



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



Tema: “Evaluación de la actividad antioxidante del contenido de antocianinas microencapsuladas de mora (*Rubus glaucus*)”

Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad 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.

Autora: Vanessa Monserrath Bastidas Bastidas

Tutor: PhD. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Agosto- 2019

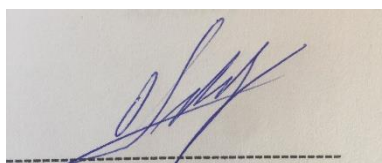
APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Orestes Darío López Hernández

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 de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 28 de Junio del 2019



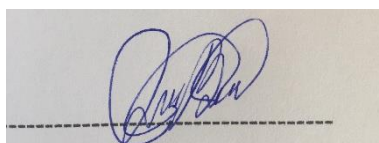
PhD. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Vanessa Monserrath Bastidas Bastidas, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Vanessa Monserrath Bastidas Bastidas

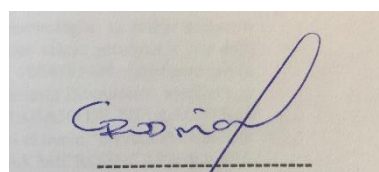
C.I. 180469540-9

AUTORA

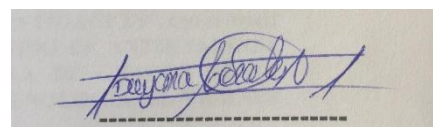
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

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 y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

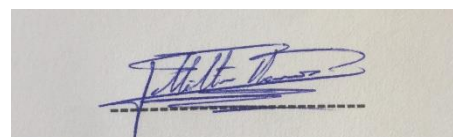
A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature is stylized and appears to be 'G. P. ...'. Below the signature is a dashed horizontal line.

Presidente del tribunal

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature is 'Dayana Morales Acosta'. Below the signature is a dashed horizontal line.

PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

C.I: 180413557-0

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature is 'Milton Ramos Moya'. Below the signature is a dashed horizontal line.

PhD. Milton Rubén Ramos Moya

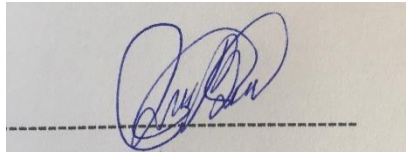
C.I: 171529005-0

Ambato, 29 de Julio de 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.



Vanessa Monserrath Bastidas Bastidas

C.I. 180469540-9

AUTORA

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico principalmente a Dios, por darme la vida y permitir que culmine una etapa más en mi vida.

A mi madre por ser ese pilar que nunca me dejo caer, por darme la valentía y la fortaleza para continuar día a día, por su amor, sacrificio y ejemplo de superación.

A mis hermanas por estar siempre presentes acompañándome física y moralmente, por su cariño y el apoyo incondicional.

A mi prometido por ser mi otra mitad y mi sostén cuando más lo he necesitado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la oportunidad de darme la vida, por bendecirme y guiarme a lo largo de este camino.

Gracias a mi madre, porque fue ella quien siempre confió en mi capacidad, me llenó de amor, fuerza y valentía para seguir adelante, por el apoyo cada día en cada uno de mis labores, por darme las palabras adecuadas y sobre todo el ejemplo de superación, por los valores, los principios que me ha inculcado, por ser el principal promotor de mis sueños más anhelados.

A mis hermanas por estar al cuidado de su hermana menor, por las palabras de aliento y el apoyo incondicional brindado todos los días, a mi prometido por estar a mi lado en gran parte de mi carrera, por ayudarme en todo momento, por darme una mano amiga para continuar y por amarme como lo hace.

Agradezco a mis amistades, a las Srtas. Ruth Cisneros, Jadyra Monar, Jannys Rivera y Eliana Ramos que hicieron de éste un bonito camino lleno de buenas experiencias inolvidables, a mi compañera y amiga Kelly Guanoquiza con quien compartí el proceso en la construcción de este proyecto de investigación.

Finalmente agradezco a mi tutor PhD. Orestes López al cual he tenido la dicha de conocer, no solo por su dirección e instrucción en mi proceso de titulación, sino también por impartir su conocimiento como docente en gran parte del transcurso de mi carrera.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TABAJO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE GENERAL DE TABLAS	x
ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
CAPITULO I.....	13
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	13
1.1.1 Descripción de la planta	13
1.1.1.1 <i>Rubus glaucus</i>	13
1.1.2 Taxonomía.....	14
1.1.3 Compuestos fitoquímicos en <i>Rubus glaucus</i>	14
1.1.4 Microencapsulación.....	15
1.1.2 Antocianinas.....	16
1.1.3 Proceso oxidativo	17
1.1.4 Mecanismo de acción de un antioxidante	17
1.2 Hipótesis.....	18
1.2.1 Hipótesis Nula	18
1.2.2 Hipótesis Alternativa	18
1.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis	18
1.3.1 Variables dependientes.....	18
1.3.2 Variables independientes.....	18
1.4 Objetivos	18
1.4.1 Objetivo General	18
1.4.2 Objetivos específicos.....	18

CAPÍTULO II	19
2.1 Materiales.....	19
2.1.1 Materiales de laboratorio:.....	19
2.1.2 Reactivos y materias primas	19
2.1.3 Equipos:.....	20
2.2 Métodos.....	20
2.2.1 Trabajo de campo	20
2.2.1.1 Recolección de la planta	20
2.2.2 Análisis de varianza.....	21
2.2.3 Trabajo de laboratorio	21
2.2.3.1 Preparación del material vegetal.....	21
2.2.3.2 Caracterización físico-química de la mora (<i>Rubus glaucus</i>).....	21
2.2.3.3 Obtención de extractos vegetales líquidos	23
2.2.3.4 Determinación de antocianinas de mora (<i>Rubus glaucus</i>)	23
2.2.3.5 Determinación de sólidos totales	24
2.2.3.6 Microencapsulación.....	24
2.2.3.7 Eficiencia de microencapsulación	25
2.2.3.8 Análisis por espectroscopía infrarroja FT-IR.....	25
2.2.3.9 Evaluación de la actividad antioxidante.....	25
CAPÍTULO III	28
3.1 Análisis y discusión de resultados	28
3.1.1 Caracterización físico-química de la mora (<i>Rubus glaucus</i>).....	29
3.1.2 Obtención de extractos de antocianinas	32
3.1.3 Microencapsulación de antocianinas	32
3.1.4 Análisis por espectroscopía infrarroja FT-IR.....	32
3.1.5 Verificación de la hipótesis	37
CAPÍTULO IV	38
5.1 Conclusiones	38
5.2 Recomendaciones.....	39
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXOS	47

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1.- Taxonomía <i>Rubus glaucus</i>	14
Tabla 2.- Características físicas de la mora (<i>Rubus glaucus</i>).....	30
Tabla 3.- Mediciones de color de <i>Rubus glaucus</i>	31

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1.-Hojas y frutos de la mora (<i>Rubus glaucus</i>)	14
Figura 2.-Tabla de color de la mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>)	21
Figura 3.- Comparación de concentración de antocianinas en los microencapsulados de mora (<i>Rubus glaucus</i>).....	28
Figura 4.- Comparación de la eficiencia de microencapsulación de antocianinas de mora (<i>Rubus glaucus</i>).....	29
Figura 5.- Comparación de los espectros del FTIR de la muestra sin microencapsular y las muestras microencapsuladas	33
Figura 6.- Comparación de los espectros de muestra sin microencapsular con microencapsulado de maltodextrina y el polímero maltodextrina.....	34
Figura 7.- Curvas de antocianinas microencapsuladas en base a los diferentes polímeros en el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	36

RESUMEN

El trabajo de investigación, se basó en la extracción, microencapsulación y cuantificación de flavonoides (antocianinas) a partir de mora (*Rubus glaucus*), además se evaluaron las propiedades antioxidantes que poseen los componentes extraídos de la planta en estudio. Se obtuvieron tres microencapsulados utilizando como agentes encapsulantes polímeros como: maltodextrina, mezcla en proporciones (1:1) de maltodextrina y goma arábiga y proteína concentrada de suero. Se alcanzaron eficiencias de microencapsulación de 90,81 % - 90,64 % y 89,73 %, respectivamente con cada agente encapsulante. Mediante el análisis de espectroscopía infrarroja se demostró que las antocianinas de mora se encontraban recubiertas por los polímeros, en forma de microesferas. Para evaluar las propiedades antioxidantes se realizó un análisis *in vivo* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* en donde a través de las curvas de crecimiento se verificó el efecto antioxidante comparado con la vitamina C como antioxidante de referencia.

Palabras Clave: microencapsulación de antocianinas, secado por aspersión, flavonoides, actividad antioxidante, *Rubus glaucus*

ABSTRACT

The research presented was based on the extraction, microencapsulation and quantification of flavonoids (anthocyanins) from blackberries (*Rubus glaucus*). The antioxidant properties of the plant under study were also evaluated. three microencapsulations were obtained using 3 polymers as encapsulating agent: maltodextrin, that is a mixture in proportions (1: 1) of maltodextrin-gum arabic and concentrated whey protein, where through the analysis of variances of efficiency of 90.81%, 90.64% and 89.73%, were achieved respectively. with a spectroscopic analysis it was demonstrated that the anthocyanins of blackberries were covered by the polymers, obtaining a form of microspheres. To evaluate the antioxidant properties, a live analysis was carried out using *S. cerevisiae*, where through the growth curves it was verified that each microencapsulated had antioxidant activity and that they were within the curves containing vitamin C as a strong antioxidant.

