



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN Y LIBERACIÓN DEL
EXTRACTO DE BUGAMBILIA (*Bougainvillea* sp.) ENCAPSULADO
EN PERLAS DE ALGINATO Y ALMIDÓN DE MAÍZ”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

ALONDRA JAZMIN ESCOBAR ROJAS

ASESOR

JUAN OROZCO VILLAFUERTE

COASESOR

HÉCTOR CARRILLO NAVA

ASESOR EXTERNO

MA. DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES

06 DE DICIEMBRE DE 2016



ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO	6
1.1 COLORANTES	8
1.1.1 Clasificación de los colorantes	8
1.1.2 Colorantes naturales	9
1.1.2.1	
CAROTENOIDES	10
1.1.2.2 CLOROFILAS	10
1.1.2.3 PIGMENTOS FENÓLICOS	11
1.1.2.3.1 Flavonoides	11
1.1.2.3.2 Antocianinas	11
1.1.2.3.3 Taninos	11
1.1.2.4 HEMOPIGMENTOS	12
1.1.2.5 BETALAÍNAS	12
1.2 GENERALIDADES DE LA BUGAMBILIA	12
1.2.1 Origen	13
1.2.2 Taxonomía	13
1.2.3 Características botánicas	14
1.2.3.1 BETACIANINAS	15
1.2.3.2 BETAXANTINAS	15
1.2.3.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	16
1.2.3.4 ESTABILIDAD	16
1.3 ANTIOXIDANTES	18
1.3.1 Clasificación de los antioxidantes	19
1.3.2 Actividad antioxidante	20
1.3.3 Cuantificación de la actividad antioxidante	20
1.3.3.1 MÉTODO DPPH	21
1.3.3.2 MÉTODO ABTS	22
1.3.4 Cuantificación de Fenoles Totales	22
1.3.5 Cuantificación de Betalaínas	23
1.3.6 Medición del color	23
1.4 ENCAPSULACIÓN	24
1.4.1 Métodos de encapsulación	25
1.4.1.1 ENCAPSULACIÓN POR EXTRUSIÓN	25
1.4.2 Materiales encapsulantes	26
1.4.2.1 ALGINATO	27

1.4.2.2 ALMIDON DE MAÍZ	28
CAPÍTULO 2 JUSTIFICACIÓN	30
CAPÍTULO 3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo general	33
3.2 objetivos particulares	33
CAPÍTULO 4 HIPÓTESIS	34
CAPÍTULO 5 MATERIALES	36
5.1 Material	37
5.2 Material biológico	37
CAPÍTULO 6 METODOLOGÍA	38
6.1 Acondicionamiento del material vegetal	39
6.2 Obtención de los extractos	39
6.3 Determinación de Fenoles Totales	40
6.4 Cuantificación de betalaínas	40
6.5 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH	41
6.6 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS	41
6.7 Cuantificación del color (Colorímetro)	41
6.8 Elaboración de las perlas	42
6.9 Eficiencia de encapsulación	42
6.10 Cinética de liberación	43
6.11 Determinación de la estabilidad del extracto encapsulado	43
CAPÍTULO 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	45
7.1.1 Determinación de Fenoles Totales	46
7.1.2 Cuantificación de betalaínas	46
7.1.3 Capacidad antioxidante	48
7.1.3.1 Capacidad antioxidante por el método DPPH	48
7.1.3.2 Capacidad antioxidante por el método de ABTS	49
7.1.4 Cuantificación del color (Colorímetro)	50
7.2 Encapsulación	52
7.2.1 Eficiencia de encapsulación	52
7.2.2 Cinética de liberación	52
7.2.3 Determinación de Fenoles Totales	58
7.2.4 Cuantificación de betalaínas	59

7.2.5 Capacidad antioxidante	62
7.2.6 Cuantificación del color (Colorímetro)	63
CAPÍTULO 8 CONCLUSIONES	65
CAPÍTULO 9 PERSPECTIVAS	67
CAPÍTULO 10 REFERENCIAS	69
CAPÍTULO 11 ANEXOS	79
Anexo 1 Determinación de Fenoles Totales	80
Anexo 2 Cuantificación de betalaínas	81
Anexo 3 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH	82
Anexo 4 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS	83

RESUMEN

La demanda actual de productos funcionales (productos elaborados no solo por sus propiedades nutricionales sino con la finalidad de mejorar la salud y ayudar en la prevención de algunas enfermedades) ha provocado la búsqueda de nuevas fuentes naturales las cuales contengan compuestos activos que puedan ser agregados a dichos productos, los cuales pueden ser vitaminas, minerales, fenoles, flavonoides, carotenoides, betalaínas, entre otros.

Existen estudios o investigaciones en busca de fuentes alternativas para obtener colorantes naturales y poder sustituir los colorantes sintéticos. Una buena opción es el uso de la bugambilia, diversas investigaciones reportan que los extractos obtenidos de esta planta presenta una gran cantidad de pigmentos. Aunado a esto se ha reportado que dichos pigmentos poseen capacidad antioxidante haciéndolos más atractivos para su uso en diferentes áreas de la industria tales como la alimenticia, cosmética, farmacéutica entre otras. Sin embargo, existe un inconveniente con el uso de estos compuestos, una vez que son extraídos de la planta son muy propensos a degradarse debido a factores ambientales como pH, temperatura, luz, oxígeno, etc. por lo que es necesario diseñar un sistema de protección de los compuestos. Con base en lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar la protección y liberación del extracto de las brácteas de bugambilia encapsulado en perlas de alginato de sodio y almidón de maíz.

Se obtuvieron dos diferentes extractos, uno acuoso y otro etanol-acuoso. Se comparó la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos por ambos solventes, así como el contenido de betalaínas y la capacidad antioxidante de los extractos. Encontrándose que la extracción llevada a cabo con etanol-agua arrojó un mayor contenido de fenoles totales 6.7843EAGmg/g de muestra que la extracción acuosa 5.7903EAGmg/g de muestra.

Posteriormente, se encapsularon los extractos en perlas de alginato de sodio y almidón de maíz por el método de extrusión con la finalidad de protegerlos de su degradación obteniendo un porcentaje de eficiencia de encapsulación promedio de 79.35% (etanol-agua) y 76.92% (acuoso).

