



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



---

**Evaluación de diferentes combinaciones de polímeros en la microencapsulación  
de licopeno de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)**

---

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

**Autora:** Damaris Abigail Pazmiño Eugenio

**Tutora:** M.Sc. Danae Fernández Rivero

Ambato – Ecuador.

Diciembre – 2019

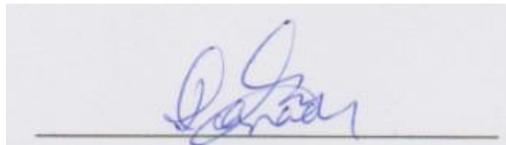
## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

MSc. Danae Fernández Rivero

### **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 diciembre del 2019



MSc. Danae Fernández Rivero  
C.I. 1757181209

**TUTORA**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Damaris Abigail Pazmiño Eugenio manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



---

Damaris Abigail Pazmiño Eugenio

C.I. 180477253-9

**AUTORA**

## APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

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 del tribunal



---

MSc. Wilson Patricio Orozco Freire  
C.I. 172136300-8



---

PhD. José Homero Vargas López  
C.I. 180197804-8

Ambato, 29 de noviembre del 2019

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso 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 los derechos de autor.



---

Damaris Abigail Pazmiño Eugenio

C.I. 180477253-9

**AUTORA**

## DEDICATORIA

Porque yo soy el SEÑOR, tu Dios,  
que sostiene tu mano derecha;  
yo soy quien te dice:  
“No temas, yo te ayudaré”.

Isaías 41:13

A Dios, quien ha sido mi motor y sustento en este viaje llamado vida,

A mis padres, por su apoyo incondicional y ejemplo,

A mi hermano, por su paciencia y cariño infinito,

A mi familia, por su amor constante,

A mis amigos, por ser mi segundo hogar.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, creador de todo lo que existe y mostrar su infinito amor en todo momento.

Este trabajo no lo hubiese podido realizar sin el apoyo de mis padres y familia quienes con su preocupación han hecho que avance a pesar de los instantes difíciles. Gracias papi por sus consejos y fortaleza. Gracias mami por sus constantes mimos y cuidado, les amo.

A mi tutora, MSc. Danae Fernández por su colaboración y consejos.

A mis profesores MSc. Yunys Pérez y Dr. Orestes López por haber confiado en mí, ser pacientes, apoyarme en esta etapa universitaria y enriquecer mi conocimiento.

A mi calificador Dr. Homero Vargas por las revisiones y sugerencias realizadas en la elaboración de este trabajo.

A mi calificador MSc. Patricio Orozco por toda la ayuda y amistad brindada en esta etapa universitaria, por sus consejos y sugerencias aportadas en este trabajo.

A mis amigos y amigas por cada experiencia vivida, por escucharme y apoyarme siempre, sin duda son los mejores. A cada persona que ha compartido momentos increíbles conmigo, por mostrarme con otros ojos como se puede disfrutar de la vida.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### PÁGINAS PRELIMINARES

Portada.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL.....	iv
DERECHOS DE AUTOR .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO .....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	viii
INDICE DE TABLAS .....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCION .....	1
CAPÍTULO I .....	3
EL PROBLEMA.....	3
1.1 Tema de investigación .....	3
1.2 Justificación .....	3
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos .....	5
CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 Antecedentes investigativos .....	6
2.1.1 Carotenoides: fuente y características.....	6
2.1.2 Microencapsulación de carotenoides .....	6
2.1.3 Polímeros utilizados en la microencapsulación .....	8
2.1.3.1 Goma Arábica.....	9
2.1.3.2 Maltodextrina.....	9
2.1.4 Influencia de la temperatura en la microencapsulación .....	10
2.1.5 Capacidad antioxidante del tomate de árbol ( <i>Solanum betaceum</i> ) .....	11
2.1.6 El licopeno y las especies reactivas de oxígeno (ERO`s) .....	12
2.1.7 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	13

2.1.8	Actividad antioxidante <i>in vivo</i> utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	14
CAPÍTULO III.....		17
MATERIALES Y MÉTODOS .....		17
3.1	Materiales, equipos y reactivos .....	17
3.1.1	Materiales.....	17
3.1.2	Equipos .....	17
3.1.3	Reactivos.....	18
3.2	Metodología .....	19
3.2.1	Tipo de estudio.....	19
3.2.2	Recolección del material vegetal .....	19
3.2.3	Preparación del material vegetal .....	19
3.2.4	Obtención de extractos vegetales.....	19
3.2.5	Concentración del extracto vegetal .....	20
3.2.6	Cuantificación de licopeno presente en el concentrado obtenido .....	20
3.2.7	Determinación de sólidos solubles totales (SST).....	20
3.2.8	Determinación del rendimiento de sólidos extraídos .....	21
3.2.9	Porcentaje de eficiencia de la extracción (% EE) .....	21
3.2.10	Obtención de microencapsulados con diferentes combinaciones de polímeros.....	21
3.2.11	Análisis estadístico de los microencapsulados.....	22
3.2.12	Porcentaje de eficiencia de la microencapsulación (EME).....	22
3.2.13	Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante por el método del radical 2,2-diphenil-1-1-picrylhydrazil (DPPH) .....	23
3.2.14	Determinación <i>in vivo</i> de la actividad antioxidante usando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
3.2.14.1	Aislamiento de la levadura.....	24
3.2.14.2	Determinación de las concentraciones antioxidantes.....	24
3.2.15	Análisis Infrarrojo .....	25
CAPÍTULO IV.....		26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		26
4.1	Cuantificación de licopeno en el concentrado obtenido .....	26
4.2	Determinación de sólidos solubles totales (SST) y porcentaje de sólidos .....	26
4.3	Porcentaje de eficiencia de la extracción (% EE) .....	28
4.4	Porcentaje de eficiencia de la microencapsulación (EME).....	29
4.5	Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante por el método del radical 2,2-diphenil-1-1-picrylhydrazil (DPPH) .....	31
4.6	Determinación <i>in vivo</i> de la actividad antioxidante usando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 35	
4.7	Análisis Infrarrojo .....	47

4.8	Verificación de la hipótesis.....	49
CAPÍTULO IV.....		50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		50
5.1	Conclusiones.....	50
5.2	Recomendaciones .....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....		52
ANEXOS .....		59

## INDICE DE TABLAS

Tabla I. Proporciones polímero – licopeno y temperatura de entrada/salida.....	33
Tabla II. Análisis de varianza para el porcentaje de eficiencia de la microencapsulación (EME).....	40
Tabla III. Análisis de varianza para la actividad antioxidante (AA).....	42

## INDICE DE FIGURAS

Figura I. Diagrama de Pareto del porcentaje de eficiencia de la microencapsulación.....	41
Figura II. Diagrama de superficie de respuesta para el análisis del porcentaje de eficiencia de la microencapsulación (EME).....	42
Figura III. Diagrama de Pareto de la actividad antioxidante determinada por el radical libre DPPH.....	44
Figura IV. Diagrama de superficie de respuesta estimada de la actividad antioxidante determinada por el radical libre DPPH.....	44
Figura V. Diagrama de superficie de respuesta estimada que interacciona las variables de respuesta: eficiencia de la microencapsulación y actividad antioxidante determinada por el radical libre DPPH.....	45
Figura VI. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en medio YPD durante 20 horas.....	47
Figura VII. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sometida a 0,5 y 50 mmol/L de NaOCl.....	48
Figura VIII. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sometida a 0,5 y 50 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	49
Figura IX. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sometida a microencapsulados y 0,5 mmol/L NaOCl.....	50
Figura X. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> con microencapsulados y 0,5 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	51
Figura XI. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> con microencapsulados y 50 mmol/L de NaOCl.....	52
Figura XII. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> con microencapsulados y 50 mmol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53

Figura XIII. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sometida a 0,5 mg/mL (Vit C 0,5:0), 5 mg/mL (Vit C 5:0) y 50 mg/mL (Vit C 50:0) de Vitamina C.....	54
Figura XIV. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sometida a 0,5 y 5 mg/mL de Vitamina C y 0,5 y 50 mmol/L de NaOCl.....	55
Figura XV. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sometida a 0,5 y 5 mg/mL de Vitamina C y 0,5 y 50 mmol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	55
Figura XVI. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en la cual representa actividad pro-oxidante y antioxidante a 0,5 mmol/L de NaOCl.....	56
Figura XVII. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en la cual representa actividad pro-oxidante y antioxidante a 0,5 mmol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	56
Figura XVIII. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en la cual representa actividad pro-oxidante y antioxidante a 50 mmol/L de NaOCl.....	57
Figura XIX. Razón de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en la cual representa actividad pro-oxidante y antioxidante a 50 mmol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	57
Figura XX a. Licopenos sin microencapsular.....	60
Figura XX b. Polímeros.....	60
Figura XX c. 30% Carga Te/Ts 160/90 °C.....	60
Figura XX d. 30% Carga Te/Ts 120/80 °C.....	60
Figura XX e. 20% Carga Te/Ts 160/90 °C.....	60
Figura XX f. 20% Carga Te/Ts 120/80 °C.....	60

## RESUMEN

El concentrado de licopeno de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) se microencapsuló utilizando cuatro tipos de combinaciones de polímeros y se evaluó la capacidad antioxidante. Las combinaciones fueron la carga con respecto a los polímeros usados que fueron maltodextrina y goma arábiga con modificaciones en la temperatura de entrada y salida en la microencapsulación. La determinación de la actividad antioxidante *in vitro* se realizó mediante la prueba de DPPH. Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular para analizar la actividad *in vivo* midiendo la razón de crecimiento que presenta en niveles de estrés alto y bajo con peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio.

Se determinó que el microencapsulado con 30% de licopenos, 35% de goma arábiga y 35% de maltodextrina a una temperatura de entrada (Te) de 120 °C y de salida (Ts) de 80 °C presentó mayor capacidad antioxidante al usar el método del radical libre DPPH obteniéndose un 81,84% de inhibición lo que equivale a una concentración de trolox de  $333,78 \pm 4,53$   $\mu\text{mol}$  de trolox/g muestra, además registró un porcentaje de eficiencia de microencapsulación del 64,42%, lo que se corroboró con el análisis en el espectro infrarrojo lejano tomando en cuenta que se obtuvo un 83,76% de transmitancia. La actividad antioxidante *in vivo* comprobó los resultados anteriores, debido a que al utilizar el microencapsulado a una concentración de 700 mg/mL, *Saccharomyces cerevisiae* mostró una razón de crecimiento mayor a 1 en presencia de NaOCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> superando la capacidad antioxidante de la vitamina C.

**Palabras claves:** Carotenoides, secado por aspersion, actividad antioxidante, *Saccharomyces cerevisiae*, *Solanum betaceum*.

## ABSTRACT

The concentrate of lycopene of tree tomato (*Solanum betaceum*) was microencapsulated using four different combinations whose were evaluated through the antioxidant capacity. The combinations consisted of varying the load, with respect to the polymers used that were maltodextrin and gum arabic with modifications in the entry and exit temperature in the microencapsulation. The evaluation of antioxidant activity *in vitro* was developed using the DPPH test. On the other hand, *Saccharomyces cerevisiae* was used as a cellular model to analyze the activity *in vivo* comparing the growth rate it presents against high and low stress levels with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite.

It was determined that the microencapsulated with 30% lycopene, 35% gum arabic and 35% maltodextrin at an inlet temperature ( $T_e$ ) of 120 °C and outlet ( $T_s$ ) of 80 °C showed greater antioxidant capacity when using the DPPH free radical method obtaining 81,84% inhibition equivalent to trolox concentration of  $333,78 \pm 4,53 \mu\text{mol}$  of trolox/g sample, also recorded a percentage of microencapsulation efficiency of 64,42%, which was comprobated with the analysis in the far infrared spectrum taking into account that 83,76% transmittance was obtained. The antioxidant activity *in vivo* corroborated the previous results, because when using the microencapsulation at a concentration of 700 mg/mL, *Saccharomyces cervisiae* showed a growth rate greater than 1 in the presence of NaOCl and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exceeding the antioxidant capacity of vitamin C.

**Key words:** Carotenoids, spray drying, antioxidant activity, *Saccharomyces cerevisiae*, *Solanum betaceum*.

## INTRODUCCION

El licopeno presenta grandes propiedades que son desconocidas por la mayoría de la población, es por tal razón que al estar presente en un 82% en la piel de tomate **Yamaguchi (2010)** de árbol (*Solanum betaceum*) hace que sean considerados como desecho o abono.

La actividad antioxidante que presenta este compuesto es elevada, usada así como potente captador de radicales libres que son generadas por el metabolismo celular y se concentran en gran cantidad en el interior de la célula (**Pryor, 2001**). En estudios realizados por (**Aràndiga & Díaz, 2008**), se ha visto que produce su necrosis, mientras que al ser eliminados al torrente sanguíneo provocan las enfermedades no transmisibles como diabetes, aterosclerosis, entre otras. (**Xu, 2012**).

Los carotenos brindan protección a nivel celular evitando la oxidación de los lípidos presentes en la membrana celular (**Iturriaga, 2014**). La propiedad que le confiere a este componente fitoquímico es la presencia de dobles enlaces en la estructura del licopeno. (**Britton, 2004**).

Sin embargo, al ser expuesto a condiciones externas a su ambiente natural disminuye su actividad antioxidante. Es por tal motivo que se busca un ambiente que no lo vuelva lábil ante condiciones externas a su fuente natural, utilizando así la técnica de microencapsulación variando las temperaturas de entrada y salida, además de la concentración de los componentes a microencapsular, es decir, los polímeros goma arábica y maltodextrina sin dejar de lado el componente a evaluar que es el licopeno. La variación consiste en la concentración del licopeno al 30% con 35% de maltodextrina y 35% de goma arábica con una temperatura de entrada de 160 °C y 90°C de salida (E1), el siguiente microencapsulado se sometió a una Te de 120 °C y 80 °C de salida (E2), el tercero 20% de licopeno 40% de goma arábica y 40% de

maltodextrina a una temperatura de entrada de 160 °C y 90 °C de salida (E3), el cuarto microencapsulado mantuvo la misma concentración de carotenos pero se trabajó a una temperatura de entrada de 120 °C y 80 °C de salida (E4).

Los métodos empleados para determinar la actividad antioxidante de los microencapsulados resultantes fueron: el método *in vitro* del radical libre DPPH que además de ser una prueba colorimétrica ayuda en la determinación del porcentaje de actividad antioxidante expresado en  $\mu\text{mol}$  de trolox/ g de muestra (**Klein, Kimberly; Amitava, 2014**).

Por otro lado, el método *in vivo* usando *Saccharomyces cerevisiae* sometida a estrés método usado por **Peláez (2016)** en el cual utilizó peróxido de hidrogeno e hipoclorito de sodio con previo tratamiento de microencapsulados. (**Folch-Mallol, Garay-Arroyo, Lledías, & Covarrubias Robles, 2004**)

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1 Tema de investigación

Evaluación de diferentes combinaciones de polímeros en la microencapsulación de licopeno de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

### 1.2 Justificación

Una de las causas más comunes que provoca un aumento en la tasa de mortalidad humana son las enfermedades no transmisibles (ENTs). Actualmente, un 71% de la población representada por aproximadamente 41 millones de personas son afectadas cada año según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 2018). El Instituto Nacional de Estadística y Censos (2016), reportó que el 16,33% de la población ecuatoriana muere a causa de patologías como: diabetes mellitus, enfermedades cerebrovasculares e hipertensivas.

La evidencia revelada por trabajos científicos actualizados sugiere que el estrés oxidativo es uno de los mediadores claves de los efectos producidos por ENTs como la hiperglucemia (Arándiga & Díaz, 2008). Además, este es el principal factor de riesgo para el desarrollo de complicaciones crónicas diabéticas ya que contribuye a la respuesta inflamatoria que caracteriza a las enfermedades cardiovasculares (ECV) (Preedy, 2013). Por otro lado, el estrés oxidativo se ve involucrado en el proceso de degeneración celular debido al alto índice de toxicidad al que se expone la célula al no ser capaz de mediar los productos resultantes del metabolismo, provocando así su necrosis (Matata & Elahi, 2011).

Los siglos XIX y XX experimentaron un uso elevado de antioxidantes sintéticos provenientes de la industria química, que han sido una parte esencial en el campo alimentario, siendo su principal desventaja su grado de toxicidad (Castro, 2013). Por

tal razón, en los últimos años las investigaciones realizadas sobre nuevos antioxidantes se han enfocado principalmente en sus análogos de origen natural y sus efectos sobre los radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ERO's). La búsqueda de fuentes vegetales con dichas propiedades se ha encaminado al estudio de la familia de los carotenoides, destacándose entre esta de manera especial el licopeno (**Aràndiga & Díaz, 2008**).

Se ha demostrado que el licopeno es un compuesto bioactivo, químicamente inestable y de rápida degradación, al estar expuesto a condiciones ambientales externas diferentes a las de su fuente natural de obtención, como el oxígeno, la temperatura, la luz, el pH y algunas otras sustancias reactivas (**Wiley, 2014**). Tales causas han despertado el interés en el desarrollo de un método que brinde estabilidad a dicho compuesto, razón por la que se ha escogido a la microencapsulación con polímeros inocuos para el consumidor como objeto de estudio del presente trabajo de investigación. Adicionalmente, es de suma importancia determinar las proporciones a utilizar y posterior análisis de sus efectos en el procedimiento.

El Ecuador es un país rico en recursos naturales, por tal motivo presenta una inmensa variedad de cultivos propios de cada región. Por lo que, es considerado un gran nicho a nivel industrial. Sin embargo, es vital recalcar que los desechos generados por dicho sector productivo son de 2.074 toneladas al día de los cuales el 53,81% son de origen orgánico (**INEC, 2018**). El porcentaje reportado anteriormente es indicativo del desaprovechamiento de una parte representativa de los insumos utilizados en diferentes procesos agroindustriales.

