado	31
4.1.5. Actividad antioxidante <i>in vivo</i> del microencapsulado	32
4.2. Verificación de la hipótesis	33
CAPITULO V.....	34
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	34
5.1. Conclusiones	34
5.2. Recomendaciones.....	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXOS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hojas y frutos de <i>Daucus carota</i>	17
Figura 2. A) Diagrama de Pareto estandarizado; B) Gráfica de efectos principales para extracción de carotenoides	27
Figura 3. Gráfica de superficie de respuesta de los efectos principales en la extracción de carotenoides	28
Figura 4. A) Espectro para el concentrado de carotenoides; B) Espectro para el microencapsulado; C) Espectro para los polímeros utilizados.....	30
Figura 5. Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía <i>Daucus carota</i>	18
Tabla 2. Condiciones óptimas para extracción de metabolitos	26
Tabla 3. Porcentaje de eficiencia de microencapsulación.....	28
Tabla 4. Resultados de la inhibición por DPPH	32

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Determinación de sólidos totales.	23
Ecuación 2. Concentración de carotenoides.	23
Ecuación 3. Masa de sólidos extraídos.	23
Ecuación 4. Masa de carotenoides en 100 gramos de sólidos extraídos.	23
Ecuación 5. Eficiencia de extracción.	23
Ecuación 6. Porcentaje de inhibición de DPPH.	25

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resumen del proceso experimental.	39
Anexo 2. Datos obtenidos en la extracción de carotenoides para determinación de las condiciones óptimas de extracción.	40
Anexo 3. Datos obtenidos de muestras en extracción de carotenoides para determinación de las condiciones óptimas de extracción.	40
Anexo 4. Análisis de varianza y optimización para la extracción de carotenoides.	41
Anexo 5. Curva de Calibración de Trolox.	42

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se basó en la extracción y análisis de metabolitos de la planta *Daucus carota* por sus propiedades antioxidantes, tomando como punto de partida la extracción de carotenoides en base a un diseño de experimental superficie. Para aprovechar las propiedades de los metabolitos extraídos, se desarrollaron microencapsulados del tipo microesfera que contenían como principio activo los antioxidantes del extracto de la planta *Daucus carota*, utilizando dos polímeros de tipo sacárido los cuales fueron maltodextrina y goma arábica de gran uso comercial con los que se obtuvo una eficiencia de microencapsulación del 92,21 %, los cuales se utilizaron para verificar las propiedades antioxidantes mediante ensayos *in vitro* por el método DPPH para analizar el porcentaje de inhibición de radicales libres en el que se obtuvo 394,076 μmol equivalentes de Trolox que muestra un porcentaje de inhibición del 71,20% para el microencapsulado, y en la actividad antioxidante *in vivo* a través de la curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se determinó el potencial antioxidante.

Palabras clave: *Daucus carota*, carotenoides, actividad antioxidante, microencapsulación.

ABSTRACT

The present research work was based on the extraction and analysis of metabolites of the *Daucus carota* plant for its antioxidant properties, taking as a starting point the extraction of carotenoids based on an experimental surface design. To take advantage of the properties of the extracted metabolites, microencapsulated microcapsules containing the antioxidants of the extract of the *Daucus carota* plant were developed, using two saccharide-type polymers which were maltodextrin and gum arabic of great commercial use with which a microencapsulation efficiency of 92.21% was obtained, which were used to verify the antioxidant properties by means of in vitro tests by the DPPH method to analyze the percentage of inhibition of free radicals in which 394,076 μmol equivalents of Trolox was obtained. a percentage of inhibition of 71.20% for the microencapsulation, and in the antioxidant activity in vivo through the growth curve of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* the antioxidant potential was determined.

Key words: *Daucus carota*, carotenoids, antioxidant activity, microencapsulated.

INTRODUCCIÓN

Existen muchos compuestos metabólicos que se encuentran de forma natural en las plantas de diferentes partes del mundo y que han sido utilizadas tradicionalmente por el ser humano como un medicamento ante enfermedades. Entre los diversos metabolitos secundarios que se pueden encontrar están los carotenoides que son pigmentos orgánicos muy importantes para el ser humano por su función farmacéutica, estos compuestos pueden ser un sustituto de medicamentos convencionales (Cesar, 2017).

La extracción de metabolitos en plantas es un proceso importante, ya que dichos metabolitos pueden presentar actividades biológicas, como por ejemplo la capacidad antioxidante que reduce la formación de los radicales libres y los elimina del organismo, disminuyendo así enfermedades. Los carotenoides presentan muchas actividades beneficiosas ya comprobadas como son la protección ante rayos UV, eliminación de radicales libres y su potencial antioxidante, que es punto importante de estudio a nivel *in vitro* e *in vivo* (Luis Folch-Mallol, Garay-Arroyo, Lledías, & Covarrubias Robles, 2016).

La actividad antioxidante se da en el organismo ante el proceso oxidativo que ocurre cuando en las células y en el tejido muscular existe un desequilibrio entre la producción y la acumulación de especies que reaccionan con el oxígeno y la capacidad que tiene el sistema biológico para actuar ante estas especies y poder neutralizarlas. La principal fuente de producción de estas especies reactivas al oxígeno son las mitocondrias, que en condiciones fisiológicas y patológicas forman radicales superóxido que son resultado de la respiración celular o resultado del proceso de ciclooxigenasas y lipoxigenasas en el momento del metabolismo del ácido araquidónico. La rápida acción ante estas especies reactivas está a cargo de un conjunto de componentes enzimáticos, como es un claro ejemplo la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, las cuales tienen un mecanismo de ruptura de cadenas, y por otro lado está la acción antioxidante que tiene como mecanismo la donación de un electrón al radical libre de la especie reactiva que da como resultado su neutralización. Por esta razón, se busca alternativas de antioxidantes de origen natural y que sustituyan a los medicamentos convencionales que produzcan un mejor resultado en el organismo del ser humano (Justo & Venereo Gutiérrez, 2002).

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de investigación

EXTRACCIÓN Y MICROENCAPSULACIÓN, DE CAROTENOIDES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE *Daucus carota*

1.2. Justificación

Las plantas desde la antigüedad han sido consideradas como fuente de obtención de compuestos curativos para controlar enfermedades como el envejecimiento, aterosclerosis y cáncer. Los compuestos antioxidantes pertenecientes al grupo de los ácidos fenólicos, polifenoles y flavonoides, eliminan los radicales libres como el peróxido, hidroperóxido o piróxilo lipídico e inhiben los mecanismos oxidativos que conducen a enfermedades degenerativas (Loganayaki, Siddhuraju, & Manian, 2013).

Se ha determinado que los antioxidantes pueden proteger a los lípidos y aceites en los alimentos contra la degradación oxidativa, de esta forma cuando se agregan compuestos antioxidantes a los alimentos se controla el desarrollo de la ranciedad, es decir, se retrasa la formación de productos de oxidación, manteniendo la calidad nutricional, prolongando la vida útil de los productos y cumpliendo así normas de seguridad alimentaria.

En la industria los antioxidantes sintéticos están limitados para ser utilizados como conservantes de alimentos, en contra parte los antioxidantes naturales obtenidos a partir de plantas como especias y hierbas, han sido de interés creciente para cubrir la demanda y reemplazar a los de origen sintético (Škrovánková, Mišurcová, & Machů, 2012).

La adición de compuestos antioxidantes naturales en la dieta humana ayudaría a reducir el estrés oxidativo, que es causado por la alta concentración de radicales libres en células, resultado de la radiación UV, rayos X, alimentos contaminados, condiciones ambientales adversas, esfuerzo físico intensivo o ingerir sustancias como alcohol o tabaco (Yashin, Yashin, Xia, & Nemzer, 2017).

Daucus carota es una planta con gran acumulación de pigmentos del tipo carotenoide, estudios realizados han determinado que estos compuestos juegan un papel esencial en la salud humana por su aporte nutritivo y composición antioxidante, y también como precursor de la provitamina A (Jourdan et al., 2015). Al ser una fuente natural de carotenoides se han estandarizado métodos de extracción, siendo la forma más efectiva con etanol caliente,

obteniendo un mejor rendimiento en el proceso por el volumen de descarga (Mustafa, Trevino, & Turner, 2012).

La microencapsulación es una tecnología que ha demostrado ser prometedora como vehículo para suministrar compuestos bioterapéuticos. Se ha demostrado que es útil en la inmovilización de fármacos, células vivas de mamíferos, bacterias y otras moléculas biofarmacéuticas, ya que puede proporcionar estructuración del material, protección del producto incluido y liberación controlada de los contenidos encapsulados, con lo cual puede garantizar efectos terapéuticos eficientes y seguros (Tomaro-Duchesneau, Saha, Malhotra, Kahouli, & Prakash, 2013). La microencapsulación también cumple la función de proteger los principios activos obtenidos de los procesos de extracción, para evitar la degradación del producto debido a factores ambientales externos como oxígeno, luz, calor y humedad que degradan cualquier compuesto lábil. La protección mediante microcápsulas es adecuada cuando se administra por vía oral un agente terapéutico, debido a la exposición a las duras condiciones del tracto gastrointestinal superior, brindando así una liberación controlada y segura (Singh, Hemant, Ram, & Shivakumar, 2010).

