



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



---

**Extracción y Microencapsulación de antocianinas a partir de col morada**  
**(*Brassica oleracea* L.)**

---

Trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación previo la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Eliana Catalina Ramos Lalaleo

Tutor: PhD. Orestes Darío López Hernández

Ambato-Ecuador

Junio-2019

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Orestes López Hernández

**CERTIFICA**

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

Ambato, 09 de mayo de 2019



.....  
PhD. Orestes López Hernández

C.I. 175478486-4

**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Eliana Catalina Ramos Lalaleo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas.



---

Srta. Eliana Catalina Ramos Lalaleo

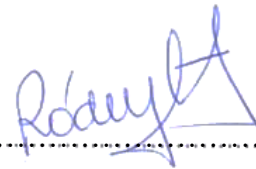
1804364865

Autor

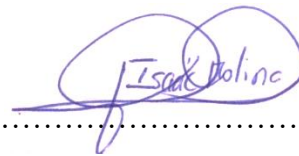
## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

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

Para constancia firman:

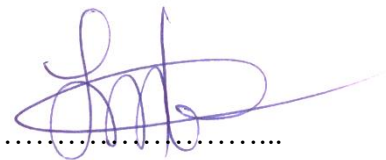


.....  
Presidente de Tribunal



.....  
MSc José Isaac Molina Sánchez

C.I. 1803752300



.....  
Dr. Walter Aurelio Simbaña Ayo

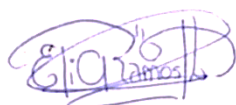
C.I. 1709180853

Ambato, 20 de Junio de 2019

## **DERECHOS DE AUTOR**

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

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



---

Srta. Eliana Catalina Ramos Lalaleo

C.I. 1804364865

**AUTOR**

## DEDICATORIA

*A mi familia, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; por enseñarme que se pueden tener raíces y alas a la vez, por motivarme constantemente para alcanzar mis anhelos.*

*Su ayuda ha sido fundamental, han estado conmigo incluso en los momentos más turbulentos. Este proyecto no fue fácil, pero estuvieron motivándome y ayudándome hasta donde sus alcances lo permitieron. Muchos de mis logros se los debo a ustedes, entre los que se incluye este.*

*Gracias a mi amada madre Susana, mi hermana Leticia, y tía Enmíta.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Dios, que en todo momento está conmigo, por rodearme de tantas personas buenas que hicieron posible cumplir una de mis metas.

### **A mi familia:**

Por sus consejos y palabras de aliento que me han ayudado a crecer como persona y luchar por lo que quiero. No fue sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes, su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos.

Gracias por creer en mí.

### **A mi tutor:**

Por transmitirme sus conocimientos, su tiempo, dedicación y paciencia en la elaboración de este documento. Por ser un buen mentor y un buen amigo a la vez. Gracias PhD. Orestes López.

### **A mis amigos:**

Gracias a todos ustedes por estar conmigo cuando más los he necesitado, por su ayuda, palabras de aliento, momentos de alegría: Nanda, Jannys, Majo, Jonathan, Jady, Jessy, Paulo

### **A ti:**

Gracias por apoyarme, confiar en mí y tu compañía en momentos difíciles. Santiago

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO .....	I
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	II
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	IV
DERECHOS DE AUTOR.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
ÍNDICE DE ECUACIONES .....	X
ÍNDICE DE ANEXOS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT .....	XII
INTRODUCCIÓN.....	XIII
CAPÍTULO I.....	14
EL PROBLEMA.....	14
1.1 Tema de investigación .....	14
1.2 Justificación .....	14
1.3 Objetivos .....	16
1.3.1 Objetivo general .....	16
1.3.2 Objetivos específicos .....	16
CAPÍTULO II.....	17
MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 Antecedentes investigativos .....	17
2.1.1 <i>B. oleracea</i> .....	17
2.1.2 Compuestos fitoquímicos en <i>B. oleracea</i> .....	18
2.2 Hipótesis .....	19
2.2.1 Hipótesis nula .....	19
2.2.2 Hipótesis alternativa.....	19
2.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis.....	19
2.3.1 Variables dependientes .....	19
2.3.2 Variables independientes.....	19
CAPÍTULO III .....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Materiales, equipos y reactivos .....	20
3.1.1 Materiales .....	20
3.1.2 Equipos.....	20
3.1.3 Reactivos .....	21
3.2 Métodos .....	21



3.2.1	Recolección de la planta.....	21
3.2.2	Preparación de materia vegetal .....	21
3.2.3	Obtención extractos líquidos .....	21
3.2.4	Análisis por espectroscopia de absorbancias .....	22
3.2.5	Determinación de sólidos totales .....	23
3.2.6	Diseño Experimental.....	23
3.2.7	Microencapsulación .....	23
3.2.8	Espectroscopía Infrarroja FT-IR.....	24
3.2.9	Evaluación de la actividad antioxidante .....	25
CAPÍTULO IV .....		27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		27
4.1	Análisis y discusión de resultados .....	27
4.1.1	Diseño Experimental.....	27
4.1.2	Obtención del extracto rico en antocianinas .....	29
4.1.3	Análisis espectroscópico de las antocianinas microencapsuladas .....	29
4.1.4	Eficiencia de microencapsulación de las antocianinas .....	31
4.1.5	Actividad antioxidante <i>in vivo</i> de microencapsulado de <i>B. oleracea</i> .....	32
4.2	Verificación de la hipótesis .....	34
CAPÍTULO V .....		35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		35
5.1	Conclusiones .....	35
5.2.	Recomendaciones .....	35
BIBLIOGRAFÍA .....		36
ANEXOS.....		40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Las antocianinas de color morado de <i>B. oleracea</i> .....	17
Figura 2: Diagrama de Pareto para efectos principales estandarizado del diseño experimental .....	28
Figura 3: Gráfico de superficie de respuesta estimada en la obtención de antocianinas .....	28
Figura 4: Espectros de FTIR del microencapsulado en comparación con las antocianinas sin microencapsular y el polímero .....	30
Figura 5: Actividad antioxidante de microencapsulado determinada por las curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> .....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía <i>B. oleracea</i> .....	18
Tabla 2: Análisis de Varianza para Antocianinas (mg/L) .....	27
Tabla 3: Resultados de eficiencia de microencapsulación .....	31

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Determinación de concentración de antocianinas.....	22
Ecuación 2: Determinación de sólidos totales .....	23
Ecuación 3: Determinación de la eficiencia de microencapsulado .....	24

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Absorbancias medidas a 526 nm de cada extracto.....	40
Anexo 2 Humedades medidas de cada extracto.....	40
Anexo 3: Concentración de antocianinas en cada extracto .....	41
Anexo 4: Microencapsulado.....	42
Anexo 5: Eficiencia de microencapsulado .....	42
Anexo 6: Datos de antioxidación, crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> frente a estrés oxidativo .....	43

## RESUMEN

Se realizó la extracción de antocianinas a partir de col morada (*Brassica oleracea* L.) utilizando como disolvente etanol y ácido clorhídrico en relación 85:15. Se estudiaron como variables tres niveles de tiempo de extracción (60, 90, 120 min) y tres niveles de relación masa de material vegetal – volumen de disolvente (1:20, 1:25 y 1:30). Inicialmente, se determinó que las mejores condiciones de extracción fueron: 120 minutos, con una relación 1:20, a temperatura constante de 70 °C. Seguidamente, se microencapsuló el concentrado de antocianinas mediante secado por aspersión, empleando maltodextrina DE 10 como polímero el cual ocasionó que el microencapsulado tenga gran solubilidad en agua. Los análisis de espectroscopia de FTIR demostraron que las antocianinas se microencapsularon con éxito, puesto que los grupos funcionales del metabolito están enmascarados por el polímero. Las antocianinas microencapsuladas obtuvieron una eficiencia de encapsulación de 90,78 %. A continuación, se evaluó la capacidad antioxidante. Por otro lado, se evaluó *in vivo* a través de la supervivencia celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se expuso a estrés oxidativo, con el fin de evaluar su comportamiento al estar sometida a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se demostró que el microorganismo es capaz de recuperarse de la oxidación celular gracias a la presencia del microencapsulado de las antocianinas de *B. oleracea*, a una concentración 50 mg/ml, lo cual pudo protegerla, a su vez asistir en su recuperación de los daños causados por el peróxido. Se logró llegar a un máximo de 1,214 de turbidez, equivalente a biomasa en el cultivo líquido.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante, antocianinas, microencapsulado, secado por aspersión

## ABSTRACT

The extraction of anthocyanins was carried out from purple cabbage (*Brassica oleracea* L.) using ethanol and hydrochloric acid as a solvent in relation to 85:15. Three levels of extraction time (60, 90, 120 min) and three levels of mass ratio of plant material - volume of solvent (1:20, 1:25 and 1:30) were studied as variables. Initially, it was determined that the best extraction conditions were: 120 minutes, with a 1:20 ratio, at a constant temperature of 70 ° C. Next, the anthocyanin concentrate was microencapsulated by spray drying, using maltodextrin DE 10 as a polymer which caused the microencapsulation to have great water solubility. FTIR spectroscopy analyzes showed that the anthocyanins were successfully microencapsulated, since the functional groups of the metabolite are masked by the polymer. The microencapsulated anthocyanins obtained an encapsulation efficiency of 90.78%. Next, the antioxidant capacity was evaluated. On the other hand, it was evaluated *in vivo* through the cell survival of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which was exposed to oxidative stress, in order to evaluate its behavior when subjected to different concentrations of hydrogen peroxide. It was demonstrated that the microorganism is able to recover from cellular oxidation thanks to the presence of microencapsulation of the anthocyanins of *B. oleracea*, at a concentration of 50 mg / ml, which could protect it, in turn assist in its recovery from damage caused by peroxide. It was possible to reach a maximum of 1,214 turbidity, equivalent to biomass in the liquid culture.

