



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



---

**Tema:** Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de antocianinas microencapsuladas de maíz morado (*Zea mays* l.), papa morada (*Solanum tuberosum* L.) y mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

---

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

El presente estudio es parte del proyecto “Valorización de la calidad nutricional y funcional de alimentos tradicionales de la población ecuatoriana” aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por el Centro de Investigación de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 2074-CU-P2016 Coordinado por la Dra. Mayra Paredes.

**Autora:** Inés Margarita Masaquiza Jerez

**Tutora:** PhD. Linda Priscila Guamán Bautista

**Ambato – Ecuador**

**Marzo - 2018**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Ph.D. Linda Priscila Guamán Bautista

**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, mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 24 de enero de 2018



**Ph.D. Linda Priscila Guamán Bautista**

C.I. 010481184-9

**TUTORA**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Inés Margarita Masaquiza Jerez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

A handwritten signature in blue ink that reads "Inés Margarita Masaquiza Jerez". The signature is written in a cursive style with a long horizontal line underneath.

**Inés Margarita Masaquiza Jerez**

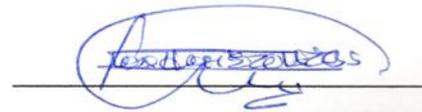
C.I. 1805169198

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



**PhD. Dayana Cristina Morales Acosta**

C.I.: 1804135570



**Ph.D. Orestes Darío López Hernández**

C.I.: 175478486-4

Ambato 20 de febrero del 2018

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de éste 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 realice respetando mis derechos de autora.

A handwritten signature in blue ink, reading "Inés Margarita Masaquiza Jerez". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath.

**Inés Margarita Masaquiza Jerez**

C.I. 1805169198

## **AUTORA**

## **DEDICATORIA**

*Al TODO PODEROSO quien me ha cuidado y orientado mi vida.*

*A mis padres Marcelino y Zoila quienes con su valioso esfuerzo y lucha diaria iluminaron mi camino estudiantil, los mismos que me han impartido amor, respeto, paciencia y humildad.*

*A mis hermanos Jesús, David, Elizabeth, Israel y Diana quienes han sido un apoyo fundamental y constante para lograr mis objetivos, brindándome siempre su mano en los momentos difíciles.*

*A mis sobrinos quienes me brindaron su alegría desde el momento que llegaron a mi vida, por todo su amor y su entusiasmo para vivir.*

**By INÉS**

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Técnica de Ambato recinto de formación académica, a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos que me dio la oportunidad de desarrollar y ejecutar un fructífero trabajo de investigación.

Un agradecimiento especial a mi Tutora, Ph.D. Linda Guamán, por su gran apoyo incondicional, quien impartió su valioso conocimiento e hizo posible la culminación de esta investigación. Al Ph.D. Orestes López, Ph.D. Dayana Morales, Ph.D. Carlos Barba y Ph.D. Sandra Horvitz por su apoyo, tiempo, motivación y dedicación en este trabajo de investigación.

Al proyecto “fortalecimiento de la unidad operativa de investigación en tecnología de alimentos (UOITA) para la investigación, tecnología e innovación en el área de alimentos, con el fin de promover la generación y desarrollo de empresas agroindustriales en la zona 3 del País; y monitorear el contenido de metales pesados en los cultivos afectados por las cenizas provenientes de las erupciones volcánicas del Tungurahua (FTTA-UOITA)”

A mis amigos Jorge, Stalin, Marlon, Santy, Lizbeth, Ximena, Evelyn, Selena, Mary, Jessica y en especial a David por su compañía y apoyo, quienes de alguna manera hicieron posible la elaboración de éste Proyecto, a todos mis buenos profesores y compañeros a quienes los he conocido durante mi carrera universitaria.

*Gracias a todos,*

***INÉS***

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPITULO I</b> .....	2
<b>EL PROBLEMA</b> .....	2
<b>TEMA</b> .....	2
<b>1.1. JUSTIFICACIÓN</b> .....	2
<b>1.2. OBJETIVOS</b> .....	4
<b>1.2.1. Objetivo general</b> .....	4
<b>1.2.2. Objetivos específicos</b> .....	4
<b>CAPITULO II</b> .....	5
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	5
<b>2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS</b> .....	5
<b>2.2. HIPÓTESIS</b> .....	8
<b>2.2.1. Hipótesis nula (H<sub>0</sub>)</b> .....	8
<b>2.2.2. Hipótesis alternativa (H<sub>a</sub>)</b> .....	8
<b>2.3. SEÑALAMIENTO DE LAS VARIABLES</b> .....	8
<b>2.3.1. Variable independiente</b> .....	8
<b>2.3.2. Variable dependiente</b> .....	8
<b>CAPITULO III</b> .....	9
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	9
<b>3.1. MATERIALES</b> .....	9
<b>3.1.1 MATERIA PRIMA</b> .....	9
<b>3.2. MÉTODOS</b> .....	9
<b>3.2.1. EXTRACCIÓN, MICROENCAPSULACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS</b> .....	9
<b>3.2.1.1 Obtención de harina de papa morada</b> .....	9
<b>3.2.1.2 Extracción de antocianinas de papa morada, maíz y mortiño.</b> .....	9
<b>3.2.1.3 Determinación de la concentración de antocianinas</b> .....	10
<b>3.2.1.4 Microencapsulación de antocianinas mediante Spray-Dryver</b> .....	11
<b>3.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	12
<b>3.2.1. Preparación de muestras</b> .....	12
<b>3.2.2. Preparación de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)</b> .....	12
<b>3.2.3. Medición de capacidad antioxidante</b> .....	12
<b>3.2.4. Curva de calibración</b> .....	13

3.2.5. Cálculo del porcentaje de inhibición de DPPH .....	13
<b>3.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN DISCO .....</b>	<b>14</b>
3.3.1. Cepas Bacterianas: medio de cultivo, condiciones de crecimiento y preservación.....	14
3.3.2. Resuspensión de antocianinas .....	14
3.3.3. Actividad antibacteriana .....	14
<b>3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>15</b>
<b>3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>16</b>
<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>17</b>
4.1. Análisis y discusión de los resultados .....	17
4.2. Verificación de las hipótesis .....	29
<b>CAPITULO V.....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>30</b>
5.1. Conclusiones .....	30
5.2. Recomendaciones .....	31
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores y niveles controlados en la evolución de actividad antimicrobiana de antocianinas microencapsuladas. ....	16
<b>Tabla 2</b> Concentración de Antocianinas (cianidina 3-glucósido) .....	18
<b>Tabla 3</b> Absorbancia de muestras con DPPH después de 40 min de incubación.....	19
<b>Tabla 4</b> Capacidad antioxidante de muestras vegetales .....	20
<b>Tabla 5</b> Normas de procedimiento para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión ( <b>Sacsquispe Contreras y Velásquez Pomar, 2008</b> ).....	22
<b>Tabla 6</b> La influencia antimicrobiana de 100 µL de antocianinas microencapsuladas de mortiño en cultivos de prueba.....	22
<b>Tabla 7</b> La influencia antimicrobiana de 100 µL de de antocianinas microencapsuladas de maíz morado en cultivos de prueba.....	23
<b>Tabla 8</b> La influencia antimicrobiana de 100 µL de de antocianinas microencapsuladas de papa morada en cultivos de prueba. ....	23
<b>Tabla 9</b> Inhibición de antocianos frente a patógenos .....	26
<b>Tabla 10</b> Medias para halos vs gentamicina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0% para bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach (ATCC® 25923™) ..	47
<b>Tabla 11</b> Medias para halos vs gentamicina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0% <i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 10145). ....	47
<b>Tabla 12</b> Medias para halos vs gentamicina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0% para <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™). ....	48
<b>Tabla 13</b> Tabla de Medias para halos vs gentamicina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0% para <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC® 19115™).....	48
<b>Tabla 14</b> Tabla de Medias para halos vs gentamicina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0% para <i>Bacillus cereus</i> (ATCC® 11778™). ....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Harina de papa morada y ajuste de pH.....	10
<b>Figura 2.</b> Microencapsulación de antocianinas mediante secado por aspersión .....	11
<b>Figura 3.</b> Preparación de muestras .....	13
<b>Figura 4.</b> Sembrado en placa difusión en agar .....	15
<b>Figura 6</b> Medias y 95,0 % de Tukey y HDS para <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™)....	24
<b>Figura 7</b> Medias y 95,0 % de Tukey y HDS para <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach (ATCC® 259).....	24
<b>Figura 8</b> Medias y 95,0 % de Tukey y HDS para <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC® 19115™) .....	25
<b>Figura 9</b> Medias y 95,0 % de Tukey y HDS para <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 10876).....	25
<b>Figura 10</b> Medias y 95,0 % de Tukey y HDS para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145) .....	26
<b>Figura 11</b> Resultados de actividad antibacteriana de antocianinas de Maíz morado frente a <i>B. cereus</i> , C1 concentración 534,1 µg/ml ; C2 concentración 400,5 µg/ml : C3 concentración 267,05 µg/ml ; C4 concentración 138,52 µg/ml ; C5 concentración 53,4 µg/ml ; C- Control negativo (agua) : C+ Control positivo (Gentamicina) 450 µg/ml .....	27
<b>Figura 12</b> Extracción de antocianinas a partir de harinas de diferentes matrices vegetales..	39
<b>Figura 13</b> Ajuste de PH e incubación .....	39
<b>Figura 14</b> Evaporador .....	40
<b>Figura 15</b> Preparación de concentrado y encapsulación .....	40
<b>Figura 16</b> Preparación de muestras .....	41
<b>Figura 17</b> Preparación de Trolox y DPPH .....	41
<b>Figura 18</b> Preparación de celdas e incubación .....	42
<b>Figura 19</b> Medición de absorbancia a 515 nm .....	42
<b>Figura 20</b> Curva de calibración de Trolox con porcentaje de Inhibición.....	43
<b>Figura 21</b> Preparación de placas agar MULLER HINTON.....	43
<b>Figura 22</b> Medición de OD y preparación de solución salina.....	44
<b>Figura 23</b> Preparación de muestras de antocianinas .....	44
<b>Figura 24</b> Sembrado en placas .....	45
<b>Figura 25</b> Resultados de actividad antibacteriana de antocianinas de Maíz morado frente a <i>S. aureus</i> , C1 concentración 534,1 µg/ml ; C2 concentración 400,5 µg/ml : C3 concentración 267,05 µg/ml ; C4 concentración 138,52 µg/ml ; C5 concentración 53,4 µg/ml ; C- Control negativo (agua) : C+ Control positivo (Gentamicina) 450 µg/ml .....	45
<b>Figura 26</b> Resultados de actividad antibacteriana de antocianinas de papa morada frente a <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> , C1 concentración 111,75 µg/ml ; C2 concentración 83,81 µg/ml : C3 concentración 55,87 µg/ml ; C4 concentración 27,93 µg/ml ; C5 concentración 11,17 µg/ml ; C- Control negativo (agua) : C+ Control positivo (Gentamicina) 450 µg/ml. ....	46
<b>Figura 27</b> Resultados de actividad antibacteriana de antocianinas de mortiño frente a <i>S. aureus</i> , C1 concentración 122,5 µg/ml ; C2 concentración 91,68 µg/ml : C3 concentración 61,13 µg/ml ; C4 concentración 30,56µg/ml ; C5 concentración 12,23µg/ml ; C- Control negativo (agua) : C+ Control positivo (Gentamicina) 450 µg/ml.....	46

## RESUMEN

En la actualidad, múltiples estudios han reportado la actividad biológica de diversos metabolitos secundarios de plantas, entre ellos uno de los más estudiados son las antocianinas. El interés por los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Además son utilizados como colorantes alimenticios, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana y actividad antioxidante de antocianinas microencapsuladas del Maíz Morado (*Zea mays L.*), Papa Morada (*Solanum tuberosum*) y Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

La obtención de antocianinas se realizó utilizando etanol acidificado, seguidamente se realizó la encapsulación de los compuestos bioactivos por el método de secado por aspersión (spray dryer) con el polímero maltodextrina. Para las pruebas de actividad biológica todos los ensayos se realizaron por triplicado. La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó por el método de DPPH el cual se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, obteniendo que las antocianinas extraídas de mortiño tuvieron el mayor porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto. Por otro lado se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos mediante el método de difusión en disco utilizando las siguientes bacterias indicadoras: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*; gentamicina como control positivo y agua estéril como control negativo, se determinó que las antocianinas extraídas de papa morada presentó mayor actividad antimicrobiana frente a los patógenos evaluados.

**Palabras Claves:** maíz morado, papa morada, mortiño, antocianinas, capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana.

## ABSTRACT

In the last years, several studies have described the biological activity of various plant secondary metabolites including one of particular interest; anthocyanins. Besides to their pharmacological and therapeutic properties, anthocyanins are used as food dyes and have great potential for obtaining products with added value for human consumption.

The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of microencapsulated anthocyanins isolated from three Andean plants: purple corn (*Zea mays indurata*), purple potato (*Solanum tuberosum*), and Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth).

Anthocyanins were extracted using acidified ethanol and microencapsulated into maltodextrin particles using spray drying. All biological activity assays were performed in triplicate. The antioxidant capacity was evaluated by the DPPH method, which is based on the stability of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. The anthocyanins extracted from the Andean blueberry showed the greatest antioxidant effect. On the other hand, the evaluation of the antimicrobial activity of the extracts was carried out by disc diffusion method, comparing the antimicrobial activity of each extract, with a positive control (the antibiotic gentamicin) and a negative control (sterile water). *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* were used as indicators. From these tests, it was determined that the anthocyanins extracted from the purple potato presented the highest antimicrobial activity against the indicator bacteria.

**Keywords:** purple corn, purple potato, Andean blueberry, anthocyanins, antioxidant activity, antimicrobial activity.

## INTRODUCCIÓN

En Ecuador la región de los Andes se caracteriza por tener alta biodiversidad, resultado de la variedad de ecosistemas debido a la ubicación geográfica, lo cual, junto con otros factores, han llevado a poseer gran diversidad de flora y fauna. En el caso de los cultivos, existe un sinnúmero de productos andinos tradicionales, como por ejemplo papa morada, maíz morado, mortiño entre otros, los mismos que se encuentran destinados al autoconsumo y producción local (**Monteros *et al.*, 2005**). En cuanto, a la producción y comercio de productos andinos, éstos se han reducido considerablemente tanto por la escasez de semillas y desinterés por parte del agricultor debido a la baja rentabilidad que se obtiene de estos productos, así como por el desconocimiento de los varios beneficios terapéuticos reportados en años recientes asociados al consumo de estos productos.