Los residuos producidos a escala industrial si bien se sabe que, se degradan con mayor facilidad son una gran fuente de sustancias orgánicas, entre ellas tomando en cuenta el licopeno que se encuentra en una proporción de 600-800 µg de carotenos/100 g de cáscara de diferentes tipos de tomate (**Yamaguchi, 2010**). Debido a lo antes mencionado, la obtención de licopeno a partir de residuos orgánicos provenientes del cultivo de tomate de árbol se consideró como una potente oportunidad en el presente trabajo de investigación, tratando de obtener una mayor estabilidad al utilizar diferentes combinaciones de polímeros en la microencapsulación.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

Evaluar diferentes combinaciones de polímeros en la microencapsulación de licopeno de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la mejor combinación de polímeros para la microencapsulación de licopeno con diferentes combinaciones de polímeros.
- Comparar la actividad antioxidante *in vitro* de los diferentes microencapsulados y del concentrado de licopeno mediante el método DPPH.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vivo* de los diferentes microencapsulados de licopenos empleando *Saccharomyces cerevisiae*.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

##### 2.1.1 Carotenoides: fuente y características

Los carotenoides desde el punto de vista químico pertenecen a los tetraterpenos. Sus moléculas consisten en ocho unidades de isopreno condensadas, generalmente con 40 carbonos en total. Incluyen estructuras lineales como el licopeno, así como estructuras con uno o dos ciclos finales o anillos aromáticos. Se dividen en dos grupos según la ubicación de heteroátomos (oxígeno) en la molécula, uno de ellos los carotenos que son carbohidratos sin ningún heteroátomo, mientras que las xantofilas poseen grupos hidroxilo, ceto, epoxi o aldehídicos en sus cadenas. Contienen grupos acetilénicos (triple enlace) o alénicos (dos dobles enlaces no separados) en las partes alifáticas de sus moléculas (**Britton, 2004**).

El licopeno y  $\beta$ -caroteno son los componentes presentes en mayor proporción en el tomate y sus derivados. Según estudios realizados por **Yamaguchi (2010)**, éstos están presentes en un 82% en la piel del tomate. Además, existen otras fuentes de carotenoides, tales como: banana, brócoli, espárrago, col, zanahoria, cebolla colorada, calabaza, espinaca, tomate, en una proporción aproximada de 600-800  $\mu\text{g}$  de carotenos/100 g de cáscara. En una menor proporción se encuentra el kiwi, papaya, piña, sandía y guayaba en una relación de 400-480  $\mu\text{g}$  de carotenos/100 g de cáscara (**Iturriaga, 2014**).

##### 2.1.2 Microencapsulación de carotenoides

Según **Castro (2013)**, el licopeno, al estar en su fuente natural presenta una alta estabilidad frente a los factores medioambientales pero el consumo en dicha fuente no es el suficiente, pues la biodisponibilidad de carotenos no alcanza a cubrir las necesidades biológicas por lo que, se ve necesaria la obtención del mismo en mayor

proporción. Por tal motivo, se usan solventes orgánicos a diferentes temperaturas para su extracción proceso el cual convierte al licopeno en un compuesto fácilmente oxidable (**Meléndez, 2004**).

Al someter los compuestos bioactivos a varios factores dañinos, se ha visto en la necesidad de aplicar tecnologías de microencapsulación o sistemas de administración eficaces para cuidarlos cuando estos ingredientes bioactivos o nutraceuticos están aislados de su entorno natural (**Nasirullah et al., 2011**). La utilización de esta técnica brinda protección contra la degradación, mejora la biodisponibilidad y enmascara sabores y colores indeseables. Se producen principalmente mediante el secado por pulverización y tecnologías de lecho fluido o de emulsión (**Castro, 2013**). Se utilizan para la fortificación de alimentos básicos, funcionales, aplicaciones de bebidas y en formulaciones de suplementos dietéticos. Un formato de polvo seco es también una opción de entrega preferida sobre sistemas húmedos debido a la facilidad de manejo y los menores costos de almacenamiento y transporte (**Garti, 2012**). Dicho lo anterior, **Yamaguchi (2010)**, menciona que la encapsulación de los carotenos en materiales hidrófilos logra obtener sistemas de liberación controlada que conservan un efecto durante períodos más largos.

El tipo de carotenoide determina la estabilidad que presenta ante cierto tratamiento, por ejemplo **Shen & Quek (2014)**, realizaron una investigación con astaxantina, un compuesto encontrado en animales marinos. **Kha & Roach (2010)**, estudiaron la microencapsulación de carotenoides de jugo de gac (*Momordica cochinchinensis*), y de  $\beta$ -caroteno en jugo de melón (*Cucumis melo*) en secado por aspersión (**Solval & Sundararajan, 2012**). **Juscamaita et al., (2017)** en sus ensayos sobre la microencapsulación de carotenoides de los pétalos de flores amarillas de mastuerzo (*Tropaeolum majus L*) evaluaron el porcentaje de carotenoides contenidos en las microcápsulas obtenidas. Por otra parte, **López et al., (2015)**, en sus investigaciones evaluaron la importancia de microencapsular el aceite del gac o calabaza amarga (*Momordica cochinchinensis*).

La carga, es decir, cantidad de compuesto bioactivo a microencapsular es un factor a considerar, por lo que **Pullutasig (2016)**, en sus ensayos utilizó cargas del 30 y 50% de aceite de sacha inchi mientras que **Tapia (2017)** utilizó 20, 40 y 60% de carga en sus microencapsulados de ácido ascórbico.

Tomando en cuenta la información antes mencionada, se vio la necesidad de llevar a cabo dicha técnica.

### **2.1.3 Polímeros utilizados en la microencapsulación**

En la microencapsulación es importante señalar que se busca utilizar polímeros que sean amigables con el consumidor y fáciles de degradar, por lo que la capacidad de solubilización es importante para cualquier formulador, pero aún más importante es la propiedad de estos sistemas para servir como vehículos de entrega y como transportadores de componentes fitoquímicos como es el licopeno a través de membranas humanas (**Garti, 2012**).

Los polímeros naturales son materiales de gran peso molecular, de gran importancia porque generalmente son biodegradables y generalmente reconocidos como seguros con sus siglas GRAS (**Ruiz, 2017**). La aplicación como encapsulantes está determinada por sus propiedades específicas tales como formación de película, capacidad emulsionante, alta resistencia al medio ambiente del tracto gastrointestinal, biodegradabilidad, baja viscosidad, baja higroscopicidad, disponibilidad y bajo costo (**Kilcast, 2013**).

Para el proceso de microencapsulación es necesario realizar una suspensión diluida con agua (**Parzanese, 2015**), además es indispensable tomar en cuenta las propiedades de los polímeros tales como: pH, solubilidad, precio, estabilidad, biodisponibilidad, entre otros (**Côte, 2006**). Los estudios dirigidos por **Parzanese (2015)**, han demostrado que los biopolímeros son moléculas complejas y su comportamiento en solución también puede ser sensible a muchas variables tales como los rayos UV y humedad. Las ventajas adicionales de los polisacáridos sobre los surfactantes de bajo peso molecular incluyen una protección del compuesto hidrofóbico encapsulado por el polímero y efectos de estabilización de la fase continua (**Bertolini, Siani, & Grosso, 2001**).

### 2.1.3.1 Goma Arábica

La goma arábica es una mezcla de polisacáridos obtenidos del árbol de la familia *Acacia Senegal*, se utiliza como espesante y emulsionante (**Brebban, 2013**), por otro lado facilita la estabilización de emulsiones alimenticias que contienen aceites esenciales, oleoresina, vitaminas o derivados de lípidos (**Anilkumar, 2014**). **Watanabe (2013)**, realizó varios ensayos demostrando que el uso de goma arábica aumenta la resistencia a la oxidación durante el almacenamiento y es cuatro veces más estable que la maltodextrina, es por tal razón que se aplica en el secado por aspersión de lípidos (**Ruiz, 2017**), además que al estar presente en la microencapsulación aumenta la vida útil del producto contenido en el interior de las microesferas (**Lakkis, 2016**).

**Koç et al., (2014)** estudiaron el efecto de este polímero en la solubilidad del polvo de jugo de granada y encontraron que el polímero utilizado aumenta dicha variable en solventes polares. Por otra parte, **Huertas (2010)**, utilizó goma arábica en suspensión manteniendo una temperatura constante de 30 °C para microencapsular el licopeno por desecación o atomización aspersión.

### 2.1.3.2 Maltodextrina

La maltodextrina es una preparación de almidón obtenida por despolimerización enzimática de una suspensión acuosa de papa que luego se somete a secado por pulverización. Al utilizar dicho compuesto, se ha visto que el microencapsulado se caracteriza por un bajo dulzor, fácilmente digerible y altamente higroscópico (**Hayes, 2013**). La adición de maltodextrina mejora la solubilidad, mientras que deterioraba ligeramente su contenido de humedad y densidad (**Goula & Adamopoulos, 2008**).

La matriz en estudio presenta una amplia gama de despolimerización dado a que su estructura se caracteriza por una composición heterogénea de la mezcla de azúcares, brindando así propiedades emulsionantes y estabilizantes que prolongan la frescura, mejoran el sabor y retrasan el proceso de cristalización (**Vikas, 2013**). Se utiliza en gran medida en la producción de preparaciones medicinales: tabletas, jarabes, expectorantes, preparaciones de vitaminas y suplementos minerales (**Brazel, 2012**).

**Goula & Adamopoulos (2008)**, reportaron que el contenido de humedad de microcápsulas de jugo de tomate se incrementó al aumentar la concentración de maltodextrina. Sin embargo, estos resultados son contrastantes con algunos otros estudios que reportaron que el contenido de humedad disminuye al aumentar la cantidad del material encapsulante, ya que se incrementan los sólidos totales y se reduce la evaporación de agua (**Jittanit et al., 2010**).

**Islam et al., (2016)**, en sus investigaciones mostraron que un aumento en la concentración de maltodextrina causó una disminución en la densidad del jugo de naranja. Se reportó también que al aumentar la concentración del polímero se obtuvieron microcápsulas de mayor diámetro (**Tonon et al., 2008**).

Además **López et al., (2015)**, evidenciaron que la variación del tipo de maltodextrina influye en los resultados de eficiencia de la microencapsulación, por lo que es importante tomar en cuenta el polímero a utilizar.

#### **2.1.4 Influencia de la temperatura en la microencapsulación**

La técnica del secado por aspersion es muy utilizada para mejorar la calidad de un producto de interés, y es necesario conocer que en dicho proceso influyen muchas variables como la temperatura de entrada y salida, el caudal de alimentación, la viscosidad, el tamaño de las partículas, el tipo de atomizador y la presión (**Vella, 2011**). Los productos resultantes de dicho tratamiento son microesferas con diámetros que pueden variar desde 10 a 50  $\mu\text{m}$  (polvo muy fino) hasta 2 a 3 mm (partículas grandes). Este tamaño depende del material de alimentación inicial y de las condiciones de operación (**Noomhorm, 2014**).

La variación de la temperatura de entrada y salida del aire influye en la velocidad de secado de la microcápsula y en el contenido final de agua de los polvos (**Anandharamakrishnan, 2017**). Estudios realizados por **Martínez (2015)**, demuestran que si la primera variable es demasiado baja, el agua se evapora lentamente, lo que lleva a la formación de microcápsulas con membranas de alta densidad, poca fluidez, alto contenido de agua y se forman aglomerados fácilmente. Sin embargo, al mantener una combustión demasiado alta causa evaporación excesiva,

grietas de la membrana y, como resultado, liberación y degradación prematura o pérdida de agentes activos encapsulados.

La temperatura de entrada del aire se puede ajustar, mientras que la de la salida de aire no ya que ésta se controla mediante el caudal de alimentación (**Dominguez, 2013**). Sin embargo, es importante tomar en cuenta la cantidad de calor al cual se va a someter la emulsión que contiene el principio bioactivo ya que presenta cierta sensibilidad (**Schuck, 2012**).

**Lakkis (2016)**, encontró que un incremento en la temperatura de entrada reduce el contenido de carotenoides totales, por lo que un valor de 120 °C favorece la eficiencia en la encapsulación de este tipo de compuestos de origen vegetal. En derivados de animales marinos las condiciones térmicas óptimas para formar una cápsula que provea de alto nivel de protección al material de interés son temperaturas de 160 °C y 70 °C de entrada y salida respectivamente (**Shen & Quek, 2014**). En este mismo sentido, **Kha et al., (2014)** evidenció que un incremento en la temperatura de entrada (de 120 a 200 °C) provoca una pérdida mayor del contenido de carotenoides totales de jugo de gac (*Momordica cochinchinensis*).

### **2.1.5 Capacidad antioxidante del tomate de árbol (*Solanum betaceum*)**

El tomate entre sus componentes estructurales presenta un 0,003% de licopeno contenido en la piel (**Meléndez, 2004**), por tal motivo se utilizaron las cáscaras de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) que en sus componentes se encuentran carotenos, y el licopeno como el más representativo con capacidad de eliminar los radicales libres, lo que lo convierte en uno de los antioxidantes más potentes de la familia de los carotenoides (**Iturriaga, 2014**).

La capacidad antioxidante del licopeno ha dado lugar a resultados prometedores para disminuir el riesgo de algunas enfermedades y otras patologías. Varios estudios demostraron que puede prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo que causa el proceso aterogénico y la enfermedad cardíaca (**Xu, 2012**).

Estudios epidemiológicos realizados por **Sesso et al., (2003)** revelaron que el consumo de tomates y de productos derivados del mismo reducen el riesgo de contraer

enfermedades crónicas, tales como las cardiovasculares. Por otra parte, reduce la probabilidad de adquirir cáncer de próstata, pulmón y estómago (**Raffo et al., 2006**); (**Arándiga & Díaz, 2008**); (**Aust et al., 2003**). Además, entre sus componentes están las vitaminas A y C,  $\beta$  caroteno y licopeno (**Candelas, 2006**); (**Cruz & González, 2013**); (**Arándiga & Díaz, 2008**).

### **2.1.6 El licopeno y las especies reactivas de oxígeno (ERO`s)**

Las especies reactivas de oxígeno (ERO`s) están involucradas en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Las ERO`s están continuamente equilibradas por los sistemas de defensa antioxidantes en individuos sanos. Sin embargo, cuando el equilibrio fisiológico entre pro-oxidantes y antioxidantes se rompe en favor de los primeros, el estrés oxidativo se produce como consecuencia de un daño potencial para el organismo. Por lo tanto, en los últimos años, el papel y los efectos beneficiosos de los antioxidantes contra diversos trastornos y enfermedades inducidas por el estrés oxidativo han recibido mucha atención (**Arándiga & Díaz, 2008**).

La acción de los antioxidantes es una forma efectiva para eliminar radicales libres teniendo como ventaja que a bajas concentraciones, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de compuestos (**Pryor, 2001**). Las ERO`s conducen a la reducción de la fluidez de la membrana, aumento de su permeabilidad y evita el daño de sus proteínas. Por otro lado, son capaces de inducir todas las formas de daño del ADN oxidativo, incluidas las modificaciones de bases, sitios libres de bases y enlaces cruzados ADN-proteína (**Alberts & Bray, 2006**). Las actividades antioxidantes de los compuestos se han atribuido a diversos mecanismos, como la prevención de la iniciación de la cadena, la unión de catalizadores de iones de metales de transición, la descomposición de peróxidos, la capacidad reductora y la eliminación de radicales (**Salazar, 2015**).

Los lípidos al ser componentes esenciales en las membranas celulares humanas y animales, son sustancias muy vulnerables que se oxidan fácilmente cuando se exponen a radicales libres, luz, oxígeno, prooxidantes y altas temperaturas (**Cirill, 2012**). El licopeno al ser un potente antioxidante, inhibe la generación y reduce el número de radicales libres que inician la oxidación, lo que eventualmente ayuda a prevenir o retrasar la autooxidación de lípidos (**Brites & Rosso, 2012**).

### 2.1.7 Actividad antioxidante *in vitro*

La necesidad de determinar la actividad antioxidante en el laboratorio ha hecho que se desarrollen varios métodos que se basan en el principio de reacción de transferencia de átomos de hidrógeno tales como capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), capacidad de eliminación de oxirradical total (TOSC), parámetro antioxidante captador de radicales total (TRAP), inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, entre otros (Yu, 2007). Además, existen otros métodos en los cuales se basan en la reacción de transferencia de electrones tales como ensayo de captación del radical del ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) (ABTS), capacidad antioxidante equivalente de trolox N, N-dimetil-fenilendiamina (DMPD), ensayo de captación del ión férrico y su reducción, radical DPPH, método de Folin-Ciocalteu (Klein, Kimberly; Amitava, 2014).

El ensayo de captación de radicales DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) se basa en la reducción de este radical libre mediante un antioxidante, por lo que el radical mostró un punto máximo de absorción a 515 nm y se convierte en un compuesto incoloro después de la reducción (Munné-Bosch, 2012).

El DPPH es un radical que presenta una coloración morada y al estar en contacto con agentes antioxidantes cambia de color a una tonalidad naranja ya que capta los radicales libres mediante la donación de un electrón o de un hidrógeno, lo que da a notar que al presentar alta actividad antioxidante un extracto o compuesto podrá atrapar los radicales libres y volverlos más estables, es por ello que al realizar ensayos Londoño (2012) notó cambio de color ya que se produce una reacción de reducción y oxidación simultáneamente. Guija (2015), menciona que este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de una reacción de primer orden la que puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia a medida que pasa el tiempo. Investigaciones realizadas con licopeno se observó que al poseer una estructura química de cadena abierta alifática formada por cuarenta átomos de carbono con trece enlaces dobles de los cuales once son conjugados, por lo que es muy reactivo frente al oxígeno y a los radicales libres como el DPPH (Cruz & González, 2013).

### 2.1.8 Actividad antioxidante *in vivo* utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

La necesidad de utilizar un método en el laboratorio en el cual presente resultados que, se puedan reproducir sin comprometer la integridad del ser humano empleando así modelos celulares tales como la levadura. La razón es que la mayor parte de proteínas que comparte *S. cerevisiae* con las células eucariotas son aquellas necesarias para su supervivencia, las mismas que se encargan de la señalización celular y las reacciones metabólicas (**Madigan, Martinko, 2006**).

Además, presenta varias ventajas, ya que es fácil de manejar en el laboratorio, tiene un período de crecimiento rápido, los procesos de replicación de ADN, recombinación, plegamiento de proteínas, metabolismo y transporte intracelular que se asemejan a organismos eucariotas mayores incluidos mamíferos, su genoma está completamente secuenciado y alrededor del 30% de las enfermedades humanas conocidas están asociadas con genes ortólogos presentes en la levadura. (**Mager & Winderickx, 2005**).

