



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



---

Extracción, microencapsulación y actividad antioxidante de antocianinas del capulí  
(*Prunus serotina*).

---

Trabajo de Titulación, modalidad Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autora:** Andrea Katherín Mejía Freire

**Tutor:** PhD. Milton Rubén Ramos Mora

AMBATO – ECUADOR

Julio- 2019

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Milton Ramos

### **CERTIFICA:**

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

Ambato, 20 de junio del 2019



PhD. Milton Rubén Ramos Moya

C.I. 180111963-5

**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Andrea Katherín Mejía Freire, manifiesto que los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas.



Andrea Katherín Mejía Freire

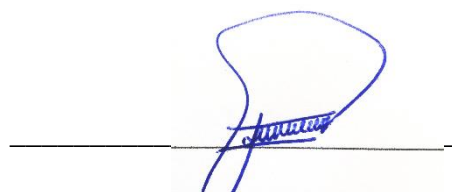
C.I. 1804211967

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE 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 y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

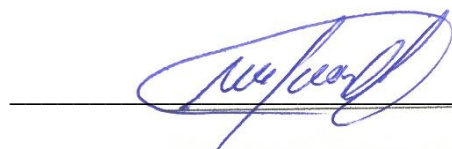


Presidente de Tribunal



PhD. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4



PhD. Freddy David Escobar Terán


C.I.1715290050

Ambato, 05 de julio del 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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Andrea Katherín Mejía Freire', is positioned above a horizontal dotted line.

Andrea Katherín Mejía Freire

C.I. 180421196-7

AUTORA

## **DEDICATORIA**

*El presente trabajo está dedicado con cariño y amor a mi familia por haber sido un pilar fundamental a lo largo de toda mi carrera universitaria.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A mis padres quienes con su apoyo incondicional han permitido alcanzar este objetivo.*

*Quiero expresar mi eterna gratitud a todas las personas especiales que Dios puso en mi camino y me acompañaron durante esta etapa de mi vida.*

*Agradezco a mis compañeros y amigos que de alguna u otra forma me brindaron su ayuda desinteresada para la culminación de este trabajo de investigación a pesar de las dificultades.*

*Finalmente, quiero expresar un sincero agradecimiento al PHD. Orestes López quién fue una fuente invaluable de conocimiento y apoyo durante el desarrollo de la investigación.*

## INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	13
1.1    Antecedentes Investigativos .....	13
1.1.1.1 Descripción del material vegetal.....	13
1.1.1.2 Taxonomía .....	14
1.1.2    Antocianinas .....	14
1.1.2.1 Generalidades.....	14
1.1.2.2 Química y estructura .....	15
1.1.2.3 Expresión del color .....	15
1.1.3    Microencapsulación.....	18
1.1.4    Actividad antioxidante.....	18
1.1.5    Importancia de las antocianinas y la microencapsulación.....	18
1.2    Objetivos.....	20
CAPÍTULO II .....	21
2.1    Materiales .....	21
2.1.1 Materiales de laboratorio .....	21
2.1.2 Equipos .....	21
2.1.3 Reactivos.....	22
2.2    Métodos .....	22
2.2.1 Recolección de la planta .....	22
2.2.2 Caracterización del capulí.....	22
2.2.3 Preparación del material vegetal y secado .....	23
2.2.4 Extracción de antocianinas .....	23
2.2.5 Determinación de sólidos totales .....	24
2.2.6 Determinación de la concentración de antocianinas por espectrofotometría .....	24
2.2.7 Diseño experimental para optimizar las variables de extracción.....	25
2.2.8 Microencapsulación .....	25
2.2.9 Eficiencia de la microencapsulación.....	26



2.2.10	Espectrofotometría Infrarroja FT-IR .....	26
2.2.11	Ensayo de estrés oxidativo sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
2.2.11.1	Crecimiento celular de levaduras.....	26
2.2.11.2	Determinación de la capacidad antioxidante .....	27
2.2.11.3	Análisis de la capacidad antioxidante .....	28
2.2.12	Capacidad antioxidante mediante el método de DPPH .....	28
CAPÍTULO III.....		30
3.1	Caracterización del fruto del capulí ( <i>Prunus serotina</i> ) .....	30
3.2	Diseño experimental de la extracción de antocianinas.....	30
3.3	Microencapsulación por aspersión .....	32
3.4	Análisis de la espectrofotometría infrarroja FT-IR .....	34
3.5	Actividad antioxidante <i>in vivo</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	36
3.6	Análisis de la actividad antioxidante por el método de DPPH.....	39
CAPÍTULO IV.....		42
4.1	Conclusiones .....	42
4.2	Recomendaciones.....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		44
ANEXOS.....		52

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### Tablas

<i>Tabla 1</i> Taxonomía del capulí ( <i>Prunus serotina</i> ) .....	14
<i>Tabla 2</i> Sustituyentes en las agliconas con sus longitudes de onda máxima.....	16
<i>Tabla 3</i> Condiciones para la extracción de antocianinas del capulí.....	24
<i>Tabla 4</i> Análisis de Varianza para la extracción de antocianinas del capulí .....	31
<i>Tabla 5</i> Análisis de varianza de la microencapsulación con diferentes polímeros....	33
<i>Tabla 6</i> ANOVA de la actividad antioxidante por el método de DPPH.....	39

### Figuras

Figura 1. Fruto del capulí ( <i>Prunus serotina</i> ).....	14
Figura 2 Diagrama de Pareto para la extracción de antocianinas del capulí.....	31
Figura 3. De Pareto estandarizada para la extracción de antocianinas .....	32
Figura 4 Diagrama de cajas de las eficiencias de microencapsulación.....	33
Figura 5 Espectrofotometría infrarroja FT-IR de los microencapsulados .....	35
Figura 6 Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> frente al estrés oxidativo .....	38
Figura 7 Diagrama de cajas de los microencapsulados frente al radical DPPH .....	40

## RESUMEN EJECUTIVO

Considerando el aumento de las enfermedades cardiovasculares y degenerativas, actualmente el desarrollo de extractos naturales con alto poder antioxidante para neutralizar los radicales libres son de gran interés. Este trabajo se enfocó en la extracción de antocianinas procedentes del capulí (*Prunus serotina*) utilizando como disolvente etanol acidificado con ácido clorhídrico a 70 °C por dos horas, y se aplicó un diseño experimental para determinar las condiciones óptimas del proceso. Para proteger a este metabolito y potenciar sus propiedades benéficas se aplicó dos polímeros en una relación 20:80 con el extracto de capulí; se utilizó una temperatura de entrada (atomización) de 150 °C y de salida (secado) 95 °C para la maltodextrina y 103 °C en la combinación de goma arábiga en una relación de 50:50. La eficiencia de este proceso fue analizado mediante microscopía infrarroja FT-IR, los espectros obtenidos mostraron características antociánicas. El mejor polímero para microencapsular las antocianinas fue la maltodextrina tanto en eficiencia con un 85,3 % como actividad antioxidante *in vitro* mediante el método de DPPH (147,042  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/g de extracto seco), esta actividad fue comprobada mediante una prueba *in vivo* con *Saccharomyces cerevisiae* que fue expuesta a un estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno, la maltodextrina permitió el aumento de biomasa superior comparado con la vitamina C gracias a su poder antioxidante.

**Palabras claves:** antioxidantes, antocianinas, flavonoides, polímeros, recubrimiento, secado por aspersión.

## ABSTRACT

Considering the increase of cardiovascular and degenerative diseases and the development of natural extracts with high antioxidant power to neutralize the free radicals are of great interest nowadays. This work was focused on the extraction of anthocyanins coming from capulí (*Prunus serotina*) using acidified ethanol as dissolvent with chloridric acid at 70 °C for two hours, an experimental design was applied for determining the optimal conditions of the process. To protect this metabolite and enhance its beneficial properties, two polymers were applied in a 20:80 ratio with the extract of capuli; an inlet temperature was used (atomization) of 150 °C and an outlet (drying) 95 °C for maltodextrin and 103 °C to the gum arabic combination in a 50:50 ratio. The efficiency of this process was analyzed by FT-IR, the gotten spectra showed anthocyanins characteristics. The best polymer to microencapsule the anthocyanins was the maltodextrin both in efficiency with 85,3 % and with antioxidant activity *in vitro* by the DPPH method (147,042 µmol equivalents of Trolox/g of dry extract), this activity was checked by an *in vivo* test with *Saccharomyces cerevisiae* that was exposed in a oxidative stress with hydrogen peroxide, the maltodextrin let the increase of biomass, it was superior than vitamin C, thanks to its antioxidant power.

**Keywords:** *anthocyanins, antioxidants, covering, flavonoids, polymers, spray drying.*

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Antecedentes Investigativos

##### 1.1.1 Características de la planta

###### 1.1.1.1 Descripción del material vegetal

El capulí (*Prunus serotina*) es de origen norteamericano y se encuentra a lo largo del continente desde Canadá hasta Bolivia. El árbol puede alcanzar de 10 a 12 m de altura, con ramas alargadas y hojas pequeñas, las flores se forman en racimos y sobre éstas aparecen cada año hasta 20 frutos de capulí en forma de drupa entre 1,5 y 2,5 cm de color rojo a negro dependiendo de la etapa de maduración (Baños, 2017).

En América del Sur, su fruto (Figura 1) es utilizado principalmente para el consumo local, por su agradable sabor (Baños, 2017). En Ecuador, el capulí se encuentra distribuido entre los 1800 a 3400 m.s.n.m, desde la provincia del Carchi hasta Loja (Gordillo, Tobar, Arahana, & Torres, 2015). De acuerdo con la investigación realizada por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias-INIAP (2013) en la provincia de Tungurahua se cultiva de manera informal en jardines y parcelas por todo el territorio.



Figura 1. Fruto del capulí (*Prunus serotina*). (Brescia, 2015)

### 1.1.1.2 Taxonomía

Tabla 1  
Taxonomía del capulí (*Prunus serotina*)

Phyllum	Plantae
Subphyllum	Spermatophyta
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	<i>Prunus</i> L
Especie	<i>Prunus serotina</i>

Nota. Adaptado de (McVaugh, 1951; Urcuango, 2014).