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que difieren en un amplio espectro de colores que van desde colores violeta, rojo, azules y naranja. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza como en flores, frutas, hojas e incluso en raíces; y recientemente, se han reportado diversas actividades biológicas lo que los hace candidatos para su uso farmacológico, además de su uso como colorantes(Dalgo *et al.*, 2014).

Diferentes estudios han confirmado que las antocianinas aportan gran beneficio para la salud ya que el consumo de frutas, vegetales y tubérculos ricos en antioxidantes, ayudan a contrarrestar enfermedades cardiovasculares y degenerativas (**Cerón *et al.*, 2010**). Los polifenoles, especialmente las antocianinas, inhiben la proliferación de las células cancerosas cultivadas *in vitro* (**Cooke *et al.*, 2005**).

Dentro de este contexto, es importante que la actividad biológica presentada por estos compuestos permanezca viable, ya que se ha reportado que las antocianinas son sensibles al cambio de pH, temperatura y oxígeno (**Burgos Aguilar *et al.*, 2016**). Razón por la cual, a fin de evaluar la actividad biológica de antocianinas extraídas a partir de cultivos andinos, en primer lugar se micro encapsularon estos compuestos mediante la tecnología *spray-dryer*.

# CAPITULO I

## EL PROBLEMA

### TEMA

“Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de antocianinas microencapsuladas de Maíz Morado (*Zea mays L.*), Papa Morada (*Solanum tuberosum L.*) y Mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*).”

### 1.1. JUSTIFICACIÓN

Ecuador un país rico en flora y fauna de lo más diversa, con gran variedad de climas que permite el desarrollo y cultivo de múltiples productos especialmente en la zona andina como son los tubérculos, cereales y frutas nativas. Los cultivos andinos han sido tradicionalmente consumidos en zonas rurales y forman parte de los hábitos alimenticios de los pobladores urbanos (**Peralta et al., 2006**). Los granos andinos como el maíz morado, la papa morada y mortiño por su alto valor nutritivo y económico contienen componentes bioactivos (**Flores Ccasa et al., 2015**). En la actualidad, no existe una integración e investigación de los cultivos andinos que contienen compuestos fenólicos y su actividad biológica como por ejemplo la capacidad antioxidante y capacidad antimicrobiana en los procesos de transformación, almacenamiento y comercialización de productos derivados, debido al poco interés que se pone en el desarrollo de nuevos alimentos o productos que permiten el uso de cultivos andinos de manera eficiente (**Riofrío Pazmiño, 2010**).

El interés por los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas (**Quesada y Muñoz, 2013**). Por lo tanto, además de su papel funcional como colorante alimenticio, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales también presentan actividad antiproliferativa (**Zhao et al., 2004**).

Según **Kong et al. (2003)** las antocianinas a pesar de su actividad biológica son sensibles a la luz, el oxígeno, alteración de pH y altas temperaturas, por lo tanto es importante proteger de estos factores para una correcta evaluación de sus actividades biológicas, por ende la microencapsulación es una tecnología que contribuye al

procesamiento de alimentos al preservar su contenido nutricional, favorecer la conservación de sabores, aromas, vitaminas, conserva los compuestos bioactivos o antioxidantes en frutas y proteger las sustancias sensibles al ambiente (**Guevara et al., 2016**).

Por esta razón la evaluación de la actividad antimicrobiana de antocianinas extraídas y microencapsuladas a partir de cultivos andinos del Ecuador, se presenta como una alternativa para promover la producción, extracción de antocianinas y posibles aplicaciones en la industria alimenticia, desde un punto de vista funcional o nutricional (**Gonzalez et al., 2007**).

Las antocianinas extraídas de cultivos andinos se pueden utilizar para contrarrestar las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) que abarcan una amplia gama de enfermedades, y son consideradas un problema de salud cada vez mayor. En Ecuador la tendencia de este evento en los últimos años ha ido en aumento a pesar del subregistro de notificación. Las principales enfermedades transmitidas por alimentos, son originadas por malas prácticas de manufactura y cosecha causados por microorganismos como *Vibrio cholerae*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, y *Escherichia coli* (**Sempértegui Puente, 2017**). Es por esta razón que la evaluación de la actividad antimicrobiana de estos compuestos en contra de bacterias patógenas asociadas a ETAS representan un gran aporte para la industria de alimentos, ya que por su naturaleza, estos compuestos pueden ser utilizados como colorantes en varios productos.

Otra actividad biológica descrita para algunas antocianinas es la capacidad antioxidante, la cual es importante debido a que un aumento en la ingesta de antioxidantes dietarios puede proteger de enfermedades crónicas, además la industria de alimentos incorpora antioxidantes naturales de tejidos vegetales debido a restricciones legales para el uso de colorantes sintéticos (**Figuroa-Cares et al., 2010**). En la mayoría de estudios publicados se ha realizado la identificación y cuantificación de los pigmentos (**Santacruz Cifuentes, 2011**). En los últimos años se ha despertado un mayor interés dentro del mundo de la investigación debido a la capacidad que tienen determinados compuestos para neutralizar los radicales libres (**López-Alarcón y Denicola, 2013**), la evaluación de la capacidad antioxidante para determinar la eficiencia de los antioxidantes naturales, en relación a la protección de los productos vegetales contra daños oxidativos y pérdida de valor nutritivo (**Robles-Sánchez et al.,**

2007). Estudios sobre la evaluación de la capacidad antioxidante en frutos han revelado aspectos interesantes en relación al comportamiento de los constituyentes antioxidantes (Eberhardt *et al.*, 2000).

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo general

- Evaluar la capacidad antimicrobiana y actividad antioxidante de antocianinas microencapsuladas del Maíz Morado (*Zea mays L.*), Papa Morada (*Solanum tuberosum L.*) y Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Extraer antocianinas de Maíz Morado, Papa Morada y Mortiño.
- Microencapsular mediante secado por aspersion y cuantificar antocianinas del maíz morado, papa morada y mortiño.
- Evaluar la actividad antimicrobiana por el método de difusión utilizando las siguientes bacterias indicadoras: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.
- Determinar la capacidad antioxidante por el método DPPH.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

En Ecuador, la Región Andina o Sierra está conformada por 11 provincias a lo largo de la Cordillera de los Andes, es una zona muy diversa en cuanto a ecosistemas. Por su topografía inclinada y rango altitudinal y latitudinal, se distinguen una gran variedad de zonas de vida, las especies nativas como el Maíz Morado (*Zea mays* L.), Papa Morada (*Solanum tuberosum* L.), Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) entre otras, son las especies más usadas por productores tradicionales (**Hofstede et al., 1998**). En la región Sierra se puede encontrar gran variedad de granos, tubérculos, frutas y hojas pigmentadas en las cuales pueden predominar los carotenoides o los flavonoides del tipo antocianinas (**Timothy et al., 1966**).

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles los cuales son responsables de una gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en distintas frutas, vegetales y cereales, mismos que se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula (**Morales Cabrera, 2011**). Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta como la atracción de polinizadores, protección contra los efectos de la radiación ultravioleta, contra la contaminación viral y antimicrobiana (**Garzón, 2008**).

El interés e investigación científica de los pigmentos antociánicos se han incrementado en los últimos años, debido al papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes; y a sus efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual. Por otro lado, las antocianinas además de su papel funcional como colorantes, son agentes potenciales para la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. La actividad biológica de estos compuestos es de muy corto plazo, debido a la rápida oxidación en condiciones ambientales y a la degradación durante el procesamiento de los alimentos, sucediendo una pérdida total o parcial de los mismos, ocasionando la pérdida de sus propiedades funcionales y limitando su aplicación para productos de consumo humano. Factores como la estructura química, pH, temperatura, oxígeno, actividad de agua, determinan la estabilidad del pigmento. Para proteger de los efectos ambientales la microencapsulación es una alternativa (**Wrolstad et al., 2005**). Como lo describe **Arrazola et al. (2014)**, en el cual se detalla la extracción de antocianinas de cáscaras de berenjena, mediante diferentes concentraciones de etanol

acidificado, mismos que posteriormente fueron microencapsulados y evaluados la influencia de las condiciones de secado por aspersión.

Para la conservación de las propiedades fisicoquímicas de sustancias químicas o compuestos bioactivos, en la actualidad se utiliza la microencapsulación mediante el secado por aspersión. Se sabe que muchos alimentos, como jugos, zumos de frutas, vegetales y compuestos farmacológicamente activos, fácilmente pierden su actividad biológica por oxidación, cuando se exponen al ambiente (**Pérez-Alonso et al., 2008**). Esta situación sugiere la necesidad de aplicar técnicas que impidan esta degradación o reducir los efectos del envejecimiento de las células.

La microencapsulación de compuestos con actividad biológica (proteínas, enzimas, etc.), desde un punto de vista tecnológico se define como el proceso de recubrimiento de dichos compuestos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. El producto resultante de este proceso tecnológico recibe la denominación de “microesfera” o “microcápsula”, dependiendo de cuál sea su morfología y estructura interna (**Lopretti et al., 2011**).

El mortiño, *Vaccinium floribundum* Kunth, pertenece a la familia *Ericaceae* y es nativo de la zona alto andina y se encuentra distribuido desde Venezuela hasta Bolivia (**Coba Santamaría et al., 2012**). El mortiño se caracteriza por su alto contenido de fenoles, antocianinas y una alta actividad antioxidante (**Gaviria Montoya et al., 2012**). El género *Vaccinium* tiene aproximadamente 400 especies y los frutos han atraído el interés de muchos investigadores alrededor del mundo, debido al alto contenido de compuestos polifenólicos, tales como ácido cinámico, flavonoles, antocianinas y antocianidinas.

La actividad antioxidante de las bayas del género *Vaccinium* como: arándano y arándano rojo se ha encontrado que está influenciada por el contenido de antocianinas y fenoles totales, los genotipos, la variación en las condiciones ambientales, el estado de madurez de las frutas y de las condiciones de almacenamiento en poscosecha (**Gaviria Montoya et al., 2012**).

Por otro lado el consumo de tubérculos frescos como las papas nativas por parte de la población andina es muy importante ya que la mayor parte de producción se destina al autoconsumo. Las papas pigmentadas proveen una fuente natural de fenoles, pues contienen antocianinas que son compuestos hidrosolubles responsables de los colores

azul, púrpura y rojo de muchas frutas y vegetales. El contenido de polifenoles y antocianinas presentes en los vegetales están asociados con la salud debido a su actividad antioxidante, entonces las papas pigmentadas constituyen una fuente de alimentos funcionales dándole un valor agregado potencial, lo cual permitiría alcanzar nuevos mercados alternativos como la industria alimentaria incluyendo los mercados de suplementos dietéticos, cosméticos y farmacéuticos (**Mamani et al., 2011**).

Según **Drago Serrano (2007)**, menciona que especies vegetales elaboran compuestos polifenólicos conocidos como flavonoides de interés en la industria farmacéutica por sus potenciales aplicaciones terapéuticas. Los flavonoides son metabolitos secundarios exclusivamente de origen vegetal distribuidos en algunas plantas consideradas como alimentos funcionales, pues además de su valor nutricional, aportan un beneficio a la salud.

**Salinas-Moreno et al. (2012)**, mencionan que las antocianinas del grano de maíz poseen actividades biológicas, especialmente su actividad antioxidante (AA), encontrándose principalmente en las antocianinas de los granos rojos y azul/morados. Además participan los ácidos fenólicos y otros flavonoides sin color, como la quercetina, que se extraen conjuntamente con las antocianinas.

**Kuskoski et al. (2005)**, han realizado la aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpas de frutos, en el cual mencionan que los resultados obtenidos con los métodos DDPH Y ABTS, permiten alcanzar resultados prácticamente iguales con desventaja de medición ya que los resultados mediante el método DPPH se obtienen en 30 minutos y con el método ABTS en 1 minuto aproximadamente.

En años recientes varios estudios han demostrado que las antocianinas presentan una alta gama de actividades biológicas, como son efectos antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios y anticancerígenos (**Xu y Howard, 2012**).

**Mex-Alvarez et al. (2013)**, evaluaron la actividad antioxidante en algunas variedades de maíz, por la técnica de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), reportando que la variedad morada presentó mayor actividad antioxidante. Además menciona que el uso del ensayo DPPH proporciona una manera fácil y rápida de evaluar los antioxidantes por espectrofotometría, por lo que puede ser útil evaluar varios productos a la vez.

## **2.2. HIPÓTESIS**

### **2.2.1. Hipótesis nula (H<sub>0</sub>)**

Las antocianinas de mortiño, maíz morado y papa morada tienen el mismo efecto de inhibición en los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup>), *Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach* (ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>TM</sup>), *Listeria monocytogenes* (ATCC<sup>®</sup> 19115<sup>TM</sup>), *Bacillus cereus* (ATCC<sup>®</sup> 11778<sup>TM</sup>) y *Pseudomona aeuruginosa* (ATCC 10145).

### **2.2.2. Hipótesis alternativa (H<sub>a</sub>)**

Las antocianinas de mortiño, maíz morado y papa morada no tienen el mismo efecto de inhibición en los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup>), *Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach* (ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>TM</sup>), *Listeria monocytogenes* (ATCC<sup>®</sup> 19115<sup>TM</sup>), *Bacillus cereus* (ATCC<sup>®</sup> 11778<sup>TM</sup>) y *Pseudomona aeuruginosa* (ATCC 10145).

## **2.3. SEÑALAMIENTO DE LAS VARIABLES**

### **2.3.1. Variable independiente**

- Tipo de antocianinas,

### **2.3.2. Variable dependiente**

- Halo de Inhibición de crecimiento de bacterias.

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIALES**

##### **3.1.1 MATERIA PRIMA**

Las muestras a evaluar papa morada, maíz morado y mortiño se adquirieron en un mercado local, ubicado en la Provincia de Tungurahua, Cantón Ambato sector Mayorista.