**Key words:** Antioxidant activity, anthocyanins, microencapsulated, spray drying

## INTRODUCCIÓN

Según Bino et al. (2004), se cree que existe una enorme diversidad bioquímica mostrada en el reino vegetal tal que supera los 200 000 metabolitos diferentes. Por lo tanto, es en las plantas donde el perfil completo de metabolitos a gran escala enfrenta su mayor desafío. Actualmente se están siguiendo varios enfoques experimentales para determinar e identificar los metabolitos de las plantas mediante comparaciones espectrales con compuestos auténticos contenidos en bibliotecas espectrales como el NIST.

Los pigmentos producen los colores que observamos a nuestro alrededor, puesto que están presentes en cada uno de los organismos del mundo y las plantas que son los principales productores. Existe gran cantidad de pigmentos con una actividad farmacológica en enfermedades como el cáncer y la enfermedad cardiovascular, lo que ha acentuado su importancia para los seres humanos (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000).

Las antocianinas son pigmentos vegetales de gran importancia. Pertenecen a la clase más extendida de compuestos fenólicos, conocidos como flavonoides, con más de 8000 flavonoides y 500 estructuras de antocianinas informadas para el año 2 000 (Ghosh, 2005).

La col morada o repollo es una de las hortalizas más importantes que se cultivan en todo el mundo. Contiene una gran cantidad de flavonoides, entre ellos las antocianinas, que son las responsables de su color característico. Según J. Singh et al. (2006), antiguamente el repollo se usaba con fines medicinales en el tratamiento de dolores de cabeza, gota, diarrea y úlceras pépticas. Debido a estos antecedentes los pigmentos de las antocianinas fueron estudiados por otros autores en cultivos de *B. oleracea*, y toda la literatura reportada está relacionada con la composición de antocianinas de la col roja y sus propiedades antioxidantes, antialérgicas, antiinflamatorias, antivirales, antiproliferativas, antimutagénicas, antimicrobianas, anticancerígenas y protección contra daños cardiovasculares y alergias (Ghosh, 2005).

Gran parte de las investigaciones se ha centrado en los fitoquímicos beneficiosos del repollo, en particular su indol-3-carbinol (I3C), sulforafano e indoles. Estos compuestos ayudan a activar y estabilizar los mecanismos antioxidantes y de desintoxicación del cuerpo que dismantelan y eliminan las sustancias que producen cáncer (Singh et al., 2006). Los extractos de coliflor violeta muestran importantes propiedades antioxidantes, entre las que se encuentran la actividad de eliminación del radical hidroxilo muy reactivo (Scalzo, Genna, Branca, Chedin, & Chassaingne, 2008). Los vegetales que tienen fitoquímicos antioxidantes tienen fuertes efectos protectores contra las principales enfermedades degenerativas y las enfermedades cardiovasculares (Singh et al., 2006).

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1 Tema de investigación

“Extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de col morada (*B. oleracea*)”.

### 1.2 Justificación

Las frutas y vegetales rojos, morados y de color azul se han utilizado tradicionalmente por sus efectos beneficiosos. Estas plantas poseen un color característico, debido a la presencia de antocianinas, las cuales han sido ampliamente estudiadas por sus valores medicinales (Khoo, Azlan, Tang, & Lim, 2017). Una de las plantas con abundante cantidad de antocianinas es el repollo rojo o morado (*B. oleracea*). Este cultivo es nativo de la región mediterránea de Europa y en la actualidad se cultiva como un vegetal de mercado fresco en todo el mundo (Song, H., Yi, H., Lee, M., Han, C.-T., Lee, J., Kim, H., ... Hur, Y. 2018). Sin embargo, se sabe que antiguamente se cultivaba solo para uso medicinal, ya que el zumo de sus hojas se empleaba para estimular la lactancia (Font Quer, 1961). Las verduras crucíferas, en particular las incluidas en el género *Brassica*, son una parte importante de la dieta del ser humano, proporcionando gran cantidad de nutrientes y compuestos bioactivos (Sotelo, Cartea, Velasco, & Soengas, 2014).

La col lombarda (*B. oleracea*; Familia-*Brassicaceae*) es un alimento funcional. Comúnmente es consumido en Asia y Europa debido a su baja composición calórica, (Jana, S., Patel, D., Patel, S., Upadhyay, K., Thadani, J., Mandal, R., ... Devkar, R. 2017), sus vitaminas, carotenoides, azúcares solubles y componentes fenólicos (Sotelo et al., 2014). Además, es una fuente rica de antocianinas como cianidin-3-diglucósido-5-glucósido y sus diversos derivados acilados (Jana et al., 2017).

Las antocianinas (perteneciente a los flavonoides) se emplean ampliamente en la industria alimentaria para aumentar la aceptabilidad del consumidor a ciertos productos (Zapata, 2014), por lo que han sido utilizadas por muchos años sin efectos adversos aparentes; poseen colores atractivos brillantes, y gracias a que son solubles en agua es fácil su incorporación en sistemas acuosos alimenticios (Aguilera, Reza, Chew, Aguilar, & Ramírez, 2012). La preferencia por colorantes naturales no sintéticos se debe a su inocuidad y excelente desarrollo (Chengaiyah, Rao, Kumar, Alagusundaram, & Chetty, 2010). En la industria de colorantes alimenticios, las antocianinas son de mucha utilidad debido a su capacidad para

conferir colores atractivos (Konczak & Zhang, 2004). El interés por los pigmentos antocianinos es debido a que han sido usados habitualmente como colorantes alimentarios naturales por su baja o nula toxicidad, (Garzón Gloria A., 2008), pues varios colorantes sintéticos han sido prohibidos debido a que causan alergias o son cancerígenos (Aguilera et al., 2012). Además, los pigmentos obtenidos de las antocianinas poseen propiedades nutricionales y farmacéuticas, beneficiosas para la salud.

La incorporación de antocianinas como colorantes alimenticios se debe a que además de mejorar la apariencia total, son muy benéficas para nuestra salud. Según Aguilera, Reza, Chew, & Meza (2011), existen varios estudios que presentan evidencia científica que los extractos ricos en antocianinas pueden mostrar actividad antioxidante, atrapar radicales y actuar como agentes quimioprotectores. Los colorantes naturales como estos, son más seguros para el consumo, incluso en grandes cantidades, que a diferencia de los colorantes sintéticos pueden llegar a ser perjudiciales (Khoo et al., 2017).

Por su parte, las antocianinas extraídas de plantas comestibles son ingredientes farmacéuticos potenciales, ya que poseen efectos antidiabéticos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antimicrobianos y antiobesidad. Además, pueden mejorar la función visual y también ayudar en la prevención de enfermedades cardiovasculares ( Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. 2017). Se han publicado investigaciones sobre las propiedades de la col lombarda como hepatoprotector, estabilizadora de membrana y neuroprotectora, en la que su potencial terapéutico es atribuido a su alto contenido de antocianinas (Jana et al., 2017). Según Arrazola, Herazo, & Alvis, (2013), también juegan un rol fundamental quizá en la reducción de enfermedades coronarias, cáncer, diabetes, y comportamiento cognitivo. Todos estos efectos preventivos y terapéuticos se asocian a sus propiedades antioxidantes (Longo & Vasapollo, 2004; Garzón Gloria A., 2008). Estos atributos de las antocianinas resultan de interés en estudios de extracción para poder utilizar posteriormente el producto en aplicaciones tecnológicas y medicinales (Zapata, 2014).

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

- Obtener productos microencapsulados con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias a partir de antocianinas extraídas de *B. oleracea*

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones óptimas de extracción de antocianinas de hojas de *B. oleracea*.
- Microencapsular mediante secado por aspersion las antocianinas extraídas, empleando maltodextrina como polímero.
- Evaluar la actividad antioxidante de las antocianinas microencapsuladas.



## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

##### 2.1.1 *B. oleracea*.

*Brassica oleracea* L. comúnmente conocida como “col morada” es una de las más de 3000 especies de género *Brassica* (Ishida et al., 2014), perteneciente a la familia Cruciferaeae. Tiene una raíz corta y sin ramificaciones. La principal característica es el pigmento púrpura en sus cabezas florales. Es una planta ampliamente apreciada, puesto que tiene gran importancia nutricional, ya sea por sus vitaminas o por sus componentes fitoquímicos vitales (Watanabe, Suwabe, & Suzuki, 2012).

El repollo morado, como también es conocida, tiene diferentes usos ya sea en el campo químico o en el gastronómico. Está constituida por abundantes en compuestos de azufre, vitamina C y ácido cítrico. Tiene un bajo contenido calórico, es rica en antioxidantes (1,88 mmoles/100 g) y proporciona mucha fibra, por lo que se le adjudica propiedades laxantes (Salas Salvadó, Ros Rahola, & Sabaté, 2005).



**Figura 1.** Las antocianinas de color morado de *Brassica oleracea* L. (Fuente: Plantas 2018)

**Tabla 1.** Taxonomía *B. oleracea*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Equisetopsida C. Agardh
<b>Orden</b>	Brassicales Bromhead
<b>Familia</b>	Brassicaceae Burnett
<b>Género</b>	<i>Brassica</i> L.
<b>Especie</b>	<i>Brassica oleracea</i> L.
<b>Autor del epíteto específico</b>	(Linneo, Carl von n.d.)
<b>Nombre científico</b>	<i>Brassica oleracea</i> L.