Los resultados obtenidos en este proyecto permitieron concluir que la técnica de encapsulación es eficiente para la protección de los compuestos activos extraídos de

las brácteas de bugambilia, siendo estas una buena fuente natural de la cual se pueden obtener compuestos activos como las betalaínas.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética está tomando en cuenta las demandas del consumidor, las cuales exigen el uso de ingredientes naturales, brindando productos de alta calidad. Así existe una demanda de productos funcionales es decir, que son elaborados no sólo por sus características nutricionales o cosméticas sino también para cumplir una función específica como puede ser el mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades(Silveira y col. 2003). Aunado a esto, se están buscando alimentos que estén compuestos por ingredientes naturales para sustituir a los ingredientes sintéticos. Un ejemplo de ello son los productos elaborados con colorantes naturales en lugar de colorantes sintéticos. Este tipo de productos son un campo emergente en el área alimentaria y cosmética con una posibilidad muy amplia de investigación. Actualmente existe una pequeña cantidad de colorantes obtenidos de fuentes naturales utilizados en la industria, por ello es necesario buscar fuentes alternativas que ayuden a cubrir las demandas del mercado.

Por ello se buscan fuentes alternativas para la obtención de colorantes naturales, existen registros en los cuales se da a conocer que se utilizan las plantas o frutos de las mismas para la obtención de colorantes como lo es la flor de Jamaica, los granos del café, la chilca, el achiote, de la semilla del aguacate, del betabel y de la bugambilia; de esta última se ha reportado que además de color tiene características antiinflamatorias, antimicrobiana, antioxidante, etc.

Una de las principales problemáticas a la cual se enfrentan las diferentes industrias es la de preservar los diferentes compuestos debido a que las propiedades funcionales de los compuestos activos son de corto plazo debido a la rápida oxidación que sufren bajo condiciones ambientales (luz, temperatura, sales, etc.) y/o a la degradación durante el procesamiento de alimentos, ocurriendo una pérdida total o parcial de los mismos, ocasionando la disminución de sus propiedades benéficas para la salud lo que limita su aplicación en productos para consumo humano (Hernández, 2009); es por ello que se han realizado diversos estudios en los cuales se dan a conocer las técnicas de encapsulación, en este caso enfocándonos en las microencapsulaciones, la producción de perlas.

Una de las metas de las industrias es el desarrollo y uso de dicha técnica de preservación implementándolas en los productos que ofrecen a los consumidores, asegurándoles una buena calidad del mismo.

Tomando este enfoque la estrategia es extraer de las plantas los compuestos activos que estas contienen e incorporarlos en perlas de alginato y almidón de maíz con la finalidad de protegerlos de los factores ambientales que los degradan y así poder dar la pauta para el desarrollo de productos funcionales, los cuales además de aportar características adicionales al alimento estarán elaboradas con ingredientes naturales los cuales tendrán una vida de anaquel prolongada.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

En la actualidad la sociedad demanda a la industria el uso de ingredientes alimenticios más naturales, dejando de lado a los procesados, por ello el uso de los pigmentos naturales están resurgiendo nuevamente abriendo un campo de investigación en la extracción de los mismos haciendo uso de lo que se encuentre a nuestro alrededor, en este caso de las plantas, las cuales han formado parte de un recurso fundamental para los seres humanos por miles de años, ya que han formado parte de su principal fuente de alimento.

El color es un elemento importante para los humanos ya que ayuda a identificar un producto y juzgar su calidad; por estas razones no es sorprendente que por cientos de años el color haya jugado un papel predominante en tres áreas de interés comercial: alimentos, medicamentos y cosméticos (Marmi3n, 1984).

Los colores de los alimentos se deben a diferentes compuestos, principalmente orgánicos, algunos de los cuales se producen durante su manejo y procesamiento, como es el caso del color que se desarrolla debido a las reacciones de Maillard, a la caramelización o a los pigmentos sintetizados o modificados por procesos de fermentación. Sin embargo, la mayoría de los alimentos deben su color a las sustancias pigmentantes que contienen o que se añaden (Francis, 1999).

Hasta la mitad del siglo XIX, los colorantes usados en alimentos, medicamentos y cosméticos fueron fácilmente obtenibles de fuentes naturales, tales como animales, vegetales y minerales (Marmi3n, 1984).

En 1987 se estimó que la producción mundial de colorantes era alrededor de 700,000 toneladas; de esta producción, un poco más del 50% fue destinada a la industria textil y un 2.2 % al sector de alimentos, medicamentos y cosméticos (Pla, 1961).

Las nuevas tendencias tecnológicas se han enfocado en la producción de alimentos reestructurados y funcionales a partir de compuestos activos como antioxidantes, vitaminas, aminoácidos, minerales e incluso de pequeñas moléculas como células, enzimas y microorganismos probióticos beneficiosos para la salud, y por tanto, de su conservación en los alimentos durante el procesamiento y almacenaje (Parra-Huertas, 2010).

1.1 COLORANTES

EL ojo humano sólo puede percibir el color cuando su energía corresponde a una longitud de onda entre 380 y 780 nanómetros (nm). Por lo tanto el color es la parte de la energía radiante que el hombre puede percibir mediante sensaciones visuales que se generan por estimulación de la retina del ojo, es la percepción por el ojo humano de los productos coloreados.

Un colorante es un compuesto químico que imparte color, puede ser definido como la sustancia obtenida de los vegetales, animales o minerales, o por síntesis, empleada para impartir o acentuar el color de los alimentos (Badui, 1993)

Los pigmentos son compuestos químicos que absorben luz en el intervalo de longitud de onda de la región visible. La producción del color se debe a la estructura específica del compuesto (cromóforo), esta estructura capta la energía y la excitación que es producida por un electrón de una órbita exterior a una órbita mayor, la energía no absorbida es reflejada y/o refractada para ser captada por el ojo, y los impulsos neuronales generados serán transmitidos al cerebro, donde puede ser interpretados como color (Delgado-Vargas y col.,2000)

1.1.1 Clasificación de los colorantes

Los colorantes se pueden clasificar en base a varios criterios; según su origen:

- Orgánicos o naturales: procedentes de plantas y animales, tales como la clorofila, carotenos, betalaínas, flavonoides, antocianinas, entre otros.
- Minerales: tales como lacas, sulfato de cobre y cromato de potasio entre otros; no se usan en alimentos debido a que contienen iones metálicos.
- Artificiales: obtenidos por síntesis química (Cenzano, 1994)

Tomando en cuenta su solubilidad pueden ser hidrosolubles o liposolubles.

En relación con la FDA existen tres categorías en las cuales clasifican a los colorantes (Marmián, 1991):

- 1) Colorantes FD&C: certificados para uso en alimentos, drogas y cosméticos en general.

- 2) Colorantes D&C: tintes y pigmentos considerados seguros en drogas y cosméticos ingeridos o usados en contacto directo con membranas mucosas.
- 3) Colorantes Ext. D&C: colorantes que, por su toxicidad oral, no se usan en productos para ingestión, pero que son considerados seguros para su uso externo.