En esta investigación se plantea la extracción y microencapsulación de carotenoides como una alternativa para el aprovechamiento de la zanahoria, que es un recurso de gran producción a nivel de la provincia de Tungurahua, para así elaborar nuevos productos con capacidad antioxidante en la industria alimentaria y farmacéutica.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Extraer carotenoides con actividad antioxidante a partir de la planta *Daucus carota*

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas de extracción de carotenoides de *Daucus carota* por medio de un diseño experimental de superficie de respuesta.
- Microencapsular los carotenoides extraídos de *Daucus carota* empleando una mezcla de diferentes polímeros de uso industrial.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del extracto y producto microencapsulado.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

2.1.1. *Daucus carota*

Daucus carota, comúnmente conocida como zanahoria (Figura 1), es una planta con flores perteneciente a la familia Apiaceae, nativa de las regiones templadas de Europa y el suroeste de Asia, naturalizada en América del Norte y Australia y su taxonomía se muestra en la Tabla 1. A nivel mundial el principal productor es China con una producción del 45 % y en menor cantidad esta Sudamérica con un 5 %, lo que convierte a la zanahoria en una hortaliza de interés en el mercado mundial, que estadísticamente, abre mercados de exportación hasta un 30 % en Europa por su utilidad comercial (Francisco López Cordero, Ruales, Uzcategui, & Koziol, 2015). La zanahoria del oeste o conocida como zanahoria naranja surgió en Europa a través de una selección gradual dentro de las poblaciones, y ahora han reemplazado en gran medida a los tipos de zanahoria orientales debido a su sabor y valor nutricional superior. De todas las hortalizas, la zanahoria, particularmente en las variedades de pulpa amarilla y naranja, son la fuente más rica de caroteno (provitamina A) que ayuda a prevenir la ceguera nocturna y por otro lado disminuye la incidencia del cáncer en determinados casos por su potencial antioxidante (*Daucus carota* ScienceDirect Topics, 2018) .



Figura 1. Hojas y frutos de *Daucus carota*

Nota: Fuente: Taxonomía en plantas: zanahoria, 2018

Tabla 1.

Taxonomía Daucus carota

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Apiales
Familia	Apiaceae
Género	Daucus
Epíteto específico	Carota
Autor del epíteto específico	(Linneo) Carlos.
Nombre científico	Daucus carota (Linneo) Carlos.

Nota: El cuadro indica la clasificación taxonómica de *Daucus carota*

Fuente: Universidad Nacional de Colombia Colecciones, 2018

2.1.2. Compuestos fitoquímicos en *Daucus carota*

El estudio fitoquímico realizado a partir de extractos de *Daucus carota* en un medio de etanol permitió determinar los compuestos presentes en la planta, en la cual se encontró carbohidratos, ácido clorogénico, flavonoides, fenoles, carotenos, aceites esenciales, terpenoides y cumarina. Por otro lado, el análisis nutricional del jugo de zanahoria mostró el contenido de proteína $1,067 \pm 0,058$ %, grasa bruta $0,367 \pm 0,089$ %, fibra bruta $1,167 \pm 0,153$ %, carbohidratos $6,100 \pm 0,346$ %, vitaminas y minerales. Los estudios farmacológicos muestran que entre los diferentes efectos que posee esta planta, los más relevantes son citotóxicos, antioxidantes, y antimicrobianos.

Se han realizado nuevos estudios del efecto citotóxico del extracto de aceite de *Daucus carota* en células de leucemia mieloide, con lo que los investigadores concluyeron que el tratamiento tópico retrasa el crecimiento de estos tumores y se obtiene un efecto positivo en el control de la muerte celular (Al-Snafi, 2017).

Por otro lado, el aceite esencial de *Daucus carota* se produce en un 3 % a partir de las semillas y en un 2,1 % a partir de las hojas. Se identificaron un total de 48 compuestos en aceite esencial de hojas de *Daucus carota* y 46 en aceite esencial de semillas (Sun, Simon, & Tanumihardjo, 2009).

Los carotenoides, R- y β -caroteno, presentes en la zanahoria tienen una estructura de polieno conjugado que permite que los electrones en los enlaces dobles se deslocalicen fácilmente y por tanto reduzcan el estado fundamental de la molécula. Este sistema central de enlaces carbono-carbono conjugados hace que los carotenoides neutralicen eficientemente el oxígeno singlete. Esta estructura también crea una forma estable que hace que los pigmentos retrasen la peroxidación lipídica y estabilicen las estructuras de proteínas lipídicas como las membranas celulares (Sun et al., 2009) .

2.1.3. Proceso oxidativo

El proceso oxidativo es un fenómeno causado por un desequilibrio entre la producción y la acumulación de especies reactivas al oxígeno (ROS) en células y tejidos, y la capacidad de un sistema biológico para desintoxicar estos productos reactivos. Existen muchos factores que favorecen a la producción de estas especies reactivas como son los rayos UV, radiaciones ionizantes, contaminantes y los metales pesados (Manganaris, Goulas, Mellidou, & Drogoudi, 2017).

Las ROS son producidas principalmente por mitocondrias, durante condiciones fisiológicas y patológicas, es decir los radicales superóxido pueden formarse por respiración celular, por lipoxigenasas y ciclooxigenasas durante el metabolismo del ácido araquidónico, y también por células endoteliales e inflamatorias. A pesar del hecho de que estos orgánulos tienen una capacidad intrínseca de captación de las ROS, esto no es suficiente para abordar la necesidad celular de eliminar estas especies producidas por las mitocondrias. Las células despliegan un sistema defensivo antioxidante basado principalmente en componentes enzimáticos, como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, para protegerse del daño celular inducido por las especies. La producción de ROS se basa en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas capaces de generar ROS son aquellas que tienen relación con la cadena respiratoria. El radical superóxido es generado por la NADPH oxidasa, xantina oxidasa y peroxidasa. Una vez formado, participa en varias reacciones que a su vez generan peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, peroxinitrito y ácido hipocloroso. El peróxido de hidrógeno es producido por múltiples enzimas oxidasa que son aminoácido oxidasa y xantina oxidasa. El radical hidroxilo, la más reactiva de todas las especies de radicales libres in vivo, se genera por reacción del radical superóxido con el peróxido de hidrógeno, con Fe^{2+} o Cu^{+} como catalizador de reacción (reacción de Fenton). El radical óxido nítrico, que desempeña algunas funciones fisiológicas importantes, se sintetiza a partir de la oxidación de arginina a citrulina mediante la sintasa de óxido nítrico. Incluso las reacciones no enzimáticas pueden ser responsables de la producción de radicales libres cuando el oxígeno reacciona con compuestos orgánicos o cuando las células están expuestas a radiaciones ionizantes. La producción de radicales libres no enzimáticos también puede ocurrir durante la respiración mitocondrial (Pizzino et al., 2017).

2.1.4. Mecanismo de acción de un antioxidante

Se han propuesto dos mecanismos de acción principales para los antioxidantes. El primero es un mecanismo de ruptura de cadenas mediante el cual el antioxidante primario dona un electrón al radical libre presente en los sistemas. El segundo mecanismo implica la eliminación de iniciadores de especies de nitrógeno reactivo mediante la desactivación del catalizador iniciador de cadena. Los antioxidantes pueden ejercer su efecto sobre los sistemas biológicos

mediante diferentes mecanismos que incluyen la donación de electrones, la quelación de iones metálicos, los co-antioxidantes o la regulación de la expresión génica. La defensa antioxidante del cuerpo se puede aproximar midiendo los niveles plasmáticos de antioxidantes, teniendo en cuenta que el compartimento circulante solo refleja el flujo entre los órganos y los tejidos (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010).

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

Los extractos de zanahoria y sus microencapsulados no presentarán actividad antioxidante.

2.2.2. Hipótesis alternativa

Los extractos de zanahoria y sus microencapsulados presentarán actividad antioxidante.

2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis

2.3.1. Variables dependientes

- Propiedades antioxidantes *in vitro e in vivo* del extracto.

2.3.2. Variables independientes

- Proporción de la masa - disolvente en la extracción y tiempo de extracción.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales, equipos y reactivos

3.1.1. Materiales

El proceso requirió el uso de los siguientes materiales de laboratorio: matraces Erlenmeyer de 100, 200 y 1000 ml, balones de aforo de 10 y 100 ml, probetas graduadas de 100 ml, núcleos de agitación magnética, espátulas, pipetas graduadas de 5 y 10 ml, micropipetas 10-1000 µl, peras de succión, placas de 96 pocillos para un espectrofotómetro (Corning® Costar®), cubetas de espectrofotómetro, botellas de vidrio color ámbar de 100 ml y tubos Falcon 15 ml.