#### **3.2. MÉTODOS**

##### **3.2.1. EXTRACCIÓN, MICROENCAPSULACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS**

###### **3.2.1.1 Obtención de harina de papa morada**

Para la obtención de harina se lavó y se eliminó todas las impurezas, se realizaron hojuelas para facilitar el proceso de secado el mismo que duró 24 horas a una temperatura de  $52\pm 1$  °C en secador de bandeja marca GRANDER MTN. Posteriormente las hojuelas secas se pulverizaron en el molino universal marca M20 IKA-WERKER, y se obtuvo la harina.

###### **3.2.1.2 Extracción de antocianinas de papa morada, maíz y mortiño.**

Para la extracción de antocianinas de las matrices se utilizó el método descrito por (E.-S. Abdel-Aal y P. Hucl, 1999) con modificaciones. Con la harina se preparó una disolución, harina /disolvente en relación 1:20, el disolvente es una mezcla de (etanol: ácido clorhídrico HCl 1N; relación 85:15), y se ajustó el pH a 1 añadiendo HCl 4N, se mantuvo en agitación durante 60 minutos a 68 °C, y finalmente se centrifugó (HETTICH EBA 12) durante 15 minutos a 15000 rpm . Como se muestra en la figura 1. Se recogió el sobrenadante y se eliminó el disolvente mediante evaporación al vacío a una temperatura de 70 °C.



**Figura 1.** Harina de papa morada y ajuste de pH

### 3.2.1.3 Determinación de la concentración de antocianinas

Una vez obtenido el extracto líquido de las matrices se determinó la concentración de antocianinas según **E.-S. Abdel-Aal y P. Hucl (1999)** a través de la medición de la absorbancia en espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC modelo 4001/4 a 535 nm para reemplazar en la ecuación 1:

#### Ecuación 1

$$C = \frac{A}{\epsilon} \times \frac{vol}{1000} \times MW \times \frac{1}{sample\ wt} \times 10^6$$

#### Donde:

**C:** Es la concentración de antocianinas mg/kg, se dividió sobre 10 para obtener el resultado en mg/100g

**A:** Es la absorbancia obtenida a 535 nm

**ε:** Absortividad molar (cianidina 3-glucósido 25965 cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>)

**Vol:** Volumen total del extracto de antocianinas (5 ml)

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

### 3.2.1.4 Microencapsulación de antocianinas mediante Spray-Dryer

La microencapsulación de antocianinas de las matrices se realizó en la universidad técnica de Ambato – Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos – Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo (UODIDE) en el equipo BUCHI MINI SPRAY DRYER.

Se preparó la disolución maltodextrina como agente encapsulante, componente activo en relación (80:20), la solución se realizó mediante agitación con un agitador vertical (ARROW ENGINEERING model 6000) a 40 °C en la plancha de calentamiento (FISHER SCIENTIFIC Isotemp Heated Magnetic Stirrer/Hotplate), la disolución principio activo/maltodextrina se secó por aspersión (Buchi Mini Spray Dryer B-290) a una presión de (-50 mbar), a temperatura de entrada de 150 °C y temperatura de salida de 90 °C cuando el proceso finaliza se apagó la temperatura de entrada y se dejó pasar agua hasta que la temperatura indique 100 °C, luego se cerró el flujo de agua y aire como se indica en la figura 2. Para obtener el producto cuando la temperatura sea 70 °C se procedió a desensamblar el equipo y recuperar el producto seco (**López Hernández, 2010**)



**Figura 2.** Microencapsulación de antocianinas mediante secado por aspersión

### 3.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante se realizó mediante el método descrito por **Brand-Williams et al. (1995)** con modificaciones, mediante inhibición del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil). Se utilizó las antocianinas microencapsuladas de papa morada directamente, para maíz morado y mortiño se realizó una dilución de 1:10 (microencapsulado:etanol/agua) y se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC modelo 4001/4. Los resultados se expresaron como equivalentes de  $\mu\text{mol}$  de Trolox/100 g de muestras y para los cálculos se utilizó una curva de Trolox (50-500  $\mu\text{mol/L}$ ).

#### 3.2.1. Preparación de muestras

Se pesaron 0,5 g de muestra antocianinas microencapsuladas y se disolvieron en 25 ml de agua/etanol (50:50 v/v). Se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos.

#### 3.2.2. Preparación de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Se pesaron 0,0023 g de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y se disolvieron en 100 ml de metanol (80%). La preparación tuvo una concentración de 60  $\mu\text{M}$ /litro.

#### 3.2.3. Medición de la capacidad antioxidante

Para la medición de la capacidad antioxidante se debe tener en cuenta lo siguiente:

**Blanco:** 3000  $\mu\text{l}$  de metanol (80%)

**Control:** 2000  $\mu\text{l}$  DPPH+ 65  $\mu\text{l}$  agua destilada

El **blanco** se utilizó para la calibración del espectrofotómetro.

La media de los valores del **control** forma parte de la fórmula de cálculo del método. En una cubeta de plástico se colocaron 65  $\mu\text{l}$  del extracto y posteriormente se añadieron 2000  $\mu\text{l}$  de DPPH, se dejó incubar en la oscuridad durante 40 min y finalmente se midió la absorbancia de la muestra con un espectrofotómetro (THERMO SCIENTIFIC, Estados Unido) a 515 nm, como se indica en la figura 3.



**Figura 3.** Preparación de muestras

### **3.2.4. Curva de calibración**

Para la obtención de la curva de calibración se pesó 0,0125 g de Trolox y se colocó en 100 ml de etanol/agua (50:50 v/v), la solución tiene una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . Posteriormente se procedió a realizar las siguientes diluciones de la solución madre 50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{M}$ .

### **3.2.5. Cálculo del porcentaje de inhibición de DPPH**

Para obtener el porcentaje de inhibición de DPPH se utilizó la ecuación 2.

*Ecuación 2*

$$\% \text{INHIBICIÓN DPPH} = (1 - (Abs_{muestra} - Abs_{control})) * 100$$

**Donde:**

**Abs muestra:** absorbancia a 515 nm de la muestra

**Abs control:** absorbancia a 515 nm del control

### 3.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN DISCO

#### 3.3.1. Cepas Bacterianas: medio de cultivo, condiciones de crecimiento y preservación.

La evaluación de actividad antibacteriana se utilizó con bacterias Gram-positivas *Listeria monocytogenes* (ATCC<sup>®</sup> 19115<sup>™</sup>), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach* (ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>™</sup>), y Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), cepas gentilmente donadas por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Azuay a cargo de la PhD (c) Ma. Fernanda Rosales.

Para el repique de las bacterias se utilizó caldo Tripticasa de Soya (TSB), 2% (w/v) para estriado previo y los ensayos como control de pureza. Las cepas se preservaron en caldo TSB con un 20% de glicerol estéril (v/v) a -80 °C.

#### 3.3.2. Resuspensión de antocianinas

A partir de 4 gramos de antocianinas microencapsuladas de las matrices vegetales (papa morada, maíz morado y mortiño), se realizó resuspensión de antocianinas con agua destilada estéril y agitación en VÓRTEX MIXER marca LABNET.

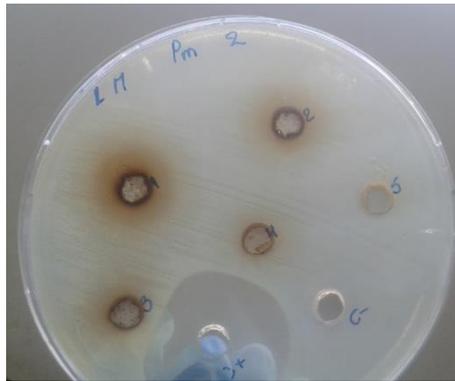
#### 3.3.3. Actividad antibacteriana

Se sembraron las bacterias en caldo Tripticasa de Soya (TSB) al 1%, en tubos de ensayo estériles con 5 ml de caldo TSB, se inocularon las bacterias indicadoras y se incubaron a 37 °C a 200 rpm de agitación MINI SHAKER marca IKA por 18 horas. Los cultivo se ajustaron a una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 0.1 (Hood *et al.*, 2010), en solución salina 0.9% (w/v) que corresponde aproximadamente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml (Riverón-Rodríguez *et al.*, 2012), luego cada cultivo se diluyó hasta  $1 \times 10^3$  ó  $1 \times 10^5$  UFC/ml.

Las suspensiones bacterianas fueron inoculadas en Mueller Hinton (MH) agar utilizando la técnica de difusión con ayuda de un hisopo estéril. Una vez inoculadas las 5 bacterias indicadoras se realizó 7 pozos de 8 mm de diámetro en la placa de MH.

A cada pozo se adicionó 100 µl de solución de antocianina en las siguientes concentraciones C1: 100, C2: 75, C3: 50, C4: 25, C5: 10 (µg/ml). Se utilizó agua destilada estéril como control negativo y gentamicina como control positivo

antibiótico de amplio espectro a una concentración de 450 µg/ml en cámara de flujo laminar marca ESCO ABC-4A2. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C en incubadora ESCO, marca IFA-10T-8. Después de la incubación, se midió las zonas de inhibición y el efecto se calculó como una media de 3 pruebas replicadas ver figura 4.



**Figura 4.** Sembrado en placa difusión en agar

### 3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplicó un diseño multifactorial de bloques, donde factor A son las 5 bacterias ((*Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Rosenbach (ATCC® 25923™), *Listeria monocytogenes* (ATCC® 19115™), *Bacillus cereus* (ATCC® 11778™) y *Pseudomona aeruginosas* (ATCC 10145)) y factor B son las 3 matrices vegetales (maíz morado, papa morada y mortiño), todos los tratamientos se realizaron por triplicado ver Tabla 1.

**Tabla 1.** Factores y niveles controlados en la evolución de actividad antimicrobiana de antocianinas microencapsuladas.

Factor		Niveles
A	<b>Bacterias</b>	a0: <i>Staphylococcus aureus</i>
		a1: <i>Listeria monocytogenes</i>
		a2: <i>Pseudomona aeruginosas</i>
		a3: <i>Bacillus cereus</i>
		a4: <i>Escherichia coli</i>
B	<b>Matriz</b>	b0: Mortiño
	<b>Vegetal</b>	b1: Maíz morado
		b2: Papa morada

Se considerarán como variables de respuesta el diámetro del halo de inhibición.

### 3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron comparados mediante un análisis de varianza y la comparación de medias de tukey ( $\alpha=0,05$ ), mediante el programa estadístico Startgrahies centurión XV.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Análisis y discusión de los resultados

Las antocianinas, se caracterizan por ser compuestos hidrosolubles, responsables de la formación de los colores de flores, frutas y verduras (**Braverman *et al.*, 1980**). A la vez se caracterizan por ser compuestos fenólicos con estructura básica, químicamente las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la cual se une un azúcar por medio del enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de la aglicona es el ión flavilo (**Salvador, 1993**). Los beneficios que proporcionan las antocianinas a la salud humana son la protección del sistema circulatorio y la prevención de enfermedades neurodegenerativas (**Kuskoski *et al.*, 2004**).

Las características físicas del grano que afectan a la concentración de antocianinas son tamaño y color principalmente (**Salinas Moreno *et al.*, 2012**), la extracción y cuantificación se lo realizó mediante el método descrito por (**M. Abdel-Aal y P. Hucl, 1999**), utilizando etanol y ácido clorhídrico HCl 1M con el objetivo de obtener la formación del catión flavilio, el cual es estable en un medio ácido. En la cuantificación de antocianinas las concentraciones fueron expresadas en cianidina 3-glucósido el cual es el pigmento antociano presente en mayor proporción en frutos y cereales, por lo tanto se midió la absorbancia de la muestra a 515 nm ver Tabla 2. Según **Abdel-Aal *et al.* (2006)**, el contenido de antocianinas totales en maíces pigmentados varían de acuerdo con el genotipo, condiciones de cultivo, o el tratamiento a que sean sometidos en el procesamiento sin embargo el valor obtenido guardo relación con otros referidos previamente. En este sentido **Žilić *et al.* (2012)**, reportaron el contenido de antocianinas en diferentes tipos de maíces pigmentados de 2,50 a 696,07 mg/kg de antocianinas lo cual corrobora el contenido determinado de antocianinas en maíz morado detallado en la tabla 2.

**Tabla 2** Concentración de Antocianinas (cianidina 3-glucósido)

<b>MATRIZ VEGETAL</b>	<b>mg/100 g</b>
<b>Maíz morado</b>	267.058±1
<b>Mortiño</b>	122,240±1
<b>Papa morada</b>	168,500±1

El contenido de antocianinas totales de las diferentes matrices vegetales expresado en miligramos por 100 gramos de harina se detalla en la tabla 2. Se determinó una concentración de 122,240 mg/100 g de harina en el mortiño o arándano andino *Vaccinium floribundum* Kunth, el cual está dentro del rango de contenido de antocianinas totales de 92-235 reportado para frutos de otras especies de bayas por **(Prior et al., 1998)**. El contenido de antocianinas encontrado en la papa morada fue de 168,500 mg/100 g de harina, encontrándose dentro del rango reportado por **(Segura Peña, 2004)**, en el cual identificaron a la pelargonidina-3-rutinósido-5- glucósido acilada, como la mayor antocianina presente en papas con un 67,4% del total de pigmentos antociánicos.

En cuanto a la estabilidad de las antocianinas, está depende de factores ambientales y químicos. Los factores que afectan la estabilidad de las antocianinas son la temperatura, pH, oxígeno, enzimas, presencia de copigmentos, iones metálicos azúcares **(Hutchings, 1994)**. Para prolongar la estabilidad de las antocianinas se utilizó la técnica de encapsulación mediante el secado por aspersion (spray dryer), que es uno de los procesos más utilizados para encapsular agentes bioactivos. Según **Yepez y Luis (2013)** mencionan que la encapsulación de antocianinas mediante el secado por aspersion utilizando maltodextrina produce encapsulados con un rendimiento de 14,9% y con una pérdida de 1.5% de antocianinas. Los parámetros a controlar para la encapsulación de antocianinas fueron la temperatura de entrada de 150 °C y temperatura de salida de 90 °C mismos que son fundamentales en la obtención de encapsulados **(López Hernández, 2010)**.

Otra de las actividades biológicas reportadas para las antocianinas y que fue también objeto de estudio fue la capacidad antioxidante medida mediante el método DPPH el cual se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (**Brand-Williams et al., 1995**).