*Nota.* Recuperado de Tropicos.org. <<http://www.tropicos.org/Nombre/100300439>> Jardín Botánico de Missouri - 4344 Shaw Boulevard- Saint Louis, Missouri 63110

### 2.1.2 Compuestos fitoquímicos en *B. oleracea*.

Los vegetales Brassicaceae tienen gran cantidad de sustancias que promueven la salud y reducen el riesgo de enfermedades. Estas verduras son fuentes potenciales de glucosinolatos anticancerígenos, gran cantidad de compuestos polifenólicos, como glucosinolatos, ácidos fenólicos, antocianidinas, carotenoides y aminoácidos (Park et al., 2014).

La col, una verdura crucífera, contiene carbohidratos y metabolitos antioxidantes como vitamina C y E (Chun, Smith, Sakagawa, & Lee, 2004). Además, se conoce que el repollo rojo contiene varios flavonoides como por ejemplo miricetina, luteolina, delphinidina, cianidina y pelargonidina y en especial kaempferol y quercetina, que se consideran compuestos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, antitrombóticos y antivirales lo que puede tener un impacto beneficioso en la salud humana (Park et al., 2014). Por otro lado (Wiczowski, Topolska, & Honke, 2014) a través de un estudio realizado con la col morada se determinó mediante el método HPLC-DAD-MS / MS que *B. oleracea* cuenta con otra subclase de flavonoides, 20 antocianinas diferentes con la estructura principal de cianidina-3-diglucósido-5-glucósidos. Se reconoció la presencia de forma no acilada, monoacilada y diacilada predominando en su mayoría los compuestos no acilados y diacilados con ácido sinápico de cianidin-3-diglucósido-5-glucósido.

## **2.2 Hipótesis**

### **2.2.1 Hipótesis nula**

No se desarrollará la extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de col morada (*B. oleracea*)”.

### **2.2.2 Hipótesis alternativa**

Se desarrollará la extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de col morada (*B. oleracea*).”

## **2.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis**

### **2.3.1 Variables dependientes**

- Propiedades antioxidantes y concentración de antocianinas en el microencapsulado.

### **2.3.2 Variables independientes**

- Proporción de material vegetal y tiempo de ebullición

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales, equipos y reactivos

##### 3.1.1 Materiales

- Balones de aforo.
- Matraces Erlenmeyer.
- Probetas graduadas.
- Núcleos para agitador magnético.
- Pipetas.
- Micropipetas.
- Pera de succión.
- Tubos para centrifugadora.
- Microplacas de 96 pocillos para espectrofotómetro.
- Botellas de cristal color ámbar.

##### 3.1.2 Equipos

- Procesador de alimentos (Thermomix®).
- Horno de secado (Gander MJN).
- Plancha de calentamiento (Corning PC-620D).
- Centrifuga (Rotina 380).
- Balanza analítica (Ohaus PA-214).
- Balanza de humedad (KERN MLS 50-3).
- Espectrofotómetro UV-VIS (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO).
- Roto Evaporador (IKA-RV8).
- Mini Spray Dryer (BUCHI-B 290).
- Computadora laptop con sistema operativo Windows 10.
- Software de análisis de datos estadístico y gráfico, Statgraphics XVII 64x .

### **3.1.3 Reactivos**

Para el proceso de extracción de antocianinas requirió los siguientes reactivos:

- Ácido Clorhídrico (1 mol/l) y etanol 96 %.

En el proceso de microencapsulación se utilizó

- Maltodextrina.

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

- Agua destilada, medio de extracto de levadura peptona-dextrosa (YPD), tampón fosfato salino (PBS), vitamina C, peróxido de hidrogeno.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Recolección de la planta**

El material vegetal fértil (fresco y en mejores condiciones) de la col morada fue recaudado en el Mercado Modelo, Provincia de Tungurahua, Ambato.

### **3.2.2 Preparación de materia vegetal**

En el laboratorio de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB) de la UTA, se deshojó el tallo para proceder a lavar las hojas y eliminar cualquier tipo de contaminación que pudiera afectar los resultados. Con el fin de obtener mejores resultados se trituraron las hojas en un procesador (Thermomix®). Posteriormente, se extendieron sobre mallas metálicas y se introdujeron en una estufa (Gander MTN) a 60 °C de temperatura.

### **3.2.3 Obtención extractos líquidos**

Previa obtención del mejor extracto vegetal, se trabajó con diferentes variables, tales como: la relación material vegetal/volumen de disolvente y el tiempo de extracción,

manteniendo constante la temperatura de ebullición. Como disolvente se usó etanol al 96 % en combinación con ácido clorhídrico 1 mol/l, en proporción 85:15. Se procedió a pesar el material vegetal utilizando una balanza analítica (Ohaus pioneer) en tres niveles de relación masa de material vegetal – volumen de disolvente (1:20, 1:25 y 1:30) y se mezcló respectivamente con 100 ml de disolvente. A continuación, en 3 matraces (Pyrex) con tapa, se calentó cada una de las muestras en una plancha de calentamiento (Corning PC-620D) a 70 °C con agitación magnética a 400 min<sup>-1</sup>, aplicando tres tiempos de extracción diferentes, 60, 90 y 120 min respectivamente para cada una de las respectivas proporciones de masa; Se tomó el tiempo después de alcanzar la temperatura, así sucesivamente con cada una de las muestras. Posteriormente, se separó los residuos sólidos del extracto líquido, utilizando una centrifuga (Rotina 380) a 5000 min<sup>-1</sup> durante 10 minutos. Se desechó el precipitado y conservó el sobrenadante en botellas cerradas de vidrio color ámbar en refrigeración a 4 °C para evitar la descomposición de las antocianinas.

Las antocianinas aisladas suelen ser un poco inestables y susceptibles a la degradación durante el almacenamiento y el procesamiento, por lo que hay que tener especial cuidado con varios factores como temperatura de almacenamiento, concentración, luz, oxígeno, disolventes (Arrazola, Herazo, & Alvis, 2014b).

#### **3.2.4 Análisis por espectroscopia de absorbancias**

El análisis de antocianinas se realizó de los extractos líquidos obtenidos con un factor de dilución 1/25, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS compatible con microplacas de 96 pocillos (Fisherbrand™ accuSkan™ GO). Se determinó la absorbancia de la col morada colocando 200 µl en cada pocillo de cada una de las muestras por cuadruplicado. La longitud de onda en la cual se midió fue de 526 nm. Según Aguilera et al., (2011), en la medición espectrofotométrica de antocianinas la absorción máxima se da entre 520-540 nm en la región visible. La longitud de onda más común usada para antocianinas separadas para ser detectadas y cuantificadas es a 526 nm.

La concentración de antocianinas se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$mg L^{-1} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times 1}$$

*Ecuación 1: Determinación de concentración de antocianinas*

donde, A es igual a absorbancia, PM equivale al peso molecular de la cianidina-3-glucósido (449,6 g/L), FD es el factor de dilución y  $\epsilon$  es coeficiente de absorción molar para la col morada (38020) (Universidad de las Américas de Puebla, 2018).

### 3.2.5 Determinación de sólidos totales

Los sólidos totales de las muestras obtenidas se determinaron tomando mediciones de humedad por triplicado con una balanza de humedad (marca KERN MLS 50-3), en recipientes de vidrio. Finalmente se calculó el porcentaje de sólidos totales con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Sólidos totales} = 100 - \% \text{ humedad}$$

*Ecuación 2: Determinación de sólidos totales*

### 3.2.6 Diseño Experimental

Para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de antocianinas se tabularon los datos obtenidos en una base de datos Excel 2010. Posteriormente se usó el programa Statgraphics el cual arrojó una ecuación de superficie de respuesta, que ayudó a observar como los cambios en las variables afectaron en los extractos obtenidos. Según Figueroa (2003), el diseño de superficie de respuesta ayuda los investigadores a analizar una respuesta, que se puede observar como una superficie, al investigar en un experimento el efecto que tiene el variar factores cuantitativos en los valores que toma una variable dependiente o respuesta.

Para predecir la combinación óptima de material vegetal y tiempo de ebullición en la extracción se aplicó un diseño experimental de superficie de respuesta  $3^2$  con los datos obtenidos de concentración de antocianinas conseguidos de las nueve relaciones de material vegetal y tiempo con sus tres respectivas réplicas. Se tomó como índice de confianza el 95 % y se consideró significativos valores de  $p \leq 0,05$  en los análisis de varianza de ANOVA.

### 3.2.7 Microencapsulación

Para proteger el metabolito obtenido se procedió a su microencapsulación que según Arrazola et al., (2014), es una técnica en la que se recubre un ingrediente sensible, ya sea puro o una mezcla, dentro de un material para aumentar su vida útil y estabilidad, al protegerlo

contra la humedad, calor, oxidación química u otras condiciones extremas, como se hace en el caso de las vitaminas, pigmentos y otros compuestos bioactivos.

En el proceso de microencapsulación se redujo el disolvente orgánico utilizando un rotoevaporador a 50 °C al vacío, se obtuvo un concentrado de la fase acuosa y se procedió a medir la húmeda por triplicado para calcular la cantidad de sólidos totales, utilizando la fórmula ya antes mencionada, que fue 18,25 % en 60 ml de extracto. Seguidamente se mezclaron los 60 ml obtenidos de solución de antocianinas con 72,98 g de maltodextrina DE (dextrosa equivalente) 10, y 260 g de agua destilada. La maltodextrina como polímero de microencapsulación es una buena opción, son extensivamente utilizados en la industria de alimentos, por el costo y la efectividad; son inodoras, incoloras y de baja viscosidad a altas concentraciones, además permiten la formación de polvos de libre flujo sin enmascarar el sabor original (Parra Huertas, 2010).