3.1.2. Equipos

Los procesos de obtención de carotenoides, microencapsulación y determinación de la actividad antioxidante, requirieron el uso de los siguientes equipos: horno de secado (Gander MJN), plancha de calentamiento (Corning PC-620D), balanza analítica (Ohaus PA-214), balanza analítica (Ohaus PA-113), balanza de humedad (KERN MLS 50-3), rotavapor (IKA-RV8), espectrofotómetro UV-VIS (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO), equipo mini Spray Dryer (BUCHI-B 290).

El análisis estadístico se realizó utilizando los siguientes equipos: computadora Lenovo 80E1 cargada con sistema operativo Windows 10, junto con el software de análisis de datos estadístico y gráfico Statgraphics Centurión XVIII.

3.1.3. Reactivos

El proceso de extracción de carotenoides requirió los siguientes reactivos:

- Agua destilada y etanol 96 %

En el proceso de microencapsulación se utilizaron los siguientes polímeros:

- Maltodextrina y goma arábica.

En el análisis de actividad antioxidante *in vitro* se utilizó los siguientes reactivos:

- Agua destilada, DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl y reactivo Trolox 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid 97 %.

En el análisis de actividad antioxidante *in vivo* se utilizó los siguientes reactivos:

- Agua destilada, medio YPD, solución amortiguadora PBS, vitamina C y peróxido de hidrógeno.

3.1. Métodos

3.2.1. Trabajo de campo

El proceso de recolección de la planta *Daucus carota*, se realizó en las coordenadas 0°23'12"S y 12°23'45"W pertenecientes a la parroquia Montalvo, del cantón Cevallos, en la provincia de Tungurahua. Se recogieron los mejores ejemplares de la planta, separando el tallo y flores, y se guardó en fundas herméticamente selladas a temperatura ambiente para su transporte seguro hacia el laboratorio.

3.2.2. Preparación del material vegetal

Se tomaron los ejemplares recolectados de *Daucus carota* y se sometieron a un lavado, se redujo el tamaño de las muestras por ralladura y los trozos se colocaron en una estufa (Gander MTN) a 60 °C por un periodo de 20 horas hasta reducir la humedad al 7 %. El material vegetal seco se pasó a un molino de cuchillas hasta obtener un polvo fino y como parte final se guardó en recipientes de vidrio con tapa hermética que permita la protección ante cualquier contaminación.

3.2.3. Obtención de los extractos líquidos

Para la obtención de extractos a partir del polvo fino de zanahoria se realizó un proceso de separación sólido-líquido, en el cual se utilizó etanol como disolvente orgánico en combinación con tres proporciones de masa distintas de 1:15, 1:20 y 1:25 de material vegetal seco con respecto al disolvente. Para la primera proporción 1:15 se pesó 13,33 g de material vegetal seco en una balanza analítica (Ohaus pioneer) y se añadió 200 g de alcohol a cada una de las muestras. Para la otra proporción 1:20 se pesó 10 g de material vegetal seco en una balanza analítica (Ohaus pioneer) y se añadió 200 g de alcohol para cada muestra. Para la proporción 1:25 se pesó 8 g de material vegetal seco en una balanza analítica (Ohaus pioneer) y se añadió 200 g de alcohol respectivamente para cada muestra.

Posteriormente se colocaron las muestras en matraces de 500 ml y se taparon para evitar la evaporación del disolvente y se llevaron a una plancha de calentamiento (Corning PC-620D) con agitación magnética a 300 rpm hasta alcanzar la ebullición a 60 °C, en tres intervalos de tiempos diferentes 30, 75 y 120 minutos. Seguidamente, las muestras se sometieron a un proceso de filtración para separar los restos vegetales del extracto líquido y se conservó en frascos de vidrio color ámbar, tomando nota del volumen que se obtuvo del sobrenadante.

Se midió la absorbancia de las muestras con el uso de un espectrofotómetro UV- Visible a una longitud de onda 472nm, utilizando como blanco el etanol (Rodríguez, 2011.) .Se determinó el mejor tiempo y concentración para la extracción de carotenoides de la planta en base al diseño experimental de superficie de respuesta.

3.2.4. Análisis de los extractos obtenidos

Para la determinación de sólidos totales (SST) se realizaron mediciones por triplicado con la ayuda de una balanza de humedad (KERN MLS 50-3), y aplicando la ecuación 1 se obtuvo la cantidad de sólidos totales, con base en el porcentaje de humedad obtenido.

$$SST = 100 - \% \text{ humedad}$$

Ecuación 1. Determinación de sólidos totales.

Por medio de un espectrofotómetro UV-VIS (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO) se midieron las absorbancias de cada extracto (A) a una longitud de 472 nm, utilizando como blanco el etanol. Dicha longitud de onda corresponde a la máxima absorbancia del analito (Iринi, 2010).

Se realizó un cálculo de la concentración (C) de carotenoides, con base en la ecuación 2, utilizando el valor de absortividad específico de licopeno 3950, para obtener el contenido de carotenoides presente en las muestras expresados como licopeno (E).

$$C = \frac{A * 10^4}{E}$$

Ecuación 2. Concentración de carotenoides.

La masa de sólidos extraídos (MSE) se calculó en base a la ecuación 3.

$$MSE = \frac{M * SST}{100}$$

Ecuación 3. Masa de sólidos extraídos.

Donde,

M: masa del extracto.

Se determinó la masa de carotenoides en cien gramos de sólidos extraídos (m_c en 100g) a través de la expresión:

$$m_c \text{ en } 100 \text{ g} = \frac{mg \text{ en volumen final} * 100}{MSE}$$

Ecuación 4. Masa de carotenoides en 100 gramos de sólidos extraídos.

Finalmente, el porcentaje de eficiencia de la extracción (%E.E) se calculó a través de la relación entre la masa de carotenoides extraídos (m_c) y la masa de material vegetal (MV)

$$\%E.E = \left(\frac{m_c}{MV} \right) * 100$$

Ecuación 5. Eficiencia de extracción.

3.2.5. Análisis Estadístico

Se utilizó el programa Statgraphics Centurión 16.1 con un diseño experimental 3ⁿ que cuenta con n factores y tres niveles de estudio que toman el nombre de medio, bajo y alto que a través de su planteamiento se puede considerar el efecto individual de cada factor y también la interacción que existen entre ellos (Pagura, 2014).

Se hizo un análisis de la varianza, diferencias significativas entre los factores estudiados y las interacciones que existen entre ellas. Se analizó la respuesta para determinar la mejor relación material vegetal/ volumen de disolvente y su tiempo de extracción con relación a la eficiencia de extracción y la masa de carotenoides por cada cien gramos de sólidos extraídos.

3.2.6. Microencapsulación

Previamente al proceso de microencapsulación se retiró el disolvente orgánico del extracto conservando los carotenoides, se evaporó a 50 °C de temperatura y con presión reducida utilizando un rota evaporador, seguidamente a la recuperación del extracto acuoso se realizaron mediciones por triplicado para determinar el contenido de humedad y calcular el valor de sólidos totales presentes en la fase acuosa, aplicando la ecuación 1.

El proceso de microencapsulación de los carotenoides se realizó utilizando un mini Spray Dryer. Previamente, se preparó la emulsión con una combinación de maltodextrina, goma arábica y el extracto acuoso, este formado por goma arábica 33,34 %, maltodextrina 33,33 % y 7,94 g de extracto equivalentes al 33,33 % y se agitó en una plancha de calentamiento a 45 °C a 500 rpm para homogeneizar la emulsión.

Finalmente, se alimentó la emulsión al mini Spray Dryer para comenzar el proceso de microencapsulación en la cámara empleando una temperatura de entrada de 160 °C y de salida de 80 °C, ambas con un rango de $\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un flujo de aire de secado de 50m³/h y un flujo de aire de alimentación 500 l/h, permitiendo la formación de microcápsulas (Jyothi et al., 2010).

3.2.7. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

Para determinar el potencial antioxidante del extracto y del microencapsulado se tomó como base la reacción del complejo de radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) con el análogo existente de la vitamina E conocida como “Trolox”(Osman, Sidik, Awal, Adam, & Rezali, 2016).

Se preparó una solución de DPPH de 60 $\mu\text{mol l}^{-1}$ usando como disolvente una mezcla de metanol-agua en proporciones 80:20 de volumen. Por otro lado, para la curva de calibración se preparó una solución Trolox usando como disolvente una mezcla de etanol-agua en

proporciones 50:50 de volumen. Este compuesto generó una curva de calibración con concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

$$\% DPPH = \left[1 - \left(\frac{A_m}{A_{br}} \right) \right] \times 100$$

Ecuación 6. Porcentaje de inhibición de DPPH

Para establecer el porcentaje de DPPH inhibido respecto a la concentración de Trolox se utilizó la ecuación 6, donde A_m representa la absorbancia de la muestra, A_{br} representa la absorbancia del blanco reactivo, en base a la curva de calibración generada se preparó las muestras en una relación 1:1 tanto para el extracto como microencapsulado, donde se obtuvieron valores y se expresaron μmol equivalentes de Trolox.