1.1.2 Colorantes naturales

También llamados pigmentos naturales; se les denomina así a todos aquellos compuestos que poseen coloraciones y que provienen de fuentes naturales como plantas superiores, algas, hongos y líquenes, así como de algunos organismos invertebrados.

Son muchas las plantas superiores que producen colorantes; a pesar de su universalidad no están lo suficientemente concentrados para permitir una rápida y económica extracción, y en consecuencia son relativamente escasas las que tienen gran importancia comercial como fuente de colorantes.

El número de pigmentos diferentes probablemente excede los 1000; aunque muchos de ellos son de naturaleza común a las plantas superiores, como por ejemplo betalaínas, carotenos y quinonas, muchos de ellos no han sido encontrados en algún otro organismo biológico (Ugaz, 1997).

Los pigmentos naturales difieren ampliamente en su estructura química y en su origen. Aunque hay colorantes poco comunes, como el ácido carmínico, los más distribuidos en los alimentos pueden agruparse en las siguientes categorías:

- 1) Carotenoides
- 2) Clorofilas
- 3) Pigmentos fenólicos: flavonoides, antocianinas y taninos
- 4) Betalaínas**
- 5) Hemopigmentos
- 6) Otros pigmentos naturales

Los cuatro primeros son de fuentes vegetales, aun cuando llegan a estar presentes en alimentos de origen animal, a lo que ingresan a través de la dieta. La mayoría de los pigmentos vegetales se localiza en el protoplasma de las células, dentro de los

organelos especializados llamados plástidos, que se observan al microscopio formando pequeñas placas o agujas de estructura cristalina; en algunos casos, cuando son solubles en agua, se encuentran disueltos en las vacuolas de las células. El quinto grupo sólo se encuentra en productos de origen animal. En el sexto grupo se incluyen pigmentos que imparten color tanto a los tejidos vegetales como animales. Son poco abundantes en la naturaleza, pero no por eso menos importantes, debido a las características específicas de cada uno.

La estructura química determina las propiedades de los pigmentos que van más allá del color, aunque ésta sea su característica evidente. La estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento; su reactividad con otros compuestos químicos para determinar tanto el color como la durabilidad o cambio de éste; su posible toxicidad, por lo que es necesario en algunos casos certificarlos para que cumplan las normas oficiales, son algunas de las características de los pigmentos (Badui, 2006).

1.1.2.1 CAROTENOIDES

Son un grupo numeroso de pigmentos muy difundidos en los reinos vegetal y animal, producen colores que van desde el amarillo hasta el rojo intenso. Se han identificado en la naturaleza más de 600 de estos compuestos, y se estima que anualmente se sintetizan 100,000 toneladas de carotenoides de fuentes naturales. Son esenciales para que las plantas realicen la fotosíntesis, ya que actúan como capatadores de la luz solar y, en forma muy especial, como escudo contra la fotooxidación destructiva. Los carotenos son muy solubles en éter de petróleo y poco en etanol. De todos los carotenoides identificados en la naturaleza, aproximadamente 115 se encuentran en los cítricos (Badui, 2006).

1.1.2.2 CLOROFILAS

Se encuentran en todas las plantas que realizan la fotosíntesis; la clorofila es el principal agente capaz de absorber la energía lumínica y transformarla en energía química para la síntesis de los compuestos orgánicos que necesita la planta. Las hojas de la mayoría de las plantas deben su color verde a la clorofila, aunque ésta va desapareciendo al acercarse a la senescencia para dejar paso a otros pigmentos como los carotenoides. Este mismo proceso se presenta en los frutos inmaduros, que de color verde se tornan amarillos, rojos, etcétera, por la pérdida de la clorofila y la síntesis de otras sustancias coloridas en la etapa de maduración. Las clorofilas se

emplean poco como aditivos alimentarios, con excepción de algunas pastillas o goma de mascar (Schwartz, 1990).

1.1.2.3 PIGMENTOS FENÓLICOS

Son sustancias con uno o más anillos aromáticos y, al menos, un sustituyente hidroxilo. Existen dos grandes grupos: los ácidos fenólicos (benzoico y cinámicos) y los flavonoides (flavonoides, antocianinas y taninos). Los ácidos fenólicos tienen un solo anillo, mientras que los flavonoides tienen dos anillos fenólicos unidos por un anillo heterocíclico (Badui, 2006).

1.1.2.3.1 Flavonoides

Los flavonoides (del latín *flavus*, amarillo) y las antocianinas son compuestos fenólicos solubles en agua, metanol y etanol; algunos flavonoides son precursores en la biosíntesis de antocianinas (Jackman, 1996).

Los flavonoides pueden tener estructuras simples o muy complejas, debidas a la polimerización (Badui, 2006).

1.1.2.3.2 Antocianinas

Las antocianinas (del griego *anthos*, flor y *kyanos*, azul) se consideran una subclase de los flavonoides; también se conocen como flavonoides azules. Son compuestos vegetales no nitrogenados pertenecientes a la familia de los flavonoides, de amplia distribución en la naturaleza. A pesar de contener pocos grupos cromóforos, se han identificado 300 de estos compuestos, que son responsables de una gama muy amplia de colores, desde el incoloro hasta el púrpura. Producen colores rojo, anaranjado, azul y púrpura de las uvas, manzanas, rosas, fresas y otros productos de origen vegetal, principalmente frutas y flores.

1.1.2.3.3 Taninos

Son una clase de compuestos fenólicos incoloros o amarillo-café, y con sabor astringente y amargo, solubles en agua, alcohol y acetona. De acuerdo con su estructura y reactividad con agentes hidrolíticos, particularmente ácidos, se han dividido en dos grupos: taninos hidrolizables o pirogállicos y taninos no hidrolizables o

condensados. Los taninos se consideran también antioxidantes, con capacidad de atrapar los radicales libres. Se oxidan con facilidad en presencia de oxígeno, e intervienen en reacciones de oscurecimiento en algunas mermeladas, a través de reacciones de tipo fenólico. Además de proporcionar color a algunas mermeladas y jaleas, la presencia de taninos en productos alimentarios como salvia y menta, contribuyen al sabor de éstos. De especial importancia es la presencia de taninos en vinos. Además de que se emplean como clarificantes al precipitar proteínas presentes en los mostos, la presencia de determinada cantidad de taninos define su sabor (Badui, 2006).

1.1.2.4 HEMOPIGMENTOS

El color rojo de la carne se debe principalmente a los hemopigmentos: la hemoglobina y la mioglobina (Badui, 2006).