Keywords: anthocyanin microencapsulated, spray drying, flavonoids, antioxidant activity, *Rubus glaucus*

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

1.1.1 Descripción de la planta

1.1.1.1 *Rubus glaucus*

Rubus glaucus, comúnmente conocida como mora de castilla, también denominada mora andina y en otros lugares como Europa y América del Norte es llamada zarzamora, originaria de las zonas altas tropicales de América. Está ampliamente distribuida por América Central, Colombia, Perú, Venezuela, Ecuador y Bolivia, en Ecuador se encuentra desde los 1500 a 3500 msnm.

La morfología de la planta es de vegetación perenne, posee tallos rastreros que forman una corona en la base de la planta, está conformada por varios tallos espinosos que pueden crecer hasta 3 m con diámetros entre 1 y 3 cm. Las hojas son trifoliadas, con bordes aserrados, ovoides de 4 a 5 cm de largo con aguijones curvos, verdes por el haz y vellosos por el envés (ANTIA. G., 1998).

El fruto es una baya elipsoidal de 15 a 25 mm en su diámetro más ancho, con un peso de 3 a 5 g, verde cuando se forma, pasando a rojo y luego a morado oscuro y brillante cuando está en su estado de maduración. Tiene bajo valor calórico que lo hace un alimento muy beneficioso por su alto contenido en vitamina C, calcio y fósforo. Adicionalmente contiene una gran cantidad de pigmentos naturales como carotenoides y antocianinas que sirven como antioxidantes para el organismo, lo cual puede ser ingerido en la dieta diaria (ANTIA. G., 1998).



Figura 1.- Hojas y frutos de la mora (*Rubus glaucus*)

Fuente: TAXONOMÍA DE LAS PLANTAS, 2018

1.1.2 Taxonomía

Tabla 1.- Taxonomía *Rubus glaucus*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Rubus
Epíteto específico	Glaucus
Autor del epíteto específico	Benth
Nombre científico	Rubus glaucus

Fuente: (Universidad Nacional de Colombia: Colecciones., 2018)

1.1.3 Compuestos fitoquímicos en *Rubus glaucus*

Un estudio fitoquímico realizado a partir de mora (*Rubus glaucus*), por el método de gelificación iónica con tripolifosfato de sodio como agente entrecruzante, en combinación con agentes activos provenientes de los extractos de la fruta tropical mora, permitió determinar, que al poseer agentes antioxidantes, expresados como concentración de ácido gálico, conceden a las nanopartículas de quitosano la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano ya que los compuestos antioxidantes actúan como agentes modificantes de las nanopartículas del quitosano. La fruta presentó una concentración de compuestos fenólicos de aproximadamente 100 mg de ácido gálico/100 g por el método de *Folin-Ciocalteu* y actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* y gram- negativas como *Serratia marcescens*, ésto se comprobó por los porcentajes de inhibición entre 10 y 60 % frente al control positivo (cloramfenicol) por el método de Kirby-Bauer (método de difusión en agar) (Porrás, 2012).

El tamizaje fitoquímico aplicado para la detección de los metabolitos secundarios en mora (*Rubus glaucus*) permitió observar la presencia de carbohidratos reductores y compuestos fenólicos como flavonoides, fenilpropanoides, polifenoles, triterpenos, esteroides, iridoides, antraquinonas y taninos

condensados. La presencia de los metabolitos secundarios mencionados anteriormente fue comprobada a través de cromatografía de capa fina (**Sánchez, 2010**). Los científicos otorgan a la mora de castilla propiedades biológicas como la acción antimutagénica, cardioprotectora, anticarcinogénica, antimicrobiana y antioxidante.

1.1.4 Microencapsulación

La microencapsulación se inició por la National Cash Register Company en 1930, para conservar los tintes empleando gelatina como agente encapsulante, con el objetivo de reducir el uso del papel carbón en las copias, esto permitió que el proceso se siga desarrollando e innovando al paso de los años con el fin de preservar productos de menor tamaño y obtener la máxima eficiencia del mismo (**Giamberini, 2015**). La microencapsulación es un proceso de recubrimiento por un agente encapsulante hacia materiales sólidos, líquidos y gaseosos de tamaño menor a 1 mm, protegiéndolo del ambiente, de la reacción con otros compuestos o que sufran reacciones de oxidación debido al oxígeno o a la luz; el material permanece estable hasta su liberación bajo condiciones específicas, (**Ghosh, 2006**). Las microcápsulas están formadas por el núcleo y la cápsula, ambos deben poseer una alta compatibilidad ya que de ello depende su morfología, estabilidad y duración, además del método de obtención (**Umer, 2011**).

1.1.4.1 Microencapsulación mediante secado por aspersión

La microencapsulación mediante secado por aspersión es un método físico, cuyo rendimiento de encapsulación oscila entre 85 – 90 % y se obtienen tamaños de partículas entre 5 – 100 μm . El método se basa en dispersar en forma de gotas muy finas la muestra que va a ser secada por una corriente de aire caliente cuya temperatura oscila entre 100 y 200 $^{\circ}\text{C}$, permitiendo que el agente activo quede atrapado dentro de una película de material encapsulante, formándose como resultado partículas esféricas que tienen gran solubilidad y aspecto de espuma desecada. A pesar de que la temperatura del aire es elevadamente alta, las partículas solo se calientan hasta 40 $^{\circ}\text{C}$ ya que la vaporización del disolvente sustrae calor y el proceso dura fracciones de segundo lo que evita la degradación del producto (**Hernández, 2010**).

Los principales agentes encapsulantes utilizados para este método son: carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, sacarosa, dextrana, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa); gomas (arábica, mezquite, guar, alginato de sodio, carragenina); lípidos (ceras, parafinas, grasas, ácido esteárico, tristearina, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, zeína, gluten, caseína). Estos encapsulantes deben tener la capacidad de proporcionar una emulsión estable durante el proceso de secado por aspersión y tener muy buenas propiedades de formación de película para proveer una capa que proteja al ingrediente activo de la oxidación **(Kalušević, 2017)**.

1.1.2 Antocianinas

Las antocianinas son polifenoles, colorantes naturales, los cuales se encuentran distribuidos en frutas y vegetales otorgando los colores como el naranja, rojo, azul. Estos pigmentos son solubles en agua lo que les permite estar presentes en varios sistemas acuosos alimentarios, agentes potenciales con valor agregado en la dieta diaria humana **(Kong, 2003)**. El interés por estos colorantes naturales se ha incrementado en los últimos años no solamente por reemplazar a los colorantes sintéticos que han ocasionado varias enfermedades, sino también por su capacidad antioxidante lo que los hace capaces de combatir enfermedades coronarias, cáncer, diabetes, además posee capacidad antiinflamatoria por lo que permite la mejora de la agudeza visual y el comportamiento cognitivo **(Garzón, 2008)**.

Las antocianinas son caracterizadas por poseer una privación de electrones debido a su estructura química, lo cual las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo. Estas actúan como antioxidantes mejorando la salud ya que actúan atrapando los radicales libres en sistemas biológicos en los que pueden donar electrones o hidrógenos a los radicales libres o atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática. El carácter polar de la molécula de antocianina permite la capacidad de ser soluble en variados disolventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y grupos acilos, además de factores como

la temperatura y la luz (**Pereira-Kechinski, Ramos-Guimarães, Zapata-Noreña, Tes-saro, & Ferreira-Marczak, 2010**).

1.1.3 Proceso oxidativo

El proceso oxidativo es un efecto desfavorable que perturba el equilibrio entre antioxidantes y prooxidantes lo que causa modificaciones funcionales en las biomoléculas; este proceso ocurre en los tejidos y en la sangre cuando hay un exceso de alteraciones en las biomoléculas causadas por los radicales libres de oxígeno (**Halliwell, 1994**).

Los radicales libres son moléculas que tienen en su última órbita un electrón desapareado lo cual los hace muy inestables y reactivos provocando que se apareen de manera muy inespecífica con las diversas moléculas presentes en el sistema celular; su vida es muy corta (**Halliwell B, 2000**).

Las especies reactivas se forman como resultado del metabolismo celular y se encuentran dentro del sistema biológico como especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), se producen principalmente en las mitocondrias y células endoteliales e inflamatorias. La producción de ROS se basa en reacciones enzimáticas y no enzimáticas, las reacciones enzimáticas capaces de formar ROS son aquellas que tienen relación con la cadena respiratoria; sin embargo, la producción de radicales libres no enzimáticos también puede ocurrir durante la respiración mitocondrial (**Pizzino, 2017**).

1.1.4 Mecanismo de acción de un antioxidante

Existen varios sistemas de acción de un antioxidante que atacan directamente, tales como: enzimas que eliminan y/o separan las moléculas que han sido oxidadas, enzimas antioxidantes y sustancias antioxidantes específicas; procesos como la quelación de iones metálicos, co-antioxidantes, donación de electrones o regulación de electrones son los adecuados para eliminar o preveer la causa de oxidación.

A pesar de existir varias formas en las que puede actuar un antioxidante, el principal sistema enzimático de defensa está compuesto por 4 enzimas: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa (**Lobo, 2010**).

1.2 Hipótesis

1.2.1 Hipótesis Nula

Las antocianinas microencapsuladas de la mora (*Rubus glaucus*) con los diferentes polímeros de uso industrial no presentan actividad antioxidante

1.2.2 Hipótesis Alternativa

Las antocianinas microencapsuladas de la mora (*Rubus glaucus*) con los diferentes polímeros de uso industrial presentan alta actividad antioxidante

1.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis

1.3.1 Variables dependientes

- Propiedades antioxidantes del extracto

1.3.2 Variables independientes

- Polímeros microencapsulantes

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Extraer antocianinas con actividad antioxidante a partir de muestras microencapsuladas de mora (*Rubus glaucus*).