3.2.8. Evaluación de la actividad antioxidante *in vivo*

En el análisis de la actividad antioxidante *in vivo* se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es un organismo modelo de estudio a nivel de biología molecular para ensayos de identificación de antioxidantes (Luis Folch-Mallol et al., 2016).

El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* junto con antioxidantes está sometida a procesos ya estandarizados, por lo cual el análisis de los factores que afectan su crecimiento por estrés oxidativo ya es un modelo de investigación que tiene su protocolo establecido.

Para el análisis del estrés oxidativo provocado por la adición de peróxido de hidrógeno en medio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó el método propuesto por, Peláez (2016) que muestra el efecto que provoca en el crecimiento de la levadura bajo estas condiciones.

Para esto se aislaron levaduras a partir de un sobre de levadura comercial de panadería (Levapán, Ecuador) mediante estría compuesta en medio PDA, con incubación a 28°C durante 72 horas, se la conservó en refrigeración a 4°C.

Se tomó una colonia de *Saccharomyces cerevisiae* y se inoculó en 5 ml de medio YPD manteniéndose en incubación durante 6 horas a 28°C y 100 rpm, se tomaron 5 μl de una dilución 1/10 del cultivo incubado y se inocularon en un tubo con medio YPD manteniéndose en incubación durante 18 horas a 28°C y 100 rpm. Concluidas las 18 horas de incubación el cultivo celular se centrifugó a 2700 g por 20 minutos a temperatura ambiente, se realizó un lavado con buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4, se diluyó en el mismo buffer hasta una densidad óptica a 600 nm ($D.O_{600}$) de 0,1 y se dejó reposar durante 30 minutos a 28 °C. Se agregó vitamina C, microencapsulado y peróxido de hidrógeno a varias concentraciones y se incubó a 28°C durante 1 hora en la oscuridad y sin agitación, después, se centrifugó a 2700 g por 20 minutos a temperatura ambiente, se realizó un

lavado con PBS, el pellet se re suspendió en 3ml de medio YPD y se sembraron 250 ul de cada cultivo por triplicado en una placa de 96 pocillos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Extracción de metabolitos

El proceso de extracción de metabolitos se basó en la determinación de la cantidad de carotenoides extraídos del material vegetal seco de *Daucus carota*, para determinar las condiciones óptimas de extracción, como se muestra en la tabla 2, se aplicó el diseño experimental de superficie de respuesta basado en los datos obtenidos previamente en el análisis espectrofotométrico en cual se determinó concentración de carotenoides para cada una de las combinaciones de masa y disolvente, posteriormente el análisis estadístico determinó que la extracción con etanol en una concentración del 96 % y en una relación de masa-disolvente de 1:25 en un tiempo de 120 minutos produjo las mejores condiciones para la extracción, obteniéndose un promedio de 63,635 g de carotenoides por cada 100 g de material vegetal seco con una eficiencia de extracción en promedio de 42,069%.

Tabla 2.

Condiciones óptimas para extracción de metabolitos

Relación	Material Vegetal (g)	Absorbancia	% Humedad	SST	MSE	Carotenoides por cada 100 gramos de solidos (mg)	%Eficiencia de extracción
1:25	8,000	0,405	98,208	1,792	3,244	65,509	40,544
1:25	8,000	0,406	98,067	1,933	3,499	60,880	43,734
1:25	8,000	0,408	98,167	1,833	3,354	64,518	41,930
	\bar{x}	0,406	98,147	1,853	3,366	63,635	42,069
	σ	0,002	0,073	0,073	0,128	2,437	1,600

Como se muestran en la Tabla 2 los resultados indican una mayor solubilidad de los metabolitos presentes en los extractos secos en presencia de una concentración de disolvente alto del 96 % a una temperatura constante de 60 °C, junto con el segundo factor que afectó la extracción que fue la proporción de masa vegetal, proporción que fue 1 parte de masa vegetal junto con 25 partes en volumen de etanol, esta proporción específica de masa-disolvente permitió la saturación completa por parte del disolvente, que permitió la transferencia de los metabolitos de interés desde la fase sólida de la mezcla hasta el extracto líquido. Según

Cardona (2015), un rango de temperatura alta, superior a las 50 °C, permite trabajar de mejor manera en la extracción ya que la alta temperatura favorece la solubilidad de sustancias lipofílicas en el disolvente, por tanto al tener una mayor cantidad de disolvente con respecto a la cantidad de materia vegetal tendrá la capacidad de extraer más metabolitos por la relación directa existente.

A continuación en la Figura 2 se presenta un gráfico en forma de resumen de lo obtenido en un análisis de superficie de respuesta, Según Gilka & Careaga (2015), el uso de estas técnicas matemáticas en el tratamiento de problemas, en la que una respuesta de interés se encuentra influenciada por diferentes factores de tipo cuantitativo, permite determinar el mejor modelo matemático a los datos obtenidos propuestos.

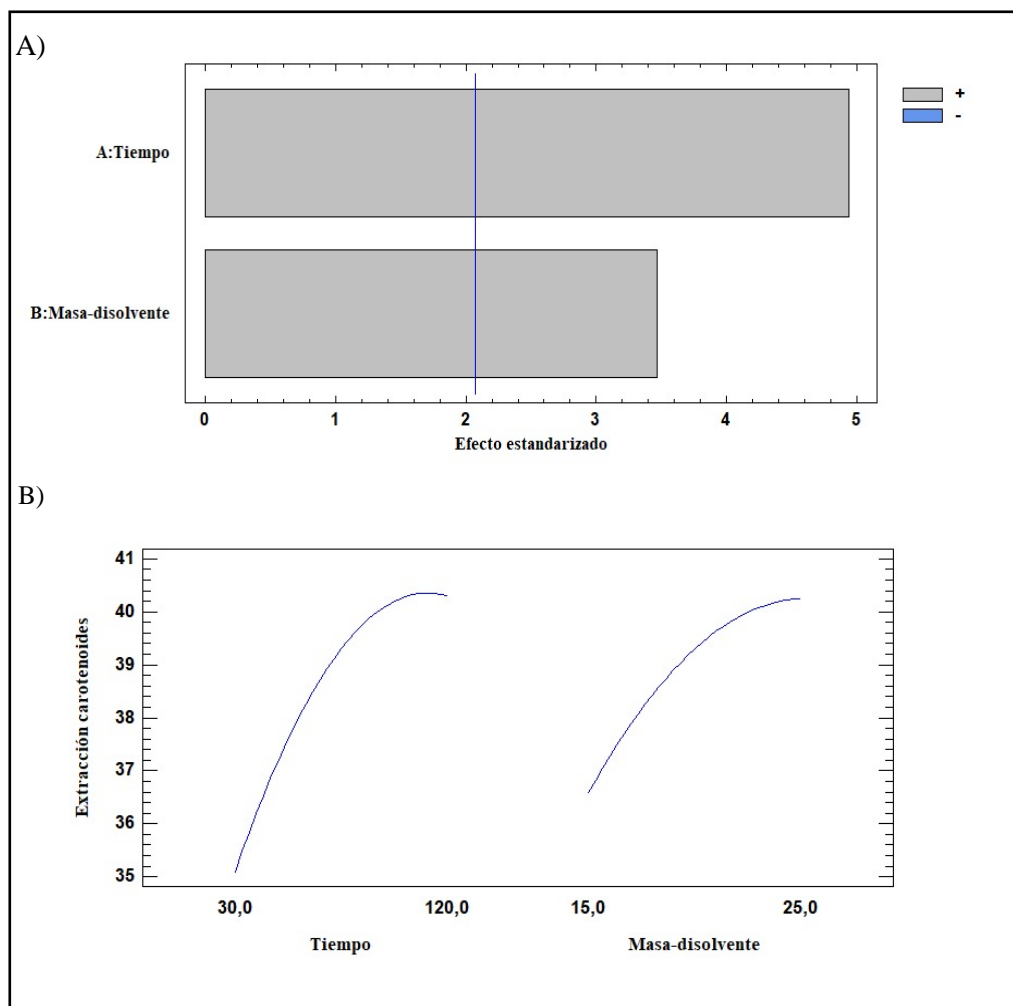


Figura 2. A) Diagrama de Pareto estandarizado; B) Gráfica de efectos principales para extracción de carotenoides

De acuerdo al análisis estadístico, los dos factores analizados, tiempo y relación masa-disolvente, contribuyeron significativamente en la extracción, como se observa en la figura 2A, sin embargo el factor tiempo fue el que tuvo más influencia en la extracción, ya que en

base a los resultados analizados del diseño experimental se determinó que el tiempo de extracción óptimo fue de 120 minutos y la relación masa-disolvente que tuvo significancia con un valor óptimo de extracción fue de 1 parte de masa vegetal por 25 partes de disolvente, esto debido a que una mayor concentración del disolvente, en este caso etanol al 96 %, permite la extracción de carotenoides en mayor cantidad en la fase líquida del extracto.