La levadura al estar sometida a condiciones externas diferentes a las que acostumbra puede alterar su normal desarrollo y producir daño, proceso conocido como estrés. Para poder sobrevivir ante estas circunstancias, la célula ha desarrollado mecanismos para adaptarse a los cambios que afectan su crecimiento y reproducción (**Wu et al., 2011**). A esta respuesta se la ha denominado “protección cruzada”, y ha dado lugar a la idea de que la levadura posee mecanismos comunes o generales de respuesta al estrés. Este sistema de respuesta coordina e integra la necesidad de establecer un metabolismo basal, en el que se requiere disminuir el gasto energético, esto conlleva a una baja tasa de crecimiento, con la inducción de diversos mecanismos de protección. La integración de estas respuestas determina la capacidad adaptativa de un organismo (**Otero, 2012**).

Los sistemas de defensa no enzimáticos consisten típicamente de moléculas pequeñas que son solubles en agua o, en algunos casos, en un ambiente lipídico actuando como atrapadores de algunas de las ERO's. El glutatión (GSH) es un tripéptido y es el mejor ejemplo de defensa no enzimática. El GSH actúa como un captador, posee un grupo sulfhidrilo que reacciona con los oxidantes y se produce glutatión reducido (GSSG). El glutatión es posiblemente la molécula atracadora de intermediarios reactivos de

oxígeno más abundante. Los sistemas de defensa enzimáticos incluyen a varias enzimas las cuales son capaces de remover ERO's tales como la catalasa, glutatión reductasa, entre otras. En el caso de la levadura posee dos superóxidos dismutasas (SOD) que dismutan el radical superóxido ( $O_2^-$ ) a  $H_2O_2$  y  $O_2$  (**Folch-Mallol, Garay-Arroyo, Lledías, & Covarrubias Robles, 2004**).

Estudios realizados por **Peláez (2016)**, muestran que la actividad antioxidante *in vivo* de los extractos etanólicos de cacao a concentraciones entre 50 – 800 mg/L tienen efecto sobre el crecimiento de la levadura sometida a estrés utilizando peróxido de hidrógeno a concentraciones de 0,5 y 50 mmol/L. **Wu et al., (2011)**, converge en la misma conclusión al realizar ensayos con el mismo modelo celular y probar agentes antioxidantes tales como ácido ascórbico, lipóico, compuestos fenólicos, ácido gálico a una concentración de 1 mmol/L frente al mismo agente oxidante a una concentración de 4 mmol/L.

## **2.2 Hipótesis**

### **2.2.1 Hipótesis nula**

Las diferentes combinaciones de polímeros, temperaturas de entrada y salida usadas en la microencapsulación no influyen en la actividad antioxidante de licopenos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

### **2.2.2 Hipótesis alternativa**

Las diferentes combinaciones de polímeros, temperaturas de entrada y salida usadas en la microencapsulación influyen en la actividad antioxidante de licopenos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

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

### **2.3.1 Variables dependientes**

Porcentaje de eficiencia de la microencapsulación y actividad antioxidante *in vitro*.

### **2.3.2. Variables independientes**

Proporción carga – polímeros de la matriz encapsulante y temperaturas de entrada/salida usadas en la microencapsulación.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales, equipos y reactivos

##### 3.1.1 Materiales

La realización del proceso requirió materiales como: pipetas graduadas estériles de 5 y 10 mL (Blaubrand®), vasos de precipitación de 500 mL (Griffin), probetas graduadas de 100 y 500 mL (Blaubrand®), tubos de centrifuga de 15 y 50 mL (Boeco®), embudos, pera de succión (Appcrom), botellas de vidrio de borosilicato con tapa azul de 250 y 500 mL (Citotest), microplaca de 96 pocillos para espectrofotómetro (Corning® Costar®), matraz Erlenmeyer de 500 y 1000 mL (Griffin), micropipetas de 2 - 10; 20 - 200; 100 - 1000  $\mu$ L (HTL Labmate), espátulas, cucharillas, fundas de cierre hermético, papel de filtro, cuchillos, eppendorfs de 1,5 mL (Citoplus), puntas plásticas estériles de 20, 200 y 1000  $\mu$ L (Boeco®). Además, el material vegetal utilizado fue la piel de tomate de árbol “*Solanum betaceum*”.

##### 3.1.2 Equipos

Se utilizaron los siguientes equipos: horno de circulación forzada de aire (Gander, China), molino de cuchillas (INOX-EQUIP), plancha de calentamiento (Corning PC620D), agitadores magnéticos (Stuart), rotaevaporador (IKA, USA), balanza de humedad (MRC mb500), espectrofotómetro (Fisher Scientific accuSkan GO), secador por aspersion (BÜCHI mini spray-dryer B-290), autoclave (Hirayama HICLAVE TM HV-85), centrifuga (Rotina 380), balanza analítica (Ohaus Adventurer-Pro), vórtex (Fisher Scientific), cámara de flujo laminar (ESCO Opti.MAIR), computadora (HP) con el software estadístico StatGraphics Centurion XVI.I y Software de espectrofotometría Skanlt RE5.0. El análisis de infrarrojo lejano se realizó en el Laboratorio de Química Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, mediante el uso de un espectrofotómetro infrarrojo (Jasco FT/IR 4100).

### 3.1.3 Reactivos

Se utilizó el reactivo 2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl, DPPH (Sigma-Aldrich), trolox (SigmaAldrich), metanol 96% (Scharlab S.L), etanol 80% (Scharlab S.L.), maltodextrina (Roig Pharma), goma arábica (Roig Pharma), agua destilada estéril.

Para el cultivo de la levadura se empleó Levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* de Levapan y agua destilada estéril junto con el medio de cultivo YPD (Alpha BiosciencesTM). Además de los agentes oxidantes y antioxidantes como peróxido de hidrógeno (LabFarmaWeir), hipoclorito de sodio (Clorox) y vitamina C (Life). Por otra parte, se usó PBS (ThermoFisher Scientific) para la incubación previo al estrés de la levadura.

## **3.2 Metodología**

### **3.2.1 Tipo de estudio**

El presente trabajo fue del tipo experimental ya que se efectuaron ensayos biológicos para evaluar diferentes combinaciones de polímeros en la microencapsulación de licopeno de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y determinar así la actividad antioxidante que presenta cada microencapsulado.

### **3.2.2 Recolección del material vegetal**

Las cáscaras de tomate de árbol se recolectaron de la Empresa Hortofrutícola Ambato Compañía Anónima (Planhofa C.A), ubicada en la Avenida El Condor y Julio César Cañar de esta ciudad, de los cuales se tomó un peso aproximado de 3 kilos debido a que son consideradas un desecho industrial.

### **3.2.3 Preparación del material vegetal**

De acuerdo a la metodología empleada por **Pérez (2019)**, las cáscaras de tomate se lavaron con agua destilada, posteriormente se colocaron en bandejas metálicas para su posterior secado a 60 °C en un horno de circulación forzada de aire (Gander), se procesaron en un molino de cuchillas marca (INOX-EQUIP). El material en polvo se almacenó en una funda de plástico.

### **3.2.4 Obtención de extractos vegetales**

La relación que se ocupó es de 1:70 que se determinó previamente como la mejor ya que obtuvo la mayor eficiencia de extracción según **Pérez (2019)**, es decir una parte de material vegetal y setenta partes de etanol al 80%, se calentó el solvente a 50 °C y posteriormente se añadió el material vegetal. La mezcla se agitó a una velocidad de 600 min<sup>-1</sup> por 30 minutos. Se filtró y el sobrenadante se almacenó en botellas color ámbar a 4 °C.

### 3.2.5 Concentración del extracto vegetal

Siguiendo la metodología propuesta por **Pérez (2019)**, el extracto obtenido anteriormente se colocó en el balón del rotaevaporador (IKA) y se calentó a baño María a 60 °C con constante rotación a 200 min<sup>-1</sup>. El proceso se realizó hasta evidenciar ausencia del etanol.

### 3.2.6 Cuantificación de licopeno presente en el concentrado obtenido

Basándose en la metodología empleada por **Aràndiga Martí & Díaz Sánchez (2008)**, para la determinación del caroteno se empleó el espectrofotómetro UV-Vis (Fisher Scientific) midiendo así la absorbancia a 472 nm (**Pérez, 2019**). Se utilizó la ecuación N°1 (Ec. 1) para determinar la concentración de licopeno presente en el concentrado obtenido, utilizando como blanco etanol. Se empleó un valor de 3950 para la absorptividad del etanol para los cálculos (**Strati & Oreopoulou, 2011**).

$$C = \frac{A \cdot 10^4}{E} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

C: Concentración de licopeno

E: Valor de absorptividad del etanol

A: Absorbancia del concentrado

### 3.2.7 Determinación de sólidos solubles totales (SST)

Se colocaron 3 g de extracto en una balanza de humedad (Mettler Toledo), descrito por **Coulson., et al (1981)**, que al obtener el porcentaje de humedad se obtuvo el porcentaje de sólidos solubles totales (%SST) (Ec. 2) y posteriormente los gramos de sólidos solubles totales contenidos en el concentrado (STT) (Ec. 3).

$$\%STT = 100\% - \% \text{ humedad} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$STT = \text{Volumen del concentrado (ml)} * \frac{\% SST}{100} \quad (\text{Ec. 3})$$

### 3.2.8 Determinación del rendimiento de sólidos extraídos

Posterior a la obtención de los sólidos solubles totales, se determinó el porcentaje de rendimiento de los sólidos extraídos con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Rendimiento sólidos extraídos} = \frac{SST (g)}{MV (g)} * 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde MV indica la cantidad de material vegetal en gramos utilizados para la obtención del extracto.

### 3.2.9 Porcentaje de eficiencia de la extracción (% EE)

Se calculó el porcentaje de eficiencia de la extracción (% EE) usando la relación masa de licopeno extraído y masa de material vegetal.

$$\% EE = \frac{m_L}{MV} * 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde

% EE: Porcentaje de eficiencia de la extracción

$m_L$ : Masa de licopeno extraído

MV: Masa de material vegetal

### 3.2.10 Obtención de microencapsulados con diferentes combinaciones de polímeros

Basándose en las técnicas de microencapsulación de **Pastuña-Pullutasig et al., (2016)** se obtuvo los microencapsulados usando el equipo mini spray dryer (BÜCHI) controlándose el caudal de alimentación, temperatura de entrada y salida.

En la tabla I se detalla los cuatro microencapsulados obtenidos con los cuales se utilizó en las pruebas *in vivo* e *in vitro*, como se puede observar la variación realizada fue en la proporción goma arábiga + maltodextrina: licopeno, temperatura de entrada y salida.

**Tabla I.**

*Proporciones polímero – licopeno y temperatura de entrada/salida.*

Polímeros	polímero - licopeno	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)
goma arábica + maltodextrina (GAMD) C15T16090 (E1)	35:35:30	160	90
goma arábica + maltodextrina (GAMD) C15T12080 (E2)	35:35:30	120	80
goma arábica + maltodextrina (GAMD) C10T16090 (E3)	40:40:20	160	90
goma arábica + maltodextrina (GAMD) C10T12080 (E4)	40:40:20	120	80

### 3.2.11 Análisis estadístico de los microencapsulados

Se realizó un diseño experimental 2<sup>2</sup> donde se determinó la influencia de los factores: polímero - licopeno y temperatura de entrada-salida, con dos niveles cada uno. Se evaluaron las variables respuesta: porcentaje de eficiencia de la microencapsulación y actividad antioxidante *in vitro* por el método DPPH.

### 3.2.12 Porcentaje de eficiencia de la microencapsulación (EME)

Según **Lakkis (2016)**, los polímeros se solubilizan de diferentes formas de acuerdo a la estructura y propiedades que posean, se empleó la ecuación 6 (Ec. 6) para determinar la eficiencia de la microencapsulación.

$$\% \text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{DT-DP}{DT} * 100 \text{ (Ec. 6)}$$

Disolución parcial (DP): Se tomó 0,01 g de cada uno de los microencapsulados y se disolvieron en 1ml de hexano.

Disolución total (DT): Se tomó 0,01 g de cada uno de los microencapsulados y se disolvieron en 1ml de agua.

### 3.2.13 Determinación *in vitro* de la actividad antioxidante por el método del radical 2,2-diphenil-1-1-picrylhydrazil (DPPH)

Se usó el método DPPH así como lo realizó **Iturriaga, (2014)**. En una placa de 96 pocillos se colocó con la ayuda de micropipetas 20  $\mu\text{L}$  de extracto diluido o solución estándar, con 180  $\mu\text{L}$  del reactivo DPPH (Sigma-Aldrich, USA) disuelto en metanol-agua en una proporción (80:20) a una concentración de 150  $\mu\text{mol/L}$  y se agitó por 60 segundos. Se incubó la placa por 40 minutos en ausencia de luz a temperatura ambiente, posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm a 25 °C en el espectrofotómetro (Fisher Scientific, Finlandia).

En el caso de la curva de calibración se prepararon soluciones estándar de trolox (Sigma-Aldrich, Alemania) a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{mol/L}$ . Por otra parte, el blanco se preparó con 20  $\mu\text{L}$  de agua y 180  $\mu\text{L}$  de metanol (Scharlab S.L., España) al 80%, dicha absorbancia se restó de las demás.

Se determinó el porcentaje de inhibición de DPPH (Ec. 7), a partir de la curva de calibración realizada con trolox en la que se graficó el porcentaje de inhibición de DPPH contra  $\mu\text{mol}$  trolox y aplicando la regresión lineal se determinó la concentración equivalente al porcentaje de inhibición. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de trolox/ g de muestra.

$$\% \text{ inhibicion de DPPH} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs control}}{\text{Abs control}} \right) \right] * 100 \text{ (Ec. 7)}$$

Donde

Abs muestra: Absorbancia de la muestra a analizar.

Abs control: Absorbancia de la muestra control, es decir la conformada por metanol y agua 80:20.

### **3.2.14 Determinación *in vivo* de la actividad antioxidante usando *Saccharomyces cerevisiae***

Se empleó el método descrito por **Peláez, (2016)** en el cual se analizó la actividad de los microencapsulados de licopeno usando como modelo de estudio *Saccharomyces cerevisiae*. En este experimento se comparó la razón de crecimiento entre la curva de crecimiento de la levadura sin agentes oxidantes con respecto a la curva de crecimiento de la levadura sometida a diferentes concentraciones de antioxidantes y oxidantes tales como peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio, siendo así las curvas resultantes las “Curvas Efecto”.

En este ensayo lo que se evaluó fue la capacidad antioxidante de los microencapsulados obtenidos mediante la variación de la razón de crecimiento que presenta la levadura al estar sometida a un estrés bajo y alto. Si la razón de crecimiento era menor a 1 se trató de una actividad pro-oxidante, por el contrario si era mayor a 1 se producía un efecto antioxidante y si el valor era igual 1 se efectuaba una razón de crecimiento similar al crecimiento de la curva patrón, es decir, en medio líquido YPD (**Peláez, 2016**).

El estrés oxidativo al que se sometió la levadura consistió en colocar agentes oxidantes a concentraciones de 0,5 mmol/L estrés bajo y 50 mmol/L estrés alto. Los reactivos utilizados fueron peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e hipoclorito de sodio (NaOCl) (**Luis Folch-Mallol et al., 2004**)(**Aust et al., 2003**).

#### **3.2.14.1 Aislamiento de la levadura**

Se aislaron levaduras a partir de un sobre de levadura comercial (Levapan) en medio PDA (Merck, Alemania), con incubación a 28 °C por 72 horas.

#### **3.2.14.2 Determinación de las concentraciones antioxidantes**

Se tomó una colonia de *S. cerevisiae* y se inoculó en 5 mL de medio YPD [2% (w/v) glucosa, 1% (w/v) extracto de levadura (Conda, España) y 2% (w/v) peptona (BD, España)] manteniéndose a una temperatura de incubación de 28 °C por 6 horas y una velocidad de agitación de 100 min<sup>-1</sup>. Se tomaron 5 µL de una dilución 1/10 del cultivo

incubado y se inocularon en un tubo con medio YPD manteniéndose en incubación por 18 horas a 28 °C y 100 min<sup>-1</sup>. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 2700 min<sup>-1</sup> por 20 minutos a temperatura ambiente, se lavó el pellet con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4. Se disolvió el pellet con PBS hasta llegar a una absorbancia a  $\lambda$  de 600 nm (D.O<sub>600</sub>) de 0,1 dejando en reposo por 30 minutos a 28 °C.

Se colocó el peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio (Ecuaquímica, Ecuador) a concentraciones de 0,5 mol/L y 50 mol/L, se incubó a 28 °C durante 1 hora sin luz. A continuación, se centrifugó a 2700 min<sup>-1</sup> por 20 minutos a temperatura ambiente, se lavó el pellet con PBS y se disolvió en 3 mL de medio YPD. Se sembró 180  $\mu$ L de cada cultivo por triplicado en una placa de 96 pocillos y se llevó a incubación a 28 °C en el lector multiplaca (Fisher Scientific, Finlandia) con control de crecimiento mediante la D.O.<sub>600</sub> por 24 horas a intervalos de 20 minutos con agitación antes de cada lectura.

La razón de crecimiento se determinó con la Ecuación 8 (Ec. 8) donde relaciona la densidad óptica de la curva estándar o del crecimiento de la levadura sometida a varias concentraciones de extractos y agentes oxidantes con respecto a la del crecimiento de la levadura sin tratamiento (**Wu et al., 2011**).

$$\text{Razón de crecimiento} = \frac{D.O_{600} \text{ de la curva estándar}}{D.O_{600} \text{ de la curva control}} \quad (\text{Ec. 8})$$

### 3.2.15 Análisis Infrarrojo

El análisis en el espectro infrarrojo lejano se basa en que toda la materia está formada por átomos, los mismos que se encuentran unidos por enlaces que tienen frecuencias de vibración específicas, que pueden ser captado por ondas del espectro infrarrojo (**Figuroa Martínez., et al, 2016**). Se analizaron los microencapsulados, mezcla de las matrices poliméricas (goma arábiga y maltodextrina) y el extracto rico en licopenos en el Laboratorio de Química Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, mediante el uso de un espectrofotómetro infrarrojo (Jasco FT/IR 4100).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Cuantificación de licopeno en el concentrado obtenido

Una vez secadas y molidas las cáscaras de tomate de árbol *Solanum betaceum*, el material particulado obtenido se empleó para la extracción de sus compuestos bioactivos. Posteriormente, se concentró y se le realizó la cuantificación de licopeno, tomando así un valor de  $0,55 \pm 0,02$  mg de carotenos/L. Estudios realizados por **Pérez (2019)**, en los que obtuvo 0,51 mg/L muestran relación con los resultados obtenidos. Por otra parte, **Arándiga & Díaz (2008)** tras realizar experimentos en el laboratorio consiguieron una cantidad de 0,44 mg/L ya que partieron del fruto maduro, lo que indica que el tiempo de cosecha influye en el proceso de obtención. (**Candelas, 2006**).