## 1.1.2 Antocianinas

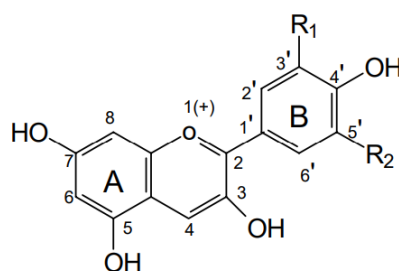
### 1.1.2.1 Generalidades

Los polifenoles se clasifican de acuerdo a su estructura química en flavonoides y no flavonoides. Dentro del primer grupo se encuentra una familia de compuestos que son hidrosolubles llamados antocianos o antocianinas, que son pigmentos que se hallan en las vacuolas celulares y son responsables de la gama de colores comprendida desde el rojo hasta el azul en diferentes partes de las plantas como: flores, frutos y epidermis de las hojas (Blanco & Troya, 2014).

### 1.1.2.2 Química y estructura

**García (2006)** menciona, desde el punto de vista químico, que la estructura de las antocianinas es el 2-fenilbenzopirilio, también llamado ion flavilio que está constituido de dos grupos aromáticos: un anillo fenólico y un benzopirilio unidos por una cadena de tres carbonos (Figura 2). Los azúcares que comúnmente se encuentran unidos mediante un enlace glucosídico a estas antocianidinas, según **Caravaca (1999)** son: galactosa, glucosa, en menor medida arabinosa o ramnosa y ocasionalmente xilosa, gentobiosa, rutinosa y soforosa, en varias ocasiones estas moléculas de azúcar se encuentran aciladas sobre el 6-hidroxil del glucósido enlazado en el carbono número 3, con ácido p-cumárico, caféico, o acético. Cuando se hidroliza el residuo de azúcar de la antocianina se produce la aglicona que es conocida como antocianidina (**Aguilera, 2009**).

Según **Aguilera, Reza, Chew, & Meza (2011)** se conocen aproximadamente 20 antocianinas, las más importantes son: cianidina, pelargonidina, ponidina, delphinidina, malvidina y petunidina, sus nombres se derivan del material vegetal del que fueron aisladas por primera vez, éstas se combinan con los diferentes azúcares anteriormente mencionados, dando como resultado aproximadamente 150 antocianinas diferentes.



**Figura 2.** Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Garzón, 2008)

### 1.1.2.3 Expresión del color

La gama de colores que expresan las antocianinas en las diferentes partes de la planta depende de diversos factores como los sustituyentes químicos que contenga la molécula o la posición y orientación de estos en el grupo flavilio (Tabla 2). Si en el anillo fenólico aumentan los grupos hidroxilo se intensifica el color azul, por otro lado, si se introducen grupos metoxilos se producen coloraciones rojas (**Garzón, 2008**).

Tabla 2

*Sustituyentes en las agliconas con sus longitudes de onda máxima*

Aglicona	Sustitución		$\lambda_{\max}$ (nm)
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	510 (naranja –rojo)
Cianidina	OH	H	522 (azul-rojo)
Delfinidina	OH	OH	520 (azul-rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	505 (naranja)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	532 (naranja-rojo)
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	546 (azul-rojo)

Nota. Recuperado de (Contreras, Castañeda, González, Añorve, & Jaimez, 2014)

#### 1.1.2.4 Biosíntesis de antocianinas

Varias rutas metabólicas biosintetizan compuestos fenólicos, entre las más sobresalientes se encuentran las de los ácidos shikímico y malónico (**Gil Salaya, 2012**). En la ruta del ácido shikímico, los carbohidratos simples que provienen del ciclo de Calvin, de la ruta de las pentosas fosfato y de la glicolisis son convertidos en ácidos orgánicos como el p-coumárico, cafeico, cinámico, ferúlico, clorogénico y la fenilalanina. El anillo B (Figura 2) de las antocianinas se sintetiza en esta ruta, por su parte el anillo A es sintetizado por la ruta del ácido malónico (**Santacruz, 2011**).

Según lo reportan (**del Valle Leguizamón, González León, & Báez Sañudo, 2005**) cuando la planta comienza a sintetizar azúcares para la maduración del fruto, se acumulan las antocianinas y rápidamente se incrementa la concentración de sólidos solubles. Seguidamente de la activación de los genes estructurales y reguladores que participan en la codificación de las enzimas responsables de la ruta de la biosíntesis de estos pigmentos.

Por medio de la acción de la enzima fenilalanina amonía liasa (PAL), el ácido shikímico da lugar a la fenilalanina que luego de producirse una pérdida de una molécula de amoniaco se convierte en ácido p-camarico. Seguidamente, se produce una reacción de condensación de tres moléculas de malonil CoA por medio del p-



coumaril-CoA para formar una chalcona (acetona aromática) de 15 carbonos (**Santacruz, 2011**). Este intermediario es transformado en una flavona por medio de una enzima llamada chalcona isomerasa. Finalmente, esta molécula por medio de una reacción de hidroxilación en el tercer carbono seguida de una hidratación es transformada en la correspondiente antocianidina que se estabiliza por glicosilación (**Garzón, 2008**).

#### **1.1.2.5 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas**

##### **pH**

**Laleh, Frydoonfar, Heidary, Jameei, & Zare (2006)** mencionan que el pH es un factor que afecta y degrada las antocianinas, debido a que la sal de flavilio es estable únicamente en condiciones ácidas. Cuando esta sal se encuentra en pH alto, se transforma en una base quinoidal, que es un pigmento inestable e inmediatamente se une al agua y forma un compuesto coloreado denominado clorofenol.

##### **Temperatura**

Otro factor importante es la temperatura, que está relacionado con la desestabilización de la estructura molecular de las antocianinas, cuando este factor aumenta produce una hidrolización en la estructura del 3-Glicósido. Otra posibilidad es que se hidrolice el anillo A que resulta en una producción de chalconas que son responsables del color café (**Laleh et al., 2006**).

##### **Luz**

Es el factor externo más importante en la biosíntesis de antocianinas, produce una activación indirecta y fotoactivación de las enzimas que se encuentran involucradas en las rutas metabólicas para la síntesis de estos pigmentos (**Contreras et al., 2014**)

### **1.1.3 Microencapsulación**

La microencapsulación mediante secado por aspersión es una operación unitaria que consiste en atomizar el producto líquido mediante una corriente de gas caliente e instantáneamente formar un polvo fino estable con un tamaño de 10 a 50  $\mu\text{m}$  o en partículas más grandes de 2 a 3 mm (**Osorio et al., 2010**). Los agentes microencapsulantes pueden ser polisacáridos (almidones, maltodextrina, jarabes de maíz y goma arábiga), lípidos (ácido esteárico, mono y diglicéridos) o proteínas (gelatina, caseína, soya, suero de leche) (Saenz, Tapia, Chavez, & Robert, 2009)

### **1.1.4 Actividad antioxidante**

Los antocianos gracias a su estructura química, tienen la capacidad de actuar como antioxidantes porque pueden donar átomos de hidrógeno o electrones a los radicales libres o a su vez desplazarlos hacia su estructura aromática. La capacidad antioxidante depende del número, posición y conjugación de los grupos hidroxilo, así como de los electrones que se encuentren formando parte del grupo aromático, debido a la capacidad para resistir al desapareamiento de los electrones por su desplazamiento (**Kuskoski, Asuero, García-Parilla, Troncoso, & Fett, 2004**).

### **1.1.5 Importancia de las antocianinas y la microencapsulación**

Según **Urcuango (2014)**, el capulí se ha utilizado desde la época prehispánica con fines medicinales por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias, especialmente para afecciones respiratorias, debido a que el fruto contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos como taninos y flavonoides.

**Jimenez, Castillo, Azuara, & Beristain (2011)** mencionan que los extractos de plantas que presentan colores característicos contienen antocianinas y compuestos fenólicos que le confieren actividad antioxidante y antimicrobiana frente a ciertos

patógenos, y se extraen dependiendo del disolvente usado. Las antocianinas reportadas en el capulí (*Pronus serotina*) son la cianidina-3-glucósido y la cianidina-3-rutinósido.

Varios estudios han demostrado que gracias a la actividad antioxidante que poseen, las antocianinas juegan un rol muy importante en la prevención de enfermedades neurológicas, cardiovasculares, diabetes e incluso el cáncer (**Cruz, Chedier, Peixoto, Fabri, & Pimenta, 2012**), también el control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectores, entre otros beneficios (**Aguilera, 2009**).

Las antocianinas confieren a las plantas colores característicos, no son tóxicas y pueden ser consumidas en lugar de los colorantes y aditivos sintéticos que son perjudiciales para la salud (**Khoo, Azlan, Tang, & Lim, 2017**). Debido a que las antocianinas tienen la propiedad de ser solubles en agua, es factible su incorporación en sistemas alimenticios acuosos como colorantes vegetales (**Arrazola, Herazo, & Alvis, 2014b**).

En los últimos años, el interés de la industria alimentaria para reemplazar los colorantes sintéticos por los naturales ha ido aumentando significativamente porque presentan una extensa variedad de colores con un valor agregado en beneficio de la salud humana (**Roobha, Saravanakumar, Aravindhan, & Devi, 2011**). **Saenz, Tapia, Chavez & Robert (2009)** mencionan que por medio de la microencapsulación se puede estabilizar y proteger a los compuestos bioactivos, y en el caso de los pigmentos como las antocianinas es un aspecto muy importante que considerar para garantizar su estabilidad en los alimentos.

Por lo señalado, la presente investigación plantea la extracción de las antocianinas presentes en el capulí, su microencapsulación utilizando maltodextrina y goma arábica, y posteriormente, la evaluación de su capacidad antioxidante *in vivo*.

## 1.2 Objetivos

### Objetivo General

Extraer, microencapsular y evaluar la actividad antioxidante de las antocianinas del capulí (*Prunus serotina*).