Un antioxidante es una sustancia que disminuye o inhibe la oxidación de otras sustancias. Los antioxidantes presentes en frutas y verduras protegen la salud humana, previniendo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, visuales y cáncer (**Bernal-Roa et al., 2011**), las antocianinas tienen una excelente actividad antioxidante debido a que son donadores de electrones o hidrogeno dando la formación de radicales intermedios relativamente estables, a la vez son capaces de quelar metales, inhibir la enzima lipooxigenasa y captar radicales libres (**Wang y Stoner, 2008**).

Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó el método propuesto por (**Brand-Williams et al., 1995**). En la tabla 3, se muestra las absorbancias de las muestras con DPPH medidas a 515 nm después de 40 minutos de incubación. Se puede evidenciar el porcentaje de inhibición del radical DPPH después de la incubación dando como resultado que el mortiño tiene mayor capacidad antioxidante en comparación con las antocianinas de maíz morado y papa morada.

**Tabla 3** Absorbancia de muestras con DPPH después de 40 min de incubación

<b>RELACIÓN MUESTRA : DPPH 65/2000 µl</b>			
<b>Papa Morada</b>	<b>Maíz Morado 1/10</b>	<b>Mortiño 1/10</b>	<b>BLANCO REACTIVO</b>
0,359	0,421	0,31	0,442
0,356	0,421	0,31	0,442
0,354	0,421	0,31	0,442
$\bar{x}$ 0,356	$\bar{x}$ 0,421	$\bar{x}$ 0,031	
$\sigma$ 0,003	$\sigma$ 0,00	$\sigma$ 0,00	
<b>% inhibición</b>	<b>% inhibición</b>	<b>% inhibición</b>	0,442
19,382	4,751	29,864	

La tabla 4 muestra la capacidad antioxidante de las muestras vegetales obtenidas mediante el método de DPPH el cual se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, propuesto por **(Brand-Williams et al., 1995)**,

**Tabla 4** Capacidad antioxidante de muestras vegetales

MUESTRAS	eq a $\mu\text{M}$ de Trolox /mg de antocianinas
<b>Papa morada</b>	5125,28 $\pm$ 1
<b>Maíz morado</b>	9736,49 $\pm$ 1
<b>Mortiño</b>	106023,84 $\pm$ 1

Con respecto a la matriz vegetal correspondiente a la papa morada *Solanum tuberosum L.*, es un cultivo ancestral andino que presenta una pigmentación rojo-morado, debido a la presencia de antocianinas y licopeno, que son indicativos de la presencia de antioxidantes naturales, la capacidad antioxidante de las antocianinas extraídas de papa morada fue de 5125,28 eq a  $\mu\text{M}$  de Trolox /mg de antocianinas, dicho valor se encuentra próximo al rango reportado por **Castillo Melgar (2012)**, quien obtuvo valores de capacidad antioxidante entre 5835.52 a 8887.46  $\mu\text{g}$  de Trolox equivalente/g. m. en base húmeda, y 15503.1 a 32590.61  $\mu\text{g}$  de Trolox equivalente /g. m. en base seca, en cultivares de papa nativa de pulpa morada, a la vez **(Brown et al., 2005)**, mencionan que los valores altos de capacidad antioxidante es debido al contenido de vitamina C, por su parte **(Lewis et al., 1998)** señalan que en los tubérculos las principales antocianinas encontradas son glucósidos diversos de pelargonidina, petunidina y malvidina. Además **Reddivari (2007)**, indicó que entre las antocianidinas, malvidina es el antioxidante más potente, mientras que la cianidina muestra tres veces más antioxidantes que el potencial de pelargonidina.

Por otra parte las antocianinas extraídas y microencapsuladas de maíz morado tuvieron una capacidad antioxidante de 9736,49 $\pm$ 1 eq a  $\mu\text{M}$  de Trolox /mg de antocianinas, por su parte **(Aoki et al., 2002)**, informaron sobre la existencia de cianidina 3- glucósido en el maíz (*Zea Mayz L.*) de la variedad morado en porcentaje del 70%, por ende la capacidad antioxidante de antocianina de maíz morado es mayor debido a la acción de la cianidina que se encuentra en el grano de maíz, a su vez las antocianidinas encontradas en el grano de maíz son cianidina y pelargonidina como lo indican **(Dooner, 1979; Harborne y Gavazzi, 1969)**, aunque también se ha detectado la presencia de peonidina y malvidina reportado por **(Salinas Moreno et al., 2013)**,

además mencionan que los granos pigmentados de maíz poseen múltiples actividades biológicas, la antocianidina predominante es la cianidina que tiene un papel preponderante, tanto por su amplia distribución ya que el 73% de las antocianinas se derivan de esta, como por poseer un alto poder antioxidante.

Otra de las matrices evaluadas fue las antocianinas extraídas de mortiño, mismos que poseen gran capacidad antioxidante, **Azas Durán y Ruilova Pineda (2017)**, mencionan que el mortiño contiene compuestos fenólicos, betacarotenos, flavonoides, antocianinas y glúcidos de cianidinas mismos que provocan gran capacidad antioxidante, los frutos del género *Vaccinium* se caracterizan por poseer gran cantidad de diferentes compuestos con actividad antioxidante (**Beccaro, Mellano, Botta, Chiabrando, & Bounous, 2004**). La actividad antioxidante evaluada con el radical DPPH de las antocianinas de mortiño fue de 106000 eq a  $\mu\text{M}$  de Trolox /mg de antocianinas, por su parte (**Maldonado-Celis et al., 2014**), reportaron valores superiores a 200000 eq a  $\mu\text{M}$  de Trolox /mg de antocianinas en frutos de género *Vaccinium* en cuanto a la capacidad antioxidante.

En cuanto a la evaluación antimicrobiana de antocianinas microencapsuladas se analizó con tres matrices vegetales las cuales son Maíz Morado (*Zea mays L.*), Papa Morada (*Solanum tuberosum*) y Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) frente a patógenos bacterianos (*Listeria monocytogenes* (ATCC® 19115™), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Rosenbach (ATCC® 25923™), y Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 10145)), los tratamientos se realizaron por triplicado y el conjunto de datos fueron analizados por análisis de varianza con un 95% de significancia.

Los ensayos de determinación de la capacidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en placa porque es un método que concentra mayor cantidad de antocianos o extractos facilitando la evaluación del potencial antimicrobiano como lo menciona (**Magallanes et al., 2003**) lo que concuerda con (**Rojas et al., 2005**) en el cual menciona que el método modificado de pocillos en agar es más sensible que el método Kirby-Bauder; por esta razón varios autores recomiendan el uso del método para ensayos de actividad antimicrobiano en plantas medicinales en condiciones estandarizadas.

En cuanto al control positivo se usó Gentamicina, teniendo en cuenta que es un antimicrobiano de amplio espectro y actúa inhibiendo la síntesis proteica de Gram positivos y Gram negativos (Fuchs *et al.*, 1994); para diluir las antocianinas microencapsuladas se utilizó agua destilada estéril así mismo como control negativo.

Para diferenciar que las antocianinas evaluadas presentaron actividad antimicrobiana o no, y a la vez esté aceptada, se tomó como referencia el halo de inhibición del control positivo Gentamicina, descritos por (Sacsquispe Contreras y Velásquez Pomar, 2008) ver tabla 5.

**Tabla 5** Normas de procedimiento para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión (Sacsquispe Contreras y Velásquez Pomar, 2008)

Antimicrobiano	Enterobacterias y <i>Staphylococcus spp</i> mm de diámetro de halos de inhibición		
	Gentamicina	Sensible ≥15	Intermedio 13 - 14

A continuación se presentan las medias y desviación estándar de resultados alcanzados con respecto a la actividad antimicrobiana de antocianos de diferentes matrices vegetales.

**Tabla 6** La influencia antimicrobiana de 100 µL de antocianinas microencapsuladas de mortiño en cultivos de prueba.

	Concentración µg/ml	Tamaño de la zona de inhibición, mm				
		<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
<b>C 1</b>	122,5	23,33±0,58	25,67±0,50	25,33±1,15	27,67±0,58	26,00±0,00
<b>C 2</b>	91,68	20,33±0,58	22,67±1,15	18,00±1,00	24,00±0,00	24,33±0,58
<b>C 3</b>	61,13	16,00±1,00	20,00±0,00	16,00±0,00	19,00±0,00	17,67±1,15
<b>C 4</b>	30,56	13,00±1,00	12,33±0,58	13,677±1,53	11,67±0,58	14,677±0,58
<b>C 5</b>	12,23	0	0	0	0	0
<b>Gentamicina</b>	450	20,33±0,58	28,00±0,00	32,00±1,00	28,00±0	20,67±1,5
<b>agua</b>	0	0	0	0	0	0

**Tabla 7** La influencia antimicrobiana de 100 µL de de antocianinas microencapsuladas de maíz morado en cultivos de prueba.

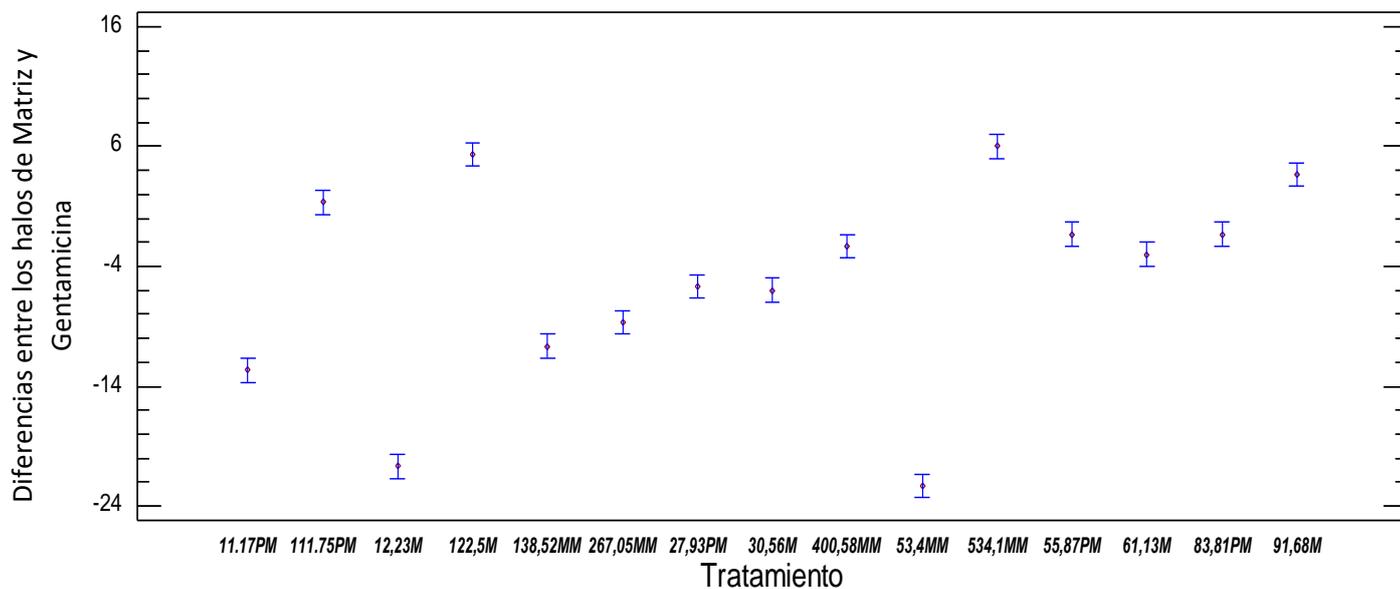
	Concentración µg/ml	Tamaño de la zona de inhibición, mm				
		<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
<b>C 1</b>	534,1	20,00±0,00	27,67±1,53	19,67±0,58	25,67±1,15	28,33±0,58
<b>C 2</b>	400,58	15,67±0,58	23,67±0,58	17,67±0,58	23,00±1,00	20,00±0,00
<b>C 3</b>	267,05	14,00±0,00	17,00±1,00	15,67±0,58	18,00±0,00	13,67±1,15
<b>C 4</b>	138,52	12,00±0,00	0	14,33±1,15	0	11,67±0,58
<b>C 5</b>	53,4	10,00±0,00	0	12,33±0,58	0	0
<b>Gentamicina</b>	450	27,0±1,00	27,67±0,58	28,67±1,15	26,67±0,58	22,00±0,00
<b>agua</b>	0	0	0	0	0	0

**Tabla 8** La influencia antimicrobiana de 100 µL de de antocianinas microencapsuladas de papa morada en cultivos de prueba.