#### 4.2 Determinación de sólidos solubles totales (SST) y porcentaje de sólidos

Al obtener el concentrado de licopenos, se vio en la necesidad de determinar el porcentaje de sólidos solubles totales (Ec. 2) que mostró un valor de  $0,33 \pm 0,01\%$  es decir, hubo un 99,67% de humedad, esto se debe a que se utilizó etanol como solvente en la extracción y al no evaporarse completamente quedaron trazas. **Juscamaita et al., (2017)**, adquirieron valores de 99,96% de humedad, es decir 0,03% de sólidos solubles, además, para la misma variable se obtuvo un resultado de 0,04% mediante la técnica de extracción por el método Soxhlet (**Cardona, Ríos, & Restrepo V, 2006**).

En este trabajo se logró una cantidad de gramos de sólidos solubles totales (Ec. 3) de  $6,64 \pm 0,02$  g lo que indica que el compuesto bioactivo está en bajas concentraciones en la piel de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). **Parzanese (2015)**, al realizar sus ensayos en extracto de licopeno obtuvo valores de 1,09 g de sólidos solubles totales, lo que revela que al estar en presencia de mayor proporción de solvente estos compuestos disminuyen ya que se encuentran en menor concentración. Cabe mencionar que, aparte de licopeno se encuentran  $\beta$ -carotenos y xantofilas (**Candelas,**

2006). Según **Cardona et al., (2006)**, en la extracción por Soxhlet el rendimiento fue de  $6,35 \pm 0,01$  g, lo que indica que la técnica a utilizar influye en una baja proporción.

Además, fue necesario realizar la cuantificación de licopeno presente en el material vegetal total utilizado, es decir, los miligramos de carotenos contenidos en las cáscaras de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), cuyo valor fue de  $30,98 \pm 0,89$  mg de licopeno/100 g de material vegetal seco. Comparando los resultados obtenidos con los reportados por **Waliszewski & Blasco (2010)**, quienes determinaron que la presencia de carotenos varía entre 15 – 31,60 mg de licopeno/100 g de base húmeda de tomate de árbol.

Cabe recalcar que la matriz utilizada en este trabajo fue la piel del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) mientras que con la que se comparó bibliográficamente fue zumo de tomate fresco. Una de las premisas que provoca la variación en la concentración de carotenoides y a considerar fue la humedad presente en el fruto, lo que produce una concentración de carotenoides baja. Por otra parte, al tener una matriz seca se evidencia notablemente que presenta mayor cantidad de licopenos.

Además, se calculó del porcentaje de rendimiento de los sólidos extraídos obteniéndose un valor del  $23,20 \pm 0,72\%$ . Comparando con los datos reportados por **Cardona, Ríos, & Restrepo, (2006)**, al emplear el método Soxhlet consiguieron un 35,33% de rendimiento lo que indica que la técnica de extracción y material de extracción influyen de manera directa.

### 4.3 Porcentaje de eficiencia de la extracción (% EE)

La extracción de metabolitos tales como el licopeno utilizando como solvente etanol requiere de la determinación de la cantidad y eficiencia que obtuvo la técnica empleada (**Quiñones Adalí, 2008**), es por tal razón que, al realizar los cálculos se alcanzó un  $0,007 \pm 0,04\%$  de eficiencia de la extracción, se puede notar que fue menor al reportado por **Pérez (2019)** que fue de  $0,008\%$  lo que da a entender que las condiciones de trabajo y operación no fueron las mismas además del material vegetal utilizado para la extracción de carotenos. Por otra parte, **Soto & Rosales (2016)** extrajeron compuestos fenólicos de las cortezas de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla* consiguiendo un porcentaje de eficiencia de extracción del  $14,34 \pm 0,30\%$  y  $19,15 \pm 0,30\%$  respectivamente. La diferencia entre los valores reportados en comparación con lo obtenido en este ensayo se debe a que el porcentaje de pureza del etanol utilizado fue del 80% en el caso de los carotenos a comparación del 50% usado en los datos bibliográficos. Cabe recalcar que al realizar la extracción de la cáscara de tomate seca se pierde una parte de los principios activos presentes en la matriz debido a que la temperatura los degrada en un pequeño porcentaje (**Paar, 2016**).

El método de extracción influye debido a que comparando los resultados reportados por **Sánchez et al., (2009)** con respecto a los de que a partir del método Soxhlet obtuvo un 87,20% de eficiencia, además que utilizaron la pulpa de tomate misma que presenta mayor cantidad de licopenos. La cáscara presenta un 82% de carotenos en la piel del tomate lo que quiere decir que existe un 18% de sólidos adicionales según investigaciones realizadas por **Yamaguchi (2010)**, obteniéndose así solamente de 600-800  $\mu\text{g}$  de carotenos/100 g de cáscara (**Iturriaga, 2014**).

#### 4.4 Porcentaje de eficiencia de la microencapsulación (EME)

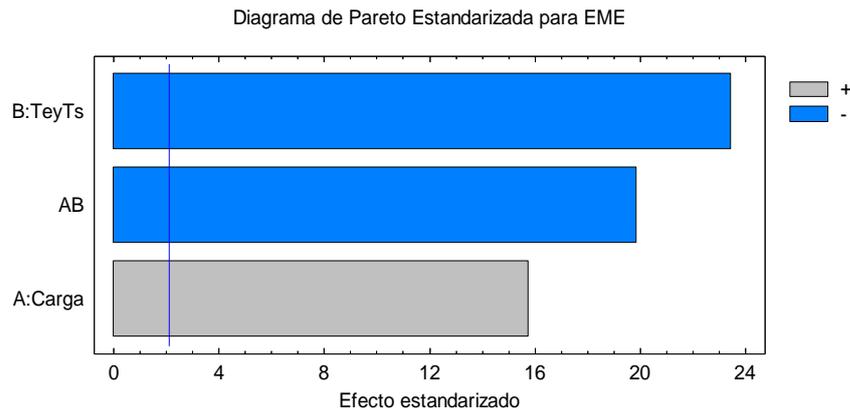
Con el objetivo de analizar la influencia de las variables temperatura de entrada y salida, proporción polímero - licopeno se realizó el análisis mediante un diseño experimental  $2^2$ , con un nivel de confianza del 95%.

En la Tabla II se muestran los resultados del análisis de varianza para el porcentaje de eficiencia de microencapsulación (EME), donde se puede observar que existen diferencias significativas para la carga (A), temperatura de entrada y salida (B) así como su interacción AB ya que se obtuvo un valor- $p < 0,05$ .

**Tabla II.**

*Análisis de varianza para el porcentaje de eficiencia de la microencapsulación (EME).*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Carga	1236,17	1	1236,17	248,46	0,00
B: Te y Ts	2736,07	1	2736,07	549,93	0,00
AB	1958,56	1	1958,56	393,66	0,00
bloques	15,94	6	2,66	0,53	0,77
Error total	89,56	18	4,98		
Total (corr.)	6036,30	27			

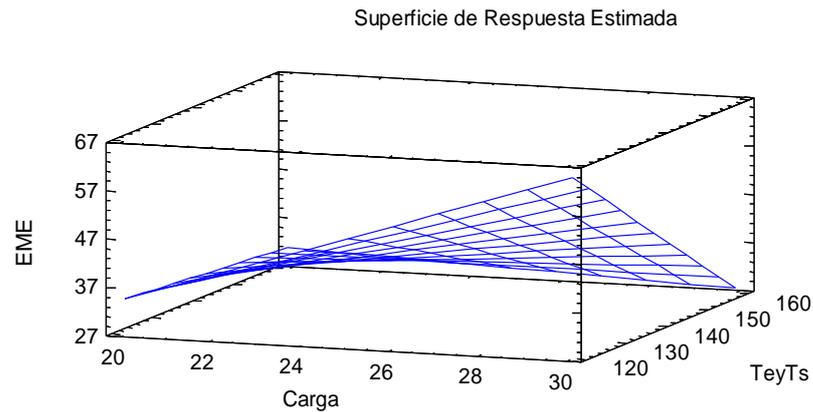


*Fig. 1* Diagrama de Pareto del porcentaje de eficiencia de la microencapsulación.

Por otro lado, en la *Fig. 1* se nota que en el diagrama de Pareto las variables B: TeyTs representan a las temperaturas de entrada y salida en la microencapsulación, y A: Carga es decir la cantidad de licopeno a microencapsular influyen de manera

significativa ya que son mayores al efecto crítico representado por la línea azul. La primera variable que es la temperatura actúa de manera antagónica ya que presenta un signo negativo, eso quiere decir que a medida que se aumenta la temperatura el porcentaje de eficiencia de microencapsulación disminuye.

La ecuación del diseño es la siguiente:  $-217,22 + 13,04*A + 1,59*B - 0,08*A*B$  con un  $R^2 = 98,52$ .



*Fig. II* Diagrama de superficie de respuesta para el análisis del porcentaje de eficiencia de la microencapsulación (EME).

Cabe recalcar que, se vio en la necesidad de determinar la combinación óptima para reportarla y se realizó el grafico de superficie de respuesta (*Fig. II*) en la que se observa el valor óptimo del porcentaje de eficiencia de la microencapsulación (EME) con un 64,42% cuya combinación representa a una carga del 30% con una temperatura de entrada de 120 °C que corresponde a 80 °C de salida.

El porcentaje eficiencia de la microencapsulación (EME) fue un factor de respuesta a tomar en cuenta en este trabajo debido a que se quiso identificar la mejor combinación, es decir la mezcla adecuada entre licopeno y polímeros. Por otra parte, fue necesario evaluar la temperatura en la que se trabajó dando como resultado que la mezcla con mayor porcentaje de eficiencia en dicho proceso fue la que contiene 30% de carga de licopeno, 35% de goma arábica y 35% de maltodextrina a una temperatura de entrada de operación en el Spray Dryer de 120 °C y salida 80 °C. Según **Anandharamakrishnan (2017)**, la última variable mencionada es de gran importancia ya que de ésta depende la formación de la microcápsula. Este valor indica que la técnica empleada ha funcionado para proteger los carotenos ya que se encuentra

contenido en el interior de las microcápsulas de la mezcla de maltodextrina y goma arábica.

Comparando los resultados obtenidos por **Soto (2018)**, quien realizó microencapsulación con xantana se observó un 77% EME. Así mismo **Rocha-Selmi et al., (2013)** determinó rangos del 25 - 80% de eficiencia empleando goma arábica y maltodextrina, comparando con los valores obtenidos en el presente trabajo se puede decir que se encuentra dentro del rango reportado. Por otro lado, se ha reportado valores entre el 12 – 88% de la misma variable utilizando maltodextrina a 120 °C (**Shu et al., 2006**).

La variación entre los diferentes microencapsulados se debe a la proporción empleada licopeno - polímeros y temperatura, como menciona **Martínez (2015)**, al elevar la temperatura de entrada se lleva a cabo una liberación y degradación prematura o pérdida de agentes activos encapsulados en este caso el licopeno.

#### 4.5 Determinación in vitro de la actividad antioxidante por el método del radical 2,2-diphenil-1-1-picrylhydrazil (DPPH)

La Tabla III muestra los resultados del análisis de varianza para la actividad antioxidante (AA), donde se puede observar que existen diferencias significativas para la carga (A), temperatura de entrada y salida (B) así como su interacción AB ya que se obtuvo un valor- $p < 0,05$ .

**Tabla III.**

*Análisis de varianza para la actividad antioxidante (AA).*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Carga	51990,80	1	51990,80	675,44	0,00
B: Te y Ts	1708,09	1	1708,09	22,19	0,00
AB	598,73	1	598,73	7,78	0,01
Bloques	626,22	6	104,37	1,36	0,28
Error total	1385,51	18	76,97		
Total (corr.)	56309,30	27			

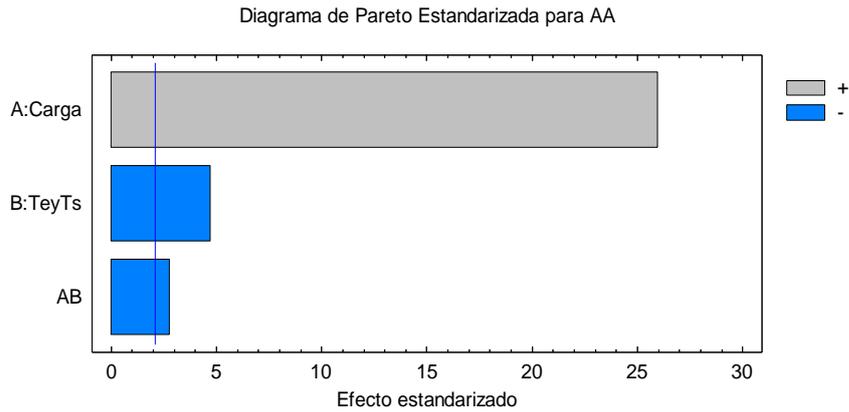


Fig. III Diagrama de Pareto de la actividad antioxidante determinada por el radical libre DPPH.

La Fig. III muestra que las variables B y A es decir temperaturas de operación y cantidad de licopeno influyen de manera significativa ya que son mayores al efecto crítico representado por la línea azul. La variable B actúa de forma inversa ya que lleva un signo negativo, eso quiere decir que a medida que aumenta la temperatura disminuye por consiguiente la actividad antioxidante.

La ecuación del diseño de la actividad antioxidante es la siguiente:  $-44,52 + 15,09*A + 0,76*B - 0,05*A*B$ . Con un valor de  $R^2 = 97,43$ .

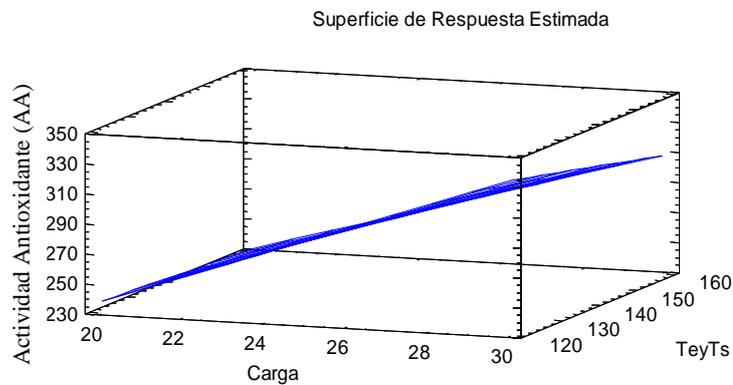


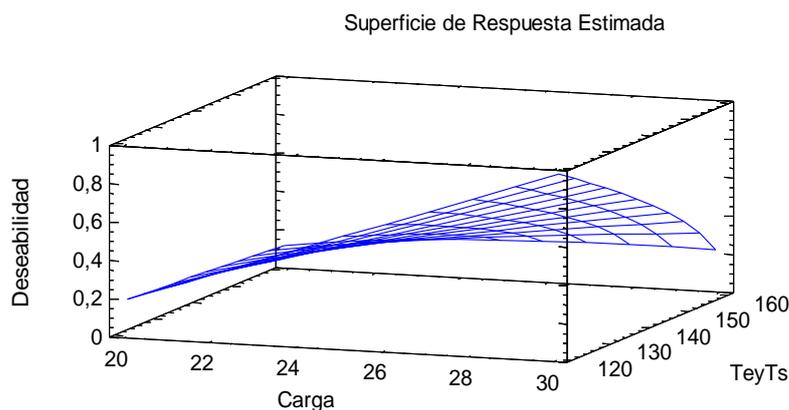
Fig. IV Diagrama de superficie de respuesta estimada de la actividad antioxidante determinada por el radical libre DPPH.

Además, se realizó el diagrama de superficie de respuesta estimada de la actividad antioxidante (AA) determinada por el método del radical DPPH en el cual se evidencia un punto máximo que corresponde a la combinación con mejor resultado siendo así la que contiene un 30% de carotenos con una temperatura de entrada de 120 °C y 80 °C de salida. (Fig. IV).

El microencapsulado que presenta mayor actividad antioxidante por DPPH fue la combinación que presenta 30% de carga de licopeno 35% de maltodextrina y 35% de goma arábica con una temperatura de entrada (Te) de 120 °C y de salida (Ts) de 80 °C partiendo los resultados utilizando la ecuación 7 (Ec. 7) además de relacionarla con la curva patrón de concentraciones conocidas de trolox (*Anexo I*) reportándose así un porcentaje de inhibición del 81,844% lo que equivale a  $333,78 \pm 4,53 \mu\text{mol}$  de trolox/g muestra.

La capacidad antioxidante equivalente en trolox (TEAC) determinada por DPPH del concentrado de licopeno es menor en comparación con los resultados obtenidos por **Mera (2018)**, en el cual el extracto de *G. mulfordii* obtuvo una concentración de  $776,42 \mu\text{mol}$  trolox/g de extracto, al igual que los valores reportados por **Hurtado (2015)** para el extracto hidroalcohólico de nogal (*Juglans Neotropica*) con un valor de  $1019,10 \mu\text{mol}$  trolox/g extracto seco. Por otro lado, tiene una actividad antioxidante mayor a los datos de **Moreno (2014)**, quien realizó estudios en aguacate y encontró que la variedad Hass, tiene un valor de  $189,80 \pm 10,80 \mu\text{mol}$  trolox/g muestra, uvilla  $70,30 \pm 9,60 \mu\text{mol}$  trolox/g extracto (**Guija, 2015**), naranjilla  $62,45 \pm 13,22 \mu\text{mol}$  trolox/g muestra y taxo  $55,47 \pm 7,42 \mu\text{mol}$  trolox/g muestra (**Encina, 2008**).