1.1.2.5 BETALAÍNAS

El término “Betalaínas” fue establecido por Mabry y Dreiding en 1968, basado en consideraciones estructurales y biogenéticas (Sánchez, 2006)

Las betalaínas son poco conocidas, probablemente por su relativa escasez natural. Sin embargo, constituyen indudablemente una opción interesante dado su gama de colores, desde el anaranjado amarillento al rojo violáceo.

Una de las propiedades de los colorantes extraídos de algunas plantas es que contienen dichos compuestos activos, como lo es el caso del betabel y la bugambilia, los cuales contienen poder antioxidantes.

1.2 GENERALIDADES DE LA BUGAMBILIA

La *Bougainvillea glabra* Choisy, es originaria de Brasil, conocida como veranera, trinitaria, flor de papel y Santa Rita, es un arbusto trepador, vigoroso de hojas elípticas y alternas, con la base estrechada y el ápice agudo, glabras o con pubescencias esparcidas, el haz es brillante y el envés pálido con pubescencia en la nervadura, puede crecer hasta 10 metros de altura y florece todo el año si le dan los rayos solares, el rasgo más característico son las llamativas brácteas, habitualmente de diferentes colores, que se confunden con los pétalos, mientras que las flores, son

pequeñas y amarillas, de estructura tubular, agrupadas de tres en tres dentro de las brácteas (Espinoza y col., 2008).



Imagen 1 Distribución geográfica de los lugares donde se cultiva la Bugamvillea. Fuente: Escamilla y col., 2015.

Es una planta ornamental de alta demanda, muy difundida y popularizada en la decoración de jardines, de mayores posibilidades para ser usada en todo tipo de diseños de paisajismos, otro uso es como arreglo en seco, ya que es posible deshidratar y mantener el brillante color de sus brácteas, lo que hace muy atractivo su cultivo (Acosta, 2000).

1.2.1 Origen

Es originaria de Brasil siendo descubierta en 1790 por el navegante francés Louis Antoine de Bougainville, quien la llevo a Europa y la popularizó rápidamente. El grupo tiene 14 especies entre ellas *Bougainvillea glabra* (Clarazo, 1998), esta especie forma parte de un grupo de enredaderas o plantas leñosas de flores cultivadas en muchas regiones tropicales y subtropicales.

1.2.2 Taxonomía

Reino: Vegetal.

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Subclase: Caryophyllidae.

Orden: Caryophyllales.

Familia: Nictaginácea

Nombre Científico: Bougainvillea glabra choisy.

1.2.3 Características botánicas

La veranera, es un arbusto espinoso frecuentemente trepador con hojas alternas, flores pequeñas, poco vistosas, hermafroditas, acompañadas de tres brácteas grandes de color lila, rosa, amarillo o blanco, frecuentemente en inflorescencias cimosas (Clarazo, 1998).

Otros autores coinciden en que constituyen enredaderas leñosas, sarmentosas, con flores amarillas reunidas por brácteas grandes foliáceas, de color, que se considera como flor en la jardinería (Mac. Millan, 2000). Dentro de este género que comprenden 14 especies, Bougainvillea glabra choisy es la variedad de mayor interés. Clarazo (1998) describe a la Bugambilia como uniforme, con ramas tupidas y abundantes flores en racimos axilares a lo largo de las ramas. Una de las principales características de la Bougainvillea es que posee un contenido de betalainas, en especial betacianinas (Sussane y col., 1999).

Existe evidencia de que las betalainas poseen interesantes actividades biológicas, entre ellas su actividad antioxidante.

Son un grupo de alrededor de 70 pigmentos hidrosolubles, se encuentran compartamentalizadas dentro de las células en las vacuolas con estructura de glucósidos. Se dividen en betacianinas (violáceas) y betaxantinas (amarillas). Se encuentran en varios géneros de cactáceas. (Badui, 1993).

Son parecidas a las antocianinas y flavonoides en apariencia visual. Anteriormente se les llamaba antocianinas nitrogenadas. Estos pigmentos se encuentran sólo en 10 familias: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Basellanaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodaceae*, *Didiereaceae*, *Holophytaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae* y *Portulacaceae* (Franco, 2004). La presencia de betalainas en plantas es mutuamente excluyente de la de antocianinas.

Químicamente, la definición de betalaínas abarca a todos los compuestos con estructuras basadas en la fórmula general (Figura No. 1), por lo tanto son derivados de la condensación de una amina primaria o secundaria con el ácido betalámico (Piatelli, 1981, Strack y col., 1993).

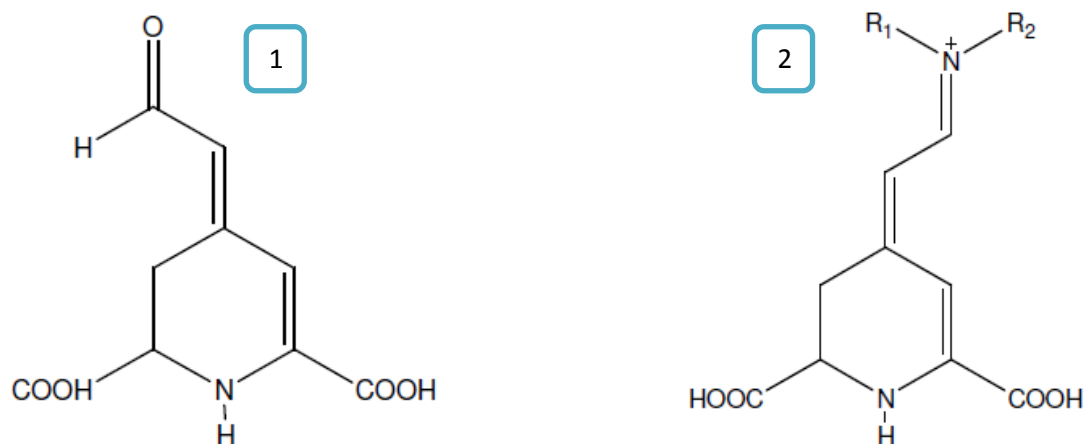


Figura No. 1 Estructura química de la betalaína. (1) Ácido betalámico presente en todas las moléculas de las betalaínas. (2) La estructura representa una betacianina o una betaxantina, dependiendo de los sustituyentes R1 y R2 (Böhm y Rink, 1988).

Las betalaínas se dividen en dos grandes grupos, los cuales son las betacianinas y las betaxantinas.

1.2.3.1 BETACIANINAS

Son pigmentos de color púrpura, se consideran glucósidos, su principal componente es la betanina (hasta un 95% del total de las betacianinas del betabel). Absorben a una longitud de onda máxima de entre los 534 y 555 nm. Son más estables que las betaxantinas. Generalmente representan del 75 al 95% de las betalaínas.