	Concentración µg/ml	Tamaño de la zona de inhibición, mm				
		<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
<b>C 1</b>	111,75	27,33±1,15	27,67±0,58	28,67±1,15	26,33±1,15	25,33±1,15
<b>C 2</b>	83,81	26,33±0,58	25,33±0,58	24,33±0,58	23,33±0,58	22,67±0,58
<b>C 3</b>	55,87	18,7±01,15	17,00±0,00	18,00±0,00	20,33±0,58	22,67±0,58
<b>C 4</b>	27,93	15,00±0,00	15,00±0,00	15,67±0,58	16,00±1,73	18,33±0,58
<b>C 5</b>	11,17	0	0	11,67±0,58	0	11,33±0,58
<b>Gentamicina</b>	450	28,00±0,00	28,33±0,58	22,33±0,58	26,00±0,00	24,00±0,00
<b>agua</b>	0	0	0	0	0	0

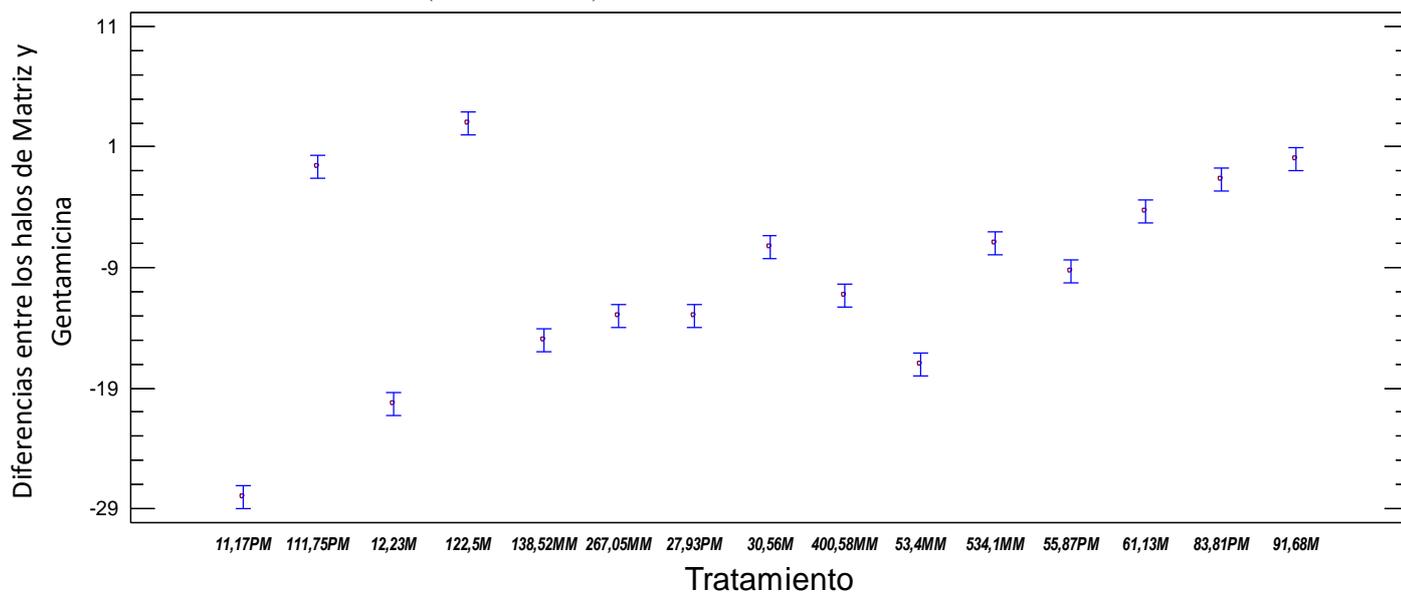
Con respecto al análisis estadístico se encontraron diferencias altamente significativas entre las antocianinas (papa morada, maíz morado y mortiño) y las concentraciones con respecto al control positivo (gentamicina), en la evaluación de la capacidad antimicrobiana (figura 6, 7, 8, 9, 10). En las cuales se muestra la media de halos vs gentamicina para cada nivel de Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0%.

**Figura 5** Medias y 95,0 % de Tukey y HDS para *Escherichia coli* (ATCC® 25922™)



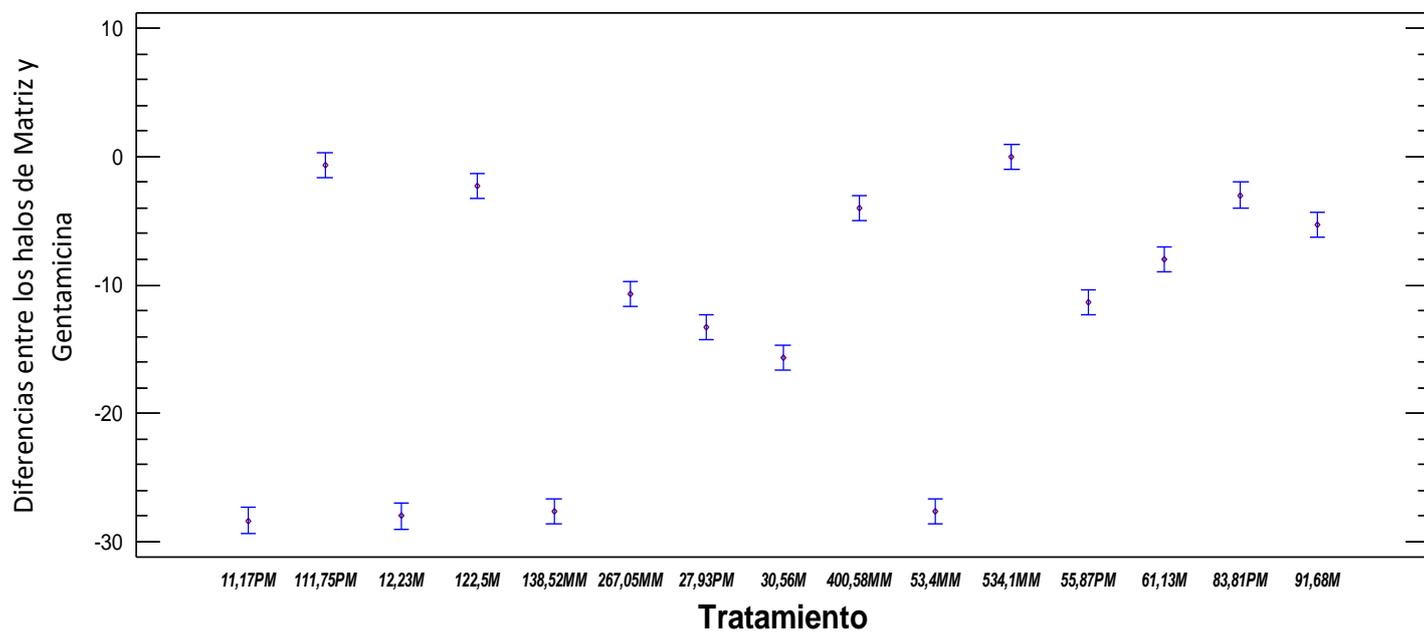
\*PM=Papa morada; \*MM= Maíz morado; \*M= mortiño

**Figura 6** Medias y 95,0 % de Tukey y HDS para *Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach* (ATCC® 259)



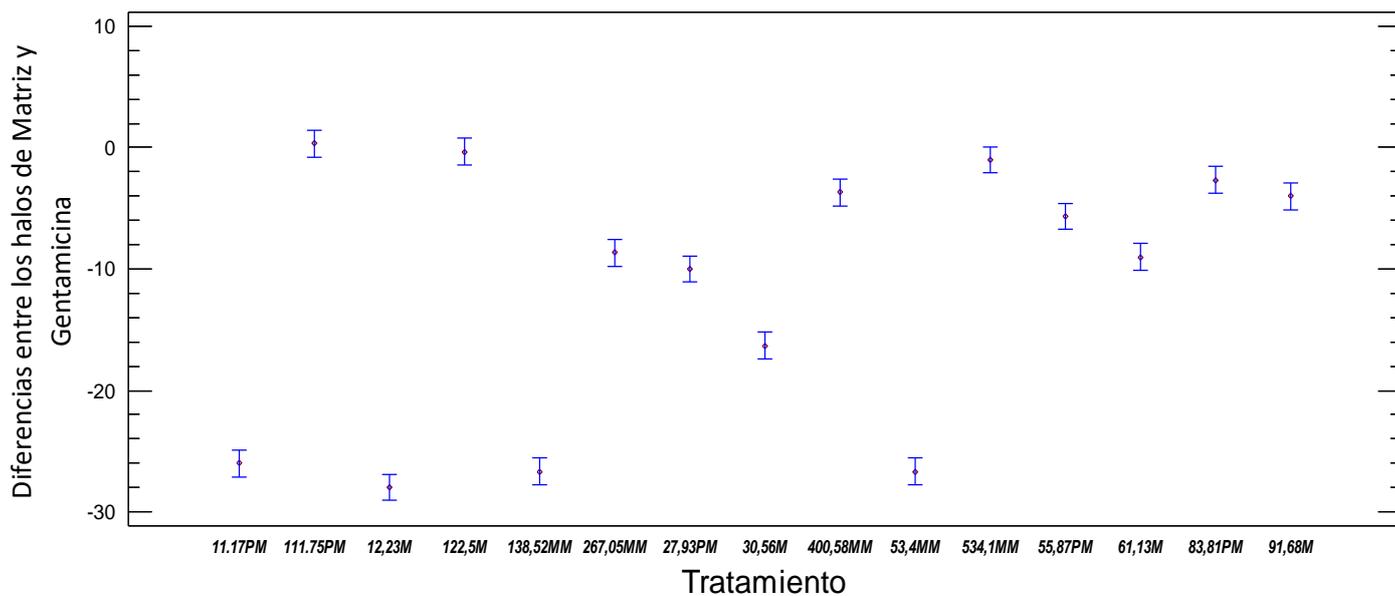
\*PM=Papa morada; \*MM= Maíz morado; \*M= mortiño

**Figura 7** Medias y 95,0 % de Tukey y HDS para *Listeria monocytogenes* (ATCC® 19115™)



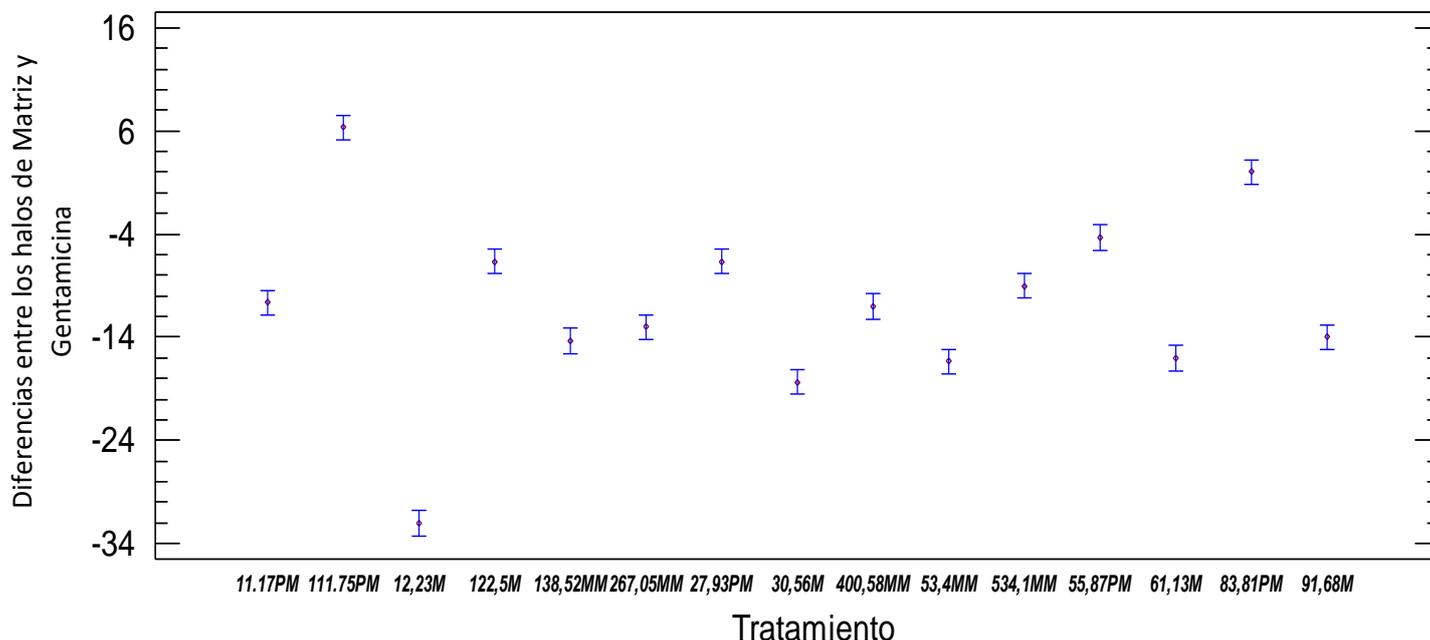
\*PM=Papa morada; \*MM= Maíz morado; \*M= mortiño

**Figura 8** Medias y 95,0 % de Tukey y HDS para *Bacillus cereus* (ATCC 10876)



\*PM=Papa morada; \*MM= Maíz morado; \*M= mortiño

**Figura 9** Medias y 95,0 % de Tukey y HDS para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145)



\*PM=Papa morada; \*MM= Maíz morado; \*M= mortiño

En la tabla 9, se muestra la inhibición alcanzada de los antocianos de las diferentes matrices vegetales frente diferentes bacterias Gram + y Gram –, en comparación al halo de inhibición producido por la gentamicina, según el análisis estadístico.

**Tabla 9** Inhibición de antocianos frente a patógenos

<i>Vegetales</i> <i>microorganismos</i>	Papa morada <i>Solanum tuberosum L.</i>	Mortiño <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth	Maíz morado <i>Zea mays L.</i>
<i>S. aureus</i>	=	+	--
<i>L. monocytogenes</i>	=	=	=
<i>P. aeruginosas</i>	+	--	--
<i>B. cereus</i>	=	=	=
<i>E. coli</i>	+	+	+

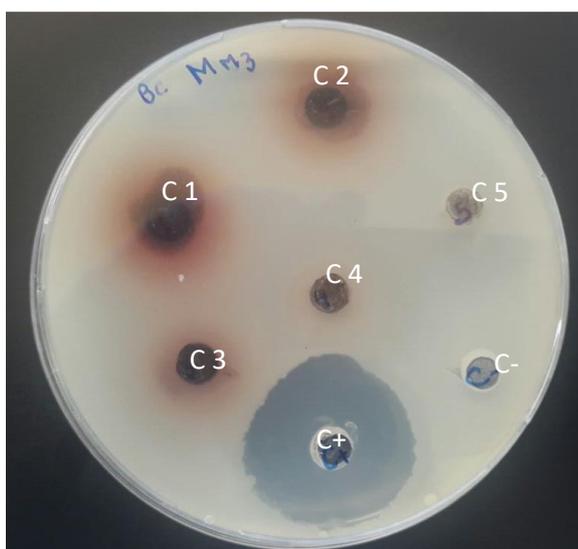
+ Mayor efecto que control positivo; = Igual efecto que control positivo; - Menor efecto que control positivo

Para los antocianos evaluados frente a *P. aeruginosas*, se evidenció que las antocianinas de papa morada (*Solanum tuberosum L.*) tuvieron mayor actividad inhibitoria a una concentración de 111,75 µg/ml presentando un halo de inhibición de

28,67±1,15 mm en relación con el control positivo (gentamicina) con una concentración de 450 µg/ml que presentó un halo de inhibición de 22,33±0,58 mm ver Tabla 8.