### Objetivos específicos

- Caracterizar el fruto del capulí previo a la extracción de antocianinas.
- Optimizar el tiempo de extracción y la relación de la masa de capulí con el disolvente mediante un análisis experimental.
- Microencapsular las antocianinas del capulí mediante un secado por aspersión con los polímeros maltodextrina y goma arábica.
- Evaluar la actividad antioxidante del microencapsulado mediante una prueba *in vivo* con *Saccharomyces cerevisiae*.

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA**

#### **2.1 Materiales**

##### **2.1.1 Materiales de laboratorio**

Para realizar el trabajo en el laboratorio se requirió el uso de los siguientes materiales: micropipetas de volumen variable de 2 a 10  $\mu\text{l}$ , de 20 a 200  $\mu\text{l}$  y de 100 a 1000  $\mu\text{l}$ , matraces Erlenmeyer y aforados de 250, 500 y 1000 ml, peras de succión, termómetro -10 a 110 °C, probetas graduadas de 50 y 100 ml, núcleos magnéticos para agitación, tubos Falcon para centrífuga de 15 y 50 ml (Corning™), tampones de caucho con entrada para termómetro, varillas de agitación, vasos de precipitación de distinto volumen, espátulas, frascos de cristal color ámbar de 50 y 1000 ml, placas de 96 pocillos para espectrofotómetro (Corning® Costar®).

##### **2.1.2 Equipos**

El proceso de deshidratación del material vegetal requirió de una estufa (Gander MTN) y la trituración se realizó en un molino manual marca (Corona). Para obtención de antocianinas del capulí se usaron los siguientes equipos: balanza analítica (Ohaus PA-214), balanza de humedad (mrc MB-50), rotoevaporador (IKA-RV8), pH metro (HANNA HI 2221), centrífuga (Rotina 380), plancha de calentamiento con agitación (Corning PC-620D), agitador vertical, y rotoevaporador (IKA-RV8). En el proceso de microencapsulación y pruebas de actividad antioxidante fueron necesarios los siguientes equipos: mini spray dryer (BUCHI-B 290), autoclave, espectrofotómetro UV-VIS (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO), espectrofotómetro infrarrojo FT-IR, cámara de flujo laminar, agitador con control de las condiciones de incubación (New Brunswick Scientific), computadora con software para análisis estadístico Statgraphics.

### **2.1.3 Reactivos**

En la preparación del disolvente para la extracción de antocianinas se usó ácido clorhídrico concentrado y etanol al 96 %. Para la microencapsulación se usó dos polímeros: goma arábiga y maltodextrina. En la determinación de la actividad antioxidante y eficiencia de la microencapsulación: vitamina C (Merck), agua oxigenada, etanol al 70 %, metanol 96 %, PBS, Trolox 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid 97 % (Aldrich chemistry), reactivo DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Aldrich chemistry).

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Recolección de la planta**

El fruto de capulí fue adquirido en las instalaciones del Mercado Mayorista de la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua. Se seleccionó el material vegetal maduro, fresco y en las mejores condiciones higiénico-sanitarias posibles. La identificación de la variedad del fruto fue realizada con la ayuda de docentes especializados en botánica de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

### **2.2.2 Caracterización del capulí**

#### **Tamaño**

Se tomó una muestra al azar de 10 capulíes, y se midió el ancho y altura del fruto con la ayuda de un calibrador pie de rey (Kex Germany) de 0 a 150 ± 0,05 mm de precisión.

#### **pH y grados Brix**

Con la ayuda de una licuadora se obtuvo aproximadamente 30 ml de pulpa de capulí y se midió el pH con un potenciómetro digital (marca HANNA HI 2221). Para

determinar los sólidos solubles asociados al contenido de azúcar, se usó un refractómetro manual (BOECO), se dejó caer una gota del jugo en el prisma del refractómetro y realizó la lectura correspondiente.

### **Humedad**

Se colocó aproximadamente 3 g de capulí en una balanza de humedad (marca Citizen modelo MB 200) y se obtuvo el porcentaje de humedad del fruto.

### **2.2.3 Preparación del material vegetal y secado**

El material vegetal se lavó tres veces con agua de grifo para eliminar restos de polvo o cualquier material que pudiera interferir con la posterior extracción de antocianinas. Posteriormente, se seleccionó los frutos que estaban en mejores condiciones y se los colocó en mallas metálicas una estufa (marca Gander MTN) a una temperatura de 60 °C hasta reducir la humedad a un valor menor al 10 %.

### **2.2.4 Extracción de antocianinas**

Para optimizar el proceso de extracción de antocianinas se utilizó como variable la relación de la masa del material vegetal/volumen del disolvente y el tiempo de extracción. El disolvente que se usó fue una mezcla de etanol al 96 % con ácido clorhídrico concentrado en una proporción de 85:15, respectivamente.

En matraces Erlenmeyer diferentes se colocó 2,5 g y 1,66 g de muestra triturada seca y pesada en una balanza analítica, y se extrajo en 50 ml de disolvente (relaciones 1:20 y 1:30), se verificó que el pH sea ácido debido a que favorece la estabilidad de las antocianinas. De igual forma se analizó la influencia del tiempo de extracción a 1 y 2 h. Cabe recalcar que se realizó por triplicado cada tratamiento, y la muestra vegetal se añadió un momento antes de alcanzar la temperatura de 70 °C en una plancha de calentamiento con agitación a 400 rpm; y se tomó el tiempo a partir de este punto (Tabla 3).

Seguidamente, se centrifugó la solución a 3000 rpm por 10 min para precipitar el material no disuelto y se colectó el sobrenadante en botellas de vidrio ámbar para analizar la eficiencia de la extracción mediante espectrofotometría. Después de realizado el análisis se conservó a 4 °C para evitar la degradación del pigmento.

*Tabla 3*

*Condiciones para la extracción de antocianinas del capulí*

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Disolvente (Etanol/HCl)	Referencia
70	60	85:15	(Fabiani, Pérez, Corral, Salguero, & Tereschuk, 2005)
70	120	85:15	

### 2.2.5 Determinación de sólidos totales

Este parámetro fue medido con la ayuda de una balanza de humedad, colocando 3 ml de muestra, y se utilizó la siguiente ecuación para calcular el porcentaje de sólidos totales en el capulí.

$$\% \text{ Sólidos totales} = 100 - \% \text{ de humedad} \quad (1)$$

### 2.2.6 Determinación de la concentración de antocianinas por espectrofotometría

Una vez obtenido el extracto con los distintos tiempos y relaciones de masa/disolvente, se realizó una dilución de 1/5 y se colocó 200 µl de muestra en una placa de 96 pocillos plástica. Se realizaron tres repeticiones por cada réplica de cada uno de los tratamientos. Para determinar la concentración de antocianinas en mg/kg, se utilizó la ecuación descrita a continuación por **Abdel-Aal & Hucl (1999)** a una longitud de onda de 535 nm que corresponde a la cianidina 3-glucósido en un espectrofotómetro UV-VI (marca Fisherbrand™ accuSkan™GO).



$$C = \frac{A}{\epsilon} \times \frac{vol}{1000} \times MW \times \frac{1}{gr \text{ de muestra}} \times 10^6 \quad (2)$$

Donde:

C= Concentración de antocianinas expresada en mg/kg, el resultado obtenido se dividirá para 10 para convertir las unidades a mg/100 g y multiplicado por 1 cm de la celda del espectrofotómetro.

A = Valor de la absorbancia medida a 535 nm

$\epsilon$  = Es la absortividad molar de la cianidina 3-glucósido 25965 cm<sup>-1</sup>/mol

vol = volumen total del disolvente usado

MW = peso molecular de la cianidina 3-glucósido (449)

La fórmula puede ser simplificada de la siguiente manera: C= A x 288,21 mg/kg

### 2.2.7 Diseño experimental para optimizar las variables de extracción

Con el fin de determinar cuál es el mejor tratamiento para la extracción de antocianinas se empleó un diseño experimental 2<sup>2</sup> en el que intervienen dos factores con dos niveles cada uno, el factor A es el tiempo (a<sub>0</sub>=1h, a<sub>1</sub>=2h) y el factor B la relación masa/disolvente (b<sub>0</sub>=1:20, b<sub>1</sub>=1:30), la variable de respuesta correspondió a la concentración de antocianinas. Mediante un análisis estadístico de varianza en el software Statgraphics se determinó las diferencias significativas de cada uno de los tratamientos previamente establecidos.

### 2.2.8 Microencapsulación

El extracto de antocianinas con el mejor tratamiento se concentró utilizando un rotoevaporador a 70 °C para eliminar el etanol de la solución. Seguidamente, se realizó la microencapsulación por secado de aspersión utilizando el polímero maltodextrina DE 10 (dextrosa equivalente) y goma arábiga en una relación con el extracto concentrado de 80:20 usando el equipo mini Spay Dryer BUCHI-B 290, con una temperatura de entrada de 150 °C y 101 °C de salida con un porcentaje de bombeo del 70 %.

### 2.2.9 Eficiencia de la microencapsulación

Para determinar la eficiencia de la microencapsulación con los dos polímeros, se disolvió 1,5 g de cada microencapsulado en 15 ml tanto de agua destilada como de etanol al 70 % y se agitó durante 10 min para homogeneizar la solución. Posteriormente se midió la absorbancia a 535 nm para obtener la concentración y aplicar la ecuación (3)

$$\% \text{ E.E} = \frac{\text{Concentración en agua} - \text{Concentración en etanol al 70 \%}}{\text{Concentración en agua}} \times 100$$

(3)

### 2.2.10 Espectrofotometría Infrarroja FT-IR

En la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH), Facultad de Ciencias, Laboratorio de Química Instrumental, se analizó la eficiencia de la microencapsulación por medio de espectrofotometría infrarroja FT-IR, que es un parámetro de seguimiento en la degradación de moléculas bioactivas (**Castañeda, Osorio, Gallardo, & Proal, 2013**).