La microencapsulación se realizó con maltodextrina y goma arábica que son polímeros ricos en carbohidratos, fácilmente digeribles y altamente solubles debido a que presentan en su estructura grupos hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) (**Brebban, 2013**).



*Fig. V* Diagrama de superficie de respuesta estimada que interacciona las variables de respuesta: eficiencia de la microencapsulación y actividad antioxidante determinada por el radical libre DPPH.

En la *Fig. V* se puede ver la optimización del proceso al interaccionar las dos variables de respuesta alcanzando una deseabilidad de 0,97 fue el microencapsulado 2 que contiene 30% de carga de licopeno 35% de maltodextrina y 35% de goma arábica con una temperatura de entrada ( $T_e$ ) de 120 °C mientras que la de salida ( $T_s$ ) fue 80 °C.

La determinación de la actividad antioxidante *in vitro* es una técnica muy útil, rápida y barata de obtención de resultados la cual es cualitativa ya que se observa el cambio de color morado característico del radical libre DPPH a uno amarillo o naranja debido a la capacidad antioxidante dependiendo de la muestra a analizar, además es cuantitativa ya que permite obtener el porcentaje de inhibición. Por otro lado, es importante evaluar dicha variable en un modelo celular y es por tal razón, que se ha visto en la necesidad de realizar pruebas de determinación de la actividad antioxidante *in vivo*.

#### 4.6 Determinación *in vivo* de la actividad antioxidante usando *Saccharomyces cerevisiae*

A continuación, se muestra en la Fig. VI el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD durante 20 horas.

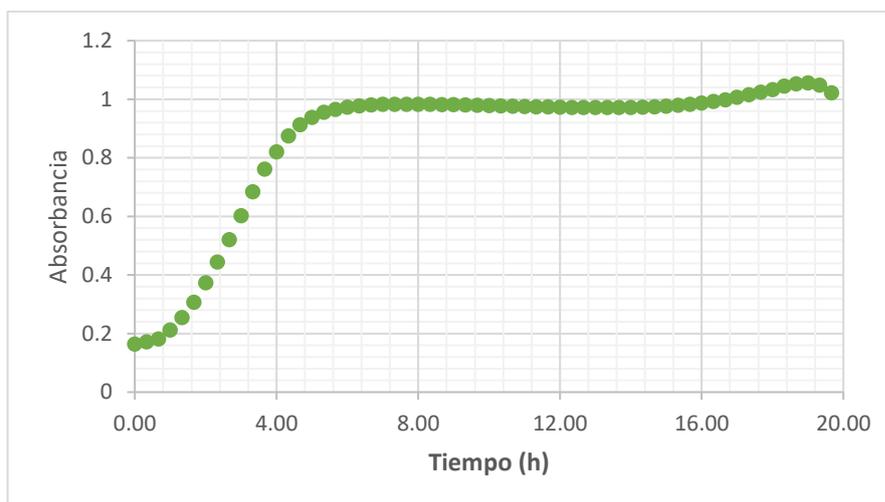


Fig. VI Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en medio YPD durante 20 horas.

La Fig. VI muestra los ejes absorbancia contra tiempo de la cual describe una curva del crecimiento normal de la levadura utilizando medio YPD, se puede notar una fase de latencia durante las dos primeras horas con posterior etapa de muerte a las 18 horas.

A continuación, se muestra en la Fig. VII la gráfica que relaciona la razón de crecimiento contra el tiempo del comportamiento de *S. cerevisiae* sometida a 0,5 mmol/L (curva de rombos Y:0,5) y 50 mmol/L (curva de cuadrados Y:50) de hipoclorito de sodio.

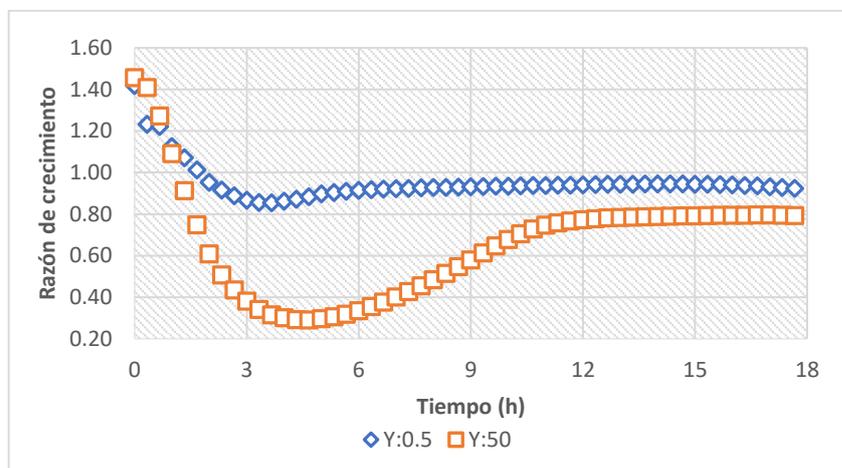


Fig. VII Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* sometida a 0,5 y 50 mmol/L de NaOCl.

Es importante mencionar que, la razón de crecimiento se obtuvo dividiendo la absorbancia que presenta la levadura al ser tratada con microencapsulados y agentes oxidantes con respecto al de su crecimiento normal sin tratamientos en medio líquido YPD (Wu et al., 2011).

Partiendo del concepto anterior, la curva Y:0,5 (rombos) obtuvo un valor de 0,86 a las 3 horas aproximadamente cuando la levadura fue sometida a 0,5 mmol/L de NaOCl y 0,29 a las 4 horas al utilizar 50 mmol/L de NaOCl, lo que indica que al enfrentar un mayor estrés se produce una razón de crecimiento menor, con posterior recuperación notando en la línea descrita por Y:50, la cual no supera el valor de 1 sino que se mantiene por debajo lo que indica una actividad pro-oxidativa no mostrando así crecimiento celular, como lo evidencia la curva descrita por Y:0,5 con una relación de crecimiento de 0,94 a partir de las 5 horas aproximadamente.

A continuación, se muestra el comportamiento de *S. cerevisiae* con 0,5 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Y:0,5 rombos) y 50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Y:50 cuadrados).

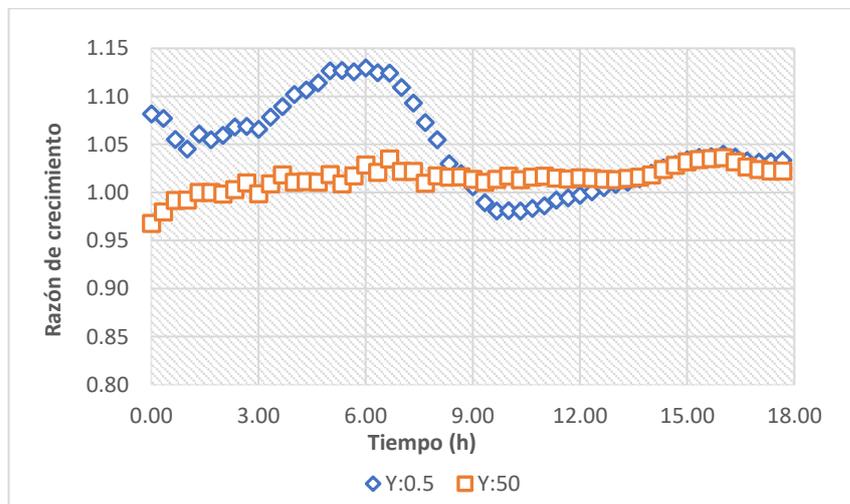


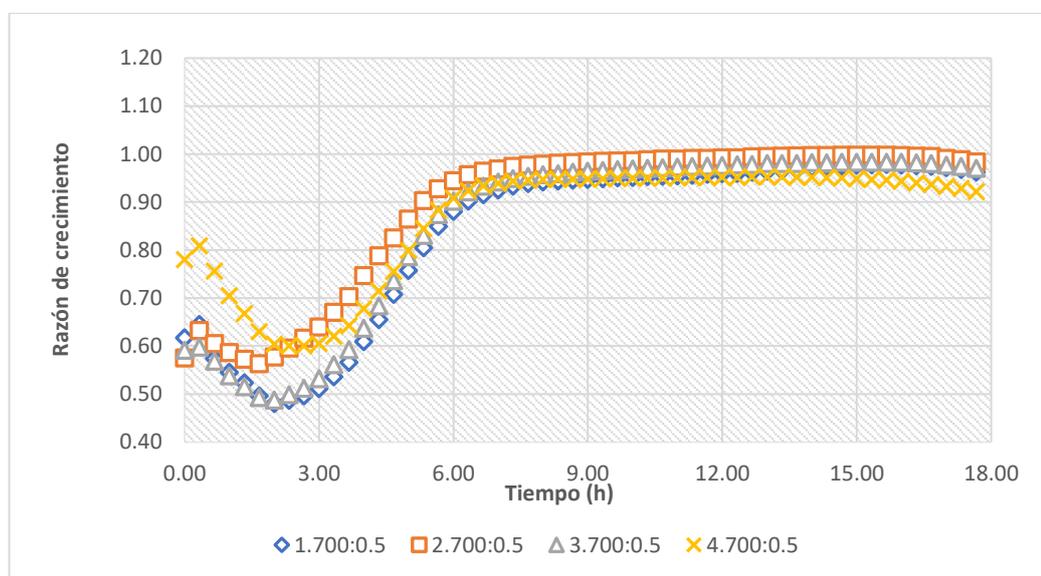
Fig. VIII Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* sometida a 0,5 y 50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En la Fig. VIII se puede observar la curva resultante al relacionar la razón de crecimiento contra el tiempo, los cuales fueron 1,07 con 0,5 mmol/L de peróxido de hidrógeno a las 2 horas con un crecimiento a las 4 horas alcanzando un punto máximo de 1,13. Mientras que la curva Y:50 (cuadrados) indica el comportamiento de la levadura con 50 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la cual tomó un valor máximo de 1,03 a las 6 horas manteniendo valores de 1 aproximadamente hasta las 18 horas.

Al comparar las cuatro gráficas se pudo concluir que el hipoclorito de sodio ejerce un mayor efecto oxidante sobre la levadura con respecto al peróxido de hidrógeno por lo que se esperaba resultados similares en las curvas efectos con los microencapsulados de licopeno de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

Tras haber realizado indagación bibliográfica, estudios realizados por **Peláez (2016)**, se determinó la concentración de los agentes antioxidantes que se quieren probar a un rango entre 50 y 800 mg/mL por lo que se evaluó dosis de 700 mg/mL como la más representativa para realizar el análisis de los resultados.

En la *Fig. IX* se observa el crecimiento de *S. cerevisiae* con microencapsulados de licopeno a 700 mg/mL y 0,5 mmol/L de NaOCl.



*Fig. IX* Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* sometida a microencapsulados y 0,5 mmol/L NaOCl.

En la *Fig. IX* se puede observar cuatro curvas, el microencapsulado 1 (1.700:0,5 rombos) (30% licopeno Te/Ts 160 °C/90 °C) presenta un comportamiento similar al microencapsulado 3 (3.700:0,5 triángulos) (20% licopeno Te/Ts 160 °C/90 °C) ya que tomaron valores de 0,48 y 0,49 respectivamente en la zona de declive de la gráfica debido a que presentan pendiente negativa. Por otra parte, la curva del microencapsulado 2 (2.700:0,5 cuadrados) (30% licopeno Te/Ts 120 °C/80 °C) sobresale en la fase de crecimiento ya que su punto mínimo fue de 0,56 ayudando a la levadura a activar su sistema de respuesta al estrés ejercido por el NaOCl tomando valores cercanos a 1 a las 5 y 17 horas de crecimiento, seguido por el microencapsulado

4 (4.700:0,5 cruces) (20% licopeno Te/Ts 120 °C/80 °C) alcanzando un valor mínimo de 0,6 y un máximo de 0,95 y manteniéndose hasta las 18 horas de crecimiento.

La Fig. X muestra el crecimiento de *S. cerevisiae* sometida a 700 mg/mL de cada uno de los microencapsulados obtenidos a partir del extracto de licopeno de tomate de árbol frente a una concentración de 0,5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

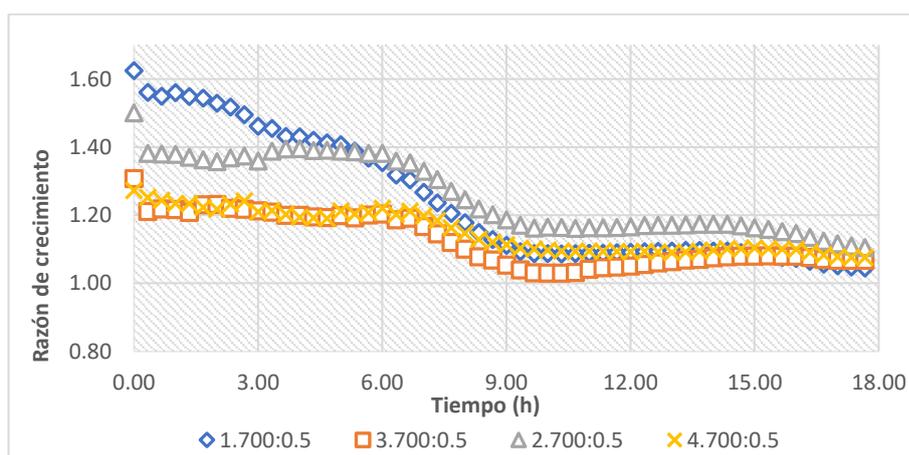


Fig. X Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* con microencapsulados y 0,5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La curva efecto generada como se muestra en la Fig. X no presenta razones de crecimiento muy marcadas, siendo así el microencapsulado 3 (cuadrados 3.700:50) (20% licopeno Te/Ts 160 °C/90 °C) quien menor efecto antioxidante ejerce sobre la levadura, seguido por el microencapsulado 4 (cruces 4.700:50) (20% licopeno Te/Ts 120 °C/80 °C). El microencapsulado 1 (rombos 1:700:50) (30% licopeno Te/Ts 160 °C/90 °C) a pesar de ayudar a la levadura durante las 7 primeras horas no ejerce un efecto antioxidante necesario como lo hace el microencapsulado 2 (triángulos 2:700:50) (30% licopeno Te/Ts 120 °C/80 °C), lo que indica que el efecto oxidante que presenta el peróxido de hidrógeno es ligero, además que la levadura presenta mayor tolerancia al mismo.

La diferencia entre los agentes oxidantes es notoria debido a que con peróxido de hidrógeno la levadura no presenta cambios drásticos en cuando a su crecimiento como se muestra en la Fig. X no existiendo pérdida celular en comparación con la Fig. IX en la que se utilizó NaOCl generando un estrés en mayor grado como se puede evidenciar en la etapa de adaptación con razones de crecimiento más bajas.

En la Fig. XI se muestra la razón de crecimiento de la levadura sometida a un estrés alto, es decir, una concentración de NaOCl 50 mmol/L.

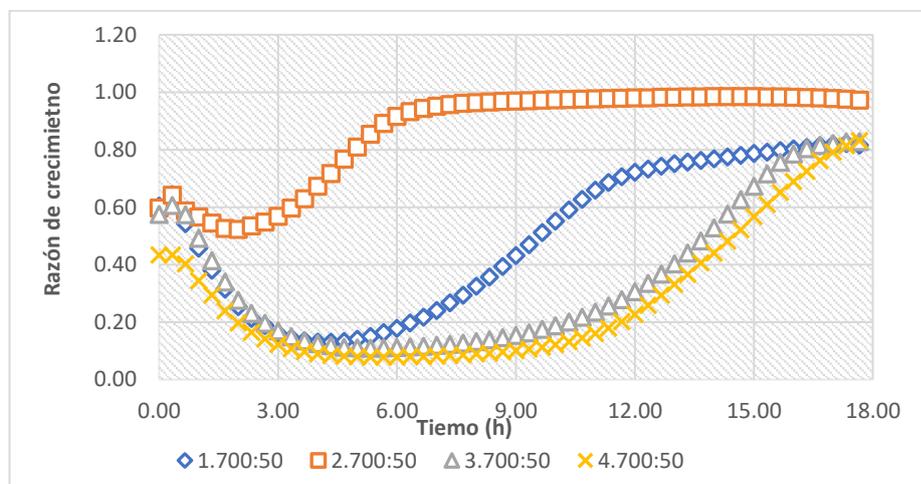


Fig. XI Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* con microencapsulados y 50 mmol/L de NaOCl.

Se observó que los microencapsulados 1 (rombos; 1.700:50), 3 (triángulos; 3.700:50) y 4 (cruces; 4.700:50) no producen un efecto antioxidante notorio ya que muestran una tendencia de pendiente negativa en la fase de latencia durante las 5 primeras horas de crecimiento. Por otra parte, el microencapsulado 2 (cuadrados; 2.700:50) tiene efecto antioxidante ya que evita que las células mueran en la fase de adaptación aumentando así la capacidad de respuesta frente al hipoclorito de sodio. Comparando con la Fig. IX se evidenció que la razón de crecimiento se mantuvo por debajo de 1 lo que indica que el efecto antioxidante de los microencapsulados 1 (30% licopeno Te/Ts 160 °C/90 °C), 3 (20% licopeno Te/Ts 160 °C/90 °C) y 4 (20% licopeno Te/Ts 120 °C/80 °C) no es del todo efectivo como lo es el 2 (30% licopeno Te/Ts 120 °C/80 °C).

La Fig. XII muestra la razón de crecimiento de *S. cerevisiae* con microencapsulados de licopeno y 50 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se puede notar que no existe diferencia en las curvas, por lo que se pudo concluir que el peróxido de hidrógeno no tiene un efecto oxidante en mayor porcentaje como lo tiene el hipoclorito de sodio.