Como parte final la extracción de carotenoides y que se muestra en la Figura 3, el diseño experimental permite analizar la influencia de los dos factores, tanto de la relación masa-disolvente como el tiempo de extracción, teniendo en cuenta que estos factores tienen un efecto significativo y su estudio en base al análisis de superficie de respuesta arroja un valor óptimo de extracción 120 minutos con una relación de masa- disolvente 1:25, esto se debe a que para potenciar una extracción de carotenoides se requiere una mezcla de disolvente con carácter prótico y polar como lo es el etanol, en el caso del experimental se trabajó con etanol en una concentración del 96 % cuyo pH es cercano al neutro(Kгаа & Alemania, 2016).

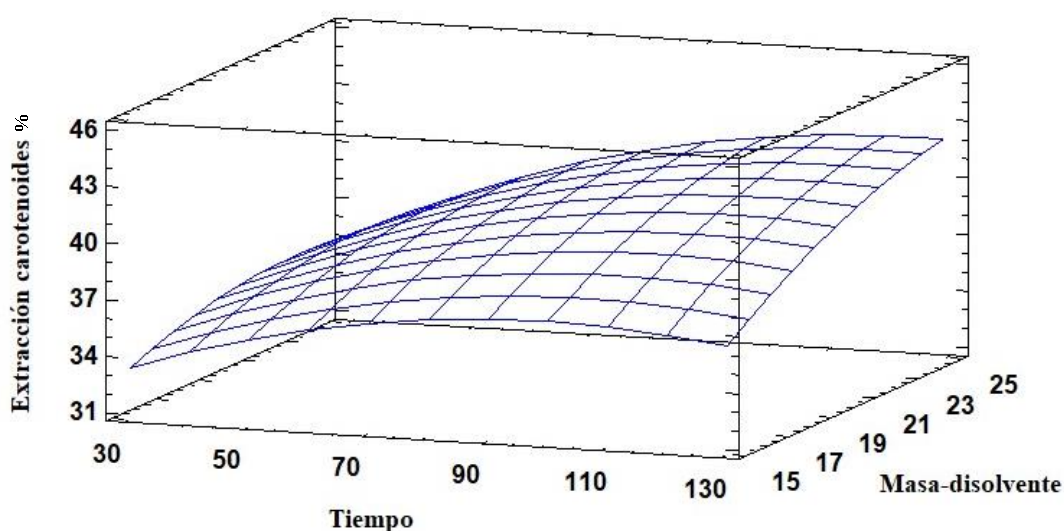


Figura 3. Gráfica de superficie de respuesta de los efectos principales en la extracción de carotenoides

4.1.2. Análisis espectroscópico de carotenoides microencapsulado

Con la utilización de un mini Spray Dryer se obtuvieron microesferas formadas un complejo polimérico con los metabolitos dispersos en la mismo (Figuroa, Ceballos, & Hurtado, 2015).

Tabla 3.

Porcentaje de eficiencia de microencapsulación (E.M)

Dilución	Absorbancia	Concentración	% E.M
1:10		mg/l	
Agua	0,8550	2,16	
			95,91

Etanol	0,0350	0,09
---------------	--------	------

En base a una disolución 1:10 del microencapsulado en agua y etanol, se obtuvo la concentración de carotenoides presentes en la superficie y en el interior de la microcápsula, con lo cual en la Tabla 3 se muestra las concentraciones que se obtuvieron para el cálculo de la eficiencia de la microencapsulación, el cual fue del 96,21 % que lo relacionamos con los valores de transmitancia obtenidos en el espectro infrarrojo del microencapsulado que son similares.

Este valor obtenido de eficiencia de microencapsulación es similar al valor reportado por Pérez (2019) donde obtuvo un valor de 96,5 % de eficiencia de microencapsulación de licopeno con el uso de goma arábica y maltodextrina.

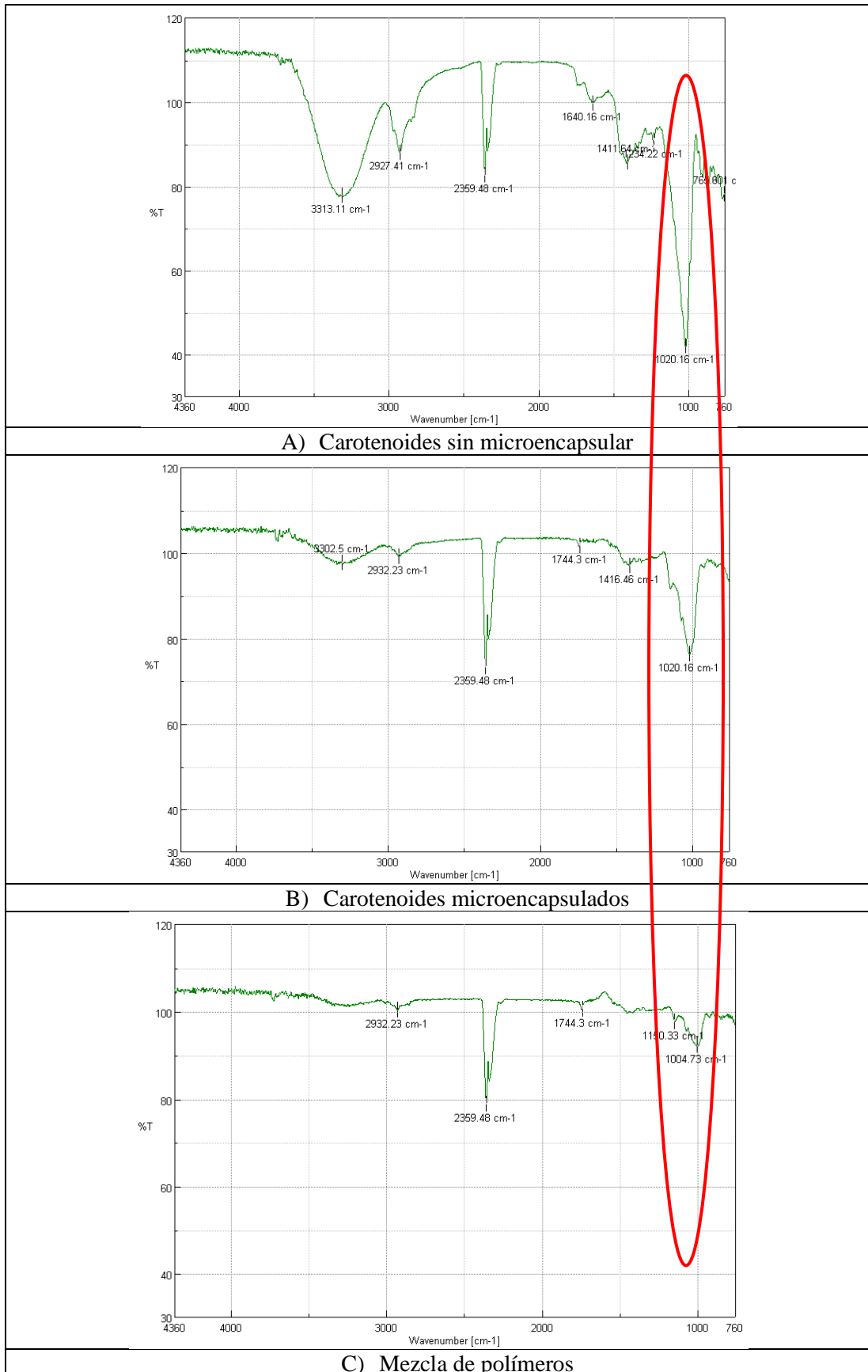


Figura 4. A) Espectro para el concentrado de carotenoides; B) Espectro para el microencapsulado; C) Espectro para los polímeros utilizados.

En base a un rango espectral de 4360 cm^{-1} a 760 cm^{-1} y con un porcentaje de transmitancia entre 30 y 120 % se analizaron los carotenoides sin microencapsular, los carotenoides microencapsulados y la mezcla polimérica. En la Figura 4 se observa los espectros infrarrojos obtenidos de los carotenoides microencapsulados y la mezcla polimérica que presentan un menor tamaño de banda en relación al espectro de carotenoides sin microencapsular, cuyas bandas son características de los grupos funcionales pertenecientes a los isoprenoides. Según (Shurvell, 2006) Las bandas pertenecientes al grupo de los alquenos tienen una rango característico de localización entre $3007,44$ y $2846,42\text{ cm}^{-1}$, y entre $1741,41$ y $1366,32\text{ cm}^{-1}$, que se encuentran minimizadas en el espectro por efecto del microencapsulado y en total ausencia en el espectro de la mezcla polimérica, con lo que se determina que los carotenoides se encuentran enmascarados por la mezcla polimérica mediante el secado por aspersión, lo que demuestra la efectividad del proceso de microencapsulación.