1.4.2 Objetivos específicos

- Establecer las características físico-químicas de la mora (*Rubus glaucus*).
- Microencapsular las antocianinas extraídas de *Rubus glaucus* empleando una mezcla de diferentes polímeros de uso industrial.
- Determinar la capacidad microencapsulante de los diferentes polímeros de uso industrial.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vivo* de los extractos microencapsulados obtenidos de la mora.

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Materiales de laboratorio:

- Algodón
- Balones de aforo
- Botellas de vidrio color ámbar
- Cápsulas de porcelana
- Celda de cuarzo (ThermoElectron 10 mm)
- Matraces Erlenmeyer
- Micropipetas
- Microplacas de 96 pocillos
- Papel aluminio
- Pera de succión
- Pera de succión
- pipetas
- pipetas Pasteur
- Placas de 96 pocillos (Thermo Sceintific)
- probetas graduadas
- Reactor de acero inoxidable de 4 L
- tubos de centrifuga

2.1.2 Reactivos y materias primas

- Ácido clorhídrico (Thermo Scientific) 37 % pureza
- Agua destilada
- Buffer fosfato salino (PBS)
- Etanol 96 %
- Extracto de mora (*Rubus glaucus*) tomadas de las coordenadas latitud: -1,23333 y longitud: - 78,6833 pertenecientes a la parroquia Quisapincha.

- Goma arábica DE 10 MEELUNIE B.V.
- Levadura
- Maltodextrina DE 10 MEELUNIE B.V.
- Proteína concentrada de suero DE 10 MEELUNIE B.V.

2.1.3 Equipos:

- Balanza analítica Ohauspioneer
- Balanza de humedad (marca: KERN MLS 50-3)
- Mini Spray Dryer Büchi B-290
- Calibrador pie de rey BP GOLD
- Cámara de cultivo celular Thermo Scientific. Modelo 1300 series A2
- Centrífuga Rotina 380
- Colorímetro Lovibond LC 100
- Computadora laptop cargada con sistema operativo Windows 10
- Espectrofotómetro FT-IR
- Espectrofotómetro UV-visible
- Estufa Grander MTN, modelo CD-160
- Incubadora de laboratorio de CO₂. Panasonic
- Molino IKA. Modelo: M 20 S003
- pH-metro digital Mettler Toledo – G20
- Plancha de calentamiento Corning PC-620D
- Refractómetro digital ATAGO Pocket-Japón
- Rotoevaporador IKA RV 8 V-C
- Software de análisis de datos estadístico y gráfico, Statgraphics XVII 64x

2.2 Métodos

2.2.1 Trabajo de campo

2.2.1.1 Recolección de la planta

Los ejemplares de mora (*Rubus glaucus*) en las mejores condiciones, se recolectaron en las coordenadas latitud: $-1,23333$ y longitud: $-78,6833$ pertenecientes a la parroquia Quisapincha, cantón Ambato, provincia de Tungurahua. Se verificó que las muestras tomadas tuvieran un buen color, tamaño,

no presenten daño físico y estén libres de deterioro causado por hongos e insectos. Se guardaron en fundas herméticamente selladas a temperatura ambiente para un transporte seguro hacia el lugar de estudio, sin causar desgastes físicos ni bacteriológicos.

2.2.2 Análisis de varianza

Para determinar diferencias significativas de los 3 distintos polímeros en cuánto a concentración y eficiencia de las muestras microencapsuladas de mora (*Rubus glaucus*) se utilizó un software de análisis de datos estadísticos y gráficos, Statgraphics XVII 64x, empleando como variable independiente los 3 polímeros: Maltodextrina, mezcla de maltodextrina con goma arábica, y proteína concentrada de suero, y como variable dependiente se planteará el valor de la concentración.

2.2.3 Trabajo de laboratorio

2.2.3.1 Preparación del material vegetal

Se tomaron los ejemplares recolectados de mora (*Rubus glaucus*) en estado de madurez 4 basándose en el color externo de la misma, utilizando para ello la tabla de color de la norma INEN 2427:2010 y se sometió a secado en una estufa (Grander MTN, modelo CD-160) a 60 °C, las muestras se extendieron en mallas metálicas con el fin que tengan el espacio apropiado para eliminar la humedad. A las muestras deshidratadas se procedió a triturar en un molino (IKA, modelo M 20 S003) hasta convertirlas en polvo fino.



Figura 2.- Tabla de color de la mora de castilla (*Rubus glaucus*)

Fuente: INEN, 2010

2.2.3.2 Caracterización físico-química de la mora (*Rubus glaucus*)

2.2.3.2.1 Características Físicas

2.2.3.2.1.1 Determinación de tamaño

El diámetro y la longitud de la fruta se determinaron con la ayuda de un calibrador pie de rey (marca BP GOLD), en 10 unidades de mora.

2.2.3.2.1.2 Determinación de peso

Se tomaron 10 unidades de mora y se registraron las lecturas de cada una de ellas utilizando la balanza analítica Ohauspioneer calibrada con una precisión de 0,1 mg.

2.2.3.2.1.3 Determinación de volumen

Se determinó el volumen de acuerdo al método de inmersión en líquidos, en donde el Principio de Arquímedes enuncia: un cuerpo que se encuentra sumergido total o parcialmente en un fluido experimenta una fuerza ascendente igual al empuje del peso del líquido desplazado, por lo tanto el volumen del líquido que se desplaza es igual al volumen de la parte que está sumergida del cuerpo (**Ramírez, 2010**).

Para ello se utilizó un vaso de precipitación de 50 ml, el cual se colocó sobre un recipiente para recoger el agua desplazada, se introdujo una unidad de mora y el volumen desplazado correspondió a la unidad en cuestión.

2.2.3.2.1.4 Determinación de densidad

Obtenidos los valores de peso y volumen se aplicó la densidad mediante la ecuación [1]

$$\rho = \frac{m}{v} \quad [1]$$

Donde:

m= masa en gramos

v= volumen en mililitros

2.2.3.2.1.5 Determinación de color

Para realizar la medición del color externo de la mora se requirió de 10 unidades de mora, utilizando un colorímetro marca Lovibond, previamente calibrado. La medición de color se ejecutó en 3 puntos diferentes de la misma muestra, en donde se obtuvo como datos un promedio de los valores de L* (Luminosidad), a* (componente rojo-verde), b* (componente amarillo-azul), croma (saturación) y h (tono), en base al espacio de color CIE Lab.

2.2.3.2.2 Características Químicas

2.2.3.2.2.1 Determinación de pH

El potencial de Hidrógeno (pH) se determinó usando un pH-metro digital (Mettler Toledo – G20), por medida directa en una solución de agua destilada (45 ml) con 5 g de pulpa, siguiendo la metodología descrita por **Choi et al. (2011)**.

2.2.3.2.2.2 Determinación de °Brix

El cociente total de materia seca (generalmente azúcares) se determinó por refractometría, mediante un refractómetro digital ATAGO Pocket-Japón de acuerdo a la norma NTE INEN-ISO 2173 (**INEN, 2013**).

2.2.3.3 Obtención de extractos vegetales líquidos

Para obtener los extractos líquidos de la muestra se realizó una extracción sólido-líquido en el cual el sólido es la muestra de mora en polvo y el disolvente (EtOH: HCl 1 mol/L; relación 85:15), manteniendo la relación 1:20, por cada 100 g de muestra sólida se emplearon 2000 ml de disolvente. Posteriormente se colocó la solución en un reactor de acero inoxidable de 4 L con su respectiva tapa para evitar la evaporación del disolvente y se mantuvo en estas condiciones a 68 °C durante 60 min en una plancha de calentamiento (Corning PC-620D) con agitación constante. Seguido se procedió a centrifugar para retirar el sedimento en una centrífuga (Rotina 380) a 4000 min⁻¹ durante 15 min, se colectó el sobrenadante y se llevó a un rotoevaporador (IKA RV 8 V-C) a 60 °C y 160 min⁻¹ para la evaporación del disolvente. Se midió el volumen total obtenido de concentrado en donde se encuentran las antocianinas y se almacenó a 4 °C en botellas ámbar para evitar el contacto con la luz.

2.2.3.4 Determinación de antocianinas de mora (*Rubus glaucus*)

Se determinará la concentración de antocianinas de la muestra de mora, según (**Abdel-Aal, 1999**), en donde se medirá la absorbancia en un espectrofotómetro (UV-visible) a una longitud de onda de 535 nm y calcular con los resultados la concentración a partir de la siguiente ecuación [2]:

$$c \text{ mg L}^{-1} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l} \quad [2]$$

Donde:

C: concentración de antocianinas mg/L⁻¹

A: absorbancia obtenida a 535 nm

ε: Absortividad molar (cianidina 3-glucósido 25965 cm⁻¹ M⁻¹)

MW: Peso molecular de cianidina 3-glucósido (449)

DF: Factor de dilución

2.2.3.5 Determinación de sólidos totales

La determinación de sólidos totales se realizó por método gravimétrico en una balanza de humedad (KERN MLS 50-3), con este dato se realizaron los cálculos respectivos y se determinó la cantidad necesaria de cada uno de los componentes de la solución posterior (concentrado de antocianinas, polímero, agua destilada). Con base al valor de humedad de cada muestra se obtuvo el porcentaje de sólidos totales mediante la siguiente ecuación [3]:

$$\% \text{ Sólidos totales} = 100 - \% \text{ humedad} \quad [3]$$

2.2.3.6 Microencapsulación

La microencapsulación de antocianinas de mora (*Rubus glaucus*) se realizó en la UTA-FCIAL-UODIDE en el equipo Mini Spray Dryer Büchi B-290. Se revisó que el equipo se mantenga en condiciones óptimas para continuar con el estudio como: voltaje, presión, compresión de aire, estructura física, etc, además se impusieron las condiciones de operación como: temperatura de entrada (150 °C), y temperatura de salida (90 °C) y bombeo (20 %). Se usaron tres polímeros (agentes encapsulantes): maltodextrina, goma arábiga y proteína concentrada de suero empleando una relación antocianinas: polímeros de 20:80. Se mezclaron los extractos líquidos con el polímero y agua destilada que actuará como disolvente creando una mezcla homogénea, la cual se secó por aspersion en el spray dryer y se recolectaron las microesferas obtenidas.