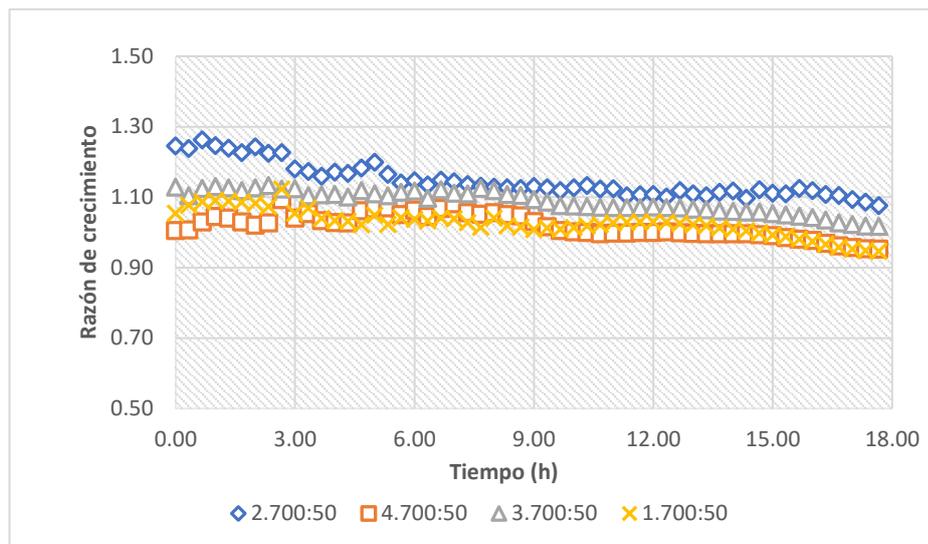


Fig. XII Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* con microencapsulados y 50 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los valores de razón de crecimiento son mayores a 1 debido a la respuesta que presenta la levadura para poder sobrevivir frente al estrés oxidativo que genera el peróxido de hidrógeno.

El microencapsulado que presenta mayor diferencia es el 2 (2.700:50 rombos) (30% licopeno Te/Ts 120 °C/80 °C) ya que el punto mínimo en la razón de crecimiento supera a 1 por lo que se podría decir que el efecto antioxidante que se produce en respuesta al estrés provocado por el peróxido es mucho mejor con respecto al hipoclorito de sodio.

La diferencia entre las Fig. XI y XII es notoria siendo así el hipoclorito de sodio un agente con mayor poder oxidante porque la razón de crecimiento peróxido de hidrógeno al ser cercana a 1 no indica una notoria variación con respecto al crecimiento normal de *S.cerevisiae* en medio YPD.

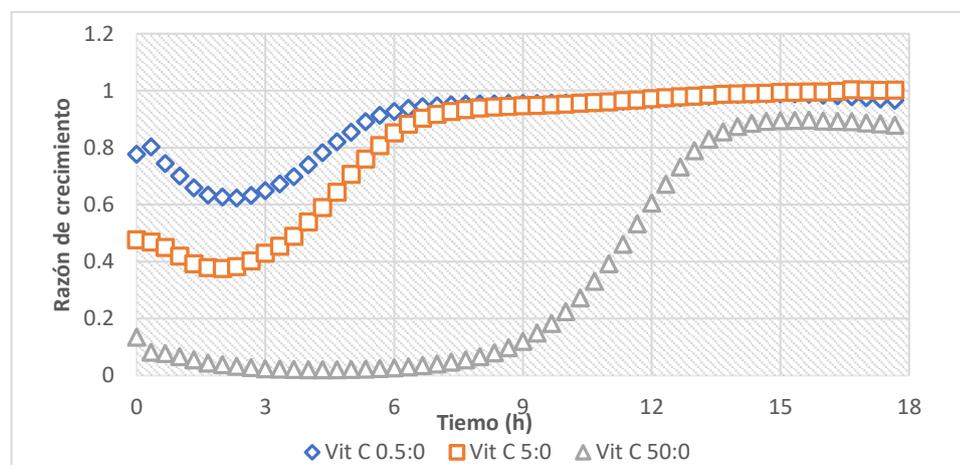
De acuerdo a los resultados obtenidos se puede comprobar según a lo que indica **Plasencia (2014)**, que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa a nivel del citosol activándose la respuesta transcripcional de la levadura. Por otra parte, **Martínez & Estruch (2005)** mencionan que *S. cerevisiae* tiene dos tipos de catalasa, la catalasa A que se encuentra en el peroxisoma y cataliza la rotura de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Además, presenta dos tipos de superóxido dismutasas (SOD), la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) que está localizada en la mitocondria y dismuta el anión superóxido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. Sin embargo, la enzima glutatión peroxidasa es la responsable de catalizar la eliminación

de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$  y la superóxido dismutasa de cobre – zinc (Cu/ZnSOD) que se encuentra en el citoplasma. Es por tales respuestas que presenta la levadura, que conserva el crecimiento sin una notoria apoptosis celular, como lo muestran las figuras antes mencionadas.

La presencia de las especies reactivas de oxígeno a nivel basal en el interior de las células se ha visto evidenciado por estudios realizados por **Kostas (2012)**, ya que se producen durante la respiración mitocondrial, es por tal razón que se dice que se producen de manera endógena. Por otra parte, pueden ser de origen exógeno al estar expuestos a estímulos externos a la célula como agentes oxidantes tales como ácidos orgánicos, inorgánicos, especies que presenten en su composición química oxígeno (**Guarnizo, 2010**).

Según **Pennathur et al (2010)**, la regulación de los eventos inflamatorios e infecciosos se deben a la alteración que sufre el licopeno al oxidarse y fragmentarse en presencia de concentraciones elevadas de iones hipoclorito ( $OCl^-$ ). Esa fragmentación del licopeno da como resultado metabolitos que a la vez interactúan con múltiples moléculas de ( $OCl^-$ ) cediendo hidrógenos lo que estabiliza a tales moléculas, es por esa razón que en la fase de crecimiento se toman valores de 1 y mayores a 1 lo que da a notar una respuesta antioxidante de los microencapsulados utilizados (**Brites & Rosso, 2012**).

En la *Fig. XIII* se muestra la influencia de la vitamina C sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* a concentraciones de 0,5, 5 y 50 mg/mL.



*Fig. XIII* Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* sometida a 0,5 mg/mL (Vit C 0,5:0), 5 mg/mL (Vit C 5:0) y 50 mg/mL (Vit C 50:0) de Vitamina C.

El ácido ascórbico (vitamina C) es un principal antioxidante que regula la división, crecimiento celular y está involucrado en la transducción de señales (Gallie, 2013). El control positivo se efectuó al sustituir los microencapsulados por el uso de vitamina C ya que es un antioxidante probado con anterioridad a concentraciones de 0,5 (rombos) 5 (cuadrados) y 50 mg/mL (triángulos) (Fig. XIII).

La concentración del agente antioxidante tomado como patrón fue necesaria determinarla debido a que la concentración altera las condiciones de desarrollo y crecimiento de las células, al agregar mayor cantidad se observaron varios cambios por ejemplo en cuanto al pH se varió del óptimo que es 5,8 a 4,3 lo que provoca modificaciones en el metabolismo y multiplicación celular (Azza & S.F. Hendawy, 2010). Es por tal razón que se eliminó la concentración de 50 mg/mL de vitamina C porque provoca su necrosis, como se muestra en la Fig. XIII durante las primeras 8 horas se da apoptosis, mientras que a concentraciones menores como 0,5 mg/mL con valores de 0,63 en la etapa pro-oxidativa y 0,94 para la oxidativa. Por otra parte, con 5 mg/mL se obtuvieron valores de 0,34 como punto mínimo y 0,94 como el máximo.

A continuación, se muestra el comportamiento de la levadura a 0,5 y 5 mg/mL de vitamina C con 0,5 y 50 mmol/L de agentes oxidantes.

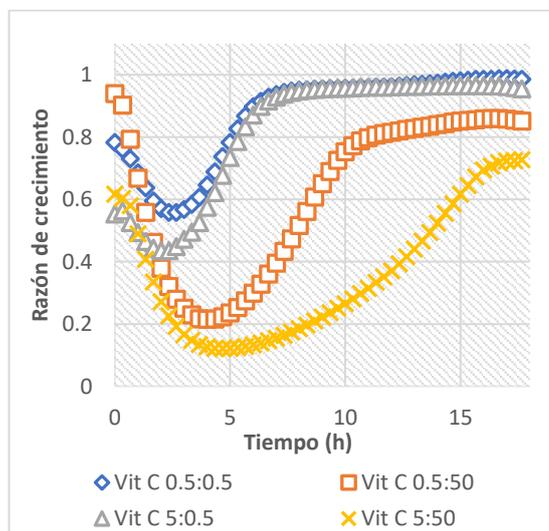


Fig. XIV Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* sometida a 0,5 y 5 mg/mL de Vitamina C y 0,5 y 50 mmol/L de NaOCl.

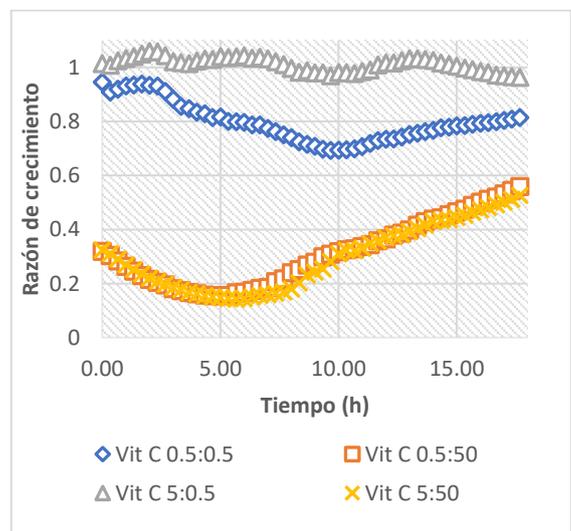


Fig. XV Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* sometida a 0,5 y 5 mg/mL de Vitamina C y 0,5 y 50 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La Fig. XIV muestra las variaciones de razón de crecimiento de la levadura utilizando un agente antioxidante control con respecto al tiempo, notándose así que el mejor resultado a una concentración de vitamina C de 0,5 mg/mL con 0,5 mmol/L de NaOCl (Vit C 0,5:0,5 rombos) y 50 mmol/L de NaOCl (Vit C 0,5:50 cuadrados) fueron los valores de 0,55 y 0,21 respectivamente. Comparando con la Fig. XV el mejor resultado fue a una concentración de vitamina C de 5 mg/mL con 0,5 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vit C 5:0,5 triángulos) tomando un valor mínimo de 0,96 mientras que con una concentración de 50 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vit C 0,5:0,5 rombos) a las 10 horas muestra un punto de 0,69 lo que corrobora lo descrito por **Wu et al., (2011)** ya que el ácido ascórbico en el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se oxida a ascorbato produciéndose así deshidroascorbato que es más estable con menor grado de toxicidad y H<sub>2</sub>O es por tal razón que el comportamiento de *S. cerevisiae* es mejor en presencia de peróxido previo tratamiento con vitamina C.

Para poder determinar de mejor manera la mejor combinación de los microencapsulados se tomó en cuenta el valor máximo y mínimo de cada curva de crecimiento obtenida (Fig. IX, X, XI, XII). El valor máximo representa a la actividad antioxidante, mientras que el valor mínimo se refiere a la actividad pro-oxidante y la capacidad que muestra el licopeno para ayudar a la levadura para activar su respuesta frente al estrés (**Folch-Mallol et al., 2004**). (Fig. XVI, XVII, XVIII, XIX).

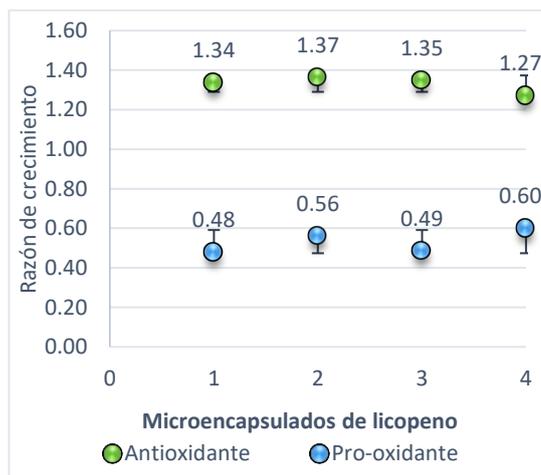


Fig. XVI Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* en la cual representa actividad pro-oxidante y antioxidante a 0,5 mmol/L de NaOCl.

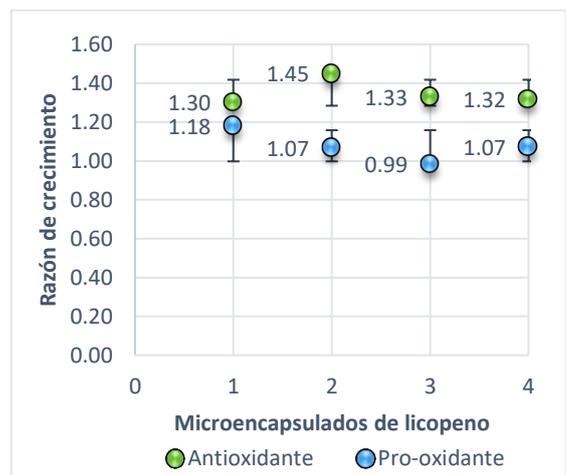


Fig. XVII Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* en la cual representa actividad pro-oxidante y antioxidante a 0,5 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

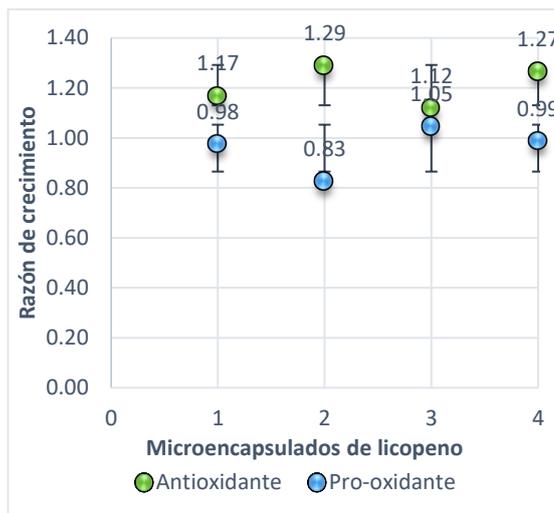


Fig. XVIII Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* en la cual representa actividad pro-oxidante y antioxidante a 50 mmol/L de NaOCl.

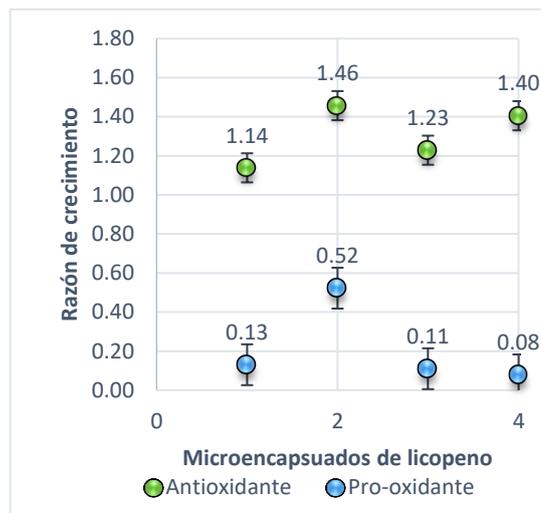


Fig. XIX Razón de crecimiento de *S. cerevisiae* en la cual representa actividad pro-oxidante y antioxidante a 50 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El pico más alto que muestra la Fig. XVI es 1,37 para el microencapsulado 2 seguido del 4 con 1,35 sometidos a un estrés bajo con 0,5 mmol/L de NaOCl, mientras que con peróxido de hidrógeno a 0,5 mmol/L el microencapsulado 2 tomó un valor de 1,45 (Fig. XVII). En cuanto al estrés alto el punto que sobresale es de 1,46 para el tratamiento con hipoclorito de sodio (Fig. XVIII) y 1,29 con peróxido de hidrógeno (Fig. XIX).

Es importante notar la variación en cuanto a los resultados obtenidos, sabiendo que el comportamiento de la levadura en presencia de hipoclorito de sodio (Fig. VII) muestra puntos de razón de crecimiento de 0,89 y 0,26 para el estrés bajo y alto. Por otro lado, con peróxido de hidrogeno (Fig. VIII) tomaron valores de 0,98 y 1 respectivamente. Si comparamos con los valores de la razón de crecimiento utilizando los microencapsulados de licopeno, los valores máximos fueron 1,37 y 1,26 en un estrés bajo y alto de NaOCl, mientras que con peróxido de hidrogeno fueron 1,45 y 1,46, lo que indica que se puede tomar en cuenta la respuesta que presenta la levadura frente al estrés, además del mecanismo que presenta el licopeno frente a los radicales con los que interactúa. Por lo que, en el caso del hipoclorito de sodio el licopeno se fragmenta generándose metabolitos que interactúan con los iones (OCl) donándoles un hidrógeno (Pennathur et al., 2010). Con respecto al peróxido de hidrógeno Plasencia (2014), menciona que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa a nivel del citosol activándose la respuesta

transcripcional de la levadura. Según **Martínez & Estruch (2005)**, la levadura presenta dos tipos de catalasa que transforman los radicales superóxido en agua y oxígeno.

Por otro lado, al comparar con la vitamina C se observa que en NaOCl mejor comportamiento tuvo la concentración de 0,5 mg/mL con valores de 0,96 y 0,86 en estrés bajo y alto, mientras que con 0,5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tomó valores de 1,06 y 0,53 en presencia de 50 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 5 mg/mL. Se evidencia un mejor comportamiento por parte de los microencapsulados debido a que el ácido ascórbico en el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se oxida a ascorbato (**Wu et al., 2011**).

Ensayos realizados por **Peláez (2016)**, muestran que extractos etanólicos de cacao presentan una razón de crecimiento superior a 1,5 a 0,5 mmol/L de peróxido de hidrógeno lo que indica una actividad antioxidante similar a la del tomate de árbol. Por otra parte **Mera (2018)**, reporta resultados de 2,5 para liposomas de *Greigia mulfordii* en condiciones de estrés bajo. En el caso del microencapsulado de licopeno se nota una actividad antioxidante con una razón de crecimiento 1,46 lo que indica que el microencapsulado de carotenos presenta características similares a los extractos de cacao y que los grupos fenólicos que contiene *Greigia mulfordii* tienen mayor actividad antioxidante.