Los antocianos de papa morada, maíz morado y mortiño evaluados frente a *L. monocytogenes* a mayor concentración presentaron igual actividad inhibitoria que la gentamicina (tabla 6, 7 y 8), Mientras que los antocianos a concentraciones de 534,1 µg/ml de antocianinas de maíz morado, 122,5 µg/ml de antocianinas de mortiño y 111,75 µg/ml de antocianinas de papa morada, evaluados frente a la bacteria *B. cereus* se obtuvo halos de inhibición equivalentes en relación al control positivo, de la misma forma con las bacterias Gram negativas con *E. coli* se encontró mayor actividad de inhibición ocasionados por los antocianos de papa morada, maíz morado y mortiño a mayor concentración frente al control positivo gentamicina.

Las antocianinas frente a *S. aureus* se obtuvo mejor halo de inhibición con los antocianos extraídos de mortiño e igual halo de inhibición con antocianos extraídos de papa morada con respecto al control positivo. En la figura 11, se muestra los resultados alcanzados de actividad antimicrobiana de antocianinas extraídas de Maíz morado frente a *S. aureus*, con diferentes concentraciones, con respecto al halo de inhibición alcanzado con el control positivo (Gentamicina).



**Figura 10** Resultados de actividad antibacteriana de antocianinas de Maíz morado frente a *B. cereus*, C1 concentración 534,1 µg/ml ; C2 concentración 400,5 µg/ml ; C3 concentración 267,05 µg/ml ; C4 concentración 138,52 µg/ml ; C5 concentración 53,4 µg/ml ; C- Control negativo (agua) ; C+ Control positivo (Gentamicina) 450 µg/ml .

En cuanto a la sensibilidad de los patógenos bacterianos, *S. aureus* fue el microorganismo más sensible frente a los antocianos de mortiño (tabla 9), debido a que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular compuesta de una gruesa capa de peptidoglucano y proteínas; lo que hace que los metabolitos polares, sean más permeables y susceptibles a la pared celular y permita el paso de sustancia a su interior ocasionando la muerte microbiana como lo menciona **(Bruneton y Bruneton, 2001; Cowan, 1999)** La pared celular es una estructura importante, y a la vez es el blanco de antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos y glicopéptidos como la gentamicina. Las modificaciones en la síntesis del peptidoglucano es una respuesta de resistencia de los estafilococos al ataque de estos antibióticos, en los antocianos extraídos de mortiño que contiene la cianidina-3-3-O-glucosídico que es un pigmento encontrado en las moras, zarzamoras, frambuesas, uvas, cerezas, arándanos, maíz morado, etc. Así mismo puede ser encontrado en frutas como la manzana y la ciruela. Últimamente ha podido ser biosintetizado el 3-O-glucósido de cianidina en la bacteria intestinal *Escherichia coli*. Lo cual es representativo ya que en la actualidad estos microorganismos son principales causantes de infecciones nosocomiales como lo detalla **(Reimer et al., 1997)**.

Los resultados alcanzados con respecto a la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos Gram positivos y Gram negativos de antocianos de las diferentes matrices vegetales permiten plantear la interrogante de ser fuente de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano de amplio espectro con acción dirigida y específica hacia cada grupo microbiano.

Los antocianos de papa morada mostraron mayor actividad frente a los diferentes patógenos evaluados, la mayoría de estudios indican que las papas andinas más que un cultivo capaz de producir una mayor energía por unidad de tiempo y área que cualquier otro, es fuente de vitaminas solubles en el agua (vitamina C y complejo B), minerales (hierro, zinc, cobre y calcio) y carotenoides. Actualmente, las investigaciones en los Estados Unidos y Europa está centrada principalmente a la caracterización del contenido de vitaminas y potencial antioxidante de las papas, principalmente en su contenido y tipos de antocianinas y carotenoides **(Bonierbale et al., 2004)**.

En los últimos años ha surgido el interés en la búsqueda de fuentes naturales de colorantes capaces de reemplazar los pigmentos sintéticos usados en grandes

industrias de alimentos. Los pigmentos derivados de la papa con pulpa roja o púrpura tienen poco olor, color intensos y con pH ácido, lo que podría representar una buena alternativa natural al rojo No. 40. En países como Japón, estos pigmentos parecen ser fuertes y con tendencia a reemplazar al pigmento extraído del rábano rojo gigante. Según (**Bonierbale et al. (2004)**) menciona en su investigación que estudios en Estados Unidos han demostrado que la producción de pigmentos a partir de la papa podría resultar económicamente provechosa. Además la cantidad de antocianinas en las papas de color depende de las condiciones del ambiente de producción, del genotipo y de la interacción entre el genotipo y el ambiente, lo que indica la posibilidad de mejorar la cantidad de estos compuestos a través de estudios de caracterización y/o mejoramiento genético, o de manejo agronómico.

#### **4.2. Verificación de las hipótesis**

Se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula, en la cual las antocianina de mortiño, maíz morado y papa morada no tienen el mismo efecto de inhibición en los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach* (ATCC® 25923™), *Listeria monocytogenes* (ATCC® 19115™), *Bacillus cereus* (ATCC® 11778™) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 10145).

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Las antocianinas microencapsuladas de diferentes matrices vegetales como del Maíz Morado (*Zea mays L.*), Papa Morada (*Solanum tuberosum*) y Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), presentaron efecto de inhibición frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas,
- Se extrajo antocianinas de forma sólido-líquido de las diferentes matrices vegetales mediante etanol acidificado, a pH 1 ya que se obtiene mayor rendimiento en valores bajos de pH, a la vez el extracto se concentró en rotavapor.
- La encapsulación es una técnica muy útil para la conservación y protección de aditivos y compuestos bioactivos, mediante el secado por aspersion se encapsulo utilizando maltodextrina como agente encapsulante ya que es uno de los carbohidratos de mayor uso y rentable, se cuantificó las antocianinas en las cuales se tuvo que controlar las temperaturas de entrada y salida en el secado del equipo.
- La actividad antimicrobiana de las antocianinas se evaluó por el método de difusión utilizando las bacterias indicadoras: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, en diferentes concentraciones en las cuales se determinó que las antocianinas muestran actividad biológica.
- La capacidad antioxidante se determinó mediante el método DPPH, las antocianinas representan una clase de antioxidantes importantes, ya que son tan comunes en los alimentos humanos. En años reciente, muchos documentos han sido publicados con respecto a la actividad antioxidante de las antocianinas y sus otras funciones, así como estudios que evalúan la correlación entre su capacidad antioxidante y estructura química, se observó que las antocianinas de mortiño presentaron mayor actividad antioxidante frente a las antocianinas de papa morada y maíz morado.

## 5.2. Recomendaciones

- Ampliar la investigación con respecto a la actividad antimicrobiana incluyendo más bacterias indicadoras y matrices vegetales.
- Ampliar estudios sobre la extracción con diferentes solventes y estabilidad de las antocianinas a los cambios de condiciones como tipo de solvente y pH, ya que éstos no fueron evaluados en el presente trabajo.
- Ampliar este estudio, incluyendo más ensayos de actividad biológica, como antitumoral, citotóxica, etc.
- Realizar la caracterización por HPLC de las antocianinas presentes en las diversas matrices vegetales

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aal, E.-S., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal chemistry*, 76(3), 350-354.
- Abdel-Aal, E.-S. M., Young, J. C., & Rabalski, I. (2006). Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(13), 4696-4704.
- Abdel-Aal, M., & Hucl, P. (1999). A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Journal of Cereal Chemistry*, C.
- Aoki, H., Kuze, N., Kato, Y., & Gen, S. (2002). Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, 41-45.
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante secado por aspersión y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. *Información tecnológica*, 25(3), 31-42.
- Azas Durán, L. d. R., & Ruilova Pineda, A. A. (2017). *Evaluación de las propiedades antioxidantes del mortiño (Vaccinium floribundum kunt) procedente del páramo andino para la elaboración de un té funcional*. Universidad estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente. Escuela Ingeniería Agroindustrial.
- Bernal-Roa, L., Melo, L., & Díaz-Moreno, C. (2011). *Evaluación del perfil aromático y propiedades antioxidantes durante la maduración de frutos de mora (rubus glaucus benth.)-aromatic profile and antioxidant properties during blackberry (Rubus glaucus benth.) Fruit ripening*. Paper presented at the II International Conference on Postharvest and Quality Management of Horticultural Products of Interest for Tropical Regions 1016.
- Bonierbale, M., Amoros, W., Espinoza, J., Mihovilovich, E., Roca, W., & Gómez, R. (2004). Recursos genéticos de la papa: don del pasado, legado para el futuro. *Suplemento revista Latinoamericana de la papa*, 1, 3-13.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Braverman, J. B., Berk, Z. H., & Fernando, A. (1980). *Introducción a la bioquímica de los alimentos*.
- Brown, C., Culley, D., Yang, C.-P., Durst, R., & Wrolstad, R. (2005). Variation of anthocyanin and carotenoid contents and associated antioxidant values in potato breeding lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(2), 174-180.
- Bruneton, J., & Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*.
- Burgos Aguilar, M. P., Ahuanari, I., & Alexander, E. (2016). Optimización para la extracción de antocianinas en *vaccinium corymbosum* l.(arándano), noviembre 2015.”.
- Castillo Melgar, F. J. (2012). Influencia de 27 cultivares de papa nativa (*solanum* sp.) sobre el contenido de componentes bioactivos y capacidad antioxidante.
- Cerón, I., Higuera, J., & Cardona, C. (2010). Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*, 5(2011), 5.
- Cooke, D., Steward, W. P., Gescher, A. J., & Marczylo, T. (2005). Anthocyanins from fruits and vegetables—does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer*, 41(13), 1931-1940.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Dalgo, M. A., Cuví, M. J. A., & Guerrero, C. M. (2014). Relación del desarrollo del color con el contenido de antocianinas y clorofila en diferentes grados de madurez de mortiño (*Vaccinium floribundum*). *Enfoque UTE*, 5(2), pp. 14-28.
- Dooner, H. K. (1979). Flavonol glucosyltransferase activity in bronze embryos of *Zea mays*. *Phytochemistry*, 18(5), 749-751.
- Drago Serrano, M. E. (2007). Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(4).
- Eberhardt, M. V., Chang, Y. L., & Liu, R. H. (2000). Nutrition: Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405(6789), 903.
- Figueroa-Cares, I., Martínez-Damián, M. T., Rodríguez-Pérez, E., Colinas-León, M. T., Valle-Guadarrama, S., Ramírez-Ramírez, S., & Gallegos-Vázquez, C.

- (2010). Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante en 12 cultivares de tuna (*Opuntia* spp.) de México. *Agrociencia*, 44(7), 763-771.
- Flores Ccasa, C., Aytara, C., & Celio, F. (2015). Determinación de vida útil en alimento instantáneo a base de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* aellen), maíz morado (*Zea mays* L.) y oca (*Oxalis tuberosa*) por pruebas aceleradas de almacenamiento y estabilidad de los compuestos bioactivos.
- Fuchs, L. Y., Conde, L. C., González, V. M., Noguez, A. H., Calderón, E., Avonce, N., & Ovando, C. (1994). Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Salud pública de México*, 36(4), 428-438.
- Garzón, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3).
- Gaviria Montoya, C., Hernández Arredondo, J. D., Lobo Arias, M., Medina Cano, C. I., & Rojano, B. A. (2012). Cambios en la actividad antioxidante en frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.) durante su desarrollo y maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 65(1).
- Gonzalez, M. B. R., Gonzalez, A. N., & Correa, L. J. (2007). Actividad antimicrobiana, conservante y obtención de un colorante natural a partir de plantas de la region de boyaca. *Scientia et technica*, 13(33), 415-417.
- Guevara, J. J. L., Fuentes, J. M. L., González, O. J., & Guevara, L. L. (2016). Microencapsulación de algunos compuestos bioactivos mediante secado por aspersión/Microencapsulation of some bioactive compounds through spray drying. *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(10), 39-49.
- Harborne, J., & Gavazzi, G. (1969). Effect of Pr and pr alleles on anthocyanin biosynthesis in *Zea mays*. *Phytochemistry*, 8(6), 999-1001.
- Hofstede, R. G. M., Lips, J. M., & Jongsma, W. (1998). *Geografía, ecología y forestación de la Sierra Alta del Ecuador: Revisión de literatura*: Abya-Yala.
- Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R., . . . Plemel, R. L. (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell host & microbe*, 7(1), 25-37.
- Hutchings, B. (1994). *Food Color and Appearance*, Blackie Academic & Professional. London, UK.

- Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, *64*(5), 923-933.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology*, *24*, 691-693.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, *25*, 726-732.
- Lewis, C. E., Walker, J. R., Lancaster, J. E., & Conner, A. J. (1998). Light regulation of anthocyanin, flavonoid and phenolic acid biosynthesis in potato minitubers in vitro. *Functional Plant Biology*, *25*(8), 915-922.
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*, *763*, 1-10.
- López Hernández, O. D. (2010). Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*, *44*(3), 381-389.
- Lopretti, M., Barriero, F., Fernandes, I., Damboriarena, A., Ottati, C., & Olivera, A. (2011). Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. *Innotec*(2 ene-dic), 19-23.
- Magallanes, C., Córdova, C., & Orozco, R. (2003). Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Revista peruana de Biología*, *10*(2), 125-132.
- Maldonado-Celis, M. E., Arango-Varela, S. S., & Rojano, B. A. (2014). Free radical scavenging capacity and cytotoxic and antiproliferative effects of *Vaccinium meridionale* Sw. against colon cancer cell lines. *Rev. Cubana Plant Med*, *19*(2), 172-184.
- Mamani, J., Margarita, D., & Arias Jordán, E. (2011). Antocianinas polifenoles totales y capacidad antioxidante en dos clones de papa nativa del género *Solanum* de pulpa azul y roja.
- Mex-Alvarez, R., Bolívar-Fernández, N., Garma-Quen, P., Tut-Heredia, J., & Romero-Guillén, K. (2013). Actividad antioxidante de cinco variedades de maíz cultivadas en Campeche, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *12*(6), 558-571.