### 2.2.11 Ensayo de estrés oxidativo sobre *Saccharomyces cerevisiae*

Para analizar la capacidad antioxidante del extracto de capulí se utilizó el protocolo sugerido por **Mera (2018)** en el que utiliza *Saccharomyces cerevisiae* como un microorganismo modelo para los ensayos biológicos.

#### 2.2.11.1 Crecimiento celular de levaduras

Se utilizaron levaduras cultivadas en 200 ml de medio YPD que en su composición constó de 2 g de levadura, 4 g de glucosa y peptona; los microorganismos fueron cultivados a 28 °C con agitación constante de 100 rpm durante toda la noche para

promover el crecimiento celular. Para obtener colonias aisladas de levaduras, se inoculó 100 µl en medio YPD solidificado con agar y se incubó a 28 °C por 72 h.

#### **2.2.11.2 Determinación de la capacidad antioxidante**

Para determinar la concentración adecuada de oxidante, se inoculó una colonia aislada de *Saccharomyces cerevisiae*, en 5 ml de medio líquido YPD y se incubó durante 6 h a 28 °C manteniendo en agitación constante a 40 min<sup>-1</sup>.

Se realizó una dilución 1/10 de este cultivo y se inoculó 5 µl en 3 ml de medio líquido YPD en el que se agregó 1 ml del extracto microencapsulado a dos concentraciones diferentes: 25 mg/ml (0,5 g de microencapsulado en 20 ml de agua destilada) y 50 mg/ml (1 g de microencapsulado en 20 ml de agua destilada) y se incubó por 18 h a 28 °C manteniendo una agitación constante a 100 min<sup>-1</sup>.

Se analizó dos concentraciones de vitamina C: 25 mg/ml (0,5 g de vitamina C en 20 ml de agua destilada) y 50 mg/ml (1 g de vitamina C en 20 ml de agua destilada). Para inducir una respuesta de la levadura frente a un antioxidante, se inoculó en un tubo Falcon 5 µl de la dilución 1/10 preparada con anterioridad, con 3 ml de medio YPD líquido fresco, y con 1 ml de cada concentración de antioxidante durante 18 h a una temperatura de crecimiento de 28 °C y con una agitación de 100 min<sup>-1</sup>. Para el control negativo se inoculó solo la levadura en el medio de cultivo.

Por medio de una centrifugación a 2700 min<sup>-1</sup>, durante 10 min a 20 °C, las células precipitadas fueron resuspendidas en tampón fosfato (PBS) pH 7,4 y se determinó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro UV-VIS, hasta alcanzar una absorbancia de 0,1 en cada uno de los tratamientos.

Para inducir al estrés oxidativo, se aplicaron distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno, añadiendo 1 ml de esta solución a dos diferentes concentraciones: 0,5 mmol/l y 3 mmol/l en cada uno de los tubos que contienen las distintas concentraciones de microencapsulado y antioxidante. Se incubó durante 1 h a 28 °C y posteriormente, se centrifugó a 2700 min<sup>-1</sup>, durante 20 min. El pellet de células

formado fue resuspendido en 1 ml de medio YPD fresco para analizar el crecimiento celular de la levadura.

Para determinar la capacidad antioxidante, se colocó 200  $\mu\text{l}$  de cada tratamiento de cultivo de levaduras, antioxidante y microencapsulado en una placa de microtitulación de 96 pocillos, los ensayos se realizaron por triplicado y se controló el crecimiento celular durante 24 h con agitación constante a 30 °C determinando la Absorbancia a 600 nm cada 20 min en un espectrofotómetro (marca Fisherbrand™ accuSkan™ GO).

### **2.2.11.3 Análisis de la capacidad antioxidante**

El efecto antioxidante que tiene el microencapsulado de capulí tanto con maltodextrina como goma arábica fue analizado mediante un gráfico de dispersión del valor de la absorbancia medida a 600 nm; que representa la relación entre el crecimiento y la capacidad de adaptarse *Saccharomyces cerevisiae* a estas condiciones, frente al tiempo de incubación con el promotor del estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno).

### **2.2.12 Capacidad antioxidante mediante el método de DPPH**

Se utilizó el protocolo descrito por **Granados, Yáñez, & Acevedo (2014)** con algunas modificaciones. Se realizó una curva estándar con concentraciones de 100, 200, 400 y 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  del reactivo Trolox, se utilizó como disolvente para las diluciones una solución de metanol y agua en proporciones de 80:20 en volumen.

Previo a la medición de la actividad antioxidante, se preparó una solución de 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$  del radical libre estándar 2,2-difenil-1-picrilhidracilo. Se realizó una dilución 1/50 del extracto concentrado de capulí de igual forma en un tubo Eppendorf estéril se disolvió 0,2 g de cada uno de los microencapsulados en 0,8 g de agua destilada.

En una placa de 96 pocillos se colocó el blanco (20  $\mu\text{l}$  de agua destilada con 180  $\mu\text{l}$  de la mezcla de metanol-agua), un control de referencia (20  $\mu\text{l}$  de agua destilada con

180  $\mu$ l de la solución preparada con anterioridad del reactivo DPPH), 20  $\mu$ l de las muestras de microencapsulado preparadas previamente junto con 180  $\mu$ l del reactivo DPPH y 20  $\mu$ l de la dilución 1/10 del concentrado de capulí con 180  $\mu$ l del reactivo DPPH. La placa se agitó por 60 segundos en el espectrofotómetro, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm después de una hora de incubación.

Los valores de las absorbancias fueron reemplazados en la ecuación (4) y se graficó el porcentaje de inhibición, se comparó con la curva de referencia de Trolox y los resultados se expresaron en  $\mu$ mol equivalentes de Trolox por cada gramo de extracto de la planta seco.

$$\% \text{ DPPH} = 1 - \left( \frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{control} - Abs_{blanco}} \right) * 100 \quad (4)$$

Donde:

$Abs_{muestra}$  = Absorbancia medida de cada microencapsulado y del concentrado del extracto de capulí.

$Abs_{blanco}$  = Representa la absorbancia del blanco

$Abs_{control}$  = Es la absorbancia de la solución control

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Caracterización del fruto del capulí (*Prunus serotina*)

Se tomaron las longitudes tanto de ancho como alto de 10 capulíes por medio de un pie de rey y se obtuvo  $12,066 \pm 2,056$  mm de ancho y  $8,22 \pm 0,54$  mm de alto; el pH del jugo de capulí fue realizado por triplicado con un valor de  $5,45 \pm 0,1$  indica que es levemente ácido; la humedad del fruto completo con semilla fue de 86 % y sólidos solubles con 13 grados Brix, según **(Bautista Justo, García Oropeza, Salcedo Hernández, & Parra Negrete, 2001)** éstos representan una escala para la medición de las densidades de las soluciones de azúcares equivalentes al peso de sólidos solubles, que principalmente son azúcares.

#### 3.2 Diseño experimental de la extracción de antocianinas

Con el fin de establecer las mejores condiciones para la extracción de antocianinas del capulí mediante la extracción sólido – líquido, se realizó un diseño experimental  $2^2$  en el cual se analizó la influencia del tiempo de extracción y la relación de la masa del capulí seco y molido con el disolvente. Se utilizó un disolvente polar como lo recomienda **S. Silva, Costa, Calhau, Morais, & Pintado (2017)**, en este caso fue etanol al 96 % mezclado en una proporción de 85:15 con ácido clorhídrico, que según **Fan, Han, Gu, & Chen (2008)** ayuda a prevenir la degradación de los compuestos no acetilados.

Como variable de respuesta se determinó la concentración de antocianinas, que según **Hernández-Quintero et al. (2017)**, el análisis mediante espectrofotometría UV-Vis es el método más utilizado para la cuantificación de antocianinas a una longitud de onda entre 465 y 550 nm. Se midió la absorbancia de todos los tratamientos (Anexo 1)

a una longitud de onda de 535 nm que corresponde a la cianidina 3-glucósido **Abdel-Aal & Hucl (1999)**. En la tabla 4 se muestra el análisis de varianza realizado a los resultados del diseño.

*Tabla 4*

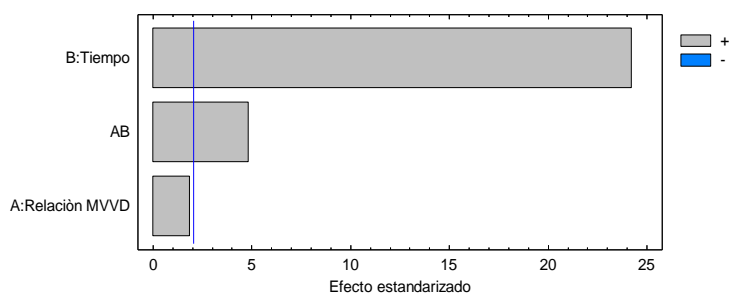
*Análisis de Varianza para extracción de antocianinas del capulí*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Relación MVVD	12,783	1	12,783	3,49	0,0740
B: Tiempo	2152,31	1	2152,31	587,56	0,0000
AB	85,4084	1	85,4084	23,32	0,0001
Bloques	28,0667	8	3,50834	0,96	0,4904
Error total	87,9147	24	3,66311		
Total (corr.)	2366,48	35			

*Nota.* MMVD = relación de masa con el disolvente

A un 95 % de confianza con la tabla ANOVA (Tabla 4) se obtuvo un valor de  $p = 0,0740$  que es mayor a un nivel de significancia del 0,05 % con lo cual se comprueba que se acepta la hipótesis nula; es decir, la relación de la masa con el volumen del disolvente (MVVD) no influye en la respuesta experimental; y el valor de  $p = 0,000$  establece que el tiempo afecta directamente en la cantidad de antocianinas extraídas del capulí.

A continuación, se muestra en las figuras 2 y 3 el diagrama de Pareto y de superficie de respuesta del análisis del diseño experimental.



*Figura 2.* Diagrama de Pareto estandarizado de la influencia de los factores que intervienen en el diseño experimental para la optimización de la extracción de antocianinas del capulí.