1.2.3.2 BETAXANTINAS

Son pigmentos amarillos relacionados estructuralmente con las betacianinas, absorben a una longitud de onda máxima de 480 nm.

1.2.3.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Para la extracción de este tipo de pigmentos, la fruta o planta cruda, generalmente, se macera o se muele en agua fría o a temperatura ambiente. En la mayoría de los casos, es necesario el uso de soluciones acuometanólicas o acuoetanólicas, desde el 20 hasta el 50 % v/v, para alcanzar la extracción completa (Piatelli, 1981).

La degradación de la betanina puede ocurrir rápidamente y su destrucción puede evitarse trabajando a bajas temperaturas y protegiéndola de la luz (Strack y col., 1993).

1.2.3.4 ESTABILIDAD

Un factor importante que se debe tomar en consideración al momento de utilizar estos pigmentos como colorantes y/o antioxidantes en alimentos es su estabilidad. La estabilidad de las betalaínas ha sido estudiada en pigmentos obtenidos de betarraga (von Elbe y col., 1974; Sapers y col., 1979; Delgado Vargas y col., 2000; Herbachy col., 2006; Azeredo, 2008), en betalaínas de tuna púrpura (Butera y col., 2002; Castellar y col., 2003, Stintzing y col., 2005; Moßhammer y col., 2005; Herbachy col., 2006; Azeredo, 2008).

La estabilidad de las betalaínas es un factor que restringe su uso como colorante en alimentos (Von Elbe, 1975, Jackman y col., 1996).

Los principales factores que influyen en la estabilidad de las betalaínas son: temperatura, pH, actividad de agua, luz, presencia o ausencia de oxígeno y de metales, acción enzimática, siendo la temperatura el factor más influyente en la degradación de las betalaínas (Herbach y col., 2006). Pierden coloración bajo influencia de pH, luz, altas temperaturas, oxígeno y actividad de agua (Badui, 1993)

- Temperatura: es un factor crítico en la estabilidad de la betalaína (Drdák y Vallová, 1990). La degradación de las betalaínas depende de la temperatura y sigue una cinética de reacción de primer orden, dependiente del pH (Huang y von Elbe., 1985; Castellar y col., 2003). Al calentar soluciones de betanina se produce una reducción gradual del color rojo característico de este pigmento con la aparición de pardeamiento (von Elbe y col., 1974).

- pH: las betalaínas son estables en el rango de pH entre 3,5-7, rango en el que se encuentran la mayoría de los alimentos (Delgado Vargas y col., 2000; Castellar y col., 2003; Stintzing y col., 2005), fuera de este rango el color decrece. El pH óptimo para la estabilidad de las betalaínas de betarraga, en presencia de oxígeno se encuentra a pH 5,5-5,8, y en condiciones anaeróbicas a pH 4,0-5,0 (Huang y von Elbe, 1985). Se ha reportado que las soluciones de betabel muestran una máxima estabilidad a pH=5.5, correspondiente al pH normal del betabel fresco. La estabilidad optima del pigmento en polvo reconstituido tiene lugar a pH 5.7 (Sánchez, 2006).
- Actividad de agua (aw): La actividad de agua es uno de los factores que más influye en la estabilidad de las betalaínas y el color de los alimentos que las contienen (Sánchez, 2006). Las betalaínas presentan mayor estabilidad en alimentos o sistemas modelo con un bajo contenido de humedad y aw, debido a que el agua está menos disponible para que ocurran reacciones químicas. Valores de aw por debajo de 0,63 mejoran la estabilidad de la betanina de betarraga (Delgado Vargas y col., 2000). Además, métodos para reducir la aw, como la concentración y el secado por atomización han demostrado proporcionar estabilidad a las betalaínas, en pigmentos provenientes de tuna púrpura (*Opuntia stricta*) (Castellar y col., 2006) y de amaranto (Caiy col., 2000).
- Luz: Existe una relación inversa entre la estabilidad de las betalaínas de betarraga y la exposición a la luz. La degradación de betalaínas sigue una cinética de primer orden que es oxígeno dependiente, ya que los efectos de la exposición a la luz son insignificantes bajo condiciones anaerobias (Attoe y col., 1981). Se ha reportado que el índice de degradación de la betanina aumenta un 15.6% después de su exposición a la luz del sol a 15°C (Von Elbe col. 1974); además Aurstad y Dahle (1973) reportaron el efecto de los rayos UV y la irradiación gamma en la estabilidad de la betanina.
- Oxígeno: Según lo observado por Attoe y von Elbe (1985), en betalaínas de betarraga, estas reaccionan con el oxígeno molecular, causando el oscurecimiento del producto y la pérdida del pigmento. La presencia de oxígeno causa el oscurecimiento del producto y la pérdida del pigmento (Sánchez, 2006). La degradación de la betanina es una reacción parcialmente reversible y se ha recomendado que para aumentar la estabilidad del pigmento

es necesario colocar las muestras en atmósferas con bajas concentraciones de oxígeno (Attoe y col., 1985).

- Efecto de antioxidantes: la inestabilidad de betalaínas al oxígeno es una de las limitantes de su uso como colorante alimenticio. La adición de antioxidantes debe por tanto resultar en mejoramiento de la estabilidad. La betanina no se degrada por mecanismos de oxidación por radicales libres (Lugo, 1998).

De acuerdo con estas características, las betalaínas se pueden utilizar en alimentos con una corta vida de anaquel, procesados por un tratamiento de calor mínimo, envasándolos y colocándolos en un lugar seco, bajo niveles reducidos de luz, oxígeno y humedad (Rayner, 1993, Von Elbe, 1977).

Las betalaínas pueden ser usadas como ingredientes en la industria de alimentos, específicamente en la industria láctea y de bebidas refrescantes (Moßhammer y col., 2005 y 2006).

Debido a que existen restricciones de tipo legal en el uso de colorantes rojos sintéticos, se ha sugerido emplear las betalaínas en diversos alimentos. Estudios de toxicidad y seguridad (Reynoso y col., 1997) indican que las betalaínas pueden ser alternativas viables para colorantes sintéticos. Sin embargo, por las limitaciones de su estabilidad, su uso se restringe a ciertos productos en los que el pigmento se conserva más fácilmente (Mandujano, 2006)

Debido a su alto poder antioxidante y su capacidad para absorber radicales libres, se ha reportado recientemente, que las betalaínas presentes en el betabel y en frutos de cactáceas, pueden beneficiar la salud del ser humano. Empleándose principalmente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, cáncer, asma, artritis, estrés oxidativo, inflamación intestinal, y otras asociadas con el envejecimiento (Sánchez, 2006).