- Monteros, C., Cuesta, X., Jimenez, J., & Lopez, G. (2005). *Las papas nativas en el Ecuador*: INIAP Archivo Historico.
- Morales Cabrera, M. (2011). Actividad antimicrobiana y caracterización fenólica de extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.).
- Peralta, E., Espinoza, P., Vásquez, W., & Villacrés, E. (2006). Importancia de los cultivos andinos. Recuperado desde [http://www.terraecuador.net/revista\\_42/42\\_importancia\\_cultivos\\_andinos.html](http://www.terraecuador.net/revista_42/42_importancia_cultivos_andinos.html).
- Pérez-Alonso, C., Cruz-Olivares, J., Barrera-Pichardo, J., Rodríguez-Huezo, M., Báez-González, J., & Vernon-Carter, E. (2008). DSC thermo-oxidative stability of red chili oleoresin microencapsulated in blended biopolymers matrices. *Journal of Food Engineering*, 85(4), 613-624.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., . . . Krewer, G. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(7), 2686-2693.
- Quesada, N. V., & Muñoz, L. S. (2013). Actividad antimicrobiana del arándano (*Vaccinium macrocarpon*). *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 70(605), 9-12.
- Reddivari, L. (2007). *Influence of genetic variability on specialty potato functional components and their effect on prostate cancer cell lines*. Texas A&M.
- Reimer, L. G., Wilson, M. L., & Weinstein, M. P. (1997). Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clinical microbiology reviews*, 10(3), 444-465.
- Riofrío Pazmiño, C. (2010). *Elaboración de gomas masticables de mortiño como fuente de vitamina C, para preescolares, determinando su aporte nutricional y análisis bromatológico: octubre 2009-marzo 2010*. QUITO/PUCE/2010.
- Riverón-Rodríguez, E., Ramírez-Frómata, N., Herrera-Alba, D., Barreras-García, G., Zayas-Tamayo, Á. M., & Regueiro-Gómez, Á. (2012). Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 43(2), 1-5.
- Robles-Sánchez, R. M., Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Astiazarán-García, H., González-Aguilar, G., & Cruz-Valenzuela, R. (2007). Frutos tropicales mínimamente procesados: potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia*, 32(4).

- Rojas, J. J., García, A. M., & López, A. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 4(2).
- Sacsquispe Contreras, R., & Velásquez Pomar, J. (2008). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.
- Salinas-Moreno, Y., Pérez-Alonso, J. J., Vázquez-Carrillo, G., Aragón-Cuevas, F., & Velázquez-Cardelas, G. A. (2012). Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas Chalqueño, Elotes Cónicos y Bolita. *Agrociencia*, 46(7), 693-706.
- Salinas Moreno, Y., Cruz Chávez, F. J., Díaz Ortiz, S. A., & Castillo González, F. (2012). Granos de maíces pigmentados de Chiapas, características físicas, contenido de antocianinas y valor nutracéutico. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 33-41.
- Salinas Moreno, Y., García Salinas, C., Coutiño Estrada, B., & Vidal Martínez, V. A. (2013). Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Revista fitotecnia mexicana*, 36, 285-294.
- Salvador, B. (1993). Química de los alimentos. *Química de los Alimentos*, Editorial Alhambra Mexicana.
- Santacruz Cifuentes, L. A. (2011). *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. Universidad Nacional de Colombia.
- Segura Peña, D. (2004). Evaluación de la potencialidad funcional en 15 genotipos de papa nativa (*Solanum* sp.): Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru). Facultad de Industrias Alimentarias.
- Sempértegui Puente, M. A. (2017). *Evaluación de la calidad microbiológica de las ensaladas frescas vendidas en dos mercados de la ciudad de Cuenca y su asociación con los factores de riesgo para adquirir enfermedades transmitidas por alimentos*. Universidad del Azuay.
- Timothy, D. H., Grant, W., Castro, U. T., Sarria, M., & D Varela, J. (1966). Razas de maíz en Ecuador.
- Wang, L.-S., & Stoner, G. D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters*, 269(2), 281-290.

- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 423-428.
- Xu, Z., & Howard, L. R. (2012). *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*: Wiley.
- Yepez, V., & Luis, J. (2013). *Desarrollo de microencapsulados por SPRAY DRYING a partir de frutos de mora de castilla (Rubus glaucus Benth)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Zhao, C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A. (2004). Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 52(20), 6122-6128.
- Žilić, S., Serpen, A., Akilloğlu, G. I., Gökmen, V., & Vančetović, J. (2012). Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 60(5), 1224-1231.

## ANEXOS

### ANEXO 1 *EXTRACCIÓN Y MICROENCAPSULACIÓN DE ANTOCIANINAS*



**Figura 11** Extracción de antocianinas a partir de harinas de diferentes matrices vegetales



**Figura 12** Ajuste de PH e incubación



**Figura 13** Evaporador

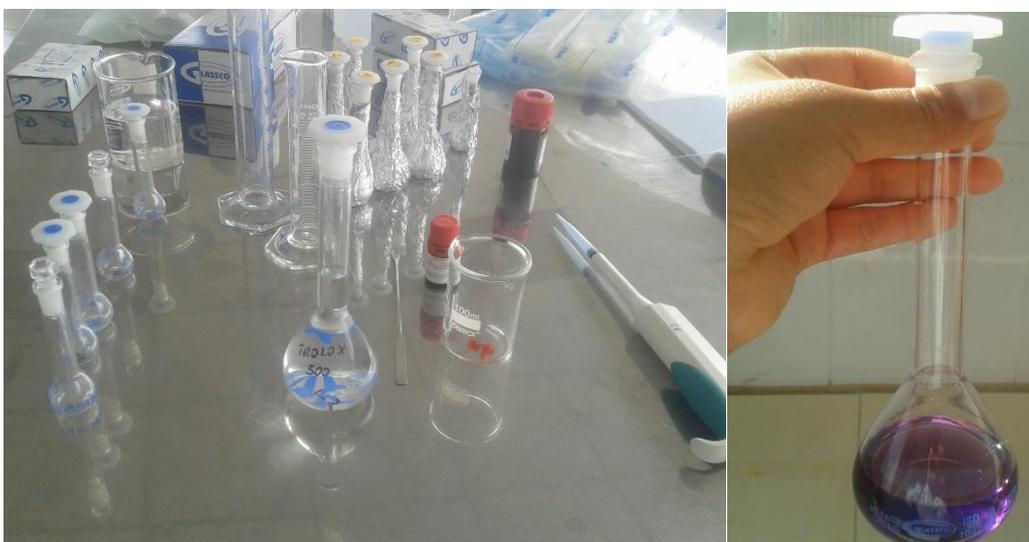


**Figura 14** Preparación de concentrado y encapsulación

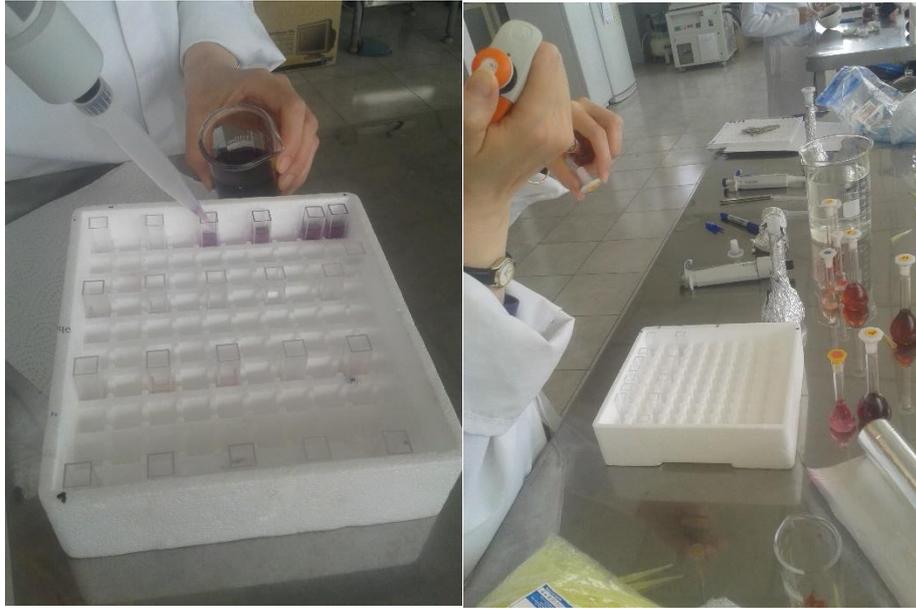
**ANEXO 2 FOTOGRAFÍAS DE LA FASE EXPERIMENTAL CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**



**Figura 15** Preparación de muestras



**Figura 16** Preparación de Trolox y DPPH

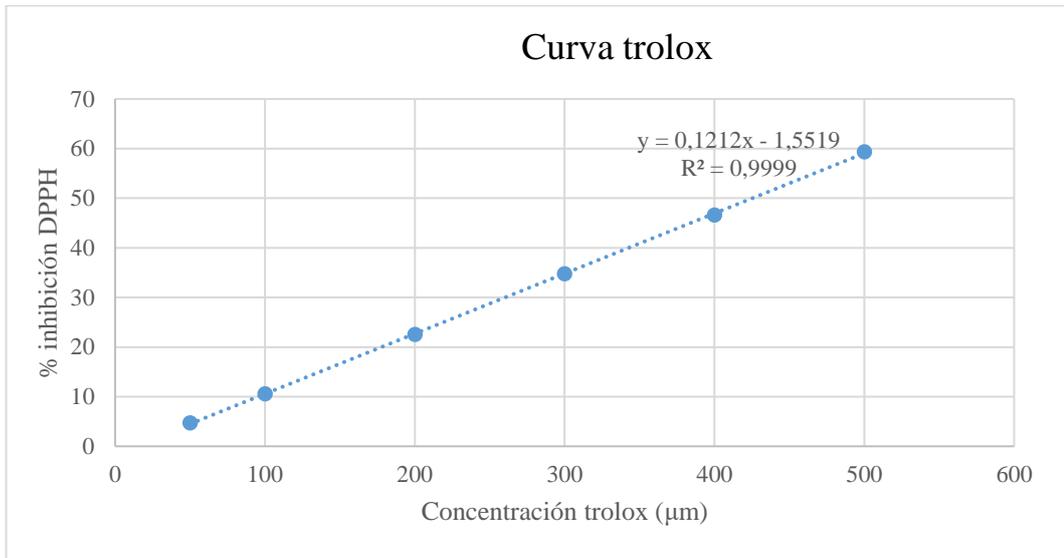


**Figura 17** Preparación de celdas e incubación



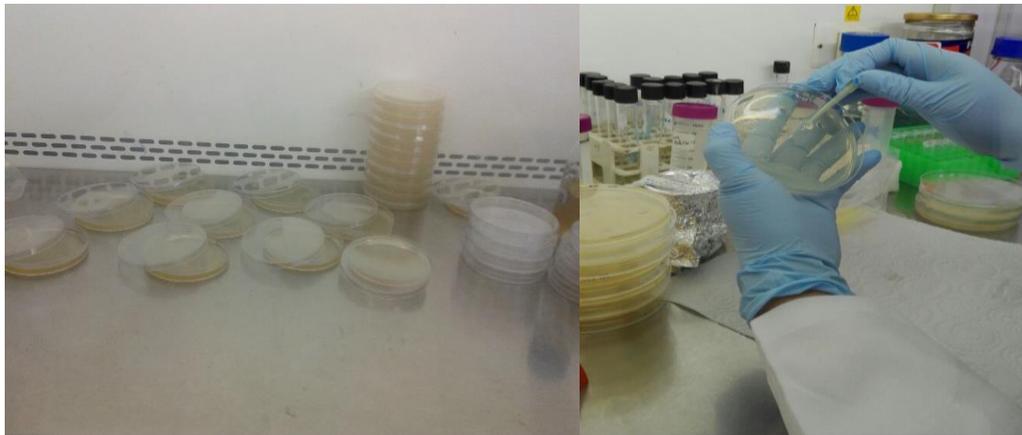
**Figura 18** Medición de absorbancia a 515 nm

**Figura 19** Curva de calibración de Trolox con porcentaje de Inhibición

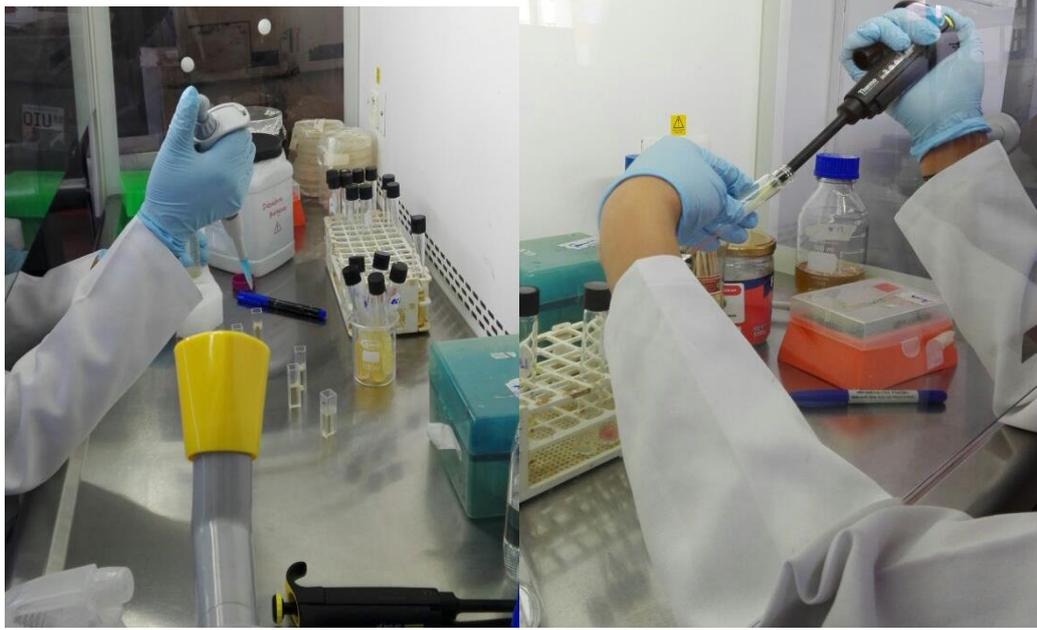


La figura 19, muestra la curva de calibración de Trolox para un rango de 50- 500 µM.