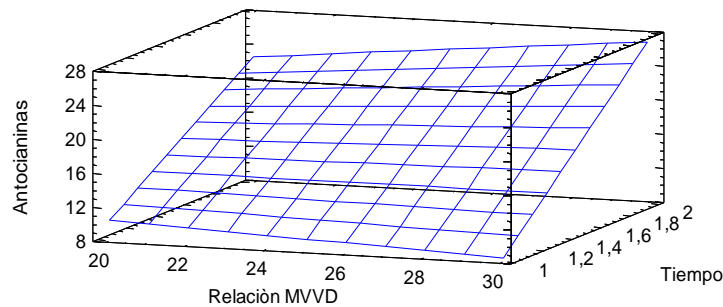


Figura 3. Superficie de respuesta estimada para la extracción de antocianinas del capulí. MVVD= relación de la masa del material vegetal con el disolvente etanol-HCl. Las antocianinas extraídas tienen una concentración en mg/100g y el tiempo en horas.

La interacción de los factores A (tiempo) y B (relación masa con el disolvente) afectó en menor proporción a los resultados experimentales al analizar el diagrama de Pareto (Figura 2). Por otra parte, el mejor tratamiento se produjo con la interacción de 2 horas con una relación de material vegetal con el disolvente de 1/30 con la que se obtuvo una concentración máxima de antocianinas 32,749 mg/100 g de material vegetal seco cómo se observa en la Figura 3.

### 3.3 Microencapsulación mediante secado por aspersión

Este método se basó en la atomización de la solución de polímero con el extracto concentrado de las antocianinas de capulí, en el seno de una corriente de aire caliente, para formar partículas esféricas huecas. El aire que se introduce alcanza altas temperaturas, pero las gotas de solución polimérica se calientan a bajas temperaturas debido a la rapidez del proceso que evita la degradación de las antocianinas (**Arteaga & Arteaga, 2016**).

En el proceso de microencapsulación se utilizaron temperaturas de entrada de aire de entrada de 150 °C para los dos polímeros y de salida de 95 °C para la maltodextrina y 103 °C en la combinación de goma arábiga y maltodextrina 50:50. Según **Arrazola, Herazo, & Alvis (2014a)** si se aumenta este gradiente de temperatura se produce una fuerza motriz mayor para la evaporización del agua, resultando una formación de un



polvo seco. La microencapsulación por medio de secado por aspersión de acuerdo con **Akhavan Mahdavi, Jafari, Assadpoor, & Dehnad (2016)** protege a las moléculas de antocianinas extraídas del capulí frente al daño de factores externos.

Seguidamente, en la tabla 5 se muestra la comparación de las eficiencias de microencapsulación obtenidas.

*Tabla 5*

*Análisis de varianza de las eficiencias de microencapsulación con diferentes polímeros*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	90,4817	1	90,4817	327,04	0,0001
Intra grupos	1,10667	4	0,276667		
Total (Corr.)	91,5883	5			

A un 95 % de confianza el valor de  $p = 0,0001$  con la fuente de entre grupos, según la Tabla 5, es menor que el nivel de significancia de 0,05 %, por lo tanto, existe diferencia estadísticamente significativa entre las eficiencias de microencapsulación obtenidas entre los dos polímeros. La eficiencia de la microencapsulación depende de varios factores, entre ellos la temperatura. En la figura 4 se muestra la comparación.

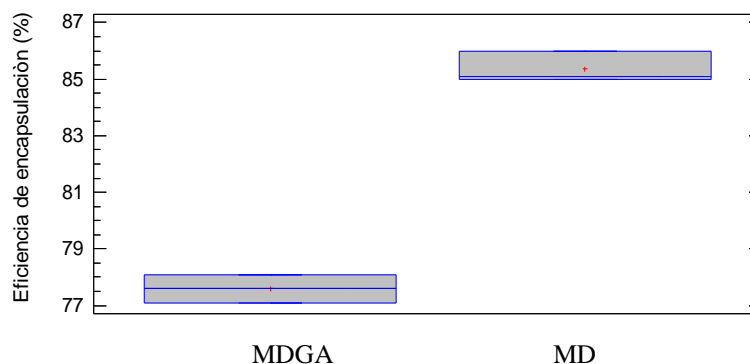


Figura 4. Microencapsulación con Maltodextrina y la combinación con Goma Arábica. MD= Microencapsulado de Maltodextrina MDGA= Microencapsulado de Maltodextrina y Goma arábica en una relación de 50:50 de ambos polímeros. Los dos polímeros fueron microencapsulados en una relación de 80:20 con el extracto concentrado de capulí.

Mediante la prueba de múltiples rangos de Duncan se demuestra que existen diferencias significativas entre las medias de los dos tratamientos con los diferentes polímeros. Se aplicó la ecuación (4) para el cálculo de la eficiencia de la microencapsulación, con maltodextrina se obtuvo una eficiencia media de 85,3 %, resultado que es similar al que reporta **Arrazola et al (2014a)** que fue de 86 % a la misma temperatura de entrada. Por el contrario, la menor eficiencia de microencapsulación fue con la combinación de maltodextrina y goma arábiga en una relación de 50:50 con 77,3 %, un resultado similar con la misma mezcla de polímeros lo obtuvieron **G. Silva, Constant, Figueiredo, & Moura (2010)** con 72,27 %.

### **3.4 Análisis por espectrofotometría infrarroja FT-IR**

Se analizó la eficiencia de la microencapsulación por medio de espectrofotometría infrarroja FT-IR, que es un parámetro de seguimiento en la degradación de moléculas bioactivas (**Castañeda et al., 2013**). El espectro de absorción infrarrojo es una gráfica que relaciona la cantidad de radiación IR que atraviesa la muestra versus la longitud de onda de la radiación, la posición de los picos muestra la absorción específica de cada grupo funcional que se encuentra en la muestra (**Shurvell, 2006**).

En la figura 5 se muestran los espectros de los microencapsulado, las antocianinas sin microencapsular y los polímeros.

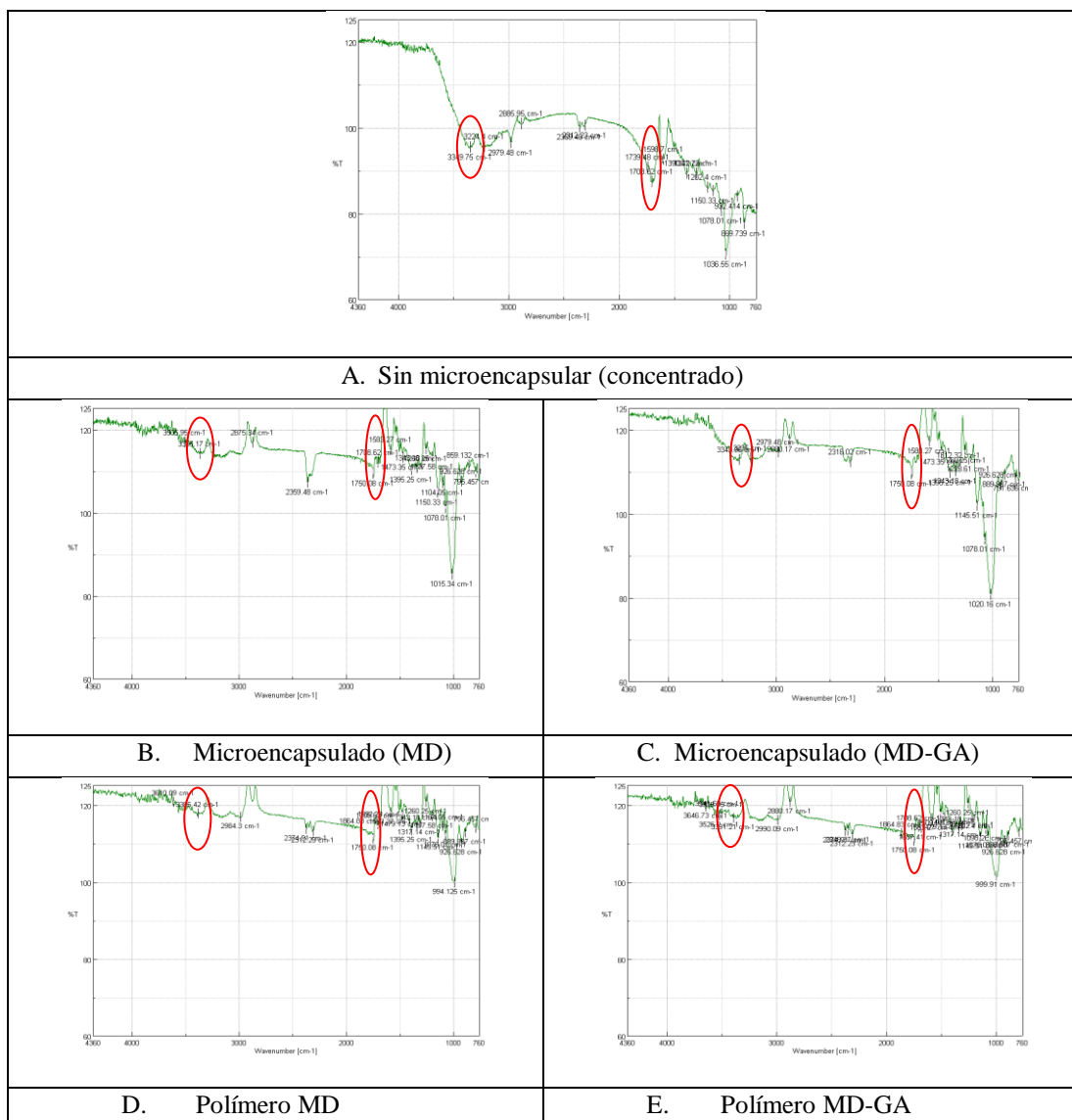


Figura 5. Espectrofotometría infrarroja FT-IR para comprobar la eficiencia del microencapsulado. A= concentrado de capulí en forma líquida, B= Microencapsulado en una relación 80:20 de maltodextrina con el extracto, C= Microencapsulado con la misma relación polímero/extracto, pero con 50 % de maltodextrina y goma arábica, D y E corresponden a los polímeros en forma de polvo usados para la microencapsulación por secado por aspersión.