Se homogenizó la muestra en una plancha de calentamiento a 45 °C a 500 min<sup>-1</sup>. La microencapsulación del extracto vegetal rico en antocianinas se llevó a cabo utilizando un mini Spray Dryer BUCHI B- 290. Se procedió a secar por aspersion con una temperatura de entrada de 150 °C. Se abrió el flujo de aire y de agua para controlar la temperatura de salida que fue de 90 °C a una presión de -50 mbar. El material encapsulante se solidificó sobre las partículas a medida que el disolvente se evaporó formando microesferas.

Para verificar la eficiencia de microencapsulación, el polvo se puso en contacto 1,5 g del microencapsulado en 15 ml de agua y en 15 ml de etanol individualmente. Se filtró y al filtrado se le realizó una dilución 1/1000 para medir las absorbancias a una longitud de onda de 526 nm. La concentración de cada dilución se calculó utilizando la Ecuación 1. En la eficiencia se utilizó la siguiente ecuación.

$$\%E.E = \frac{\text{Concentración en agua (total)} - \text{concentración en etanol(libre)}}{\text{concentración en agua (total)}} * 100$$

*Ecuación 3: Determinación de la eficiencia de microencapsulado*

### **3.2.8 Espectroscopía Infrarroja FT-IR**

Con el fin de comprobar que la microencapsulación de antocianinas se realizó de forma eficiente se realizó un análisis de espectroscopía infrarroja en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Facultad de Ciencia en el Laboratorio de Química Instrumental.



Se utilizó el programa Spectra Analysis y se procedió a analizar una pequeña muestra de microencapsulado de antocianinas, de extracto líquido de antocianinas y de maltodextrina, en el soporte del espectro infrarrojo. Al hacer una comparación de los picos más relevantes obtenidos en las tres muestras.

### **3.2.9 Evaluación de la actividad antioxidante**

Para la evaluación de la actividad antioxidante se utilizó cepas cultivadas en 200 ml de medio YPD compuesto por glucosa 4 g, extracto de levadura 2 g y peptona 4 g y se cultivaron a 28 °C con agitación toda la noche. Posteriormente se extendieron sobre placas de agar YPD y se incubaron a 28 °C por 72 h para obtener colonias individuales.

Una sola colonia de cepa de levadura se inoculó en 5 ml de medio YPD líquido fresco y se incubó durante 6 horas a 28 °C con agitación a 40 min<sup>-1</sup>, posteriormente se realizó una dilución 1/10 de este precultivo. A continuación, se inoculó una alícuota de 5 µL de la dilución realizada en 3 mL de medio YPD líquido fresco junto con 1 mL de microencapsulado a una concentración de 50 mg/ml (1 g de microencapsulado en 20 mL de agua destilada) y 25 mg/mL (0,5 g de microencapsulado en 20 mL de agua destilada) durante 18 h a 28 °C con agitación a 100 min<sup>-1</sup> en un rotador de tubos.

Para los controles positivos se analizaron varias concentraciones de vitamina C para inducir una respuesta antioxidante intracelular en la levadura. Se inoculó una alícuota de 5 µL de la dilución en 3 mL de medio YPD líquido fresco junto con 1 mL de vitamina C a una concentración de 25 mg/ml (0,5 g de vitamina C en 20 mL de agua destilada) y 50 mg/mL (1 g de vitamina C en 20 mL de agua destilada) durante 18 h a 28 °C con agitación a 100 min<sup>-1</sup> en un rotador de tubos.

Para el control negativo se utilizó cultivos sin ningún ingrediente antioxidante, por lo que solo se inoculará una alícuota de 5 µL de la dilución 1/10 previamente realizada en 3 mL de medio YPD líquido fresco y se dejó reposar durante 18 h a 28 °C con agitación a 100 min<sup>-1</sup> en un rotador de tubos.

Las células se recogieron mediante centrifugación a 2700 min<sup>-1</sup>, durante 10 minutos, a 20 °C y se resuspendieron los precipitados en 3 mL de PBS pH 7,4. Se leyó la absorbancia a 600 nm para asegurar una concentración de 0,1 en todas las etapas.

Para realizar la etapa de estrés oxidativo, se analizó un rango de concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se añadió 1 mL a una concentración de 0,5 mmol/l de peróxido de hidrogeno y 1 mL a

una concentración de 3 mmol/l de igual manera de peróxido de hidrogeno para concentración de microencapsulado y vitamina. Se incubó durante 60 min a 28 °C. Los oxidantes se eliminaron mediante centrifugación a 2700 min<sup>-1</sup>, durante 20 min, a 20 °C. El pellet se resuspendió en 1 mL de medio YPD fresco para su posterior análisis de crecimiento.

Los cultivos se distribuyeron en placas de microtitulación de 96 pocillos con un volumen final de 250 µl por pocillo utilizando tres repeticiones para cada combinación de condición. El crecimiento de la levadura se controló a 30 °C leyendo la Absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro con lector de placas de 96 pocillos (marca Fisherbrand™ accuSkan™ GO) durante 23 h con agitación antes de cada lectura cada 20 min.

El efecto ejercido por el peróxido de hidrogeno y los agentes oxidantes a evaluarse se determinó mediante el análisis estadístico de la gráfica de curva de relación de crecimiento vs tiempo. La absorbancia medida a 600 nm es equivalente a la actividad antioxidante puesto que muestra el crecimiento de microorganismos y refleja la adaptación y efectividad del microencapsulado como antioxidante. (Peláez Soto & Patricia Roig Montoya José Vicente Gil Ponce Valencia, 2016).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Análisis y discusión de resultados

##### 4.1.1 Diseño Experimental

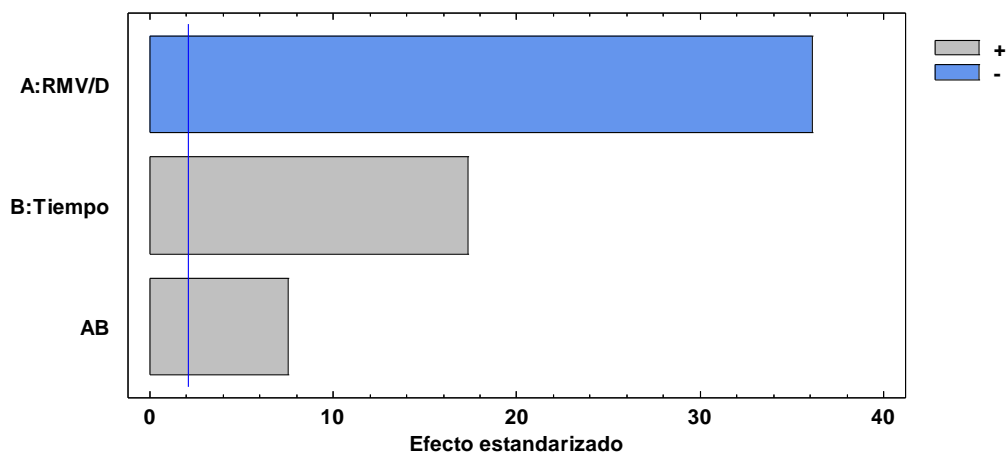
Se utilizó un modelo de superficie de respuesta  $3^2$ , el cual arrojó una tabla ANOVA. De acuerdo a Pardo et al. (2017), la ANOVA es ampliamente utilizada como estrategia de análisis de datos en muy diversas áreas de investigación. ya que permiten estudiar el efecto de la interacción entre factores. A continuación, en la Tabla 2 se muestra el análisis de varianza:

**Tabla 2.** Análisis de Varianza para Antocianinas (mg/L).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: RMV/D	11188,6	1	11188,6	1302,68	0,0000
B: Tiempo	2587,68	1	2587,68	301,28	0,0000
AB	487,305	1	487,305	56,74	0,0000
bloques	9,49127	2	4,74563	0,55	0,5836
Error total	180,367	21	8,58892		
Total (corr.)	14453,4	26			

Como se observa en la Tabla 2, en el análisis de varianza para antocianinas se obtuvo un valor de R-cuadrada de 0,9875. Según Rodríguez (2005), cuando el valor de  $R^2$  es más cercano a 1 muestra que el ajuste del modelo es bueno. El 98,75 % el modelo de regresión describe la variabilidad de las variables de tiempo de extracción, relación material vegetal – volumen de disolvente y la interacción que existe entre ellas. La ecuación del modelo ajustado de las antocianinas (mg/l) =  $318,3 - 8,8 * \text{RMV/D} - 0,66 * \text{Tiempo} + 0,04 * \text{RMV/D} * \text{Tiempo}$

A continuación, en la Figura 2, se ilustra a través del diagrama de Pareto la influencia de los factores estudiados.