1.3 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son moléculas que a bajas concentraciones, respecto a las de un sustrato oxidable, retardan o previenen su oxidación. El antioxidante al reaccionar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico; un radical libre es cualquier especie que contiene uno o más electrones

desapareados y que es capaz de mantener una existencia independiente. El radical libre, en estas condiciones, busca a toda costa otro electrón para poder parearse. Es esta intensa búsqueda la que hace a estos radicales libres extremadamente reactivos (Arrate Lacalle, 2007).

En el ámbito de los alimentos se puede definir a los antioxidantes como "aquellas sustancias que, en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando grandemente la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas" (Chipault, 1962).

Las principales características de un compuesto o sistema antioxidante son de acuerdo a Namiki,(1990):

- La prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado
- La regeneración del antioxidante radicalario ayudando así a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano

1.3.1 Clasificación de los antioxidantes

Se puede clasificar a los antioxidantes en cuatro grandes grupos (Arrate Lacalle, 2007):

- Enzimas antioxidantes (superóxidodismutasa, catalasa)
- Antioxidantes de alto peso molecular (Albúmina, ferritina...)
- Antioxidantes de bajo peso molecular (Carotenoides, ascórbico...)
- Algunas hormonas (Angiotensina...)

De acuerdo a Gordon (1990) la clasificación de los antioxidantes son dos tipos principales, el "primario" (ruptura de la reacción en cadena, secuestradores de radicales libres) y el "secundario" o "preventivo". Los mecanismos antioxidantes "secundarios" pueden incluir la desactivación de metales, inhibición de los hidroperóxidos lipídicos interrumpiendo la producción de volátiles indeseables, la regeneración de antioxidantes "primarios", eliminar el oxígeno singulete, etc.

1.3.2 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia para disminuir la presencia de las especies reactivas de oxígeno antes de su ataque a diversos sustratos (lípidos, proteínas, ADN). Esto es de suma importancia debido a que las especies reactivas de oxígeno producen diversas acciones sobre el metabolismo que pueden ser el origen del daño celular porque actúan:

1. Sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).
2. Sobre los glúcidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación en prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.
3. Sobre las proteínas produciendo inactividad y desnaturalización.
4. Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el organismo también utiliza los radicales libres para la destrucción de bacterias y patógenos invasores. Por lo tanto, el problema real se presenta cuando las especies reactivas de oxígeno (EROs) sobrepasan las defensas endógenas ocasionando los daños antes mencionados (González y col., 2001).

Una especie reactiva de oxígeno es un átomo o molécula con electrones desapareados, y por lo tanto, es una especie inestable. Entre estos podemos mencionar a los radicales, (ión superóxido, radical hidroxilo, alcoxilo, peroxilo y óxido de nitrógeno) y a los no radicales (peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete y peroxinitrito) (González y col., 2001)

1.3.3 Cuantificación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de un compuesto puede evaluarse por medio de experimentos sencillos que examinan directamente dicha habilidad y que a la vez evalúan el posible efecto prooxidante sobre diferentes moléculas.

Estos métodos deben ser rápidos, reproducibles y requerir cantidades pequeñas de los compuestos químicos por analizar, además de no estar influenciados por las propiedades físicas de dichos compuestos (Marco, 1968).

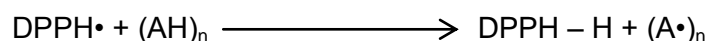
Los siguientes son ejemplos de los modelos frecuentemente usados para la evaluación de la actividad antioxidante total.

- a) Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•)
- b) Ensayo FRAP, (Del inglés ferric-reducing antioxidant power)
- c) Método ORAC, (Del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity)
- d) Método del 6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina (ABTS)
- e) Método del N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)

Los métodos utilizados en el presente trabajo fueron los, DPPH y ABTS, los cuales se describen a continuación

❖ 1.3.3.1 Método DPPH•

Brand-Williams y col., (1995) evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) en una solución metanólica. La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbencia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación:



Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A•) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH• y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas.

❖ 1.3.3.2 Método ABTS

La generación del radical ABTS^{•+} constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El método original de ABTS^{•+} estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Éste fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS^{•+}, implica la producción directa del cromóforo ABTS^{•+} verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈). Éste presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 m, 734 m y 815 m. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de captación del radical catión ABTS^{•+} está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones (Ojha, 2012).

1.3.4 Cuantificación de Fenoles Totales

El método de Folin-Ciocalteu es uno de los métodos más antiguos para determinar el contenido de fenoles totales. Esta prueba consiste en mezclar tungstato y molibdato en un medio altamente básico (Na₂CO₃ al 5-10 %, acuoso). Los polifenoles son fácilmente oxidables en medio básico quienes reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno MoO₃. Este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopía de uv/vis debido a que absorbe a una longitud de 750 nm. El contenido de fenoles totales generalmente, se expresa en equivalentes de ácido gálico. La prueba de FC es similar a la de ABTS (2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácidosulfónico) ya que ambos métodos ayudan a la determinación de polifenoles y monofenoles. La ventaja del método de FC sobre ABTS es que FC está relacionado con la aparición de una absorbancia que es consecuencia de la aparición de color debido a la reacción, no a una disminución de la absorbancia como ocurre con la prueba de ABTS. Otra de las ventajas es que esta prueba no requiere de una estandarización de las condiciones del análisis. Aunque, si bien el método de Folin-

Ciocalteu no está relacionado con la medición de actividad antioxidante, parece ser uno de los mejores métodos para estimar esta actividad antioxidante, con la excepción de que la muestra no contenga una cantidad significativa de proteína. (Roginsky y col., 2005).

1.3.5 Cuantificación de betalainas

El análisis de las betalainas, como el de otros compuestos coloridos, se ha basado en la espectroscopia UV-Visible. Las betacianinas violetas-rojas absorben alrededor de una longitud de onda máxima de 540 nm, mientras que las betaxantinas amarillas lo hacen aproximadamente a 480 nm (Sánchez, 2006).

1.3.6 Medición del color

El análisis de los pigmentos y su propiedad física directa, el color, puede llevarse a cabo por métodos físicos o químicos.