2.2.3.7 Eficiencia de microencapsulación

Para calcular la concentración mg/L se utilizó la ecuación 2, mientras que para determinar la eficiencia se usó la siguiente ecuación [4]:

$$\%E.E = \frac{[H_2O]-[EtOH]}{[H_2O]} * 100 \quad [4]$$

Donde:

%E.E = Eficiencia de la microencapsulación en porcentaje en masa (%)

[H₂O]= Concentración total presente en las microcápsulas (mg/L)

[EtOH]= Concentración superficial presente en las microcápsulas (mg/L)

2.2.3.8 Análisis por espectroscopía infrarroja FT-IR

El proceso de espectrofotometría infrarroja FT-IR se llevó a cabo en la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo ESPOCH, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Química Instrumental. Se observó que el equipo funcione en excelentes condiciones, se analizaron la muestra líquida sin microencapsular, los polímeros y las muestras sólidas microencapsuladas, al momento de procesar y corregir las escalas leídas para cada muestra se utilizó el programa Spectra Analysis, el mismo que ayudará a identificar y etiquetar los picos más relevantes, entre otras opciones según lo que se requiera.

2.2.3.9 Evaluación de la actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante se utilizó una cepa cultivada en medio YPD cuya composición es: glucosa 2 % p/v, extracto de levadura 1 % p/v, peptona 2 % p/v y agar 2 % p/v. Se tomó la cepa de un stock de glicerol congelado, se inocularon en medio YPD líquido y se cultivaron a 28 °C con agitación constante toda la noche. Después los cultivos se diluyeron en medio YPD líquido para que tengan un mayor crecimiento a 28 °C con agitación constante toda la noche, y se inocularon en placas de agar YPD y se incubaron a 28 °C por 72 h para obtener colonias individuales.

Para determinar la concentración correcta de agente oxidante se realizaron varios experimentos.

En 5 ml de medio YPD se inoculó una única cepa de levadura y se incubó durante 6 horas a 28 °C y 40 min⁻¹. Posteriormente se realizó una dilución 1/10 del cultivo líquido, se tomó 5 µL del cultivo líquido diluido 1/10 y se inoculó en 3 ml de medio YPD, con 1 ml de microencapsulado a una concentración de 50 mg/ml (1 g de microencapsulado diluido en 20 ml de agua destilada).

Nuevamente, se tomó 5 µL del cultivo líquido diluido 1/10 y se inoculó en 3 ml de medio YPD, pero esta vez con 1 ml de microencapsulado a una concentración de 25 mg/ml (0,5 g de microencapsulado diluido en 20 ml de agua destilada).

Para el control positivo se tomó 5 µL del cultivo líquido diluido 1/10 y se inoculó en 3 ml de medio YPD y se añadió 1 ml de vitamina C a una concentración de 25 mg/ml (0,5 g de vitamina C diluido en 20 ml de agua destilada).

Para el control negativo se tomó 5 µL del cultivo líquido diluido 1/10 y se inoculó en 3 ml de medio YPD.

Se incubaron los 4 tubos durante 18 h a 28 °C y 40 min⁻¹.

Las células se recolectaron por centrifugación a 2700 min⁻¹, durante 20 min, a 20 °C y se resuspendieron los precipitados en 3 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4.

Se leyó la absorbancia a 600 nm hasta alcanzar un valor de 0,1 (añadiendo alícuotas de suspensión de levadura) para asegurar una concentración homogénea y se incubó durante 30 minutos a 28 °C.

Para el proceso de estrés oxidativo, una vez alcanzada la OD de 0,1 se añadió 1 ml de H₂O₂ 0,5 mmol/l para cada concentración de microencapsulado, y también se añadió 1 ml de de H₂O₂ 3 mmol/l para cada concentración de microencapsulado. Posteriormente el peróxido se eliminó mediante centrifugación a 2700 min⁻¹, durante 20 min, a 20 °C y se realizó un lavado con PBS, el pellet se resuspendió en medio YPD fresco para su posterior crecimiento registrando la absorbancia a 600 nm.

Los cultivos se distribuyeron en placas de microtitulación de 96 pocillos con un volumen final de 250 µl por pocillo, utilizando tres replicas para cada combinación. El crecimiento de la levadura se controló a 30 °C leyendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro con lector de placas de 96 pocillos (Fisherbrand™ accuSkan™ GO) durante 18 h con agitación a 600 min⁻¹ antes de cada lectura.

Las curvas de relación de crecimiento se calcularon para cada cepa y condición a las 5, 9, 12, 16 y 18 h de incubación según la siguiente ecuación [5]:

$$\text{Curva de relación de crecimiento} = \frac{\text{curva de crecimiento del cultivo expuesto al estrés oxidativo}}{\text{curva de crecimiento del cultivo no expuesto}}$$

[5]

El efecto que ejerce el peróxido de hidrógeno y los agentes oxidantes se determinaron mediante el análisis estadístico de la gráfica de curva de relación de crecimiento vs tiempo (**Peláez, 2016**).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

En la figura 3 presenta la comparación de concentración de las antocianinas en los microencapsulados de mora.

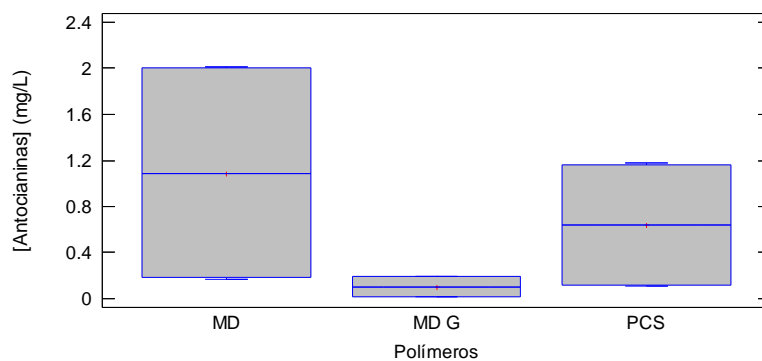


Figura 3.- Comparación de concentración de antocianinas en los microencapsulados de mora (*Rubus glaucus*)

De acuerdo al análisis estadístico realizado en Statgraphics utilizando la prueba de múltiples rangos se indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los 3 polímeros dado que el valor P (0,0640) de la prueba F es mayor a 0,05 con un nivel de confianza del 95,0 %. Sin embargo; a través del procedimiento de diferencia menos significativa (LSD) de Fisher, MD obtuvo una media mayor respecto a los dos polímeros restantes (Anexo 1).

Se discriminó entre los pares de medias de los gráficos indicando que existe homogeneidad entre MD y PCS, entre MD-G y PCS, verificado por el gráfico de caja y bigotes ya que cada uno tiende a sobreponerse; sin embargo, no existe homogeneidad entre MD y MD-G.

La figura 4 presenta la eficiencia de microencapsulación de cada agente encapsulante (Maltodextrina, Maltodextrina-Goma arábica y Proteína concentrada de suero).

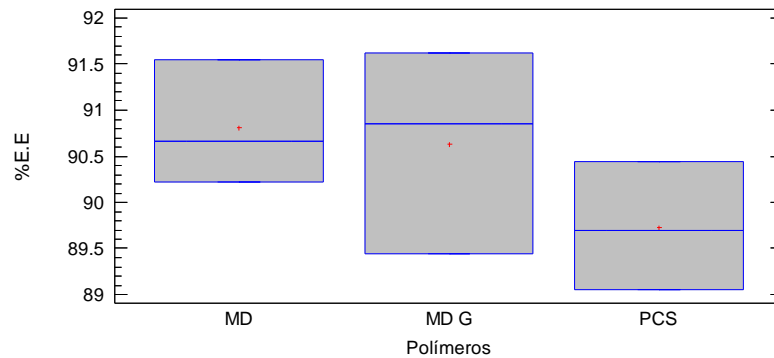


Figura 4.- Comparación de la eficiencia de microencapsulación de antocianinas de mora (*Rubus glaucus*)

Como se aprecia, no existe diferencia significativa entre los distintos polímeros en cuanto a sus medias P (0,3173), pero a pesar de que no existe diferencia, se observó que con MD se alcanza un valor de eficiencia de 90,81 %, siendo éste superior al que se alcanzó con MD-G de 90,64 % y al obtenido con PCS de 89,73 %, por lo que se selecciona la MD como la matriz que mayor eficiencia de microencapsulación de antocianinas proporciona.

Las eficiencias obtenidas se lograron al utilizar las condiciones correctas, siendo así entre los 3 polímeros utilizados maltodextrina la más alta con una eficiencia del 90,81 %.

La maltodextrina al ser altamente soluble forma partículas huecas en donde el polímero tiene al agente activo atrapado durante el proceso de secado por aspersión (Tonon, 2010).

3.1.1 Caracterización físico-química de la mora (*Rubus glaucus*)

3.1.1.1 Caracterización física

En la tabla 2 se presentan los resultados de longitud, diámetro, peso, volumen y densidad de la mora (materia prima utilizada), los cuales fueron fundamentales para iniciar el proceso de extracción.