4.1.4. Actividad antioxidante *in vitro* del microencapsulado

El constante estudio de nuevas formulaciones farmacéuticas con actividad antioxidante tiene muchas ventajas en relación a las que son de consumo diario, ya que el medicamento con microencapsulación en bajas dosis tiene el mismo afecto terapéutico, y al tomar en cuenta la matriz polimérica que poseen la goma arábica y la maltodextrina permitirá que los efectos de los principios activos sean de larga duración y se encuentren protegidos en su paso por el ácidos del estómago y cumplan su fin farmacológico en determinada parte del organismo (Jouanny, 2014).

En el análisis del microencapsulado y del extracto de *Daucus carota* se determinó el potencial antioxidante que posee esta planta y que se muestra en la Tabla 4 y su concentración en equivalentes del compuesto Trolox, como un potente antioxidante.

En base a la curva de calibración con Trolox ($50\text{-}500\ \mu\text{mol.l}^{-1}$) que se muestra en la Anexo 6, se obtuvo la siguiente ecuación de recta $y = 0,0013 + 0,7101x$, junto con un $R^2 = 0.99$,

Tomando en cuenta la curva de calibración Trolox obtenemos un porcentaje de inhibición para las muestras que se indican en la tabla 4 y que dan como referencia el potencial antioxidante que tiene el extracto y microencapsulados.

Tabla 4.*Resultados de la inhibición por DPPH*

Muestras	Diluciones	Absorbancias	% de Inhibición	μmol equivalentes de Trolox l^{-1}
Extracto	Sin diluir	0,0594	91,346	500,515
	Dilución $\frac{1}{2}$	0,0328	52,112	293,230
Microencapsulado	8 g	0,3423	50,160	286,923
	9 g	0,2324	66,161	367,461
	10 g	0,1978	71,199	394,076

Se obtuvo un porcentaje de inhibición del radical DPPH para la muestra diluida de 52,11 % y para el microencapsulado con un peso de 8 g un valor de 71,20 % y con una relación a la concentración de μmol equivalentes de Trolox se obtiene valores de 293,230 $\mu\text{mol l}^{-1}$ y 394,076 $\mu\text{mol l}^{-1}$ respectivamente, que al compararlos con los estudios de F., Celis, A., S., & M., (2016) donde obtuvo un valor de 491,32 $\mu\text{mol l}^{-1}$ que son cercanos al valor obtenido podemos establecer la existencia de la inhibición por parte del extracto y del microencapsulado.

4.1.5. Actividad antioxidante *in vivo* del microencapsulado

En la actividad antioxidante de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se analizó su curva para cinética de crecimiento, que es un parámetro de control para identificar el efecto que produce el agente de estudio a medida que crece la levadura y si es significativo la adición del antioxidante en el medio (Mager & Winderickx, 2005).

Como se muestra en la Figura 5 existen diferentes curvas de crecimiento de las cuales, dos corresponden a la vitamina C en una concentración de 50 mg/ml y 25 mg/ml, con la adición del peróxido en una concentración 3 mmol/l y para la otra 1,5 mmol/l respectivamente, adicional a esto tenemos la curva de crecimiento de la levadura con la adición del peróxido en una concentración 3 mmol/l, otra curva sin la adición de ningún tratamiento y finalmente la curva de crecimiento de la levadura con la adición del microencapsulado con una concentración de 50mg/ml junto con el peróxido en una concentración de 3 mmol/l.

Las absorbancias medidas a una longitud de onda de 600 nm equivale al número de microorganismos presentes en un cultivo, por lo que a mayor absorbancia más número de *Saccharomyces cerevisiae* todo esto en un rango de tiempo determinado (Mager & Winderickx, 2005).

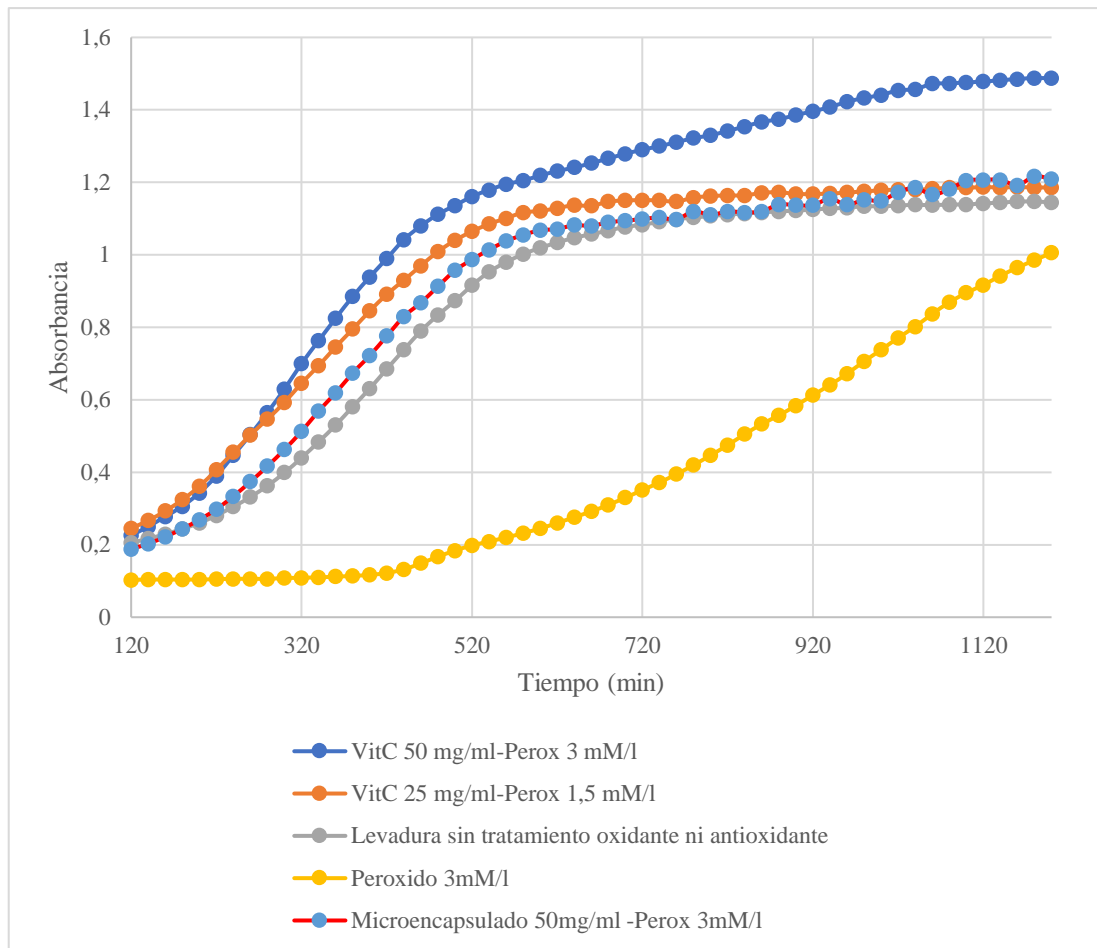


Figura 5. Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Nota: Mediciones cada 20 minutos durante 18 horas

La curva generada por el crecimiento de levadura en presencia del microencapsulado mostró una disminución en las absorbancias registradas inicialmente que está relacionada a la duración de la fase de adaptación, sin embargo, los valores máximos de crecimiento tienden a estabilizarse en la fase estacionaria del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Luego de 1080 min se llegó a una absorbancia máxima de 1,209 con el microencapsulado y 1,186 con la vitamina C, siendo claro el efecto que tienen los carotenoides microencapsulados sobre el crecimiento de la levadura con el paso del tiempo.

4.2. Verificación de la hipótesis

Por medio del análisis de los datos obtenidos en los distintos ensayos realizados *in vitro* e *in vivo*.

$H_0 \neq 0$ Se rechaza la hipótesis nula.