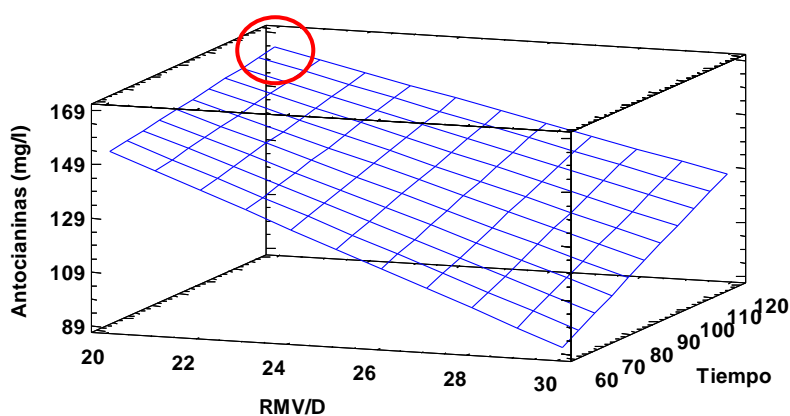


**Figura 2.** Diagrama de Pareto para efectos principales estandarizado del diseño experimental.

De acuerdo con Sales (2009), el diagrama de Pareto es un gráfico. Ayuda a asignar un orden de prioridades a los problemas o las causas que los provocan, mediante la organización varios datos en un orden determinado, por medio de barras sencillas.

Los factores que influyen significativamente son la relación de material vegetal y el tiempo, ya que sobrepasan la línea de confianza del 95 %.

La metodología de superficie de respuesta permite analizar como alterar factores cuantitativos en los valores que toma una variable, puede afectar en una respuesta, que se muestra como una superficie, (G. Figueroa, 2003). A continuación, en la Figura 3 se muestra el diagrama de superficie de respuesta.



**Figura 3.** Gráfico de superficie de respuesta estimada en la obtención de antocianinas.

Según la Figura 3, en donde se observa el gráfico de superficie de respuesta para la obtención de antocianinas, la máxima concentración de antocianinas se alcanza con el mínimo de la relación material vegetal: volumen de disolvente siendo 1:20 y el valor máximo del

tiempo siendo de 120 min. Se alcanza una concentración de 164,54 mg/l. Al haber estudiado en el diseño valores de la relación material vegetal: volumen de disolvente superior se puede deducir que no hay saturación del disolvente, sin embargo, se pudiera estudiar para esta relación tiempos mayores, con el objetivo de verificar si se supera la concentración alcanzada bajo las condiciones de este diseño.

#### **4.1.2 Obtención del extracto rico en antocianinas**

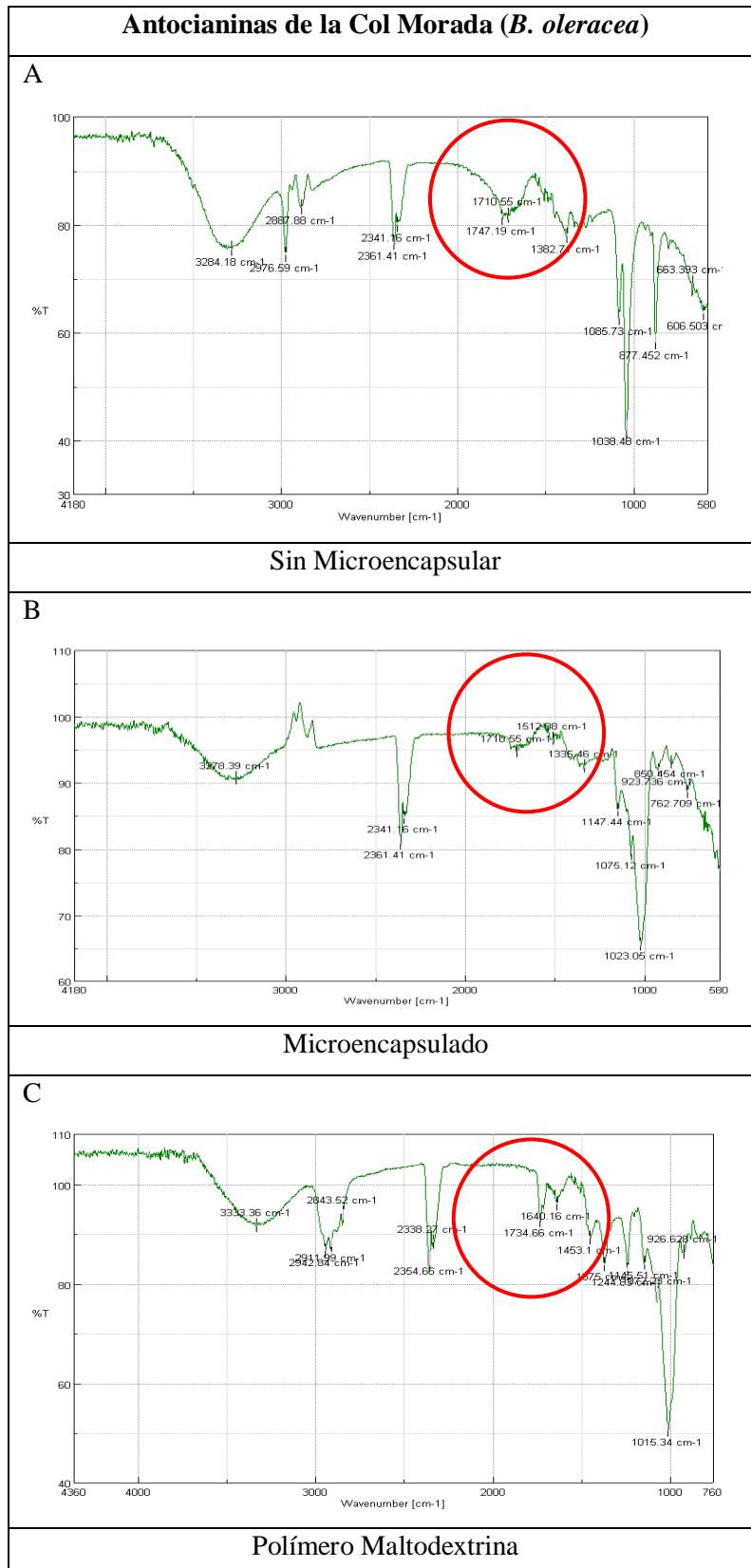
Una vez determinadas las condiciones óptimas de extracción de antocianinas se realizó la mezcla de material vegetal (57,50 g) y disolvente (1150 mL) a una escala mayor la cual se mantuvo a 70 °C durante 120 min y se obtuvieron 800 mL de extracto rico en antocianinas. Después se eliminó gran parte del disolvente con un rotoevaporador al vacío IKA (RV 8 V-C) a una temperatura de 75 °C y se obtuvo 60 mL de concentrado del extracto rico en antocianinas, con un porcentaje de sólidos totales de 18,25 %.

#### **4.1.3 Análisis espectroscópico de las antocianinas microencapsuladas**

Según Cozzolino (2002), la espectroscopía está basada en la luz que incide en una muestra, los fotones se transmiten a través de la misma, siendo el resto absorbida. La muestra al absorber energía da como resultado un espectro con una combinación de bandas de absorciones parciales, sobrepuestas o muy cercanas, debido a que los enlaces entre carbono e hidrógeno, oxígeno e hidrógeno y nitrógeno e hidrógeno; que son los principales componentes en la estructura básica de las sustancias orgánicas; vibran en distintas formas produciendo picos, valles y curvaturas característico de cada enlace. Las antocianinas como flavonoides, tienen un esqueleto carbonado que varía en el número de grupos hidroxilo y en la localización de unión de los azúcares en la molécula, los ácidos alifáticos o aromáticos que están unidos a los azúcares también varían en cuanto a clase y número (Orellano, et al., 2017).

La estructura básica de una antocianina simple está conformada por dos anillos aromáticos unidos por una estructura de tres carbonos, naturalmente está esterificada a uno o varios azúcares. (Castillo et al., 2010).

A continuación, en la Figura 4 se muestra el análisis por espectroscopía infrarroja de las antocianinas microencapsuladas.



**Figura 4.** Espectros de FTIR del microencapsulado en comparación con las antocianinas sin microencapsular y el polímero.

La Figura 4A, ilustra los grupos químicos característicos de las antocianinas y el espectro de antocianinas sin microencapsular, mientras la Figura 4B exhibe el metabolito microencapsulado enmascarado por el polímero maltodextrina.

Según Barragán et al. (2018), la presencia de ciertos grupos funcionales en un análisis de espectros de FTIR, son propias de una posible estructura antociánica, estos grupos son: C=O que tienen características de absorción entre 1680 y 1640, aromáticos entre 1600 y 1500 y la de -OH quelatado o-hidroxicetona a 3500 – 3200. Este análisis espectroscópico FTIR permite apreciar claramente las vibraciones características de anillos fenólicos que pueden encontrarse ocultas en las bandas que aparecen en los 1747,19 – 1382,71 cm<sup>-1</sup>.

El espectro de antocianinas microencapsulado en maltodextrina puede ser observado en la Figura 4B. Las antocianinas se han microencapsulado con éxito puesto que el grupo funcional está enmascarado por el polímero.

Por otro lado, el espectro del polímero Maltodextrina carece de las bandas presentes en el espectro de las antocianinas sin microencapsular (Figura. 4C). Dichas bandas corresponden a los grupos OH de los polifenoles (1747,19 – 1382,71 cm<sup>-1</sup>).