Tabla 2.- Características físicas de la mora (*Rubus glaucus*)

N°	Longitud (mm)	Diámetro (mm)	Peso (g)	Volumen (cm ³)	Densidad g/cm ³
1	25,3	18,2	4,60	4,5	1,02
2	24,2	19,4	4,54	4,4	1,03
3	24,3	18,5	4,51	4,5	1,00
4	24,4	18,5	5,44	5,1	1,07
5	25,2	18,4	5,24	5,1	1,03
6	24,5	19,3	4,56	4,5	1,01
7	25,4	19,3	4,46	4,4	1,01
8	24,2	18,4	4,35	4,3	1,01
9	24,4	19,5	5,35	5,2	1,03
10	25,3	18,3	5,47	5,4	1,01
Promedio	24,7	18,78	4,85	4,74	1,02

El diámetro de la mora de acuerdo al tamaño (grande, mediano, pequeño) es: >25, 25-18, <18 respectivamente; mientras que la longitud se encuentra en el rango >25 para mora grande, 25-20 para mora mediana y <20 para mora pequeño (INEN, 2010). El peso de la fruta se encuentra en un rango entre 4,16 y 5,48 g considerando un tamaño mediano y grande (Montalvo, 2010). Puesto que se han realizado los procedimientos correspondientes se ha demostrado bibliográficamente que los resultados de la materia prima elegida corresponden al rango presentado anteriormente.

El volumen y la densidad de la mora correspondientes al estado de madurez 4 están en un rango entre $6,81 \pm 1,25 \text{ cm}^3$ y $1,01 \pm 0,07 \text{ g/cm}^3$ (Ayala, 2013).

Los datos presentados en el estudio se encuentran en el rango establecido por Ayala de acuerdo al estado de madurez 4, lo que indica que la fruta se encontraba en dicho estado.

3.1.2.1.1.- Determinación del color de la mora

A través de un colorímetro marca Lovibond, previamente calibrado, se realizó la medición de color en 3 puntos diferentes de la mora (materia prima), por lo cual presentó los siguientes resultados, en dónde; L* (Luminosidad), a* (componente rojo-verde), b* (componente amarillo-azul), croma (saturación) y h (tono), en base al espacio de color CIELab:

Tabla 3.- Mediciones de color de *Rubus glaucus*

	Estándar	Muestra	Δ
L*	100,0	15,3	-84,7
	100,0	9,7	-90,3
	100,0	10,8	-89,2
a*	0,0	8,2	8,2
	0,0	9,2	9,2
	0,0	7,5	7,5
b*	0,0	5,6	5,6
	0,0	2,1	2,1
	0,0	2,2	2,2
C*	0,0	10,0	10,0
	0,0	9,4	9,4
	0,0	7,8	7,8
h*	0,0	34,5	H* 0,0
	0,0	12,6	H* 0,0
	0,0	16,4	H* 0,0

En base a los valores presentados en la tabla 3 de los tres puntos distintos de la mora, mediante el programa Encycolorpedia que indica el porcentaje de color que posee la fruta en cuestión, se demostró que el estado de madurez al que pertenece la mora (*Rubus glaucus*) es de grado 4; (Ver anexo 3) por medio de la Norma INEN 2427 donde indica los diferentes estados de madurez que posee la fruta a partir del color externo.

3.1.1.2 Caracterización química

3.1.1.2.1 ° Brix

La cantidad de azúcares que posee la mora, fue determinada a partir de los grados Brix, encontrándose como resultado un valor de 10 °Brix.

El ° Brix que se refiere según la norma es mayor o igual a 9 ° Brix, lo que demuestra que se cumple el valor especificado en la norma. (INEN, 2010).

3.1.1.2.2 pH

Por medio del procedimiento descrito anteriormente se obtuvo un pH de 3,16 indicando que tiene un pH ácido. Los valores de pH de acuerdo al estado de

madurez varían desde 2,80 a 2,88 (Ayala, 2013); sin embargo la disminución de acidez presentado en este estudio (3,16) se debe a la temperatura de almacenamiento de la mora que superó los 8 °C, por lo que el deterioro de la fruta se encontraba en aumento.

3.1.2 Obtención de extractos de antocianinas

Se siguió el procedimiento detallado por (Aranda, 2018) para obtener un extracto rico en antocianinas y se obtuvo un volumen final de extracto concentrado de antocianinas de 100 ml con un contenido de 30,05 % de sólidos totales.

3.1.3 Microencapsulación de antocianinas

El concentrado con un contenido de sólidos de 30,05 % se microencapsuló empleando como polímeros maltodextrina de bajo equivalente (DE10), goma arábica y proteína concentrada de suero mediante secado por aspersión. Se obtuvieron polvos finos de color rosados-morados compuestos por metabolitos dispersos en una única matriz polimérica (Sukla, 2018).

La concentración de maltodextrina no interfiere con el rendimiento del proceso, debido a la viscosidad de la mezcla. El aumento de la viscosidad probablemente puede causar que los sólidos se aglutinen en la pared de la cámara principal, lo que podría reducir el rendimiento del proceso (Tonon R. , 2008).

3.1.4 Análisis por espectroscopía infrarroja FT-IR

En la figura 5 se muestran los espectros infrarrojos de las antocianinas sin microencapsular y de las microencapsuladas.

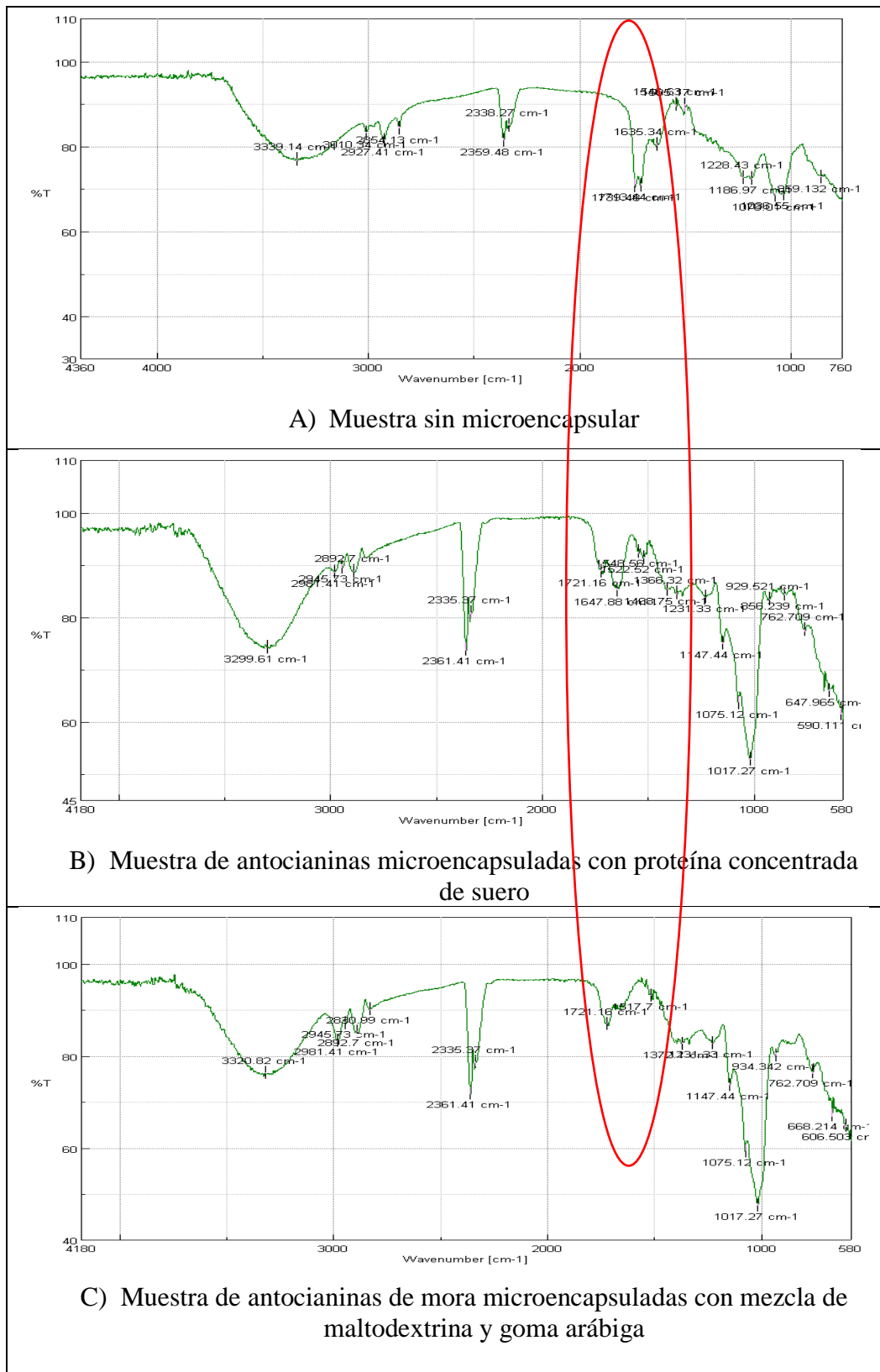


Figura 5.- Comparación de los espectros del FTIR de la muestra sin microencapsular y las muestras microencapsuladas