El método de reflectancia presenta la ventaja de que se correlaciona con la percepción del color por el ojo humano; se lleva a cabo midiendo la superficie del alimento. El método de espectrometría de reflexión se basa en tres coordenadas: el tono (rojo, azul, verde y amarillo, y combinaciones de éstos), la cromaticidad o saturación (qué tan intenso es el color) y la luminosidad (componente blanco o negro). El CIE (Comisión Internacional de la Iluminación) desarrolló un sistema basado en una fuente de iluminación estándar y un observador estándar, sobre el que se construyó un sistema tricromático basado en la percepción del ojo humano: rojo, verde y azul, y tres parámetros: L^* = luminosidad, a^* = rojo a verde; b^* = amarillo a azul. Con el espacio de color CIELAB es posible describir cualquier color. Por otra parte, existen dos magnitudes psicofísicas, el tono (h^*) y el croma (C^*), calculadas a través de fórmulas matemáticas a partir de a^* y b^* (Badui, 2006).

Un factor importante a tomar en consideración es la forma en la cual se pueden proteger los compuestos activos que se han extraído de las plantas, esto es que cuando se encuentran en la planta están protegidos, pero una vez que son extraídos son muy sensibles a sufrir una degradación, por ello que una de las formas en las cuales se protegen es encapsulándolos.

1.4 ENCAPSULACIÓN

Recientemente ha surgido un gran interés en pigmentos naturales debido principalmente, a la demanda por productos alimenticios saludables y oportunidades para la innovación en el sector (Ge y col., 2009). El uso de estos pigmentos requiere de conocimientos químicos de sus moléculas y de su estabilidad, además para adaptarse a las condiciones de utilización durante el procesamiento, empaqueo y distribución. La industria requiere de tecnologías que protejan los pigmentos naturales del ambiente, debido a su inestabilidad en la presencia de luz, aire, humedad y altas temperaturas. Actualmente, una alternativa es la tecnología de la microencapsulación (Parize y col., 2008).

El concepto de encapsulación se ha fundamentado en la incorporación de una matriz polimérica, la cual forma un ambiente capaz de controlar su interacción con el exterior. La técnica de microencapsulación ha sido descrita como un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo integrado a las cápsulas con variadas aplicaciones (Borgogna y col., 2010).

La microencapsulación es una técnica mediante la cual compuestos activos, sólidos, líquidos o gaseosos (antioxidantes, sabores, bactericidas, etc.) se introducen en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de proteger los activos del medioambiente, de su interacción con otros componentes del alimento o bien para controlar su liberación (Yáñez y col., 2002).

Por todo lo anterior definimos a la microencapsulación como la técnica de obtención de una barrera que retarda las reacciones químicas con el medio que lo rodea promoviendo un aumento en la vida útil del producto, la liberación gradual del compuesto encapsulado e incluso facilitando su manipulación al convertir un material líquido o gaseoso a una forma sólida llamada microcápsula (Fang y col., 2010).

Una microcápsula consiste en una membrana esférica, semipermeable, delgada y fuerte que rodea un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que varía de pocos micrones a 1000 μm . El núcleo que compone la microcápsula es también denominado fase interna o principio activo, así como a la membrana se puede nombrar capa externa o matriz. En este sentido, las micropartículas, microcápsulas o microesferas son definidas como el producto del proceso de microencapsulación

dependiendo de cuál sea su morfología y estructura interna (Anal y col., 2007; Saezy col., 2007).

Las principales ventajas de la microencapsulación son (Astray y col., 2009):

- Proteger el material activo de la degradación producida por el medio ambiente (calor, aire, luz, humedad), etc.
- El compuesto encapsulado se libera gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado en un punto determinado.
- Las características físicas del material original pueden ser modificadas y hacer más fácil su manejo (un material líquido convertido a polvo), la higroscopia puede ser reducida, la densidad se modifica y el material contenido puede ser distribuido más uniformemente en una muestra.
- El sabor y olor del material puede ser enmascarado.
- Puede ser empleado para separar componentes, con el fin de que estos no reaccionen.
- Estabilización de principios activos inestables.
- Transformación de líquidos en sólidos.

1.4.1 Métodos de encapsulación

Algunas de las técnicas usadas para microencapsulación son: secado por atomización, liofilización, extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado, atrapamiento por liposomas, coacervación (Gibbs y col., 1999; Santinho y col., 2002), inclusión, extrusión centrífuga, suspensión rotacional, separación y polimerización interfacial (Wang y col., 2004) entre otros.

1.4.1.1 ENCAPSULACIÓN POR EXTRUSIÓN

Esta técnica consiste en la formación de gotas de la solución de alginato que contiene el componente a encapsular al hacer pasar dicha solución por un dispositivo extrusor

de tamaño y velocidad de goteo controlado. Estas gotas caen sobre un baño que contiene la fuente de iones divalente, quien induce la gelificación mediante el mecanismo de gelificación externa (Chan y col., 2009).

La principal limitación presentada por esta técnica ha sido el gran tamaño de las perlas, lo cual depende del diámetro de la boquilla del dispositivo extrusor. Otra desventaja es que la producción a gran escala es difícil debido a que la formación de las perlas se logra una a una lo cual trae como consecuencia largos tiempos de gelificación (Mofidiy col., 2000).

1.4.2 Materiales encapsulantes

Se ha estudiado una gran variedad de materiales encapsulantes para aplicaciones en alimentos, sin embargo, es importante considerar características como la solubilidad en agua, permeabilidad, facilidad de aplicación, baja viscosidad en soluciones concentradas y naturaleza hidrofóbicas o hidrofílicas de los mismos. Todos estos factores influirán en las características del producto final (Gibbs y col., 1999).

Como materiales encapsulantes se han utilizado: carbohidratos (almidones de diferentes fuentes: papa, arroz, maíz, entre otros) (Loksuwan, 2007), maltodextrinas de diferente equivalente de dextrosa (ED) (Wagner y Wathersen, 1995; Desobry y col., 1997), alginato de sodio, carragenina y quitosano (Souza y col., 2005). En general, estos agentes encapsulantes han mostrado una función protectora sobre el agente activo contra el daño oxidativo, siendo la estabilidad del activo dependiente del tipo de agente encapsulante (Robert y col., 2003).

Los materiales encapsulantes antes mencionados pueden emplearse en forma individual o combinados con otros materiales, a fin de generar sinergias favorables (López, 2012).

Entre las sales de alginato más empleadas se han encontrado la sal de sodio debido a su alta solubilidad en agua fría y característica transición sol-gel de forma instantánea e irreversible ante el ión calcio (Funamiy col., 2009).

Los agentes encapsulantes que se utilizaron en el presente estudio fueron el alginato de sodio y el almidón de maíz y una solución de cloruro de calcio; esto debido a que tanto el alginato como el almidón son polímeros de origen natural cuya aplicación está

ampliamente distribuida en la industria alimentaria. Ambos materiales han sido empleados como matriz encapsulante de diferentes compuestos, obteniendo resultados satisfactorios (George y col., 2006).