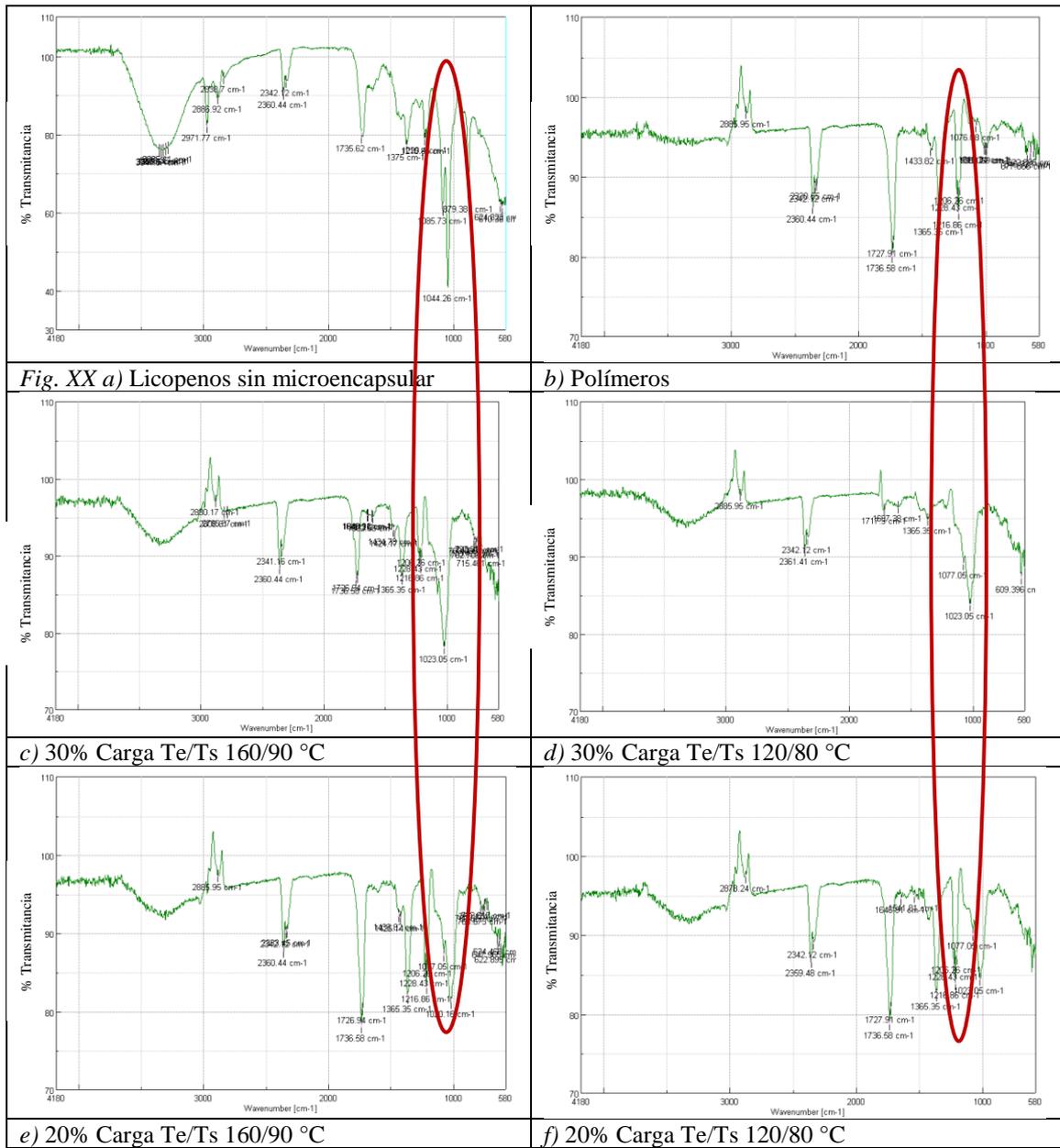
Los microencapsulados tienen la ventaja de la liberación controlada de compuestos, se ha reportado que la capacidad antioxidante depende del polímero utilizado para su protección e interacción con la membrana plasmática de la célula para asegurar su biodisponibilidad (**Roostae et al., 2017**). La liberación lenta puede estar asociada a la interacción entre las bicapas lipídicas y el licopeno al ser un compuesto hidrofóbico se acopla fácilmente a las lipoproteínas de la membrana celular (**Bavelloni et al., 2015**).

Es importante recalcar que en este trabajo la razón de crecimiento mínima alcanzada por el microencapsulado 2 (30% licopeno Te/Ts 120 °C/80 °C) en la fase pro-oxidativa fue 1,07 y 0,56 mientras que en la actividad antioxidante tomaron valores de 1,45 y 1,37 frente a un estrés de 0,5 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NaOCl respectivamente una concentración de 700 mg/mL de microencapsulado de carotenos.

En consecuencia, tras la realización de este trabajo se muestra que la variación de las concentraciones de polímeros como la temperatura de operación en la microencapsulación son factores para tomar en cuenta ya que modifica la actividad que presenta el principio activo que en este caso fue el licopeno mostrando diferentes respuestas en cuanto la actividad antioxidante y porcentaje de eficiencia de encapsulación. Los resultados obtenidos en el ensayo con *S. cerevisiae* son útiles como primera etapa. Sin embargo, el uso en seres humanos requiere mayor estudio y análisis de los posibles efectos que puede producir la ingesta de los polímeros por lo que se ve necesaria una dosificación adecuada.

## 4.7 Análisis Infrarrojo

En la Fig. XX se muestran los espectros resultantes del análisis del Infrarrojo lejano en el cual relaciona el porcentaje de transmitancia (% Transmitancia) de 30 a 110% contra la longitud de onda de 500-4100  $\text{cm}^{-1}$ . Los picos que se observan se deben a las vibraciones de los átomos de los compuestos analizados que se generan al ser excitados.



La Fig. XX muestra el análisis en el espectro infrarrojo lejano del concentrado de licopeno sin microencapsular (a); mezcla de polímeros (maltodextrina + goma arábiga) (b); microencapsulado 1 (30% licopeno Te/Ts 160 °C/90 °C) (c); microencapsulado 2 (30% licopeno Te/Ts 120 °C/80 °C) (d), microencapsulado 3 (20% licopeno Te/Ts 160 °C/90 °C) (e), microencapsulado 4 (20% licopeno Te/Ts 120 °C/80 °C) (f). Se puede notar que la línea verde representa a cada uno de los comportamientos que presentan los átomos al vibrar, es importante notar que hay un pico característico de licopeno en la zona de 1020 – 1030  $\text{cm}^{-1}$  que se marca en la Fig. XX a. La Fig. XX a muestra un valor de transmitancia de 40,83% en la zona de 1025  $\text{cm}^{-1}$ , si comparamos con las Fig. XX c, d, e y f se evidencia un aumento de este valor, siendo el más característico (Anexos III, IV, V, VI y VII) el valor de 83,76% que corresponde al microencapsulado 2. La investigación elaborada por **Pérez (2019)**, mostró un pico representativo de carotenos fue en un rango de 1020 – 1043 ( $\text{cm}^{-1}$ ) lo que corrobora la presencia de dicho compuesto en la presente investigación.

Estos valores indican que, al presentar un pico de menor tamaño, es decir, con una transmitancia de mayor porcentaje existe mayor protección de licopeno como se muestra en la zona resaltada por la línea roja. **González (2010)**, menciona que la transmitancia está ligada con el paso de luz a través de una muestra a una longitud de onda determinada, en este caso al tener mayor cantidad de licopeno la luz incidente va a ser menor, mientras que al tener el mismo compuesto protegido por los polímeros va a hacer que el haz incidente sea mayor lo que indique mayor porcentaje de transmitancia.

La Fig. XX a) muestra un pico característico de grupos hidroxilo en la zona comprendida entre 3400 - 3200 ( $\text{cm}^{-1}$ ) que corresponde a grupos OH presentes en líquidos, en este caso corresponde al etanol usado como solvente en la matriz de extracción. Por otra parte en todas las imágenes se presentan los picos de la zona comprendida entre 1100 - 1000 ( $\text{cm}^{-1}$ ) que indican la existencia de dobles enlaces en hidrocarburos insaturados, es decir, grupos =C-H que son característicos del licopeno debido que en su estructura química presenta 11 dobles enlaces conjugados y 2 sin conjugar (**Candelas, 2006**). Los picos que se encuentran en la zona de 1020 - 1050 ( $\text{cm}^{-1}$ ) corresponden a los grupos -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>- presentes en los compuestos alifáticos (**Aust et al., 2003**) (**Shurvell, 2006**).

## **4.8 Verificación de la hipótesis**

### **4.8.1 Hipótesis nula**

Las diferentes combinaciones de polímeros, temperaturas de entrada y salida usadas en la microencapsulación no influyen en la actividad antioxidante de licopenos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*): Se rechaza la hipótesis nula.

### **4.8.2 Hipótesis alternativa**

Se acepta la hipótesis alternativa ya que se comprobó que las diferentes combinaciones de polímeros, temperaturas de entrada y salida usadas en la microencapsulación influyen en la actividad antioxidante de licopenos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- Se evaluaron las diferentes combinaciones de polímeros en la microencapsulación de licopeno de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) encontrando que la mejor combinación fue la del microencapsulado 2 (E2) que contiene 30% de carga, 35% goma arábiga y 35% de maltodextrina a una temperatura de entrada (Te) de 120 °C y de salida (Ts) de 80 °C que presentó el mayor porcentaje de eficiencia con un valor de 64,42% EME.
- Se comparó la actividad antioxidante *in vitro* de los diferentes microencapsulados y del concentrado de licopeno mediante el método DPPH en el cual se observó que el valor máximo fue el del microencapsulado 2 con un porcentaje de inhibición del 81,84% que representa una concentración equivalente de trolox de  $333,78 \pm 4,53$   $\mu\text{mol}$  de trolox / g muestra.
- Se evaluó la actividad antioxidante *in vivo* de los diferentes microencapsulados de licopenos empleando *Saccharomyces cerevisiae* encontrando que el microencapsulado 2 a una concentración de 700 mg / mL presenta mayor actividad antioxidante tomando valores de 1,37 y 1,45 en la razón de crecimiento sometida a una concentración de 0,5 mmol/L de hipoclorito de sodio y peróxido de hidrogeno respectivamente.
- Al someter a la levadura a un estrés alto, es decir, a 50 mmol/L de agentes oxidantes se evidenció que el microencapsulado 2 presenta mayor efecto antioxidante sobre la célula tomando un valor máximo de razón de crecimiento de 1,26 con hipoclorito de sodio, mientras que al utilizar peróxido de hidrogeno esta variable aumentó a 1,46.
- La actividad antioxidante de la vitamina C a 0,5 mg/mL en presencia de hipoclorito de sodio tuvo valores de razones de crecimiento de 0,96 y 0,86 en estrés bajo y alto, mientras que el microencapsulado 2 obtuvo valores de 1,37 y 1,26.

- La vitamina C a una concentración de 5 mg/mL en presencia de 0,5 mmol/L y 50 mmol/L de peróxido de hidrogeno tomó valores de 1,06 y 0,53 mientras que el microencapsulado 2 tuvo actividad antioxidante de 1,45 y 1,46.

## 5.2 Recomendaciones

- Se recomienda utilizar cáscaras de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) sin previo secado para la extracción de carotenos.
- De ser posible utilizar *Saccharomyces boulardii* en la determinación de actividad antioxidante *in vivo* o levaduras certificadas.
- Utilizar agentes oxidantes orgánicos para la determinación de actividad antioxidante *in vivo* en *S. cerevisiae*.
- Realizar estudios toxicológicos de los microencapsulados de licopeno de tomate de árbol para determinar la cantidad máxima asimilable por el ser humano.
- Se recomienda ejecutar ensayos que determinen el periodo de vida útil de los microencapsulados para comprobar su actividad antioxidante en el transcurso del tiempo.
- Elaborar estudios de liberación de licopeno contenido en los microencapsulados mediante el uso de fluidos biológicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alberts, B., & Bray, D. (2006). *Introducción a la biología celular* (Panamerica). Madrid: Ed. Médica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=qrrYZJhrRm4C&pgis=1>
- Anandharamakrishnan, C. (2017). *Handbook of Drying for Dairy Products*. India. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=4801041&query=Zbicinski>
- Anilkumar, G. (2014). *Microencapsulation in the Food Industry*. San Diego, USA. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1727287&query=Light+stability+of+spraydried+bixin+encapsulated>
- Aràndiga, G., & Díaz, S. (2008). Estudio del licopeno del tomate como colorante natural desde la perspectiva analítica e industrial. Retrieved from <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/5544>
- Aust, O., Ale-Agha, N., Zhang, L., Wollersen, H., Sies, H., & Stahl, W. (2003). Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food and Chemical Toxicology*, 41(10), 1399–1407. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00148-0)
- Azza, A., & S.F. Hendawy. (2010). Effect of Dry Yeast and Compost Tea on Growth and Oil Content of Borago Officinalis Plant, 7. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Saber\\_Hendawy2/publication/266883856\\_Effect\\_of\\_Dry\\_Yeast\\_and\\_Compost\\_Tea\\_on\\_Growth\\_and\\_Oil\\_Content\\_of\\_Borago\\_Officinalis\\_Plant/links/545858770cf2bccc49112680/Effect-of-Dry-Yeast-and-Compost-Tea-on-Growth-and-Oil-Content](https://www.researchgate.net/profile/Saber_Hendawy2/publication/266883856_Effect_of_Dry_Yeast_and_Compost_Tea_on_Growth_and_Oil_Content_of_Borago_Officinalis_Plant/links/545858770cf2bccc49112680/Effect-of-Dry-Yeast-and-Compost-Tea-on-Growth-and-Oil-Content)
- Bavelloni, A., Piazzini, M., Raffini, M., Faenza, I., & Blalock, W. L. (2015). Prohibitin 2: At a communications crossroads. *IUBMB Life*, 67(4), 239–254. <https://doi.org/10.1002/iub.1366>
- Bertolini, A. C., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F. (2001). Stability of Monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 780–785. <https://doi.org/10.1021/jf000436y>
- Brazel, C. (2012). *FUNDAMENTAL PRINCIPLES OF POLYMERIC MATERIALS* (1st ed.). New Jersey, USA. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=837617&query=microencapsulation>
- Brebban, C. (2013). *Handbook of Plant Food Phytochemicals SOURCES, STABILITY AND EXTRACTION* (1st ed.). New Zealand. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1120629&query=Spray-dried+dairy+and+dairy-like#>
- Brites, F. D., & Rosso, L. a G. (2012). Lípidos y Lipoproteínas Características , Fisiología y Acciones Biológicas Objetivos Contenidos.
- Britton, J. (2004). BUILDING BLOCKS FOR A SCALABLE QUANTUM INFORMATION PROCESSOR BASED ON TRAPPED IONS. Retrieved February 4, 2019, from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=296154&query=britton>
- Candelas, G. (2006). *Licopeno y otros carotenoides en tomate y polvo de tomate*. Mexico. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/141/14101911.pdf>

- Cardona, E., Ríos, L., & Restrepo V, G. M. (2006). EXTRACCIÓN DEL CAROTENOIDE LICOPENO DEL TOMATE CHONTO (*Lycopersicum esculentum*), 8. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v13n2/v13n2a06.pdf>
- Castro, V. (2013). Licopenos y Salud Humana - Google Books. <https://doi.org/2027-6850>
- Cirill, G. (2012). *Antioxidant Polymers : Synthesis, Properties, and Applications*. Canadá. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=918280&query=antioxidant+activity>
- Côte, R. (2006). *Industry Ecology*. (A. Dale, Ed.). Toronto. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3412528&query=Cote>
- Coulson, J. M., Richardson, J. F., Backhurst, J. R., & Harker, J. H. (1981). *Ingeniería química : unidades SI. T. 2, Operaciones básicas*. Reverté.
- Cruz, R., & González, J. (2013). Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutr Hosp*, 28(1), 6–15. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6302>
- Dominguez, H. (2013). *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals : Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. New York. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1581394&query=microencapsulation>
- Encina, C. (2008). *Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas*. *Revista de la Sociedad Química del Perú* (Vol. 74). Sociedad Química del Perú. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2008000200004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2008000200004)
- Figuroa Martínez, P. M., Hurtado Benavides, A. M., Ceballos Ortiz, M. A., & Ortiz, M. A. C. (2016). Microencapsulación mediante secado por aspersión de aceite de mora (*Rubus glaucus*) extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico. *Revista Colombiana de Química*, 45(2), 39. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.57481>
- Folch-Mallol, J., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Covarrubias Robles, A. A. (2004). *La respuesta a estrés en la levadura Saccharomyces cerevisiae* MICROBIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA. Argentina. Retrieved from [http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2004/mi04-1\\_2d.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2004/mi04-1_2d.pdf)
- Gallie, D. R. (2013). L-ascorbic Acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*, 2013, 795964. <https://doi.org/10.1155/2013/795964>
- Garti, N. (2012). *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*. (J. McClements, Ed.). Philadelphia. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1575574&query=lycopene>
- González, I. (2010). *Caracterización química del color de diferentes variedades de guayaba*. Bogotá. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/2815/1/197449.2010.pdf>
- Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2008). Effect of Maltodextrin Addition during Spray Drying of Tomato Pulp in Dehumidified Air: II. Powder Properties. *Drying Technology*, 26(6), 726–737. <https://doi.org/10.1080/07373930802046377>
- Guarnizo, A. (2010). *Experimentos de Química Orgánica*. ELIZCOM S.A.S. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=Otm5wsEeKYEC&pgis=1>