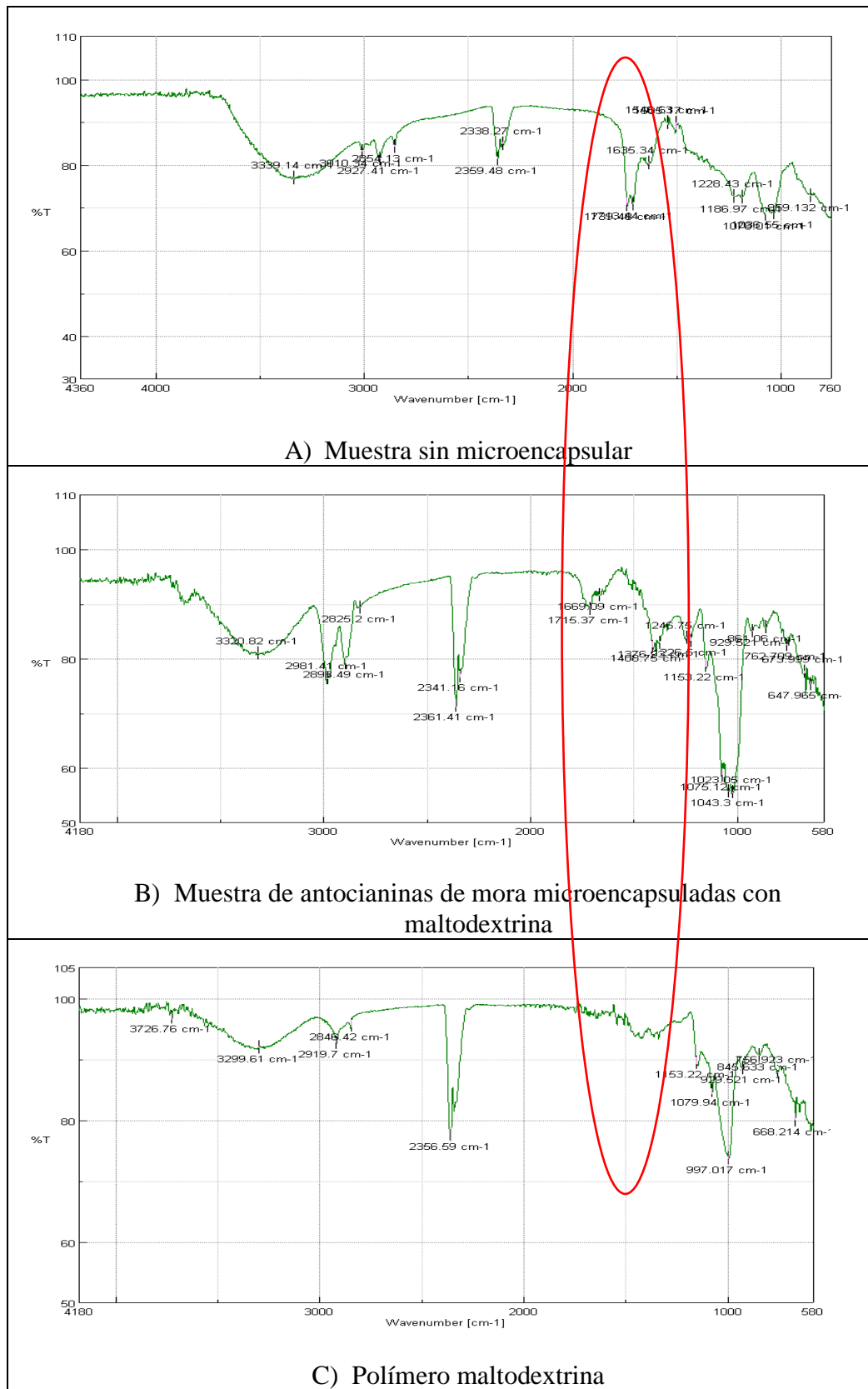


Figura 6.- Comparación de los espectros de muestra sin microencapsular con microencapsulado de maltodextrina y el polímero maltodextrina

En la figura 5 A) se observa la muestra líquida sin microencapsular, B) muestra de antocianinas de mora microencapsuladas con proteína de suero, C) muestra de antocianinas de mora microencapsuladas con mezcla de maltodextrina y goma arábica.

En la figura 6 A) se indica la muestra líquida sin microencapsular, B) polímero maltodextrina y C) polímero maltodextrina.

Como se observa en la figura, los intervalos de números de onda de los grupos funcionales (OH) de los polifenoles se encuentran entre 1710- 1635 cm^{-1} .

En el espectro de la muestra sin microencapsular se observa que las bandas correspondientes al grupo OH están más intensas a comparación con los espectros de las muestras microencapsuladas por lo que se comprueba que las antocianinas se encuentran recubiertas por el polímero.

Los espectros pertenecientes a las antocianinas microencapsuladas con los diferentes polímeros presentan bandas más intensas en comparación con el polímero maltodextrina debido a que el porcentaje de eficiencia con dicho agente microencapsulante fue superior a la alcanzada con los otros agentes encapsulantes, por lo que se puede decir que a medida que la eficiencia aumente el pico del microencapsulado va a disminuir y será similar al del polímero.

3.1.5 Evaluación de la Actividad antioxidante *in vivo*

En la figura 7 se presentan las diferentes curvas de crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* expuesta a oxidación con peróxido de hidrógeno, comparada con la vitamina C como antioxidante de referencia y los microencapsulados de antocianinas en los tres polímeros de uso industrial.

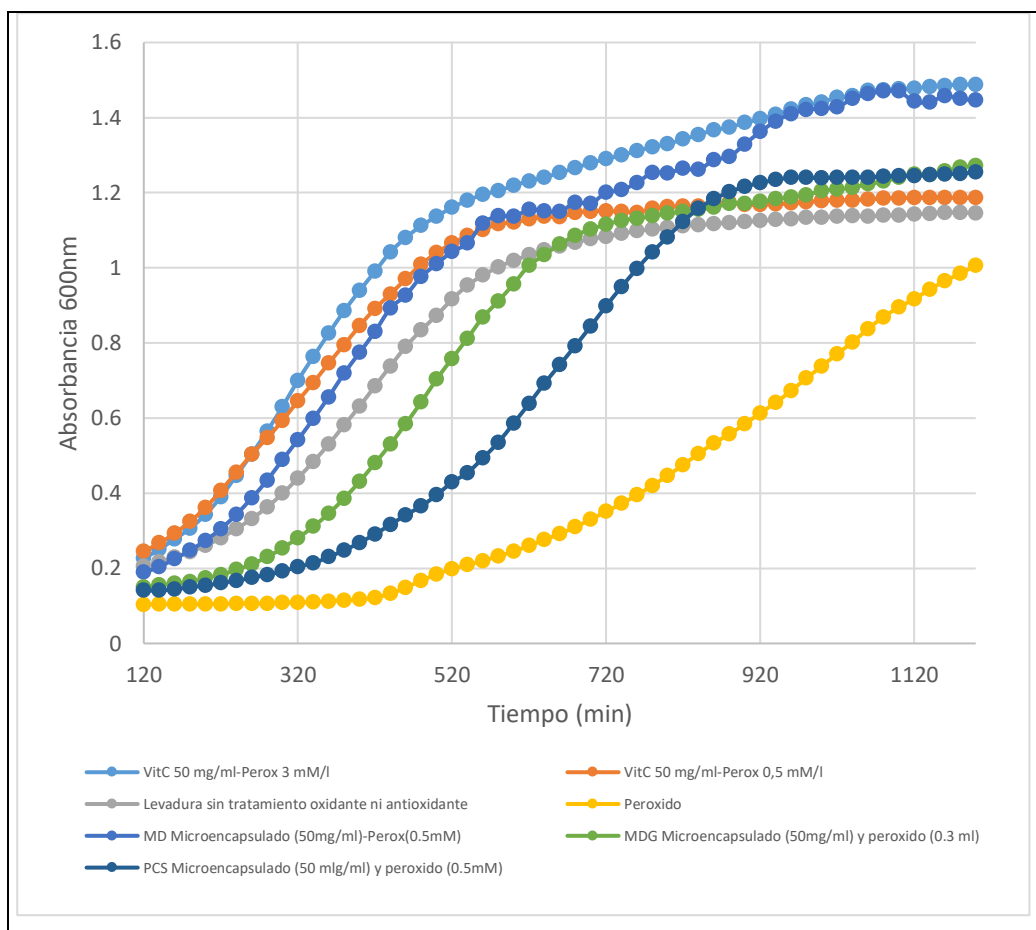


Figura 7. Curvas de antocianinas microencapsuladas en base a los diferentes polímeros en el crecimiento de *S. cerevisiae*

La determinación de la actividad antioxidante *in vivo* se realizó en base a la levadura *S. cerevisiae* como modelo, a la cual se le sometió a estrés oxidativo utilizando peróxido de hidrógeno para evaluar su capacidad de recuperación en presencia de antioxidantes.

En la figura 7 se observa el crecimiento de la levadura sin tratamiento (curva gris) la cual crece normalmente con sus respectivas propiedades en fase de adaptación, exponencial y estacionaria debido a que se encuentra en un medio rico en nutrientes para la misma como es caldo YPD; sin embargo, la curva de crecimiento que contiene peróxido de hidrógeno (curva amarilla) se oxidó y se nota la deficiencia que tiene en su desarrollo. Las levaduras contienen algunos compuestos antioxidantes como el ubiquinol ácido D-eritroascórbico, la flavohemoglobina, ácido D-eritroascórbico, el glutatión, ergosterol, las metalotioneínas, la trehalosa y poliaminas, inclusive está dotada de algunos

metabolitos carotenoides, además poseen enzimas que detoxifican el oxígeno activo, tales como la Cu/Zn superóxido dismutasa, peroxidasa, Mn superóxido dismutasa, tiorredoxina peroxidasa, citocromo C, catalasa A, glutatión reductasa, tiorredoxina reductasa, tiorredoxina, y catalasa T (**Jamieson, 1998**); (**Gibson, 2007**); (**Herrero, 2008**); (**Kaino, 2008**). A pesar que la levadura contiene peróxido como una forma de estrés oxidativo realiza su crecimiento inicial, sin embargo a medida que pasa el tiempo su crecimiento va declinando.