Como se reporta en la Figura 5, entre los picos más significativos que se encontraron en el extracto de capulí sin microencapsular fueron a  $3224,4 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde al grupo funcional hidroxilo (OH inter o intra molecular) (Castillo et al., 2010) y a  $1708,62 \text{ cm}^{-1}$  que representa un grupo carbonilo C=O (Shurvell, 2006); estas características del espectro sugieren una estructura molecular de un flavonoide del tipo

antocianina (**Barragán Condori, Aro Aro, Huamaní Meléndez, & Cartagena Cutipa, 2018**). Una vez que el extracto de capulí se microencapsuló tanto con la maltodextrina como la mezcla de ésta con goma arábiga se puede observar que los picos representativos mencionados anteriormente desaparecieron, debido a que el polímero recubre estos grupos funcionales formando una coraza para proteger a las antocianinas, este resultado confirma la eficiencia de la microencapsulación mediante secado por aspersión.

### **3.5 Actividad antioxidante *in vivo* con *Saccharomyces cerevisiae***

Los microorganismos aerobios requieren de oxígeno para obtener energía química en forma de ATP para satisfacer sus funciones vitales. Sin embargo, cuando esta concentración de oxígeno aumenta se convierte en un agente tóxico para la célula, y como consecuencia se producen especies reactivas del oxígeno ROS (Reactive Oxygen Species), estas especies reaccionan con las macromoléculas modificando su estructura y función, cuando los mecanismos de defensa del microorganismo disminuyen causa un desbalance conocido como estrés oxidativo que produce envejecimiento y muerte celular. (**Valdivieso Ugarte, 2006**).

Este ensayo permitió evaluar la capacidad que tienen los compuestos presentes en el extracto del capulí para promover el crecimiento de la levadura frente a un estrés oxidativo inducido (**Abdel-Aal & Hucl, 1999**). Para analizar la capacidad antioxidante del extracto de capulí se utilizó el protocolo sugerido por **Mera (2018)** en el que utilizó *Saccharomyces cerevisiae* como un microorganismo modelo para los ensayos biológicos y se observó si la levadura responde al estrés oxidativo por medio de una serie de respuestas celulares antioxidantes para asegurar su supervivencia.

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ha sido utilizado como agente oxidante para evaluar la capacidad antioxidante de extractos naturales (**Sánchez Lamar et al., 2005**). En este ensayo la vitamina C fue considerado como control positivo, debido a su capacidad antioxidante por excelencia (**Avello & Suwalsky, 2006**), el control negativo fue la levadura sin agente antioxidante, y se evaluaron dos concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5 mmol/l y 3 mmol/l. Según **Fiallos (2017)**, la turbidez del medio está directamente

relacionada con la concentración de biomasa en el caldo. Se observó que al aumentar la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la concentración de 25 mg/ml de cada antioxidante (tanto con vitamina C, así como de los dos microencapsulados), la absorbancia máxima a 600 nm disminuye, debido a que la levadura sufre un estrés oxidativo y las células mueren. Al aplicar la concentración de 50 mg/ml de antioxidante no se observó una diferencia significativa en las absorbancias de las dos concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Anexo 2), por lo que esta concentración fue adecuada para determinar cuál de los dos microencapsulados tiene una mayor capacidad antioxidante al compararlo con la vitamina C.

Los microorganismos presentan diferentes mecanismos de defensa antioxidante frente a los ROS; la primera barrera son los sistemas enzimáticos entre ellos están la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, que neutralizan estas especies reactivas en moléculas menos dañinas para la célula (**Wu et al., 2011**). Existen otros sistemas no enzimáticos que están conformados por los carotenoides, glutatión reducido y algunas vitaminas como las C y D que tienen la capacidad de estabilizar los ROS o también ayudan a la quelación de los iones metálicos de los elementos de transición como el Fe y Cu, que cuando se encuentran en su estado reducido se potencia la autooxidación y la producción del anión superóxido (**Muñoz & Soto, 2005**).

**Folch-Mallol, Garay-Arroyo, Lledías, & Robles (2004)** mencionan que cuando los mecanismos de respuesta antioxidante de las células no son capaces de sobrellevar estas condiciones de oxidación, la respuesta inmediata de las células es establecer un metabolismo basal para disminuir el gasto energético. Para ello es necesario realizar cambios fisiológicos como la detención del ciclo celular y la replicación celular mediante mecanismos moleculares **Wu et al. (2011)**. De igual forma inducir las proteínas de estrés (**Godon et al., 1998**), acumular solutos compatibles y modificar la membrana celular (**Peláez, 2016**).

A continuación, se presenta las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* y su respuesta al estrés oxidativo producido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con los microencapsulados.

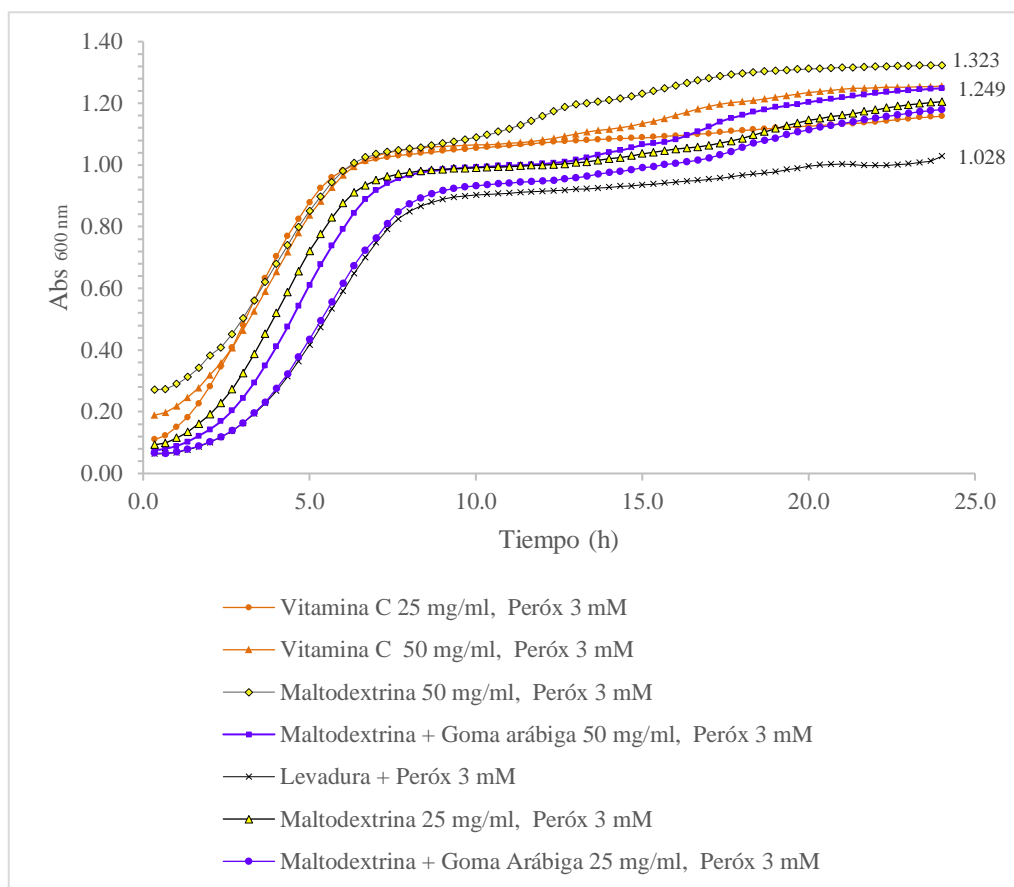


Figura 6. Curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* frente a un estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno 3 mmol/l, el control positivo es la vitamina C y el control negativo corresponde a la levadura sin la adición de un agente antioxidante.

En la figura 6 se puede observar que la levadura sin un agente antioxidante tarda en alcanzar la fase exponencial y la absorbancia máxima alcanzada después de las 24 h de incubación es menor (1,028), esto se debe a que los mecanismos de defensa del microorganismo antes mencionados no fueron suficientes para proteger a las células del estrés oxidativo producido por el  $H_2O_2$  para asegurar la supervivencia de los microorganismos y esto se ve notablemente reflejado en la absorbancia medida, debido a que estas condiciones modifican a las estructuras celulares, y afectan la función de macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Folch-Mallol et al., 2004).

Por otra parte, tanto la vitamina C a una concentración de 25 mg/ml y los microencapsulados de capulí con maltodextrina y la mezcla de maltodextrina y goma arábica a la misma concentración, presentaron valores similares de absorbancia final: 1,58, 1,205 y 1,80, respectivamente. Al aplicar una concentración mayor de los tres

agentes antioxidantes se produjo un aumento en la absorbancia, esto quiere decir que las células se adaptaron mejor ante las condiciones oxidantes del medio con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se obtuvo absorbancias de 1,256, 1,323 y 1,249. Es importante destacar que las absorbancias obtenidas con el microencapsulado con maltodextrina en las dos concentraciones presentaron los valores más altos incluso superiores a los de la vitamina C, esto confirma que el extracto de capulí al contener antocianinas tiene actividad antioxidante y ayuda a la levadura a superar las condiciones de estrés oxidativo.

Al analizar las curvas de crecimiento presentadas anteriormente, la curva correspondiente a la maltodextrina a una concentración de 50 mg/ml, presentó una absorbancia mayor que las demás, esta superioridad ratifica que las antocianinas recubiertas por este polímero a esta concentración específica gracias a la actividad antioxidante que poseen ayudaron a la levadura a superar de mejor manera las condiciones de estrés producidas por el peróxido de hidrógeno con respecto a los demás ensayos.

### 3.6 Análisis de la actividad antioxidante por el método de DPPH

Este ensayo se basó en la reducción del radical libre DPPH en la presencia de compuestos antioxidantes donadores de hidrógeno como las antocianinas (**Wu et al., 2011**). A continuación, se muestra la tabla 6, el análisis de varianza de la actividad antioxidante obtenida de cada microencapsulado.