### **ANEXO 3 FOTOGRAFÍAS DE FASE EXPERIMENTAL ACTIVIDAD ANTIMICROBIANO Y RESULTADOS DE DISEÑO EXPERIMENTAL**



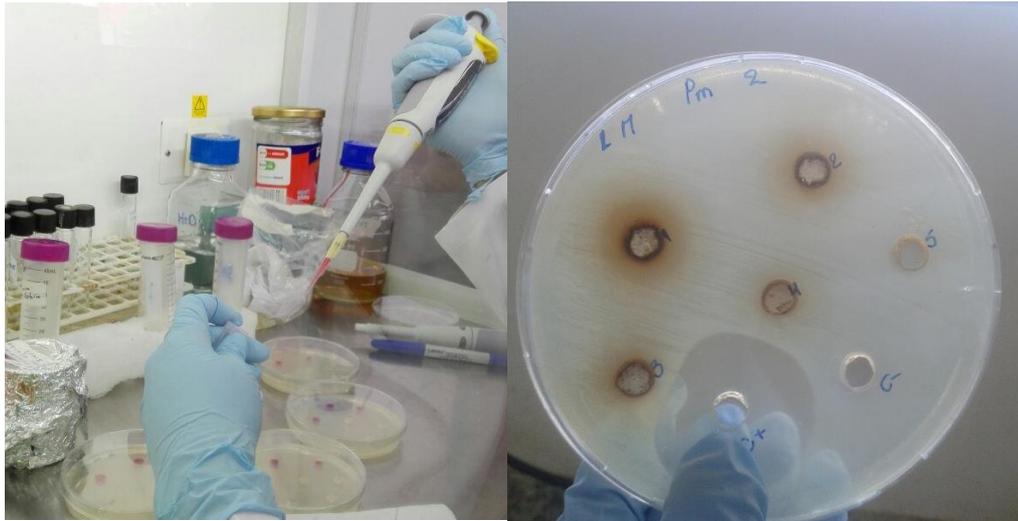
**Figura 20** Preparación de placas agar MULLER HINTON



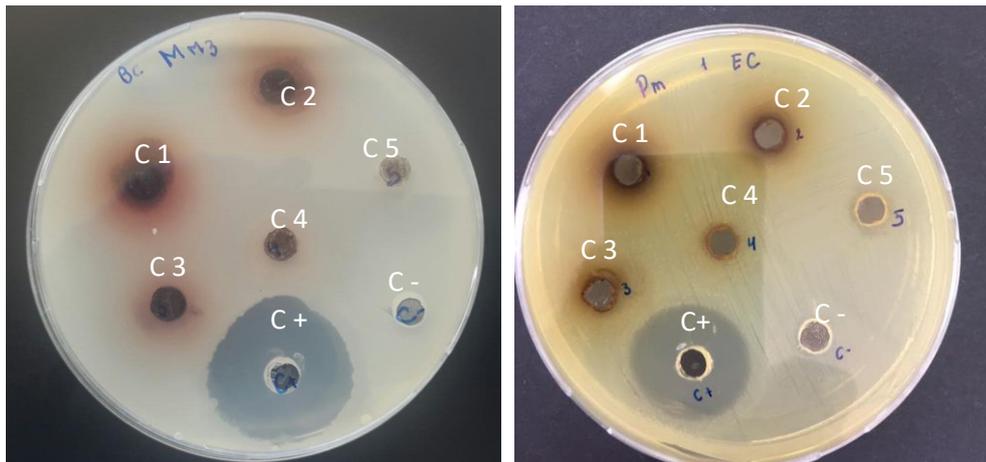
**Figura 21** Medición de OD y preparación de solución salina



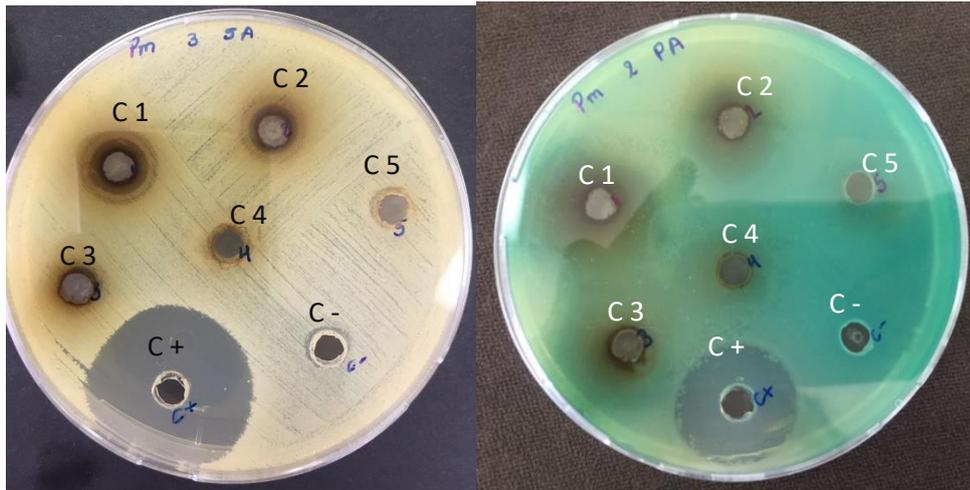
**Figura 22** Preparación de muestras de antocianinas



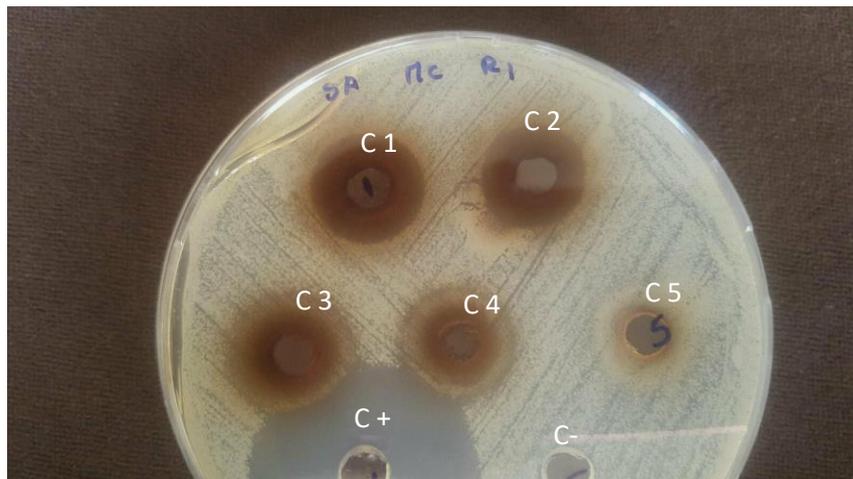
**Figura 23** Sembrado en placas



**Figura 24** Resultados de actividad antibacteriana de antocianinas de Maíz morado frente a *S. aureus*, C1 concentración 534,1  $\mu\text{g/ml}$  ; C2 concentración 400,5  $\mu\text{g/ml}$  ; C3 concentración 267,05  $\mu\text{g/ml}$  ; C4 concentración 138,52  $\mu\text{g/ml}$  ; C5 concentración 53,4  $\mu\text{g/ml}$  ; C- Control negativo (agua) : C+ Control positivo (Gentamicina) 450  $\mu\text{g/ml}$



**Figura 25** Resultados de actividad antibacteriana de antocianinas de papa morada frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus* , C1 concentración 111,75  $\mu\text{g/ml}$  ; C2 concentración 83,81  $\mu\text{g/ml}$  ; C3 concentración 55,87  $\mu\text{g/ml}$  ; C4 concentración 27,93  $\mu\text{g/ml}$  ; C5 concentración 11,17  $\mu\text{g/ml}$  ; C- Control negativo (agua) : C+ Control positivo (Gentamicina) 450  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 26** Resultados de actividad antibacteriana de antocianinas de mortiño frente a *S. aureus* , C1 concentración 122,5  $\mu\text{g/ml}$  ; C2 concentración 91,68  $\mu\text{g/ml}$  ; C3 concentración 61,13  $\mu\text{g/ml}$  ; C4 concentración 30,56  $\mu\text{g/ml}$  ; C5 concentración 12,23  $\mu\text{g/ml}$  ; C- Control negativo (agua) : C+ Control positivo (Gentamicina) 450  $\mu\text{g/ml}$ .

## RESULTADOS ALCANZADOS DE DISEÑO EXPERIMENTAL

**Tabla 10** Medias para halos vs gentamicina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0% para bacteria *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC® 25923™)

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
11,17PM	3	-28,0	0,365148	-28,9516	-27,0484
111,75PM	3	-0,666667	0,365148	-1,61824	0,284905
12,23M	3	-20,33	0,365148	-21,2816	-19,3784
122,5M	3	3,00333	0,365148	2,05176	3,95491
138,52MM	3	-15,0	0,365148	-15,9516	-14,0484
267,05MM	3	-13,0	0,365148	-13,9516	-12,0484
27,93PM	3	-13,0	0,365148	-13,9516	-12,0484
30,56M	3	-7,33	0,365148	-8,28157	-6,37843
400,58MM	3	-11,3333	0,365148	-12,2849	-10,3818
53,4MM	3	-17,0	0,365148	-17,9516	-16,0484
534,1MM	3	-7,0	0,365148	-7,95157	-6,04843
55,87PM	3	-9,33333	0,365148	-10,2849	-8,38176
61,13M	3	-4,33	0,365148	-5,28157	-3,37843
83,81PM	3	-1,66667	0,365148	-2,61824	-0,715095
91,68M	3	0,00333333	0,365148	-0,948238	0,954905
Total	45	-9,66556			

**Tabla 11** Medias para halos vs gentamicina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0% *Pseudomona aeuruginosa* (ATCC 10145).

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
11,17PM	3	-10,6633	0,463481	-11,8712	-9,45551
111,75PM	3	6,33667	0,463481	5,12884	7,54449
12,23M	3	-32,0	0,463481	-33,2078	-30,7922
122,5M	3	-6,66667	0,463481	-7,87449	-5,45884
138,52MM	3	-14,3367	0,463481	-15,5445	-13,1288
267,05MM	3	-13,0033	0,463481	-14,2112	-11,7955
27,93PM	3	-6,66333	0,463481	-7,87116	-5,45551
30,56M	3	-18,3333	0,463481	-19,5412	-17,1255
400,58MM	3	-11,0033	0,463481	-12,2112	-9,79551
53,4MM	3	-16,3367	0,463481	-17,5445	-15,1288
534,1MM	3	-9,00333	0,463481	-10,2112	-7,79551
55,87PM	3	-4,33	0,463481	-5,53783	-3,12217
61,13M	3	-16,0	0,463481	-17,2078	-14,7922
83,81PM	3	2,00333	0,463481	0,795508	3,21116
91,68M	3	-14,0	0,463481	-15,2078	-12,7922
Total	45	-10,9333			

**Tabla 12** Medias para halos vs gentamicina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0% para *Escherichia coli* (ATCC® 25922™).

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
11,17PM	3	-12,6667	0,3849	-13,6697	-11,6636
111,75PM	3	1,33333	0,3849	0,330289	2,33638
12,23M	3	-20,67	0,3849	-21,673	-19,667
122,5M	3	5,33	0,3849	4,32696	6,33304
138,52MM	3	-10,6633	0,3849	-11,6664	-9,66029
267,05MM	3	-8,66333	0,3849	-9,66638	-7,66029
27,93PM	3	-5,66667	0,3849	-6,66971	-4,66362
30,56M	3	-6,00333	0,3849	-7,00638	-5,00029
400,58MM	3	-2,33	0,3849	-3,33304	-1,32696
53,4MM	3	-22,33	0,3849	-23,333	-21,327
534,1MM	3	6,00333	0,3849	5,00029	7,00638
55,87PM	3	-1,33333	0,3849	-2,33638	-0,330289
61,13M	3	-3,00333	0,3849	-4,00638	-2,00029
83,81PM	3	-1,33333	0,3849	-2,33638	-0,330289
91,68M	3	3,66333	0,3849	2,66029	4,66638

**Tabla 13** Tabla de Medias para halos vs gentamicina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0% para *Listeria monocytogenes* (ATCC® 19115™).

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
11,17PM	3	-28,33	0,375154	-29,3076	-27,3524
111,75PM	3	-0,663333	0,375154	-1,64098	0,314314
12,23M	3	-28	0,375154	-28,9776	-27,0224
122,5M	3	-2,33333	0,375154	-3,31098	-1,35569
138,52MM	3	-27,67	0,375154	-28,6476	-26,6924
267,05MM	3	-10,67	0,375154	-11,6476	-9,69235
27,93PM	3	-13,33	0,375154	-14,3076	-12,3524
30,56M	3	-15,6667	0,375154	-16,6443	-14,689
400,58MM	3	-4,00333	0,375154	-4,98098	-3,02569
53,4MM	3	-27,67	0,375154	-28,6476	-26,6924
534,1MM	3	-0,00333333	0,375154	-0,98098	0,974314
55,87PM	3	-11,33	0,375154	-12,3076	-10,3524
61,13M	3	-8	0,375154	-8,97765	-7,02235
83,81PM	3	-2,99667	0,375154	-3,97431	-2,01902
91,68M	3	-5,33333	0,375154	-6,31098	-4,35569

**Tabla 14** Tabla de Medias para halos vs gentamicina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95,0% para *Bacillus cereus* (ATCC® 11778™).

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
<b>11,17PM</b>	3	-26	0,421637	-27,0988	-24,9012
<b>111,75PM</b>	3	0,333333	0,421637	-0,765447	1,43211
<b>12,23M</b>	3	-28	0,421637	-29,0988	-26,9012
<b>122,5M</b>	3	-0,333333	0,421637	-1,43211	0,765447
<b>138,52MM</b>	3	-26,67	0,421637	-27,7688	-25,5712
<b>267,05MM</b>	3	-8,67	0,421637	-9,76878	-7,57122
<b>27,93PM</b>	3	-10	0,421637	-11,0988	-8,90122
<b>30,56M</b>	3	-16,3333	0,421637	-17,4321	-15,2346
<b>400,58MM</b>	3	-3,67	0,421637	-4,76878	-2,57122
<b>53,4MM</b>	3	-26,67	0,421637	-27,7688	-25,5712
<b>534,1MM</b>	3	-1,00333	0,421637	-2,10211	0,0954471
<b>55,87PM</b>	3	-5,66667	0,421637	-6,76545	-4,56789
<b>61,13M</b>	3	-9	0,421637	-10,0988	-7,90122
<b>83,81PM</b>	3	-2,66667	0,421637	-3,76545	-1,56789
<b>91,68M</b>	3	-4	0,421637	-5,09878	-2,90122