Las curvas control (celeste y tomate) a pesar de contener peróxido presentan un crecimiento normal ya que la presencia de vitamina C tiene la característica de ser antioxidante por su actuación en la reducción de radicales libres, disminuyendo las reacciones continuas y previniendo daños en los alimentos; además que frena el pardeamiento de las frutas y tiene un alto valor nutricional (**Bastías, 2016**). La curva de crecimiento de color azul pertenece al microencapsulado con maltodextrina, se nota que se encuentra entre las curvas con vitamina C y está creciendo normalmente similar a las curvas patrón (vitamina C) por lo que se determina que el microencapsulado posee actividad antioxidante.

La curva verde es el microencapsulado con una mezcla de maltodextrina- goma arábica y la curva azul intenso es la curva del microencapsulado con el polímero proteína concentrada de suero. Estas curvas presentan una manera similar de crecimiento comparando con las curvas patrón que contienen vitamina C, lo que indica que también presentan actividad antioxidante; a pesar de ello al comparar las tres curvas de microencapsulado se determinó que la de maltodextrina contiene mayor actividad antioxidante por su similitud más próxima a las curvas patrón, cuestión que puede atribuirse a que presenta también una mayor concentración de antocianinas y eficiencia de microencapsulación.

3.1.6 Verificación de la hipótesis

Por medio del análisis de los datos obtenidos en el ensayo realizado *in vivo*.

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

$H_a = 0$ Se acepta la hipótesis alternativa ya que se demostró que las antocianinas obtenidas de los extractos microencapsulados de la mora presentan actividad antioxidante.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se determinaron las características físico-químicas de la mora (*Rubus glaucus*), la fruta presentó características físicas como longitud de 24,7 mm, diámetro de 18,78 mm, peso de 4,85 g, volumen de 4,74 cm³ y densidad de 1,02 g/cm³, con un estado de madurez grado 4, además de características químicas como pH 3,16 y 10 °Brix.
- Se microencapsularon las antocianinas extraídas de *Rubus glaucus* mediante secado por aspersión empleando diferentes polímeros de uso industrial: maltodextrina, mezcla de goma arábiga-maltodextrina y proteína concentrada de suero, en una relación 20:80, obteniéndose polvos de color de rosado.
- Se determinó la capacidad microencapsulante a través de la eficiencia de microencapsulación, encontrándose que todos los polímeros poseen capacidad de microencapsular, alcanzándose para la maltodextrina la mayor eficiencia de 90,81 %, siendo ésta superior a los dos polímeros restantes cuyas eficiencias fueron 90,64 % para la mezcla de maltodextrina-goma arábiga y 89,73 % para la proteína concentrada de suero.
- Se evaluó la actividad antioxidante *in vivo* de los microencapsulados de antocianinas de mora utilizando *S. cerevisiae* como modelo, a través de la comparación de las curvas de crecimiento en presencia de los microencapsulados con diferentes polímeros y las curvas con vitamina C como antioxidante de referencia, donde se demostró todos poseen actividad antioxidante, siendo ligeramente superior la del microencapsulado con maltodextrina.

5.2 Recomendaciones

- Realizar ensayos *in vivo* para evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto de *Rubus glaucus* microencapsulado.
- Evaluar la posibilidad de reproducir el método de extracción de antocianinas de mora *Rubus glaucus* a escala industrial.
- Efectuar una evaluación de la estabilidad del microencapsulado con maltodextrina frente a factores ambientales durante un largo periodo de tiempo.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. (2011). *República de Colombia. Anuario Estadístico Agropecuario*. Obtenido de epública de Colombia. Anuario Estadístico Agropecuario.: http://www.bdigital.unal.edu.co/6911/1/71378544._2012.pdf?fbclid=IwAR3xz64j8llyG-79cOKqiUqlfXoP41y8qc7R1F5oEqMFsABbgmiDDF0SGSs
- Abdel-Aal, M. &. (1999). *A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats*. *Journal of Cereal Chemistry*, 73(C), 350–354. Obtenido de A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Journal of Cereal Chemistry*, 73(C), 350–354.: http://www.aaccnet.org/publications/cc/1999/May/Pages/76_3_350.aspx
- ANTIA. G., T. J. (1998). *El manejo post-cosecha de Mora (Rubus glaucus Benth)*. *Serie de paquetes de capacitación sobre manejo post-cosecha de frutas y hortalizas; No. 12. Programa Nacional del SENA de capacitación en Manejo post-cosecha y comercialización de frutas y hortalizas.*, (S. d. Convenio SENA – Reino Unido. Edición Magnitud Ltda. Pereira. Impreso OP gráficas, Ed.) Obtenido de El manejo post-cosecha de Mora (Rubus glaucus Benth). *Serie de paquetes de capacitación sobre manejo post-cosecha de frutas y hortalizas; No. 12. Programa Nacional del SENA de capacitación en Manejo post-cosecha y comercialización de frutas y hortalizas.*: http://www.bdigital.unal.edu.co/6911/1/71378544._2012.pdf?fbclid=IwAR3xz64j8llyG-79cOKqiUqlfXoP41y8qc7R1F5oEqMFsABbgmiDDF0SGSs
- Apaza, N. M. (2013). *Polimerización de compuestos antociánicos presentes en el colorante de la hierba santa (Cestrum hediondinum D.) y prueba de adsorción de iones Aluminio (III)*. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000100010#fig01
- Aranda, C. (2018). *Extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de papas nativas (Solanum tuberosum spp) variedades Puca- shungo- y Yana Shungo*. Obtenido de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27504/3/BQ%20145.pdf>

- Arrazola, G. H. (2014). *Microencapsulación de antocianinas de berenjena (Solanum melongena L.) mediante Secado por aspersion y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. Informacion Tecnologica, 25(3), 31–42.* Obtenido de <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300006>
- Ayala, L. (2013). *CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE MORA.* Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11n2/v11n2a02.pdf>
- BADUI-DER GAL, S. (2006). *Química de los alimentos.* (4. e. Educación., Ed.) Obtenido de *Química de los alimentos.* : <https://www.redalyc.org/pdf/145/14532635008.pdf?fbclid=IwAR3tnZudEcPJNza8jVwan04PsMcS7rE5AaMawef0bxaMsUJb0GTf7OUcTn0>
- Bakowska-Barczaka, A. M. (2011). *Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. Industrial Crops and Products 34: 1301– 1309 .*
- Bastías, M. (2016). *La vitamina C como un eficaz micronutriente.* Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/469/46946023012.pdf>
- Choi, Y.-S. C.-Y.-W. (2011). Choi, Y.-S., Choi, J., Han, D., Kim, H.-Y., Lee, M., "Effects of rice bran fiber on heat-induced gel prepared with pork salt-soluble meat proteins in model system". 88(1),59-66.
- Garzón, A. (2008). *LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS: REVISIÓN.* Obtenido de *LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS: REVISIÓN:* http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2008000300002
- Ghosh, S. (2006). *Functional Coatings by Polimer micronencapsulation.* Obtenido de *Functional Coatings by Polimer micronencapsulation.:* <http://pharmacyglobal.yolasite.com/resources/formulation.pdf>
- Giamberini, M. F. (2015). *Microencapsulation Innovative Applications.* Obtenido de *Microencapsulation Innovative Applications.:* <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/6159/3/UDLA-EC-TIAG-2016-20.pdf?fbclid=IwAR0Z15NjdyWvMykmeYpikKnpQxsKUGQxKWNiZVgL1erTeewEHcqgoicQFQ>
- Gibson, B. (2007). *Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. FEMS Microbiology Reviews, 31(5): 535-569.*

- Halliwell B, G. J. (2000). *Free radicals in Biology and Medicine. Tercera edición. Oxford, New York*. . Obtenido de Free radicals in Biology and Medicine. Tercera edición. Oxford, New York. : <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>
- Halliwell, B. (1994). *Free radical, antioxidants and human disease, curiosity, cause, or consequence?. Lancet.*; 344: 721 – 724. Obtenido de Free radical, antioxidants and human disease, curiosity, cause, or consequence?. Lancet.; 344: 721 – 724.: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>
- Hernández, O. L. (2010). *Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersion Microencapsulation of oily substances by aspersion drying. Revista Cubana de Farmacia, 44(3), 381–389*. Obtenido de Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersion Microencapsulation of oily substances by aspersion drying. Revista Cubana de Farmacia, 44(3), 381–389.: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v44n3/far13310.pdf>
- Herrero, E. (2008). *Redox control and oxidative stress in yeast cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1780(11): 1217-1235*.
- INEN. (2010). *Frutas frescas mora, requisitos*. Obtenido de <https://archive.org/details/ec.nte.2427.2010/page/n3>
- Jamieson, D. (1998). *Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Yeast, 14(16): 1511-1527*.
- Jyothi, N. P. (2010). *Microencapsulation: technique, factors influencing encapsulation efficiency : a review. The internet Journal of Nanotechnology . 27(3), 187-197*. . Obtenido de Microencapsulation: technique, factors influencing encapsulation efficiency : a review. The internet Journal of Nanotechnology . 27(3), 187-197. : <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/02652040903131301>
- Kaino, T. (2008). *Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in Saccharomyces cerevisiae under ethanol and sorbitol stresses. Applied Microbiology and Biotechnology, 79(2): 273-283*.
- Kalušević, A. L. (2017). *Microencapsulation of anthocyanin-rich black soybean coat extract by spray drying using maltodextrin, gum Arabic and skimmed milk powder. Journal of Microencapsulation, 0(0), 1–13*. . Obtenido de Microencapsulation of anthocyanin-rich black soybean coat extract by spray