*Tabla 6*

*ANOVA de la actividad antioxidante por el método de DPPH*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	74741,2	2	37370,6	1483,07	0,0000
Intra grupos	151,189	6	25,1981		
Total (Corr.)	74892,4	8			

Se realizó un análisis de varianza a un 95 % de confianza de la actividad antioxidante por el método de DPPH, en el cual se obtuvo un valor de  $p=0$  que es menor al porcentaje de significancia de 0,05, lo que indica que existen diferencia significativa entre los dos polímeros. Se realizó una prueba de comparación de Duncan y se encontró una diferencia en los tres casos (concentrado, maltodextrina y maltodextrina con goma arábica) y al comparar las medias de los mismos se encontró que el concentrado tiene mayor actividad antioxidante que los dos polímeros, este valor es aceptable debido a que el concentrado de capulí tiene antocianinas libres y por ende una mayor actividad que cuando se encuentra encapsulado con los polímeros.

En la figura 7 se presenta el diagrama de cajas de la actividad antioxidante de los microencapsulados por el método de DPPH.

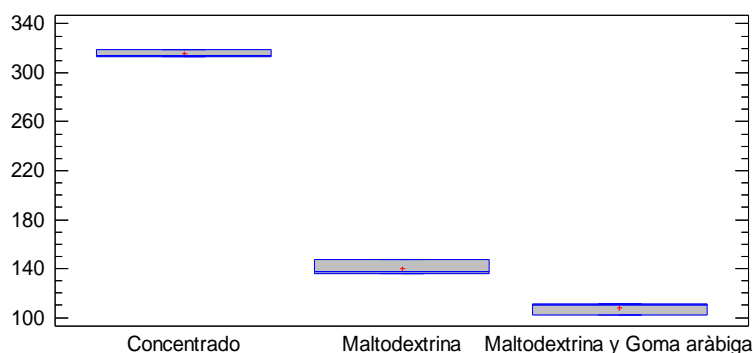


Figura 7 Diagrama de cajas de los microencapsulados frente al radical DPPH

Se puede observar que existe diferencia significativa en la actividad antioxidante del radical DPPH entre los dos polímeros utilizados; esto se evidenció cuando se produjo un cambio de color desde morado a amarillo luego de una hora de incubación con el radical estable. Analizando las medias estadísticas se encontró que la maltodextrina brinda una mayor actividad antioxidante con respecto a la mezcla con goma arábica.

El extracto de capulí concentrado sin microencapsular, la maltodextrina y la mezcla de maltodextrina con goma arábica alcanzaron los valores de: 319,265, 147,042 y 111,102  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/ g de extracto seco, respectivamente; para llegar a estos valores se calculó el porcentaje de inhibición con la ecuación (4) detallada en la metodología, y se graficó frente a las  $\mu\text{M}$  Trolox y mediante la ecuación de la



regresión lineal (Anexo 3). El extracto de capulí tiene gran cantidad de antocianinas que poseen alta reactividad que actúan como donadores de hidrógeno o electrones, es decir, tienen actividad antioxidante; los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con **Jimenez et al (2011)** que obtuvieron 73,47 % de actividad antioxidante DPPH con una concentración de 102 mg cianidina 3-gluósido /100 g de extracto de capulí.

Es necesario destacar que en el caso del concentrado de capulí se obtuvo una alta cantidad de antocianinas que se encuentran en forma libre pero desprotegidas de los daños que pueden causar los factores externos, sin embargo, al recubrirlas por los polímeros mediante secado por aspersión la actividad antioxidante disminuye, pero sigue presente especialmente con la maltodextrina.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 Conclusiones

- Se caracterizó las drupas de capulí utilizadas para la extracción de antocianinas, cuyo tamaño fueron de aproximadamente 12 mm, humedad del 85 %, y pH del jugo extraído de la pulpa ligeramente ácido con 13 grados Brix.
- Se optimizó el proceso de extracción de antocianinas del capulí aplicando un diseño experimental  $2^2$ , a partir del análisis estadístico se determinó que la mejor combinación de factores usando como disolvente la mezcla 85:15 de etanol- HCl fue una relación de 1 parte de material vegetal seco y molido en 30 partes de disolvente, con un tiempo de extracción de 2 h, lo que permitió alcanzar una concentración máxima de antocianinas de 32,749 mg/100 g de material vegetal seco.
- Se microencapsuló el extracto concentrado de capulí mediante secado por aspersión, obteniéndose con maltodextrina una eficiencia de microencapsulación de 85,3 % y con la mezcla en una relación de 50:50 de maltodextrina y goma arábica de 72,27 %, las microesferas en forma polvo fueron analizadas mediante espectrofotometría infrarroja FT-IR para confirmar que las antocianinas fueron protegidas por los distintos polímeros.
- Se evaluó la actividad antioxidante *in vivo* con *S. cerevisiae* e *in vitro* mediante una prueba de DPPH de los microencapsulados de extracto de capulí tanto de maltodextrina como la mezcla con goma arábica, siendo el microencapsulado con maltodextrina el que presentó un mayor crecimiento con la levadura sometida a un estrés oxidativo, este microencapsulado fue capaz de secuestrar

las especies reactivas del oxígeno producidas por el peróxido de hidrógeno, ejerció una acción protectora a la levadura permitiéndole aumentar su biomasa, superó las condiciones de estrés y llegó a una absorbancia máxima de 1,323 incluso superior a los valores alcanzados con la vitamina C. Este efecto antioxidante fue comprobado mediante la prueba de DPPH en los que se obtuvo 147,042  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/g de extracto seco.

#### **4.2 Recomendaciones**

- Realizar el proceso de extracción utilizando otro disolvente como acetona o metanol.
- Realizar pruebas *in vitro* por estabilización de membrana o por inhibición de desnaturalización de albúmina para determinar si las antocianinas del capulí ayudan a combatir los procesos antiinflamatorios.
- Utilizar otros polímeros como el almidón para la microencapsulación de antocianinas y comprobar su actividad antioxidante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aal, E.-S. M., & Hucl, P. (1999). A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Cereal Chemistry Journal*, 76(3), 350–354. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.3.350>
- Aguilera, M. (2009). *Caracterización y estabilidad de las antocianinas de higo (Ficus carica) variedad Misión, cultivado en ciudad Lerdo Durango, México*. Autónoma de nuevo león, México.
- Aguilera, M., Reza, M. del C., Chew, R. G., & Meza, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOTecnia*, 13(2), 16. <https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Akhavan Mahdavi, S., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014a). Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante Secado por Aspersión y Evaluación de la Estabilidad de su Color y Capacidad Antioxidante: Anthocyanins Microencapsulation of Eggplant (*Solanum melongena* L.) and Evaluation of Color Stability and Antioxidant Capacity. *Información Tecnológica*, 25(3), 31–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300006>
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014b). Obtención y Evaluación de la Estabilidad de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) en

- Bebidas. *Información tecnológica*, 25(3), 43–52.  
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300007>
- Arteaga, A., & Arteaga, H. (2016). Optimización de la capacidad antioxidante, contenido de antocianinas y capacidad de rehidratación en polvo de arándano (*Vaccinium corymbosum*) microencapsulado con mezclas de hidrocoloides. *Scientia Agropecuaria*, 7(SPE), 191–200.  
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.05>
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161–172.  
<https://doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>
- Baños, K. (2017). *Identificación y descripción de las características anatómicas de la madera de prunus serotina (capulí), procedente de tres provincias: Chimborazo, Tungurahua y Cotopaxi*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Barragán Condori, M., Aro Aro, J. M., Huamaní Meléndez, V. J., & Cartagena Cutipa, R. (2018). Antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del mio - mio (*Coriaria ruscifolia* L). *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(4), 419–428. <https://doi.org/10.18271/ria.2018.419>
- Bautista Justo, M., García Oropeza, L., Salcedo Hernández, R., & Parra Negrete, L. A. (2001). Azúcares en agaves (agave tequilana Weber) cultivados en el estado de guanajuato. *Acta Universitaria*, 11(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=41611105>
- Blanco, N., & Troya, R. (2014). *Evaluación de métodos no térmicos sobre la estabilidad de las antocianinas del maíz morado (Zea Mays L.) frente a*

*temperatura de pasteurización*. (San Francisco de Quito). Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3576/1/112263.pdf>

Brescia, C. (2015). Estudio cinético de antocianinas en cáscara de Capulí. Recuperado el 13 de abril de 2019, de <https://www.panificacionlatam.com/index.php/inocuidad/58-alergenic/2677-estudio-cinetico-de-antocianinas-en-cascara-de-capuli.html>

Caravaca, E. (1999). *Extracción y caracterización de antocianos y procianidinas de distintas variedades de uva empleadas en la elaboración del txakoli tinto de Bizkaia*. 5, 67–82.

Castañeda, E., Osorio, G., Gallardo, T., & Proal, J. (2013). Uso de FTIR-HATR y análisis multivariable para el seguimiento de la degradación de compuestos bioactivos durante el secado de pimiento rojo. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(2), 12.

Castillo, G., Michelena, G., Nogueiras, C., Ortega, G., Bello, D., Guerra, M., ... Mieres, G. (2010). Caracterización cromatográfica y espectroscópica de un pigmento rojo obtenido a partir de *Bothryodiplodia theobromae*. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 44(3), 15–20.

Contreras, E., Castañeda, A., González, L. G., Añorve, J., & Jaimez, J. (2014). *Effect of Light on Stability of Anthocyanins in Ethanolic Extracts of Rubus fruticosus*. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.56058>

Cruz, B. P., Chedier, L. M., Peixoto, P. H. P., Fabri, R. L., & Pimenta, D. S. (2012). Effects of light intensity on the distribution of anthocyanins in *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers. *An Acad Bras Cienc*, 7.