#### 4.1.4 Eficiencia de microencapsulación de las antocianinas

La microencapsulación con maltodextrina reduce en gran manera la viscosidad de una dispersión. Al parecer esto ocasionó que el microencapsulado tenga gran solubilidad en agua (Domínguez, 2012). Los resultados de la determinación de la eficiencia de microencapsulación son presentados en la Tabla 3. El mayor porcentaje de eficiencia de microencapsulación fue del 90,78%. La eficiencia alcanzada quizás se debió al impacto de los parámetros de microencapsulación mediante secado por aspersión. La misma fue realizada a una temperatura de entrada de 150 °C y 90 °C de salida del mini Spray Dryer BUCHI-B 290. Estos resultados casi concuerdan con lo descrito en Arrazola et al. (2014), quienes indican que la temperatura de entrada entre 150 °C – 170 °C es un factor que influye en la eficiencia del microencapsulado de las antocianinas de la berenjena. Una temperatura elevada del aire de entrada da mayor eficiencia de calor y mejora los procesos de transferencia de masa.

**Tabla 3.** Resultados de eficiencia de microencapsulación.

Dilución 1/1000	Absorbancia a 526 nm	Concentración (mg/L)	Eficiencia de encapsulación (%)
Agua (total)	0,293	8,66	90,78

Etanol (superficial)	0,027	0,80	
Agua (total)	0,297	8,06	90,57
Etanol (superficial)	0,028	0,76	
Agua(total)	0,291	8,60	89,69
Etanol (superficial)	0,03	0,89	

Por otro lado, Choque & Corilla (2015), notaron al microencapsular antocianinas extraídas de las flores del mastuerzo que la eficiencia de la microencapsulación también puede ser afectada por la viscosidad del extracto, pudiendo provocar que los sólidos se aglutinen en la pared de la cámara del secador haciendo que la eficiencia disminuya.

#### 4.1.5 Actividad antioxidante *in vivo* de microencapsulado de *B. oleracea*.

Los organismos tienen un complejo mecanismo de defensa contra los agentes oxidantes que se producen naturalmente en el metabolismo del oxígeno. Un antioxidante reacciona químicamente con sus componentes naturales para modificar o suprimir la producción de especies oxidantes (Orellano et al., 2017).

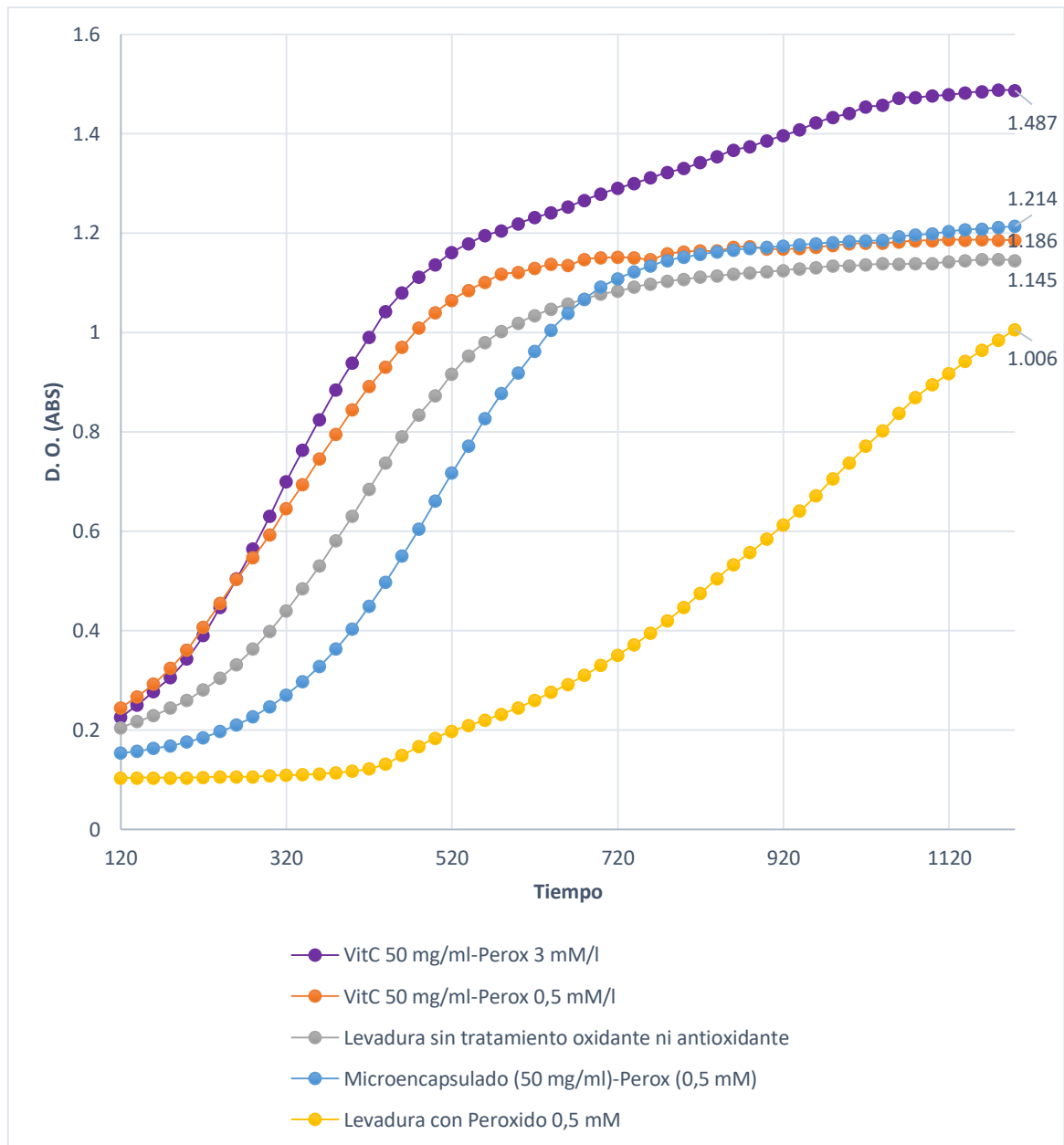
Los polifenoles en especial los flavonoides son donadores de hidrógenos o electrones a los radicales libres, pueden atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática (Kuskoski, et al., 2004).

Las antocianinas son uno de los pigmentos más importantes y conocidos del mundo. Este flavonoide tiene un efecto beneficioso para la salud, previniendo enfermedades del tipo cardiovasculares, cáncer, enfermedades circulatorias y neurológicas. Son muy importantes también por su potencial antioxidativo (R. Figueroa, et al., 2011).

La actividad antioxidante del microencapsulado se comprobó mediante un análisis *in vivo*. Se expuso a estrés oxidativo a *S. cerevisiae* con el fin de evaluar su comportamiento al estar sometida a peróxido de hidrógeno.

Los perfiles de crecimiento de la levadura se exponen en la Figura 5. Se decidió cuantificar la biomasa por turbidimetría a 600 nm ya que las absorbancias medidas a esta longitud de onda puede interpretarse como la cantidad de microorganismos presentes en un cultivo líquido. La obtención de una absorbancia elevada indica que existe gran turbidez, lo que se podría considerar como la biomasa existente (Camacho & Sáenz, 2010).





**Figura 5.** Actividad antioxidante de microencapsulado determinada por las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae*.

Para identificar el poder antioxidante del extracto *B. oleracea*, se empleó a la levadura con el microencapsulado a una concentración 50 mg/ml. Por otro lado, la levadura con la vitamina C a una concentración de 50 mg/ml se consideró como control positivo, y como control negativo a la levadura sola. Todos estos controles se sometieron a una concentración de peróxido de hidrogeno de 0,5 mmol/l.

Se utilizó como control positivo a la vitamina C, ya que según Avello & Suwalsky (2006) es uno de los antioxidantes hidrosoluble más abundante en el cuerpo humano. Este compuesto ayuda a proteger al organismo de los efectos oxidativos provocados por los radicales libres.

La levadura sin ningún tratamiento antioxidante y sin presencia de peróxido de hidrogeno llega a un punto máximo de absorbancia de 1,145, que equivaldría al ciclo normal de crecimiento de *S. cerevisiae*. Sin embargo, el perfil de crecimiento del control positivo y el de la levadura con microencapsulado es superior. El control negativo que implica a la levadura expuesta al estrés oxidativo sin ningún antioxidante tiene una tasa de crecimiento limitado. Según Moreno, et al. (2014), el microorganismo posee mecanismos de defensa propios como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas contra el daño oxidativo. A pesar de esto, *S. cerevisiae* en este ensayo alcanza un máximo de absorbancia de 1,006, el cual no supera al control positivo, cuya curva de crecimiento alcanza 1,186 gracias a la vitamina C.

Por otro lado, se puede observar que la levadura que ha sido sometida a estrés oxidativo y fue protegida con el microencapsulado de *B. oleracea*, pudo recuperarse del efecto del peróxido de hidrógeno y ha llegado a un punto máximo de 1,214. Según Orellano et al. (2017), el repollo morado tiene un total de 25 mg/100 g de antocianinas, y Salas Salvadó et al. (2005), afirman que es rica en antioxidantes, 1,88 mmol/100 g.

Tanto el microencapsulado como la vitamina C a una concentración de 50 mg/mL tienen actividad antioxidante similar pasado los 800 min. La curva generada por el crecimiento de la levadura en presencia del microencapsulado mostró una disminución inicial drástica relacionada a la duración de la fase de adaptación. No obstante, los valores máximos de crecimiento tienden a estabilizarse en la fase estacionaria del crecimiento de *S. cerevisiae*. El microencapsulado fue capaz de promover un crecimiento mayor gracias a las antocianinas. Hernández & Arturo (2017), aseguran que este metabolito tiene actividad antioxidante que ayuda a la protección de la oxidación del ADN y disminución en enfermedades cardiovasculares y algunas degenerativas, diabetes, cáncer, problemas de visión.