- drying using maltodextrin, gum Arabic and skimmed milk powder. *Journal of Microencapsulation*, 0(0), 1–13. :
<https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1354939>
- Kong, J. L. (2003). *Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry*. 64: 923–933. Obtenido de Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64: 923–933.:
https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v24n5/art11.pdf?fbclid=IwAR3UyJy05Rt_bkQ84anOJuHCkXk1HupQR4PY0aeavvtIBXSfZbaZIOh_yQcc
- Lobo, V. P. (2010). *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. Obtenido de Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Martínez, S. G. (2015). *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición hospitalaria* 17(6), 271-278. Obtenido de Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria* 17(6), 271-278.:
<http://web.udlap.mx/tsia/files/2016/05/TSIA-9-Castaneda-Sanchez-et-al-2015.pdf?fbclid=IwAR1mryE9wGbqP>
- Montalvo, D. (2010). *Evaluación de la calidad poscosecha de las accesiones seleccionadas de mora de Castilla (Rubus glaucus Benth) provenientes de las provincias de Tungurahua y Bolívar* . Obtenido de <http://scielo.senescyt.gob.ec/pdf/enfoqueute/v7n3/1390-6542-enfoqueute-7-03-00082.pdf>
- NTE INEN-ISO 2173 (2013). "Productos vegetales y de frutas. Determinación de sólidos solubles. Método refractométrico., 2. 1.-3. (s.f.).
- Pastuña, A. (2016). *Microencapsulación de sachá inchi (Plukenetia volubilis L.) mediante secado por aspersion* . Obtenido de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/21313/1/BQ%2080.pdf>
- Peláez, A. &. (2016). *VALIDACIÓN FUNCIONAL DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE CACAO MEDIANTE ENSAYOS IN VIVO CON ORGANISMOS MODELO*. Obtenido de VALIDACIÓN FUNCIONAL DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE CACAO MEDIANTE ENSAYOS IN VIVO CON ORGANISMOS MODELO.:
<https://core.ac.uk/download/pdf/75988884.pdf>

- Pereira-Kechinski, C., Ramos-Guimarães, P., Zapata-Noreña, C., Tesar, I., & Ferreira-Marczak, L. (2010). *Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment*. *Food Science*, 75, 173–176. Obtenido de Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *Food Science*, 75, 173–176.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492222>
- PERKINS-VEAZIE, P. J. (2000). *Cultivar and maturity affect postharvest quality of fruit from erect blackberries*. *HortScience*. Vol. 31. p 258-261. Obtenido de Cultivar and maturity affect postharvest quality of fruit from erect blackberries. *HortScience*. Vol. 31. p 258-261.
- Pizzino, G. I. (2017). *Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. . Obtenido de Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. : <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Porrás, M. &. (2012). *Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants*. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 67, pp. 75–139). Obtenido de 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>.
- Sánchez, M. &. (2010). *Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. . Obtenido de Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. : <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Shipp, J. A.-A. (2010). *Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients*. *The Open Food Science Journal*, 4, 7–22. . Obtenido de Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4, 7–22. .
- Sukla, P. (2018). *Microcapsules and Microspheres*. Obtenido de http://www.venturecenter.co.in/techrx/pdfs/TechShowcase_Microsphere.pdf

- TAXONOMÍA EN PLANTAS: MORA. (10 de October de 2018). *TAXONOMÍA EN PLANTAS: MORA*. Obtenido de TAXONOMÍA EN PLANTAS: MORA.: <http://taxonomiaenplantas2017.blogspot.com/2017/11/zanahoria.html>
- Tonon. (2010). *Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (Euterpe oleracea Mart.) juice produced with different carrier agents. Food Research International*, 43 (3): 907-914.
- Tonon, R. C. (2008). *Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (Euterpe oleraceae Mart.) powder produced by spray drying. Journal of Food Engineering* 88: 411–418 .
- Tonon, R. C. (2010). *Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (Euterpe oleracea Mart.) juice produced with different carrier agents. Food Research International*, 43 (3): 907-914 .
- Umer, H. N. (2011). *Microencapsulation: process, techniques and apliccations. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science*. 2(2). 474-481. . Obtenido de Microencapsulation: process, techniques and apliccations. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science. 2(2). 474-481. : <http://www.ijrpbsonline.com/files/R017.pdf>
- Universidad Nacional de Colombia: Colecciones. (2018). *Universidad Nacional de Colombia: Colecciones*. Obtenido de Universidad Nacional de Colombia: Colecciones.: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/101331/>
- Vargas, D. J. (2000). *Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289. . Obtenido de Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains- characteristics, biosynthesis, processing and stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40(3), 173-289. : http://web.udlap.mx/tsia/files/2016/05/TSIA-9-Castaneda-Sanchez-et-al-2015.pdf?fbclid=IwAR1mryE9wGbqPX6zuW2YJDymZ1sbaiXVs28YkwPGkr5-riHus_YNyKDKtr4
- Yashin, A. Y. (2017). *Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review. Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 6(3). . Obtenido de

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.- Tabla de múltiples rangos de la concentración de antocianinas de mora (*Rubus glaucus*)

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
MD G	6	0.103947	X
PCS	6	0.639823	XX
MD	6	1.08991	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
MD - MD G	*	0.985961	0.81644
MD - PCS		0.450086	0.81644
MD G - PCS		-0.535876	0.81644

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.92372	2	1.46186	3.32	0.0640
Within groups	6.60251	15	0.440168		
Total (Corr.)	9.52623	17			

Anexo 2.- Tabla de múltiples rangos de la eficiencia de antocianinas de mora (*Rubus glaucus*)

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
PCS	3	89.73	X
MD G	3	90.6367	X
MD	3	90.81	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
MD - MD G		0.173333	1.69725
MD - PCS		1.08	1.69725
MD G - PCS		0.906667	1.69725

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.01849	2	1.00924	1.40	0.3173
Within groups	4.33007	6	0.721678		
Total (Corr.)	6.34856	8			

Anexo 3.- Resultados de las 3 mediciones para determinar el color de la mora (*Rubus glaucus*) en base a Encycolorpedia.



The screenshot shows the Encycolorpedia website interface. At the top, the logo "Encycolorpedia" is displayed in a colorful font. Below it is a search bar containing the hex code "34221f" and a "Buscar" button. A navigation menu includes "Pintura", "Colores web", "Colores HTML", "Colores nombrados", and "Ayuda". Social media icons for Twitter, Facebook, and Pinterest are visible, along with a "Boletín informativo" link. The main content area features the title "#34221f código de color hex" and a detailed description: "El código de color hexadecimal #34221f es una sombra oscura de rojo. En el modelo de color RGB #34221f dicho color se compone de 20.39% de rojo, 13.33% de verde y 12.16% de azul. En el espacio de color HSL #34221f tiene un tono de 9° (grados), 25% de saturación y 16% de luminosidad. Este color tiene una longitud de onda aproximada de 597.98 nm." A color swatch for #34221f is shown on the left, with its RGB values (52, 34, 31) listed below it.



The screenshot shows the Encycolorpedia website interface. At the top, the logo "Encycolorpedia" is displayed in a colorful font. Below it is a search bar containing the hex code "271618" and a "Buscar" button. A navigation menu includes "Pintura", "Colores web", "Colores HTML", "Colores nombrados", and "Ayuda". Social media icons for Twitter, Facebook, and Pinterest are visible, along with a "Boletín informativo" link. The main content area features the title "#271618 código de color hex" and a detailed description: "El código de color hexadecimal #271618 es una sombra muy oscuro de rosa-rojo. En el modelo de color RGB #271618 dicho color se compone de 15.29% de rojo, 8.63% de verde y 9.41% de azul. En el espacio de color HSL #271618 tiene un tono de 353° (grados), 28% de saturación y 12% de luminosidad. Este color tiene una longitud de onda aproximada de 680.13 nm." A color swatch for #271618 is shown on the left, with its RGB values (39, 22, 24) listed below it.



The screenshot shows the Encycolorpedia website interface. At the top, the logo "Encycolorpedia" is displayed in a colorful font. Below it is a search bar containing the hex code "28191a" and a "Buscar" button. A navigation menu includes "Pintura", "Colores web", "Colores HTML", "Colores nombrados", and "Ayuda". Social media icons for Twitter, Facebook, and Pinterest are visible, along with a "Boletín informativo" link. The main content area features the title "#28191a código de color hex" and a detailed description: "El código de color hexadecimal #28191a es una sombra muy oscuro de rosa-rojo. En el modelo de color RGB #28191a dicho color se compone de 15.69% de rojo, 9.8% de verde y 10.2% de azul. En el espacio de color HSL #28191a tiene un tono de 356° (grados), 23% de saturación y 13% de luminosidad. Este color tiene una longitud de onda aproximada de 626.64 nm." A color swatch for #28191a is shown on the left, with its RGB values (48, 25, 26) listed below it.

Anexo 4.- Eficiencias del microencapsulado de las antocianinas de mora (*Rubus glaucus*)

	Dil 1/100	Abs	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/vf)	% E.E
PCS	H₂O	0.408	1.175890622	0.017638359	89.73
		0.398	1.147069773	0.017206047	
		0.402	1.158598113	0.017378972	
	EtOH	0.039	0.112401309	0.00168602	
		0.041	0.118165479	0.001772482	
		0.044	0.126811734	0.001902176	
MD	H₂O	0.695	2.003048976	0.030045735	90.81
		0.698	2.011695231	0.030175428	
		0.685	1.974228128	0.029613422	
	EtOH	0.068	0.19598177	0.002939727	
		0.059	0.170043007	0.002550645	
		0.064	0.184453431	0.002766801	
MD+G	H₂O	0.644	0.185606265	0.002784094	90.64
		0.667	0.19223506	0.002883526	
		0.668	0.192523269	0.002887849	
	EtOH	0.068	0.019598177	0.000293973	
		0.061	0.017580718	0.000263711	
		0.056	0.016139675	0.000242095	