- del Valle Leguizamón, G., González León, A., & Báez Sañudo, R. (2005). Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(4). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=61028408>
- Fabiani, G. L., Pérez, E. E., Corral, L., Salguero, A. R., & Tereschuk, M. L. (2005). *Evaluación del contenido de antioxidantes en extractos convencionales y supercríticos de arándano (Vaccinium corymbosum L.)*. 7.
- Fan, G., Han, Y., Gu, Z., & Chen, D. (2008). Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *LWT - Food Science and Technology*, 41(1), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.019>
- Fiallos, J. (2017). *Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de Escherichia coli*. (Técnica de Ambato). Recuperado de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26334/1/BQ%20135.pdf>
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A. A. C. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1–2), 24–46.
- García, M. (2006). *Contenido en antocianos y compuestos fenólicos en diferentes frutos frescos y deshidratados*. Miguel Hernández De Elche, Orihuela.
- Garzón, G. (2008). *Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión*. 13(3), 10.
- Gil Salaya, G. (2012). *Fruticultura - Madurez de la fruta: Frutas de clima templado y subtropical* (Cuarta). Ediciones UC.

- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., ... Labarre, J. (1998). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22480–22489. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22480>
- Gordillo, M., Tobar, J., Arahana, V., & Torres, M. D. L. (2015). Identificación de alelos S asociados con autoincompatibilidad en individuos de capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) mediante la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 7(1). <https://doi.org/10.18272/aci.v7i1.224>
- Granados, C., Yáñez, X., & Acevedo, D. (2014). Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxylla* de Norte de Santander (Colombia). *Información Tecnológica*, 25(3), 11–16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300003>
- Hernández-Quintero, J. de D., Rosales-Nolasco, A., Molina-Macedo, A., Miranda-Piliado, A., Willcox, M., Hernández-Casillas, J. M., & Palacios-Rojas, N. (2017). Cuantificación de antocianinas mediante espectroscopía de infrarrojo cercano y cromatografía líquida en maíces pigmentados. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=61051413013>
- Instituto nacional autonomo de investigaciones agropecuarias (INIAP). (2013). *Generación de bioconocimiento para la conservación y uso sostenible de la agrobiodiversidad nativa en el Ecuador en el apoyo a la seguridad y soberanía alimentaria PIC-12 INIAP-13*.
- Jimenez, M., Castillo, I., Azuara, E., & Beristain, C. I. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) extracts.



- Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=62019843004>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1). <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Food Science and Technology*, 24(4), 691–693. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400036>
- Laleh, G., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R., & Zare, S. (2006). The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four *Berberis* species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(1), 90–92.
- McVaugh. (1951). *Prunus serotina*. Recuperado de <https://www.cnf.gob.mx:8443/snif/portal/libraries/phpsnif/usuarios/UsosPDF.php?especieURL=PrunusSerotina>
- Mera, N. (2018). *Evaluación de la actividad antioxidante de liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de Greigia mulfordii* (Técnica de Ambato). Recuperado de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29052/1/BQ%20168.pdf>
- Muñoz, I., & Soto, V. (2005). *DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE ANTOCIANINAS DE UN EXTRACTO DE VITIS vinifera EN AORTAS DE RATA SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO* (De Chile). Recuperado de [http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2005/munoz\\_i/sources/munoz\\_i.pdf](http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2005/munoz_i/sources/munoz_i.pdf)

- Osorio, C., Acevedo, B., Hillebrand, S., Carriazo, J., Winterhalter, P., & Morales, A. L. (2010). Microencapsulation by Spray-Drying of Anthocyanin Pigments from Corozo (*Bactris guineensis*) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6977–6985. <https://doi.org/10.1021/jf100536g>
- Peláez, A. (2016). *Validación funcional de extractos polifenólicos de cacao mediante ensayos in vivo con organismos modelo* (De Valencia). Recuperado de <http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/56209/Tesis%20Ana%20Pel%C3%A1ez%20Soto.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Roobha, J., Saravanakumar, M., Aravindhana, K., & Devi, P. (2011). *The effect of light, temperature, pH on stability of anthocyanin pigments in Musa acuminata bract*.
- Saenz, C., Tapia, S., Chavez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.095>
- Sánchez Lamar, Á., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Gensabella, G., ... De Salvia, R. (2005). Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 10(2), 0–0.
- Santacruz, L. A. (2011). *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. Nacional de Colombia, Bogotá.
- Shurvell, H. F. (2006). Spectra- Structure Correlations in the Mid- and Far-Infrared. En J. M. Chalmers & P. R. Griffiths (Eds.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (p. s4101). <https://doi.org/10.1002/0470027320.s4101>
- Silva, G., Constant, P., Figueiredo, R., & Moura, S. (2010). Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*)

- Formulation and stability of anthocyanins's colorants formulated with peels jabuticaba (*Myrciaria* spp.). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 21(3), 429–436.
- Silva, S., Costa, E., Calhau, C., Morais, R., & Pintado, M. (2017). Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 3072–3083.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087963>
- Urcuango, P. (2014). *Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación “in vitro” de capulí (prunus serotina ssp capulí cav) a partir de segmentos nodales*. Quito, Pichincha. (Central del Ecuador). Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3374/1/T-UCE-0004-102.pdf>
- Valdivieso Ugarte, M. (2006). *Obtención y caracterización de cepas de Saccharomyces cerevisiae superproductoras de glutation*. Editorial de la Universidad de Granada, Granada.
- Wu, M. J., O'Doherty, P. J., Fernandez, H. R., Lyons, V., Rogers, P. J., Dawes, I. W., & Higgins, V. J. (2011). An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*: Antioxidant assay based on oxidant-induced growth arrest. *FEMS Yeast Research*, 11(4), 379–387.  
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00726.x>

## ANEXOS

Anexo 1. Datos de la extracción de antocianinas del capulí con distintos tratamientos

Tratamiento	Réplica	Blanco	Abs 535 nm	Abs Real	Promedio	Concentración Ant mg/100g	% Humedad	Sólidos Totales		
<b>T1= a<sub>0</sub>b<sub>0</sub></b>	T1R1.1	0.0405	0.323	0.283	0.2889	9.781	97.357	2.643		
	T1R1.2		0.322	0.282		9.739	97.603	2.397		
	T1R1.3		0.336	0.295		10.203	97.452	2.548		
	Relación: 1/20 t= 1h	T1R2.1		0.367	0.326	0.32595	11.282	97.386	2.614	
		T1R2.2		0.334	0.293		10.144	97.240	2.760	
		T1R2.3		0.366	0.326		11.264	97.173	2.827	
		T1R3.1		0.316	0.276		0.29015	9.528	97.322	2.678
		T1R3.2		0.352	0.312			10.780	97.373	2.627
		T1R3.3		0.345	0.305			10.542	97.190	2.810
<b>T2= a<sub>0</sub>b<sub>1</sub></b>	T2R1.1	0.0408	0.282	0.241	0.237	8.332	96.467	3.533		
	T2R1.2		0.282	0.241		8.332	96.459	3.541		
	T2R1.3		0.275	0.234		8.093	96.952	3.048		
	Relación: 1/30 t= 1h	T2R2.1		0.281	0.240	0.245	8.293	96.704	3.296	
		T2R2.2		0.281	0.240		8.293	96.733	3.267	
		T2R2.3		0.291	0.251		8.664	96.610	3.390	
		T2R3.1		0.294	0.253		0.253	8.750	96.722	3.278
		T2R3.2		0.294	0.253			8.750	96.456	3.544
		T2R3.3		0.294	0.253			8.757	96.683	3.317
<b>T3= a<sub>1</sub>b<sub>0</sub></b>	T3R1.1	0.0402	0.4542	0.414	0.428	21.531	98.583	1.417		
	T3R1.2		0.4759	0.4357		22.660	98.552	1.448		
	T3R1.3		0.4814	0.4412		22.946	98.883	1.117		
	Relación: 1/20 t= 2h	T3R2.1		0.4836	0.4434	0.446	23.060	98.715	1.285	
		T3R2.2		0.4977	0.4575		23.793	98.150	1.850	
		T3R2.3		0.4888	0.4486		23.331	98.230	1.770	
		T3R3.1		0.4637	0.4235		0.433	22.025	98.417	1.583
		T3R3.2		0.4707	0.4305			22.389	98.157	1.843
		T3R3.3		0.4821	0.4419			22.982	98.206	1.794
<b>T4= a<sub>1</sub>b<sub>1</sub></b>	T4R1.1	0.0402	0.5754	0.5352	0.582	27.834	97.791	2.209		
	T4R1.2		0.6111	0.6111		31.782	97.597	2.403		
	T4R1.3		0.6297	0.6297		32.749	97.099	2.901		
	Relación: 1/30 t= 2h	T4R2.1		0.3097	0.3097	0.319	24.953	97.608	2.392	
		T4R2.2		0.3321	0.3321		27.551	97.627	2.373	
		T4R2.3		0.3274	0.3274		28.552	97.773	2.227	
		T4R3.1		0.4244	0.4244		0.446	22.072	97.600	2.400
		T4R3.2		0.4484	0.4484			23.320	97.233	2.767
		T4R3.3		0.4683	0.4683			24.355	97.443	2.557

Anexo 2. Absorbancias máximas de los agentes antioxidantes

	Abs máx <sub>600 nm</sub>
Vitamina C 25 mg/ml + 0,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,224
Vitamina C 25 mg/ml + 3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,158
Vitamina C 50 mg/ml + 0,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,269
Vitamina C 50 mg/ml + 3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,256
MD 25 mg/ml + 0,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,226
MD 25 mg/ml + 3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,205
MD 50 mg/ml + 0,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,327
MD 50 mg/ml + 3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,323
MD + GA 25 mg/ml + 0,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,263
MD + GA 25 mg/ml + 3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,180
MD + GA 50 mg/ml + 0,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,264
MD + GA 50 mg/ml + 3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,249
Levadura + 0,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,118
Levadura + 3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,028

*Nota.* MD = maltodextrina, GA= Goma arábiga, Abs máx = absorbancia máxima medida luego de 24 h de incubación de *S. cerevisiae*.

Anexo 3. Curva de calibración del porcentaje de inhibición frente a las  $\mu\text{mol}$  de Trolox