Ha=0 Se acepta la hipótesis alternativa por lo que se considera que los factores analizados si influyen en las actividad antioxidante.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se determinaron las condiciones óptimas de extracción de carotenoides de la planta *Daucus carota* aplicando un diseño experimental de superficie de respuesta, del cual por medio de un análisis estadístico se encontró la interacción de factores existentes y su combinación óptima en una relación de 1 parte de masa por cada 25 partes de disolvente etanol 96%, con un tiempo óptimo de extracción de 120 min a una temperatura constante de 60°C.
- Se obtuvieron microcápsulas a partir del extracto *Daucus carota*, con una eficiencia de microencapsulación de 95,91 %, lo que se corroboró por medio del análisis por espectroscopía infrarroja, lo que demuestra que los carotenoides están encapsulados en la mezcla polimérica.
- Se determinó la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de los carotenoides y del microencapsulado, obteniendo valores de equivalentes de Trolox 293,230 μmol^{-1} y 394,076⁻¹ respectivamente, que representa 52,11% de inhibición para el extracto diluido y 71,20% para el microencapsulado.
- Se determinó la actividad antioxidante *in vivo* en el microencapsulado de carotenoides a través de la curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la que se encontró que el efecto producido por este permitía al microorganismo un mayor crecimiento en comparación a la curva de crecimiento de la levadura que no tenía el microencapsulado, demostrándose así el efecto positivo que tiene antioxidante en el crecimiento de la levadura.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar ensayos *in vivo* para determinar el punto exacto en que el microencapsulado alcanza una actividad antioxidante similar o igual a un fármaco de uso comercial.
- Se recomienda realizar ensayos *in vivo* en animales de laboratorio para determinar el potencial antioxidante del extracto de *Daucus carota*.
- Se recomienda poner a prueba métodos diferentes de extracción de metabolitos como son extracción ultrasónica, extracción asistida por microondas, métodos enzimáticos, para así maximizar la extracción de carotenoides.
- Se recomienda variar las concentraciones de la vitamina C y del peróxido en la prueba *in vivo* para tener más claro el efecto antioxidante en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

BIBLIOGRAFÍA

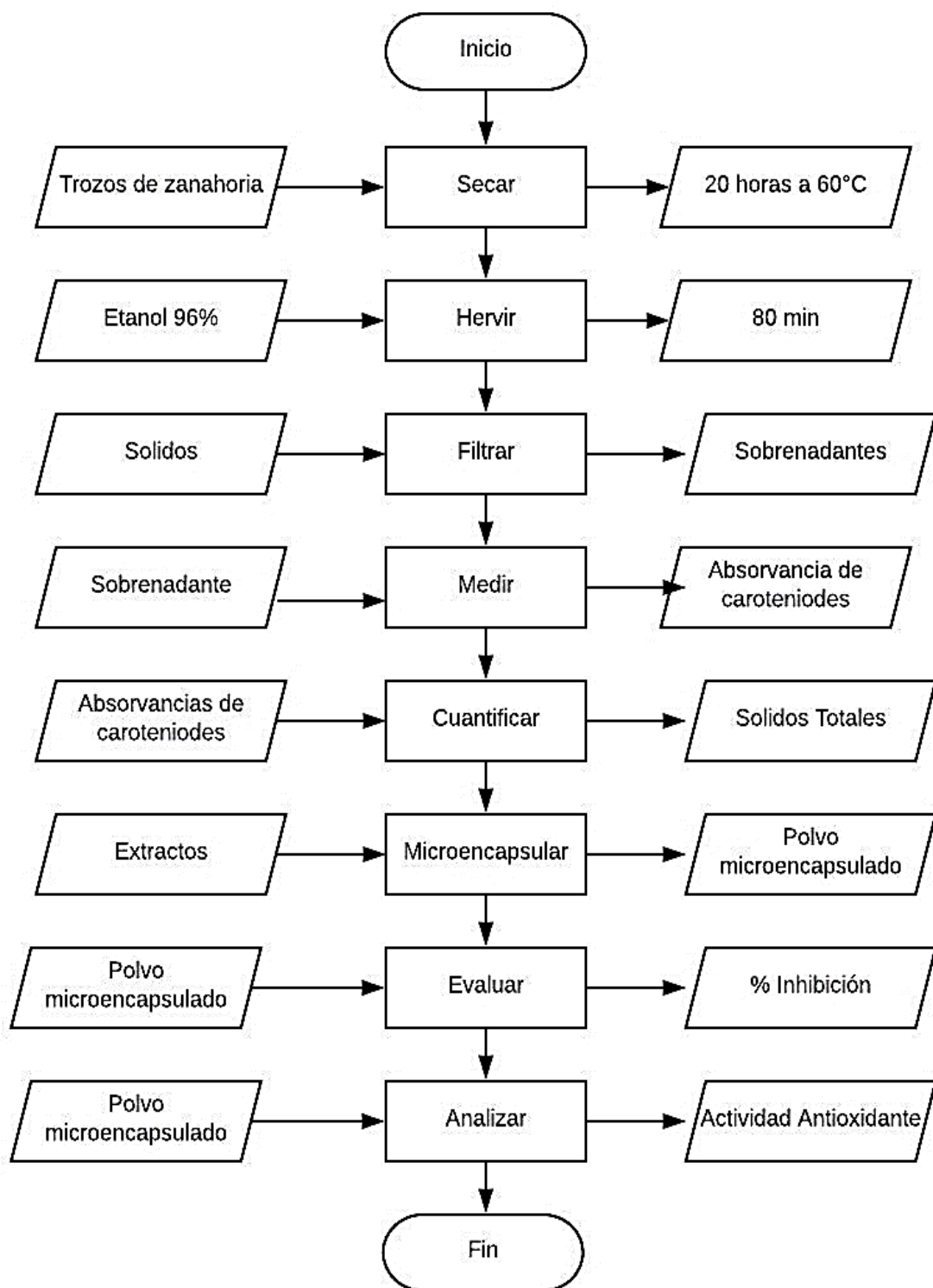
- Al-Snafi, P. D. A. E. (2017). Nutritional and therapeutic importance of *Daucus carota*- A review. *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 07(02), 72–88. <https://doi.org/10.9790/3013-0702017288>
- Aplicada, Q., Resumen, A., Figueroa, P. M., Ceballos, M. A., & Hurtado, A. M. (2015). *Microencapsulación mediante secado por aspersión de aceite de mora* (Vol. 44). Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v45n2/v45n2a06.pdf>
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Cardona, E. M., Ríos, L. A., Restrepo V, G. M., & La Facultad De Química Farmacéutica, R. DE. (n.d.). EXTRACCIÓN DEL CAROTENOIDE LICOPENO DEL TOMATE CHONTO (*Lycopersicum esculentum*) EXTRACTION OF THE CAROTENOID LYCOPENE FROM CHONTO TOMATO (*Lycopersicum esculentum*). Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v13n2/v13n2a06.pdf>
- Chasquibol Nancy. (2006). *Cuantificación de Carotenoides*. Retrieved from <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/viewFile/4035/3215>
- Daucus carota* - an overview | ScienceDirect Topics. (n.d.). Retrieved October 10, 2018, from <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/daucus-carota>
- De, U., Biotecnología, A. :, & De, P. (n.d.). *Producción de Metabolitos Secundarios*. Retrieved from <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/64553/secme-12254.pdf?sequence=1>
- F., A. M. G., Celis, M. T., A., A. J. F., S., H. N. L., & M., A. J. R. (2016). Capacidad Antioxidante Y Contenido De Fenoles, En Muestras De Lignina Obtenidas Por Precipitación En Medio Ácido A Partir De Licor Negro. *Revista Politécnica*, 38(1), 29. <https://doi.org/10.33333/RP.V38I1.804>
- Francisco López Cordero, A., Ruales, I. M., Uzcategui, E., & Koziol, M. (n.d.). *Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de la zanahoria (Daucus carota L), híbrido Cupar, en el Chaupi, provincia de Pichincha*. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/1369/1/102391.pdf>
- Gilka, L. M., & Careaga, J. (2015). *IETA Artículo Varianza Superficies de Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto*. Retrieved from http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rv/n11/n11_a07.pdf
- Irini, F. (2010). *Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery fromtomato waste*. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2621.2010.02496.x>
- Jouanny. (2014). *FORMULACIÓN DE MEDICAMENTOS*. Retrieved from https://www1.uah.es/estudios/asignaturas/descarga_fichero.asp?CodAsig=570024&CodPlan=G57&Anno=2014-15
- Jourdan, M., Gagné, S., Dubois-Laurent, C., Maghraoui, M., Huet, S., Suel, A., ... Geoffriau,