#### **4.2 Verificación de la hipótesis**

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

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

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

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- Se determinaron las condiciones óptimas de extracción de antocianinas de hojas de *B. oleracea*, alcanzándose la mayor concentración con 120 min de extracción a una temperatura constante de 70 °C y una relación de 1 parte de material vegetal por cada 20 partes de disolvente.
- Se microencapsularon mediante secado por aspersion las antocianinas extraídas, lográndose una eficiencia de encapsulación de 90,78 %.
- Se evaluó la actividad antioxidante de las antocianinas microencapsuladas *in vivo* en *S. cerevisiae* expuesta a un agente oxidante y utilizando como control positivo vitamina C, demostrándose que el microorganismo en presencia de las antocianinas microencapsuladas se logra recuperar en un nivel similar a la concentración de 50 mg/ml de vitamina C, con lo que se evidencia su poder antioxidante.

#### 5.2. Recomendaciones

- Realizar una caracterización de los tipos de antocianinas presentes en el microencapsulado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., Aguilar, J., & Ramírez, P. (2012). "Antocianinas De Higo Como Colorantes Para Yogur Natural." *Ciencias Biológicas Y De La Salud*, *14*(1), 18–24. <https://doi.org/10.18633/Bt.V14i1.111>
- Aguilera, M., Reza, M. Del C., Chew, R., & Meza, J. (2011). Propiedades Funcionales De Las Antocianinas. *Biotechnia*, *13*(2), 16–22. <https://doi.org/10.18633/Bt.V13i2.81>
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014a). Microencapsulación De Antocianinas De Berenjena (*Solanum Melongena L.*) Mediante Secado Por Aspersión Y Evaluación De La Estabilidad De Su Color Y Capacidad Antioxidante. *Informacion Tecnologica*, *25*(3), 31–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300006>
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014b). Obtención Y Evaluación De La Estabilidad De Antocianinas De Berenjena ( *Solanum Melongena L.* ) En Bebidas, *25*(3), 43–52. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300007>
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales Libres, Antioxidantes Naturales Y Mecanismos De Protección \*. *Atenea (Concepción)*, (494), 161–172.
- Barragán, M., Aro, J. M., Huamaní, V., & Cartagena, R. (2018). Antocianinas, Compuestos Fenólicos Y Capacidad Antioxidante Del Mio – Mio (*Coriaria Ruscifolia L.*). *Revista De Investigación Altoandinas*, *20*(4), 419–428.
- Bino, R. J., Hall, R. D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., ... Sumner, L. W. (2004). Potential Of Metabolomics As A Functional Genomics Tool, *9*(9). <https://doi.org/10.1016/J.Tplants.2004.07.004>
- Camacho, L. N., & Sáenz, R. T. (2010). Implementación De Diferentes Técnicas Analíticas Para La Determinación De Biomasa Bacteriana De Cepas *Pseudomonas Putida* Biodegradadoras De Fenol. *Revista Ion*, *23*(1), 41–46.
- Castillo, G., Michelena, G., Nogueiras, C., Ortega, G., Bello, D., Guerra, M., & Mieres, G. (2010). Caracterización Cromatográfica Y Espectroscópica De Un Pigmento Rojo Obtenido A Partir De *Bothryodiplodia Theobromae*. *Icidca. Sobre Los Derivados De La Caña De Azúcar*, *44*(3), 15–20.
- Chengaiyah, B., Rao, K. M., Kumar, K. M., Alagusundaram, M., & Chetty, C. M. (2010). Medicinal Importance Of Natural Dyes-A Review. *International Journal Of Pharmtech Research*, *2*(1), 144–154. <https://doi.org/10.1007/S10664-009-9106-Z>
- Choque, S., & Corilla, G. (2015). Influencia De La Temperatura Del Aire De Entrada Y La Concentración De Maltodextrinas En La Humedad Final Y Contenido De Antocianinas En El Secado Por Atomización De Las Flores Del Mastuerzo (*Tropaeolum Majus L.*).
- Chun, O. K., Smith, N., Sakagawa, A., & Lee, C. Y. (2004). Antioxidant Properties Of Raw

- And Processed Cabbages. *International Journal Of Food Sciences And Nutrition*, 55(3), 191–199. <https://doi.org/10.1080/09637480410001725148>
- Cozzolino, D. (2002). Uso De La Espectroscopía De Reflectancia En El Infrarrojo Cercano (Nirs) En El Análisis De Alimentos Para Animales. *Agrociencia-Sitio En Reparación*, 6(2), 25–32.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-Lopez, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, And Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, And Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, And Stability.
- Domínguez, A. (2012). Microencapsulación De *Lactobacillus Casei* Atcc334 Utilizando Mezclas De Almidón De Amaranto Modificado Y Maltodextrina Como Material De Pared, Mediante Secado Por Aspersión Y Su Viabilidad En La Leche En Polvo". Doctoral Dissertation, Universidad Veracruzana. Instituto De Ciencias Básicas. Región Xalapa.
- Figueroa, G. (2003). Optimización De Una Superficie De Respuesta Utilizando Jmp In. *Mosaicos Matemáticos*, (11), 17–23.
- Figueroa, R., Tamayo, J., González, S., & Moreno, G. (2011). Actividad Antioxidante De Antocianinas Presentes En Cáscara De Pitahaya ( *Hylocereus Undatus* ). *Revista Iberoamericana De Tecnología Postcosecha*, 12(1).
- Font Quer, P. (1961). *Plantas Medicinales; El Dioscórides Renovado*. Grup Editorial 62, S.L.U., 2014.
- Garzón Gloria A. (2008). Las Antocianinas Como Colorantes Naturales Y Compuestos Bioactivos. *Departamento De Química, Universidad Nacional De Colombia.*, 13(3), 27–36. <https://doi.org/10.15446/Abc>
- Ghosh, D. (2005). Anthocyanins And Anthocyanin-Rich Extracts In Biology And Medicine : Biochemical , Cellular , And Medicinal Properties, 3(2), 113–124.
- Hernández, L., & Arturo, A. (2017). Efecto De Diferentes Métodos De Cocción En El Contenido De Compuestos Fenólicos Y La Actividad Antioxidante En Brócoli (*Brassica Oleracea Var. Italica*) Y Coliflor (*Brassica Oleracea Var. Botrytis*). (Doctoral Dissertation, Universidad Autónoma De Nuevo León).
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., & Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate Metabolism, Functionality And Breeding For The Improvement Of *Brassicaceae* Vegetables. *Breeding Science*, 64(1), 48–59. <https://doi.org/10.1270/Jsbs.64.48>
- Jana, S., Patel, D., Patel, S., Upadhyay, K., Thadani, J., Mandal, R., ... Devkar, R. (2017). Anthocyanin Rich Extract Of *Brassica Oleracea* L. Alleviates Experimentally Induced Myocardial Infarction. *Plos One*, 12(8), E0182137. <https://doi.org/10.1371/Journal.Pone.0182137>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins And Anthocyanins:

- Colored Pigments As Food, Pharmaceutical Ingredients, And The Potential Health Benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Konczak, I., & Zhang, W. (2004). Anthocyanins—More Than Nature’s Colours, 5, 239–240. Retrieved From <https://cloudfront.escholarship.org/dist/prd/content/qt7sp6278f/qt7sp6278f.pdf>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad Antioxidante De Pigmentos Antociánicos 1, 24(4), 691–693.
- Linneo, C. Von. (N.D.). Tropicos | Name - *Brassica Oleracea* Var. Laciniata L. Retrieved June 18, 2019, From <http://www.tropicos.org/namepage.aspx?nameid=100300439>
- Longo, L., & Vasapollo, G. (2004). Extraction And Identification Of Anthocyanins From *Smilax Aspera* L. Berries. *Food Chemistry*, 94(2), 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.008>
- Moreno, E., Ortiz, B., & Restrepo, L. (2014). Contenido Total De Fenoles Y Actividad Antioxidante De Pulpa De Seis Frutas Tropicales. *Revista Colombiana De Química*, 43(3), 41–48.
- Orellano, E., Torres, V., & Maily, J. (2017). Propiedades Físicas , Antocianinas Y Capacidad Antioxidante Del Atomizado De Mashua ( *Tropaeolum Tuberosum* ) Encapsulado Con Maltodextrina.
- Pardo, A., Garrido, J., Ángel, M., & San, R. (2007). La Interacción Entre Factores En El Análisis De Varianza : Errores De Interpretación, 19(1), 343–349.
- Park, S., Arasu, M. V., Jiang, N., Choi, S.-H., Lim, Y. P., Park, J.-T., ... Kim, S.-J. (2014). Metabolite Profiling Of Phenolics, Anthocyanins And Flavonols In Cabbage (*Brassica Oleracea* Var. *Capitata*). *Industrial Crops And Products*, 60, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.037>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Revisión : Microencapsulación De Alimentos. *Revista Facultad Nacional De Agronomía-Medellín*, 63(2), 5669–5684.
- Peláez Soto, A., & Patricia Roig Montoya José Vicente Gil Ponce Valencia, D. (2016). Validación Funcional De Extractos Polifenólicos De Cacao Mediante Ensayos *In Vivo* Con Organismos Modelo.
- Rodríguez, M. E. M. (2005). Errores Frecuentes En La Interpretación Del Coeficiente De Determinación Lineal. *Anuario Jurídico Y Económico Escurialense*, 38, 315–331.
- Salas Salvadó, J., Ros Rahola, E., & Sabaté, J. (Sabaté C. (2005). Frutos Secos, Salud Y Culturas Mediterráneas. Glosa.
- Sales, M. (2009). Diagrama De Pareto Diagrama De Pareto, 15.
- Scalzo, R. Lo, Genna, A., Branca, F., Chedin, M., & Chassaingne, H. (2008). Food Chemistry Anthocyanin Composition Of Cauliflower ( *Brassica Oleracea* L. Var. *Botrytis* ) And