- Guija, E. (2015). *Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante*. Perú. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v15n1/a08v15n1.pdf>
- Hayes, W. (2013). *Healable Polymer Systems*. (C. Zhong, Ben; Masuda, Toshio; Weder, Ed.). USA. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1713718&query=microencapsulation>
- Huertas, A. (2010). *Microencapsulación de Alimentos Food Microencapsulation: A Review*. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* (Vol. 63). Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a20v63n01.pdf>
- Hurtado, P. (2015). *Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de Juglans Neotropica Diels (nogal peruano)*. *Revista de la Sociedad Química del Perú* (Vol. 81). Sociedad Química del Perú. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2015000300010](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2015000300010)
- INEC. (2018). *ESTADÍSTICA DE INFORMACIÓN AMBIENTAL ECONÓMICA EN GOBIERNOS AUTÓNOMOS DESCENTRALIZADOS MUNICIPALES*. Quito. Retrieved from <http://www.cepis.ops-oms.org/residuos>
- Islam, M. Z., Kitamura, Y., Yamano, Y., & Kitamura, M. (2016). Effect of vacuum spray drying on the physicochemical properties, water sorption and glass transition phenomenon of orange juice powder. *Journal of Food Engineering*, 169, 131–140. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2015.08.024>
- Iturriaga, L. (2014). *Advances in Food Science and Nutrition*. Canada. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1574374&query=antioxidant+activity>
- Jittanit, W., Niti-Att, S., & Techanuntachaikul, O. (2010). *Study of Spray Drying of Pineapple Juice Using Maltodextrin as an Adjunct*. *Chiang Mai J. Sci* (Vol. 37). Retrieved from [www.science.cmu.ac.th/journal-science/josci.html](http://www.science.cmu.ac.th/journal-science/josci.html)
- Juscamaita, L., Pérez, T., Espinoza, C., Quispe, M., Hinostroza, G., Flores, O., & Manyari, G. (2017). *EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE CAROTENOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FLOR DE MASTUERZO (Tropaeolum majus L.) EN LA MICROENCAPSULACIÓN POR SPRAY-DRYING*. Perú. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v83n3/a04v83n3.pdf>
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.016>
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., Roach, P. D., & Stathopoulos, C. E. (2014). Microencapsulation of Gac oil: Optimisation of spray drying conditions using response surface methodology. *Powder Technology*, 264, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.053>
- Kilcast, D. (2013). *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality : A Practical Guide*. New York. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/detail.action?docID=1581396&query=Özkan>
- Klein, Kimberly; Amitava, D. (2014). *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements : Prevention and Treatment of Disease*. Canada. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/detail.action?docID=1581396&query=Özkan>

ebooks/reader.action?docID=1633795&query=Folin+ciocalteu#

- Koç, B., Sakin-Yılmaz, M., Kaymak-Ertekin, F., & Balkır, P. (2014). Physical properties of yoghurt powder produced by spray drying. *Journal of Food Science and Technology*, 51(7), 1377–1383. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0653-8>
- Kostas, P. (2012). *Principles of Free Radical Biomedicine* (1st ed., p. 23). New York: Nova Science Publishers, Incorporated. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3022030&query=NaOCl%2Bcharacteristics>
- Lakkis, J. (2016). *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (2nd ed.). USA. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=4406049&query=Microencapsulation+of+black+pepper+oleoresin>
- León Sánchez Sánchez, G., Janet, M., Garzón, G., Andrea, M., Javier, F., Rojas, G., ... Ramírez, V. (2009). Aprovechamiento del suero lácteo de una empresa del norte antioqueño, 1, 10. Retrieved from <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/551/1/65-74.pdf>
- Londoño, J. (2012). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad*. Colombia. Retrieved from <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.129-162.pdf>
- López, O., Romero, A., & Nogueira, A. (2015). ESTUDIO PRELIMINAR DE MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE CALABAZA AMARGA PRELIMINARY ESTUDY OF GAC OIL MICROENCAPSULATION, 23(1), 52–55. <https://doi.org/10.1021/jf030616i>
- Madigan, Martinko, P. (2006). *Biología De Los Microorganismos 10ª Ed - Brock.pdf* (Decima). Madrid.
- Mager, W. H., & Winderickx, J. (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(5), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.004>
- Martínez, O. LA. (2015). Microencapsulación mediante secado... MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Esquivel--González B MICROENCAPSULATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS BY SPRAY DRYING. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*, 16(2), 180–192. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/813/81343176006.pdf>
- Martínez Pastor, M. T., & Estruch Ros, F. (2005). Regulación transcripcional de la respuesta a estrés de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* papel de los factores transcripcionales MSN2P y MSN4P. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*, 28. Retrieved from <https://www.tdx.cat/handle/10803/9525>
- Matata, B. M., & Elahi, M. M. (2011). *Oxidative stress: a focus on cardiovascular disease pathogenesis*. Nova Biomedical. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3020355&query=oxidative+stress>
- Meléndez, A. (2004). *Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos*. España. Retrieved from [https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/26409/Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos.pdf?sequence=1](https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/26409/Estabilidad%20de%20los%20pigmentos%20carotenoides%20en%20los%20alimentos.pdf?sequence=1)
- Mera, A. (2018). Evaluación de la actividad antioxidante de liposomas obtenidos a partir del extracto etanólico de *Greigia mulfordii*, III, 39.

- Moreno, E. (2014). *Contenido total de fenoles y actividad antioxidante de pulpa de seis frutas tropicales*. *Rev. Colomb. Quim* (Vol. 43). Bogotá. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v43n3/v43n3a06.pdf>
- Munné-Bosch, S. (2012). *Phenolic Acids: Composition, Applications and Health Benefits*. New York. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3017830&query=DPPH>
- Noomhorm, A. (2014). *Functional Foods and Dietary Supplements : Processing Effects and Health Benefits*. (A. Ahmad, Imran; Kumar, Ed.). Thailand. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1650818&query=Gharsallaoui>
- OMS. (2018). OMS | Cada año, las enfermedades no transmisibles provocan 16 millones de defunciones prematuras, por lo que la OMS insta a redoblar esfuerzos. Retrieved January 19, 2019, from <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/noncommunicable-diseases/es/>
- Otero, Miguel; Guerrero, I. (2012). Las levaduras, 88–90. Retrieved from [http://karin.fq.uh.cu/acc/2016/CIENCIAS\\_TECNICAS/032/New/Documentación/Parte I/Referencias/Libros y monografías/Las Levaduras y sus productos derivados.pdf](http://karin.fq.uh.cu/acc/2016/CIENCIAS_TECNICAS/032/New/Documentación/Parte I/Referencias/Libros y monografías/Las Levaduras y sus productos derivados.pdf)
- Paar, A. (2016). Extracción de solventes asistida por microondas, 2–3. Retrieved from <https://www.anton-paar.com/?eID=documentsDownload&document=57570&L=1>
- Parzanese, T. M. (2015). Tecnologías para la Industria Alimentaria MICROENCAPSULACIÓN Ficha N° 20. Retrieved from [www.alimentosargentinos.gob.ar](http://www.alimentosargentinos.gob.ar)
- Pastuña-Pullutasig, A., López-Hernández, O., Debut, A., Vaca, A., Rodríguez-Leyes, E., Vicente, R., ... Tapia-Hernández, F. (2016). Microencapsulación de aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) mediante secado por aspersión. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*, 45(3), 422–437. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62029>
- Peláez, A. (2016). *Validación funcional de extractos polifenólicos de cacao mediante ensayos in vivo con organismos modelo*. Valencia. Retrieved from <http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/56209/Tesis Ana Peláez Soto.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pennathur, S., Maitra, D., Byun, J., Sliskovic, I., Abdulhamid, I., Saed, G. M., ... Abu-Soud, H. M. (2010). Potent antioxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2), 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.003>
- Pérez, C. (2019). *Extracción y microencapsulación de licopenos provenientes de residuos agroindustriales del tomate de árbol (Solanum betaceum)*. Ambato. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29416/1/BQ178.pdf>
- Plasencia, C. (2014). *Optimización de la detección de daños oxidativos en la célula viva y en tiempo real*. Valencia. Retrieved from <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/46439/Trabajo Final de Grado Carolina Bets Plasencia.pdf?sequence=1>
- Preedy, V. R. (2013). Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidantes. <https://doi.org/1550525>
- Pryor, W. (2001). *Bio-Assays for Oxidative Stress Status* (1st ed.). Louisiana. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1179768&query=Reactive+Oxygen>

- Pullutasig, R. (2016). *Microencapsulación de aceite de sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) mediante secado por aspersion.* Ambato. Retrieved from [http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/21313/1/BQ\\_80.pdf](http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/21313/1/BQ_80.pdf)
- Quiñones Adalí. (2008). “Eficacia de la extracción asistida por microondas para determinar plaguicidas organofosforados en aceites vegetales mediante cromatografía gaseosa,” 56–60. Retrieved from [http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2008/qf-quinones\\_a/pdfAmont/qf-quinones\\_a.pdf](http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2008/qf-quinones_a/pdfAmont/qf-quinones_a.pdf)
- Raffo, A., Malfa, G. La, Fogliano, V., Maiani, G., & Quaglia, G. (2006). Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.02.003>
- Rocha-Selmi, G. A., Favaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2013). Morphology, Stability, and Application of Lycopene Microcapsules Produced by Complex Coacervation. *Journal of Chemistry*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/982603>
- Roostae, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Rafiee, Z. (2017). The enhancement of pistachio green hull extract functionality via nanoliposomal formulation: studying in soybean oil. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3620–3629. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2822-2>
- Ruiz, J. (2017). *New polymers for encapsulation of nutraceutical compounds.* (M. Segura, Ed.). Oxford. <https://doi.org/9781119228790>
- Salazar, N. (2015). Capacidad de dosificación de vehículos semisólidos en cápsulas duras conteniendo Piroxicam 20 mg. Retrieved from <https://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/viewFile/218/249>
- Schuck, P. (2012). *Analytical Methods for Food and Dairy Powders.* India. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=865169&query=Bimbenet>
- Sesso, H. D., Liu, S., Gaziano, J. M., & Buring, J. E. (2003). Dietary Lycopene, Tomato-Based Food Products and Cardiovascular Disease in Women. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2336–2341. <https://doi.org/10.1093/jn/133.7.2336>
- Shen, Q., & Quek, S. Y. (2014). Microencapsulation of astaxanthin with blends of milk protein and fiber by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 123, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.09.002>
- Shu, B., Yu, W., Zhao, Y., & Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 76(4), 664–669. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.062>
- Shurvell, H. F. (2006). Spectra- Structure Correlations in the Mid- and Far-Infrared. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 3–30. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s4101>
- Solval, K. M., & Sundararajan, S. (2012). Development of cantaloupe (*Cucumis melo*) juice powders using spray drying technology. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.017>
- Soto, Marcela, & Rosales, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 18(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>

- Soto, Mayra. (2018). *Microencapsulación de licopeno en mezclas de goma xantana, pectina y sacarosa mediante secado por aspersión*. Mexico. Retrieved from [https://repositorio.itesm.mx/bitstream/handle/11285/632730/TESIS\\_Mayra\\_Cristina\\_Soto\\_Caballero.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.itesm.mx/bitstream/handle/11285/632730/TESIS_Mayra_Cristina_Soto_Caballero.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2011). Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry*, 129(3), 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.015>
- Tapia, M. (2017). *Microencapsulación del Ácido Ascórbico mediante Secado por Aspersión con Almidón y Maltodextrina*. Ambato. Retrieved from [http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25306/1/BQ\\_121.pdf](http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25306/1/BQ_121.pdf)
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88(3), 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029>
- Vella, M. (2011). *Sprays: Types, Technology and Modeling*. New York. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3021289&query=Tonon>
- Vikas, M. (2013). *Encapsulation Nanotechnologies*. Canadá. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1195725&query=microencapsulation>
- Waliszewski, K. N., & Blasco, G. (2010). Nutraceutical properties of lycopene. *Salud Publica de Mexico*, 52(3), 254–265. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20485889>
- Watanabe, Y. (2013). *COORDINATION CHEMISTRY IN PROTEIN CAGES*. Canada. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1155270&query=watanabe>
- Wiley, J. (2014). *Nano- and Microencapsulation for Foods*. (H.-S. Kwak, Ed.). UK. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=1666470&query=microencapsulation>
- Wu, M. J., O'Doherty, P. J., Fernandez, H. R., Lyons, V., Rogers, P. J., Dawes, I. W., & Higgins, V. J. (2011). An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 11(4), 379–387. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00726.x>
- Xu, Z. (2012). *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*. USA. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=821888&query=antioxidant+activity>
- Yamaguchi, M. (2010). *CAROTENOIDS: PROPIETIES, EFFECTS AND DISEASES*. New York: Nova Science, Inc. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=3021582&query=lycopene>
- Yu, L. (2007). *Wheat Antioxidants*. Manhatthan. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/reader.action?docID=331471&query=Folin+ciocalteu>

{Bibliography

## ANEXOS

### Anexo I. Curva de calibración para determinar el porcentaje de inhibición utilizando trolox

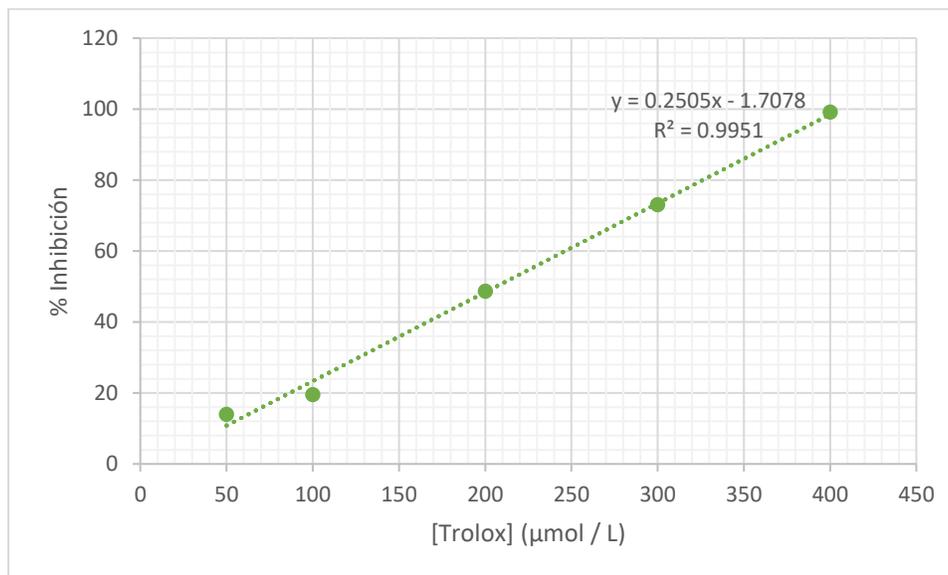


Fig XXI. Curva de calibración para determinar la actividad antioxidante mediante inhibición del DPPH

### Anexo II. Determinaciones obtenidas en los ensayos de porcentaje de eficiencia de microencapsulación (EME) y actividad antioxidante (AA)

BLOQUE	Carga (%)	TeyTs °C	EME (%)	AA (µmol Trolox / g muestra) (A ± 0,001)
1	30,0	120/80	64,75	335,04
1	20,0	160/90	31,28	219,72
1	30,0	160/90	26,57	308,43
1	20,0	120/80	34,54	233,03
2	30,0	120/80	66,19	335,04
2	20,0	160/90	35,38	236,41
2	30,0	160/90	25,36	324,78
2	20,0	120/80	33,12	242,66
3	30,0	120/80	63,27	337,88
3	20,0	160/90	28,28	237,42
3	30,0	160/90	28,88	307,54
3	20,0	120/80	32,64	242,43
4	30,0	120/80	63,63	322,95
4	20,0	160/90	31,01	235,65
4	30,0	160/90	33,20	313,39
4	20,0	120/80	32,73	232,14

5	30,0	120/80	65,11	335,04
5	20,0	160/90	31,46	220,61
5	30,0	160/90	29,32	279,73
5	20,0	120/80	36,70	243,38
6	30,0	120/80	63,95	337,31
6	20,0	160/90	32,12	237,29
6	30,0	160/90	25,98	305,77
6	20,0	120/80	33,33	241,59
7	30,0	120/80	64,03	332,11
7	20,0	160/90	30,00	235,65
7	30,0	160/90	26,13	321,65
7	20,0	120/80	37,74	232,14

**Anexo III.** Tablas de la optimización de las variables de respuesta

Valor óptimo = 0,966

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Carga	20,0	30,0	30,0
TeyTs	120,0	160,0	120,0

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo</i>
EME	64,423
AA	333,630

**Anexo IV.** Tabla que relaciona la longitud de onda y porcentaje de transmitancia para el licopeno sin microencapsular

Longitud de onda[cm-1]	%T
3356.5	75,87
3341.07	75,14
3325.64	75,75
3306.36	76,10
3286.11	76,47
2971.77	81,93
2886.92	89,25
2838.7	94,33
2360.44	90,41
2342.12	93,45
1735.62	79,24
1375.00	76,95
1229.40	78,72
1216.86	78,46
1085.73	60,62
1044.26	40,83
879.38	63,66

**Anexo V.** Tabla que relaciona la longitud de onda y porcentaje de transmitancia para el microencapsulado 1

Longitud de onda [cm-1]	%T
2880.17	97,05
2808.81	95,58
2785.67	95,62
2360.44	88,39
2341.16	90,63
1736.58	86,87
1726.94	87,27
1646.91	95,19
1640.16	95,25
1612.20	95,12
1602.56	95,01
1434.78	93,19
1424.17	93,02
1365.35	86,98
1228.43	89,69
1216.86	88,50
1206.26	90,48
1023.05	78,01
780.065	92,04
770.423	91,75
762.709	91,46
742.46	92,19
732.81	92,31
715.46	90,45

**Anexo VI.** Tabla que relaciona la longitud de onda y porcentaje de transmitancia para el microencapsulado 2

Longitud de onda [cm-1]	%T
2885.95	97,92
2361.41	90,74
2342.12	92,30
1717.30	96,01
1607.38	96,33
1365.35	94,74
1077.05	89,02
1023.05	83,76
609.396	87,13

**Anexo VII.** Tabla que relaciona la longitud de onda y porcentaje de transmitancia para el microencapsulado 3

Longitud de onda [cm-1]	%T
2885.95	97,33
2360.44	87,63
2342.12	90,00
2333.45	90,17
1736.58	77,94
1726.94	80,29
1433.82	92,20
1425.14	92,06
1365.35	81,74
1228.43	85,03
1216.86	82,99
1206.26	86,29
1077.05	87,17
1020.16	81,12
780.06	93,27
763.67	92,89
750.17	93,56
732.81	93,67
647.96	88,65
634.46	89,07
622.89	88,00

**Anexo VIII.** Tabla que relaciona la longitud de onda y porcentaje de transmitancia para el microencapsulado 4

Longitud de onda [cm-1]	%T
2878.24	97,27
2359.48	86,58
2342.12	88,93
1736.58	78,73
1727.91	80,66
1646.91	94,56
1541.81	94,81
1365.35	82,38
1228.43	86,09
1216.86	83,84
1206.26	86,97
1077.05	90,04
1023.05	84,37