- E. (2015). Carotenoid content and root color of cultivated carrot: a candidate-gene association study using an original broad unstructured population. *PLoS One*, 10(1), e0116674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116674>
- Justo, C., & Venereo Gutiérrez, R. (2002). *DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES*. *Rev Cubana Med Milit* (Vol. 31). Retrieved from http://www.bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 187–197. <https://doi.org/10.3109/02652040903131301>
- Kgaa, M., & Alemania, D. *. (2002). *Ficha de Datos de Seguridad Conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión Identificación de la sociedad o empresa*. Retrieved from www.chemdat.de
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Loganayaki, N., Siddhuraju, P., & Manian, S. (2013). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 687. <https://doi.org/10.1007/S13197-011-0389-X>
- Luis Folch-Mallol, J., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Covarrubias Robles, A. A. (n.d.). *edigraphic.com La respuesta a estrés en la levadura Saccharomyces cerevisiae MICROBIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA*. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Folch-Mallol/publication/6733600_The_stress_response_in_the_yeast_Saccharomyces_cerevisiae/links/0deec538ce70b9c1a1000000.pdf
- Mager, W. H., & Winderickx, J. (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(5), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.004>
- Manganaris, G. A., Goulas, V., Mellidou, I., & Drogoudi, P. (2017). Antioxidant Phytochemicals in Fresh Produce: Exploitation of Genotype Variation and Advancements in Analytical Protocols. *Frontiers in Chemistry*, 5, 95. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00095>
- Mustafa, A., Trevino, L. M., & Turner, C. (2012). Pressurized Hot Ethanol Extraction of Carotenoids from Carrot By-Products. *Molecules*, 17(2), 1809–1818. <https://doi.org/10.3390/molecules17021809>
- Osman, N. I., Sidik, N. J., Awal, A., Adam, N. A. M., & Rezali, N. I. (2016). In vitro xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa* L. and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(4), 343–349. <https://doi.org/10.5455/jice.20160731025522>
- Pagura. (2014). *4 Teoría de Diseño de Experimentos 46 4 Teoría de diseño de Experimentos 4.1 Introducción*. Retrieved from http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lem/salvador_s_g/capitulo4.pdf
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

- por, P., Peláez Soto Dirigida por, A., & Patricia Roig Montoya José Vicente Gil Ponce Valencia, D. (2016). *UNIVERSITAT DE VALÈNCIA VALIDACIÓN FUNCIONAL DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE CACAO MEDIANTE ENSAYOS IN VIVO CON ORGANISMOS MODELO Tesis Doctoral*. Retrieved from https://core.ac.uk/download/pdf/75988884.pdf?fbclid=IwAR21JAghHoaKcyLJ6_wKzr8fIJ3Ram93_sSiJicQITfb09hLCTZztCscWE4
- Rodriguez-Amaya, D. B. (n.d.). *A GUIDE TO CAROTENOID ANALYSIS IN FOODS*. Retrieved from <http://hni.ilsil.org/>
- Shurvell, H. F. (2006). Spectra- Structure Correlations in the Mid- and Far-Infrared. In J. M. Chalmers (Ed.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s4101>
- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 65–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21589795>
- Škrovánková, S., Mišurcová, L., & Machů, L. (2012). Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 67, pp. 75–139). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394598-3.00003-4>
- Sun, T., Simon, P. W., & Tanumihardjo, S. A. (2009). Antioxidant Phytochemicals and Antioxidant Capacity of Biofortified Carrots (*Daucus carota* L.) of Various Colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4142–4147. <https://doi.org/10.1021/jf9001044>
- TAXONOMÍA EN PLANTAS: ZANAHORIA. (n.d.). Retrieved October 10, 2018, from <http://taxonomiaenplantas2017.blogspot.com/2017/11/zanahoria.html>
- Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Malhotra, M., Kahouli, I., & Prakash, S. (2013). Microencapsulation for the Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceutics: Current Status and Future Directions. *Journal of Pharmaceutics*, 2013, 103527. <https://doi.org/10.1155/2013/103527>
- Universidad Nacional de Colombia: Colecciones. (n.d.). Retrieved October 10, 2018, from <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/101331/>
- Yashin, A., Yashin, Y., Xia, X., & Nemzer, B. (2017). Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/antiox6030070>

ANEXOS

Anexo 1. Resumen del proceso experimental



Anexo 2. Datos obtenidos en la extracción de carotenoides para determinación de las condiciones óptimas de extracción

Relación	Material Vegetal (g)	Absorbancia	Concentración mg/L	F.D.	CONC mg/L * FD	Peso final extraído (mg)
1:15	13,33	0,338	0,856	10,000	8,557	169,000
1:15	13,33	0,337	0,977	10,000	9,768	171,000
1:15	13,33	0,337	0,977	10,000	9,768	171,000
1:20	10,00	0,322	0,933	10,000	9,333	178,000
1:20	10,00	0,323	0,936	10,000	9,362	177,000
1:20	10,00	0,328	0,951	10,000	9,507	178,000
1:25	8,00	0,344	0,997	10,000	9,971	181,000
1:25	8,00	0,346	1,003	10,000	10,029	181,000
1:25	8,00	0,351	1,017	10,000	10,174	182,000
1:15	13,33	0,346	1,003	10,000	10,029	171,000
1:15	13,33	0,347	1,006	10,000	10,058	172,000
1:15	13,33	0,348	1,009	10,000	10,087	171,000
1:20	10,00	0,481	1,394	10,000	13,942	180,000
1:20	10,00	0,486	1,409	10,000	14,087	180,000
1:20	10,00	0,493	1,429	10,000	14,290	181,000
1:25	8,00	0,477	1,383	10,000	13,826	180,000
1:25	8,00	0,475	1,377	10,000	13,768	181,000
1:25	8,00	0,479	1,388	10,000	13,884	180,000
1:15	13,33	0,367	1,064	10,000	10,638	171,000
1:15	13,33	0,367	1,064	10,000	10,638	171,000
1:15	13,33	0,369	1,070	10,000	10,696	170,000
1:20	10,00	0,452	1,310	10,000	13,101	175,000
1:20	10,00	0,453	1,313	10,000	13,130	176,000
1:20	10,00	0,458	1,328	10,000	13,275	175,000
1:25	8,00	0,405	1,174	10,000	11,739	181,000
1:25	8,00	0,406	1,177	10,000	11,768	181,000
1:25	8,00	0,408	1,183	10,000	11,826	183,000

Anexo 3. Datos obtenidos de muestras en extracción de carotenoides para determinación de las condiciones óptimas de extracción

Relación	Material Vegetal (g)	Absorbancia	%HUMEDAD	SST	MSE	(mg de carotenoides/100g de solidos)	%Eficiencia de extracción
1:15	13,33	0,338	97,519	2,481	4,193	34,490	31,455
1:15	13,33	0,337	97,264	2,736	4,679	35,702	35,098
1:15	13,33	0,337	97,107	2,893	4,947	33,765	37,112

1:20	10,00	0,322	98,145	1,855	3,302	50,314	33,019
1:20	10,00	0,323	98,062	1,938	3,430	48,309	34,303
1:20	10,00	0,328	98,127	1,873	3,334	50,759	33,339
1:25	8,00	0,344	98,357	1,643	2,974	60,688	37,173
1:25	8,00	0,346	98,455	1,545	2,796	64,913	34,956
1:25	8,00	0,351	98,500	1,500	2,730	67,826	34,125
1:15	13,33	0,346	97,264	2,736	4,679	36,656	35,098
1:15	13,33	0,347	97,291	2,709	4,659	37,128	34,955
1:15	13,33	0,348	97,420	2,580	4,412	39,097	33,097
1:20	10,00	0,481	97,690	2,310	4,158	60,355	41,580
1:20	10,00	0,486	97,724	2,276	4,097	61,893	40,968
1:20	10,00	0,493	97,650	2,350	4,253	60,808	42,535
1:25	8,00	0,477	98,235	1,765	3,177	78,335	39,713
1:25	8,00	0,475	98,213	1,787	3,234	77,046	40,431
1:25	8,00	0,479	98,220	1,780	3,204	78,000	40,050
1:15	13,33	0,367	97,107	2,893	4,947	36,770	37,112
1:15	13,33	0,367	97,006	2,994	5,120	35,530	38,408
1:15	13,33	0,369	97,070	2,930	4,981	36,504	37,367
1:20	10,00	0,452	97,736	2,264	3,962	57,869	39,620
1:20	10,00	0,453	97,812	2,188	3,851	60,011	38,509
1:20	10,00	0,458	97,702	2,298	4,022	57,769	40,215
1:25	8,00	0,405	98,208	1,792	3,244	65,509	40,544
1:25	8,00	0,406	98,067	1,933	3,499	60,880	43,734
1:25	8,00	0,408	98,167	1,833	3,354	64,518	41,930

Anexo 4. Análisis de varianza y optimización para la extracción de carotenoides

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tiempo Extracción	30,9291	1	30,9291	2,04	0,1691
B: Relación masa-disolvente	4578,42	1	4578,42	301,30	0,0000
AA	320,28	1	320,28	21,08	0,0002
BB	85,1719	1	85,1719	5,61	0,0281
Bloques	3,28	2	1,64	0,11	0,8982
Error total	303,907	20	15,1953		
Total	5321,98	26			

R-cuadrada = 94,2896 %

Coefficientes de regresión para la extracción de carotenoides = $-85,2316 + 0,570327 * \text{Tiempo Extracción} + 9,21798 * \text{Relación masa-disolvente} - 0,00360798 * \text{Tiempo Ext}^2 - 0,150707 * \text{Relación MVVD}^2$

Optimizar Respuesta

Meta: maximizar extracción de carotenoides

Valor óptimo = 120,0

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Tiempo Extracción	30,0	120,0	120,0
Relación masa-disolvente	15,0	25,0	25,0

Anexo 5. Curva de Calibración de Trolox