- Cabbage ( *B . Oleracea L . Var . Capitata* ), 107, 136–144.  
<https://doi.org/10.1016/J.Foodchem.2007.07.072>
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K. P., & Rai, M. (2006). Antioxidant Phytochemicals In Cabbage ( *Brassica Oleracea L . Var . Capitata* ), 108, 233–237. <https://doi.org/10.1016/J.Scienta.2006.01.017>
- Song, H., Yi, H., Lee, M., Han, C.-T., Lee, J., Kim, H., ... Hur, Y. (2018). Purple *Brassica Oleracea Var. Capitata F. Rubra* Is Due To The Loss Of Bomybl2-1 Expression. *Bmc Plant Biology*, 18(1), 82. <https://doi.org/10.1186/S12870-018-1290-9>
- Sotelo, T., Cartea, M. E., Velasco, P., & Soengas, P. (2014). Identification Of Antioxidant Capacity -Related Qtls In *Brassica Oleracea*. *Plos One*, 9(9), E107290. <https://doi.org/10.1371/Journal.Pone.0107290>
- Universidad De Las Américas De Puebla. (2018). Extracción Antocianinas.
- Watanabe, M., Suwabe, K., & Suzuki, G. (2012). Molecular Genetics, Physiology And Biology Of Self-Incompatibility In *Brassicaceae*. *Proceedings Of The Japan Academy. Series B, Physical And Biological Sciences*, 88(10), 519–535.
- Wiczowski, W., Topolska, J., & Honke, J. (2014). Anthocyanins Profile And Antioxidant Capacity Of Red Cabbages Are Influenced By Genotype And Vegetation Period. *Journal Of Functional Foods*, 7, 201–211. <https://doi.org/10.1016/J.Jff.2014.02.011>
- Zapata, L. M. (2014). Obtención De Extracto De Antocianinas A Partir De Arándanos Para Ser Utilizado Como Antioxidante Y Colorante En La Industria Alimentaria.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Absorbancias medidas a 526 nm de cada extracto.

Extracto	1:20 (60 min)	1:20 (90 min)	1:20 (120 min)	1:25 (60 min)	1:25 (90 min)	1:25 (120 min)	1:30 (60 min)	1:30 (90 min)	1:30 (120 min)
ABS 1	0,755	0,780	0,842	0,845	0,880	0,889	0,883	0,925	0,908
ABS 2	0,754	0,772	0,840	0,842	0,898	0,890	0,878	0,940	0,937
ABS 3	0,752	0,769	0,844	0,835	0,884	0,883	0,892	0,929	0,916
ABS 4	0,754	0,760	0,838	1,058	0,890	0,866	0,889	0,878	0,908

**Anexo 2.** Humedades medidas de cada extracto.

1:20 (60 min)	1:20 (90 min)	1:20 (120 min)	1:25 (60 min)	1:25 (90 min)	1:25 (120 min)	1:30 (60 min)	1:30 (90 min)	1:30 (120 min)
95,361	96,275	96,005	96,705	96,205	96,607	95,785	96,04	96,771
95,97	96,306	96,026	96,467	96,192	96,76	95,982	96,57	96,652
95,9	96,27	95,903	96,51	96,481	96,161	95,958	96,509	96,415



**Anexo 3.** Concentración de antocianinas en cada extracto.

muestra	tiempo	concentración mg/L	Mg	volumen ml	% solidos totales	solidos totales masa	mg antocianina por cada 100g de extracto seco
1,2	60	256,56	18,22	71	3,022	214,56	8,490
1,25	60	196,04	16,08	82	2,820	231,26	6,951
1,3	60	257,15	12,34	48	1,964	94,27	13,093
1,2	90	219,95	18,26	83	3,085	256,02	7,131
1,25	90	217,59	15,67	72	2,669	192,19	8,152
1,3	90	224,09	13,89	62	2,249	139,42	9,965
1,2	120	215,52	16,81	78	3,137	244,70	6,870
1,25	120	256,27	18,45	72	2,513	180,96	10,197
1,3	120	201,94	13,73	68	2,303	156,63	8,767
1,2	60	264,53	18,78	71	3,022	214,56	8,754
1,25	60	202,83	16,63	82	2,820	231,26	7,192
1,3	60	254,79	12,23	48	1,964	94,27	12,973
1,2	90	223,79	18,57	83	3,085	256,02	7,255
1,25	90	227,63	16,39	72	2,669	192,19	8,528
1,3	90	226,45	14,04	62	2,249	139,42	10,070
1,2	120	218,18	17,02	78	3,137	244,70	6,955
1,25	120	257,74	18,56	72	2,513	180,96	10,255
1,3	120	204,01	13,87	68	2,303	156,63	8,857
1,2	60	258,33	18,34	71	3,022	214,56	8,548
1,25	60	198,70	16,29	82	2,820	231,26	7,045
1,3	60	255,38	12,26	48	1,964	94,27	13,003
1,2	90	224,38	18,62	83	3,085	256,02	7,274
1,25	90	223,79	16,11	72	2,669	192,19	8,384
1,3	90	228,22	14,15	62	2,249	139,42	10,149
1,2	120	219,07	17,09	78	3,137	244,70	6,983
1,25	120	249,77	17,98	72	2,513	180,96	9,938
1,3	120	205,49	13,97	68	2,303	156,63	8,921

**Anexo 4.** Microencapsulado.



**Anexo 5** .Eficiencia de microencapsulado.

dil 1/1000	Abs.	Concentración mg/L	Concentración mg/vf	% E.E
agua	0,297	8,057745923	0,120866189	90,57
etanol	0,028	0,759652814	0,011394792	
agua	0,291	8,602945818	0,129044187	89,69
etanol	0,03	0,886901631	0,013303524	
agua	0,293	8,662072593	0,129931089	90,78
etanol	0,027	0,798211468	0,011973172	

**Anexo 6.** Datos de antioxidación, crecimiento de *S. cerevisiae* frente a estrés oxidativo.

Tiempo (min)	Vitamina C 50 mg/ml, Peroxido 3 mM/l	Vitamina C 25 mg/ml y Peroxido 0,5 mM/l	levadura sin tratamiento	Levadura con Peroxido 0,5 mM	Microencapsulado (50mg/ml) y Peroxido (0,5mM)
120	0,226	0,245	0,205	0,103	0,154
140	0,250	0,267	0,217	0,104	0,157
160	0,278	0,293	0,229	0,104	0,163
180	0,306	0,324	0,244	0,104	0,168
200	0,343	0,361	0,26	0,104	0,176
220	0,390	0,407	0,281	0,105	0,185
240	0,447	0,455	0,305	0,106	0,197
260	0,504	0,503	0,332	0,106	0,210
280	0,565	0,547	0,363	0,106	0,227
300	0,630	0,593	0,399	0,108	0,247
320	0,700	0,646	0,44	0,109	0,271
340	0,763	0,694	0,484	0,11	0,298
360	0,825	0,746	0,53	0,112	0,328
380	0,885	0,795	0,581	0,114	0,363
400	0,939	0,845	0,631	0,117	0,403
420	0,990	0,891	0,685	0,122	0,449
440	1,042	0,930	0,738	0,132	0,498
460	1,080	0,970	0,79	0,149	0,550
480	1,112	1,009	0,834	0,167	0,604
500	1,136	1,040	0,873	0,184	0,661
520	1,161	1,065	0,916	0,198	0,717
540	1,179	1,085	0,953	0,209	0,771
560	1,195	1,101	0,98	0,22	0,827
580	1,205	1,117	1,002	0,232	0,877
600	1,219	1,121	1,019	0,245	0,919
620	1,231	1,129	1,034	0,26	0,962
640	1,241	1,137	1,047	0,276	1,005
660	1,253	1,135	1,057	0,292	1,039
680	1,266	1,147	1,067	0,31	1,067
700	1,279	1,150	1,077	0,33	1,091
720	1,290	1,151	1,083	0,351	1,108

740	1,300	1,150	1,091	0,372	1,122
760	1,311	1,147	1,098	0,395	1,134
780	1,322	1,158	1,103	0,42	1,145
800	1,330	1,162	1,107	0,447	1,151
820	1,342	1,164	1,111	0,475	1,157
840	1,354	1,164	1,114	0,505	1,162
860	1,367	1,171	1,117	0,533	1,166
880	1,374	1,173	1,12	0,557	1,169
900	1,386	1,168	1,122	0,584	1,171
920	1,396	1,168	1,125	0,613	1,174
940	1,408	1,169	1,128	0,641	1,176
960	1,422	1,172	1,13	0,672	1,179
980	1,433	1,175	1,134	0,706	1,181
1000	1,441	1,178	1,134	0,738	1,183
1020	1,454	1,180	1,136	0,771	1,184
1040	1,457	1,180	1,138	0,802	1,186
1060	1,472	1,182	1,137	0,837	1,193
1080	1,473	1,185	1,139	0,869	1,196
1100	1,476	1,185	1,139	0,895	1,199
1120	1,478	1,187	1,142	0,917	1,203
1140	1,482	1,186	1,144	0,942	1,207
1160	1,485	1,187	1,147	0,965	1,208
1180	1,488	1,186	1,147	0,985	1,211
1200	1,487	1,186	1,145	1,006	1,214