1.4.2.1 ALGINATO

El alginato permite obtener un gel estable y biocompatible. Químicamente, es un polisacárido lineal compuesto por bloques alternados de residuos de ácido α -L gulurónico (G) y β -D manurónico (M) unidos mediante enlaces 1 \rightarrow 4 (Ver Figura No. 2). La gelificación y el entrecruzamiento del polímero se logra por el intercambio de los iones sodio de los ácidos gulurónicos con los cationes divalentes y el apilamiento de estos grupos gulurónicos para formar una red tridimensional, conocida como “caja de huevos” (Ver Figura No. 3). Los factores más importantes que influyen sobre la gelificación son la concentración, la composición química, la secuencia de segmentos manurónicos y gulurónicos, la relación entre iones gelificantes y no gelificantes y la presencia de agentes complejantes como fosfatos o citratos. También hay que tener en cuenta que el alginato al ser un polielectrolito puede interactuar electrostáticamente con otros polímeros cargados.

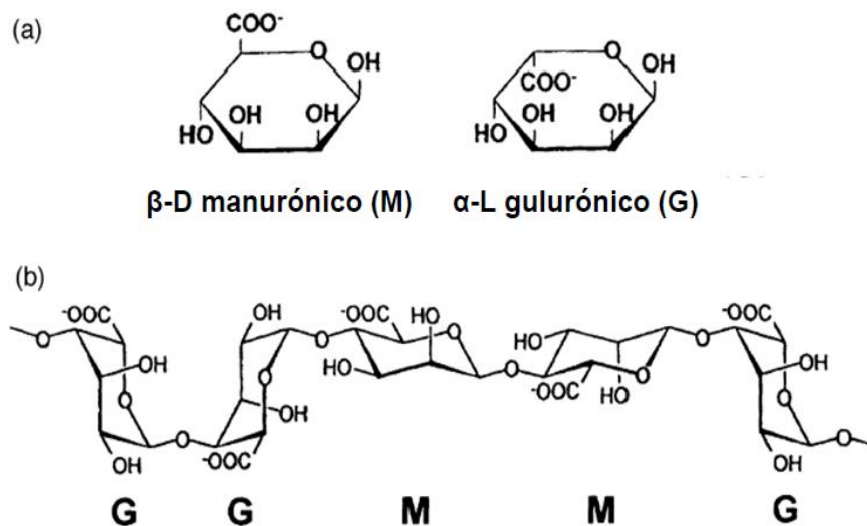


Figura No. 2 Estructura del polímero de alginato. a) Monómeros del alginato, b) Conformación de la cadena de alginato. Fuente: López, 2012.

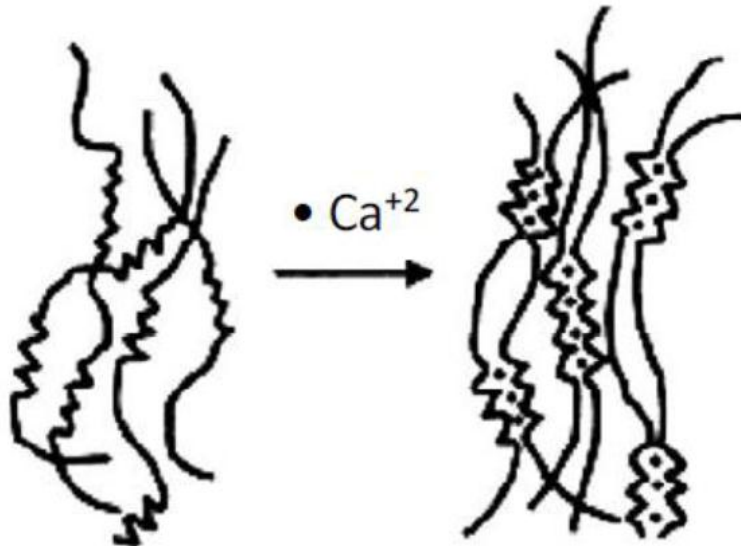


Figura No. 3 Modelo de "caja de huevo" de alginato de calcio.

Fuente: López, 2012.

Las cápsulas de alginato han sido empleadas por su fácil preparación a escala laboratorio, el proceso es muy sencillo y puede ser conducido en condiciones estériles. Además, muchos compuestos pueden ser encapsulados, ya sean hidrofóbicos o hidrofílicos, sensibles a la temperatura, líquidos o sólidos, etc. Algunos de los compuestos activos encapsulados con alginato son extractos de antioxidantes naturales, células microbianas, fármacos, entre otros.

La principal desventaja de las cápsulas de alginato es que son muy porosas y se pueden producir pérdidas del material activo durante su preparación, manipuleo o posterior incorporación en una preparación (López, 2012).

1.4.2.2 ALMIDÓN DE MAÍZ

El almidón es el principal constituyente del maíz y las propiedades fisicoquímicas y funcionales de este polisacárido están estrechamente relacionadas con su estructura. El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. Estas moléculas se organizan en anillos concéntricos para originar la estructura granular. La distribución de la amilosa dentro de los anillos concéntricos difiere entre el centro y la periferia del gránulo, ya que sólo ocupa los lugares disponibles que deja la amilopectina después de sintetizarse (Tetlow y col., 2004).

El almidón es ampliamente utilizado como ingrediente en la industria de alimentos debido a que es de fácil disponibilidad, no tóxico, biodegradable y de bajo costo. A

diferencia de otros polímeros, el almidón se encuentra en la naturaleza como complejas partículas discretas con ordenamiento radial denominadas gránulos.

Además ha sido utilizado tanto como polímero encapsulante así como también como material de relleno inerte. Con el agregado de almidón se ha observado un aumento de la resistencia mecánica, la conservación de la forma y del tamaño de las cápsulas y mayor estabilidad del material encapsulado durante el almacenamiento. Sin embargo, no se conocen estudios en literatura en los que se haya empleado almidón no sólo como relleno inerte, sino también como vehículo de compuestos activos que mejoren la funcionalidad del sistema encapsulado (López, 2012).

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una tendencia por parte de los consumidores por comprar/consumir productos naturales, en el ámbito alimenticio ha aumentado el interés por los pigmentos obtenidos de fuentes naturales para sustituir a los sintéticos. Algunos pigmentos naturales tienen la cualidad de contener propiedades antioxidantes. Un ejemplo de ello son las betalaínas, las cuales se conocen por ofrecer actividad biológica antioxidante, antidiarreica, medicinal, etc. Las betalaínas pueden encontrarse en diferentes plantas, de donde pueden ser extraídas para un posible uso comercial. Una de las plantas donde se ha reportado una alta concentración de betalaínas es la bugambilia, en específico en las brácteas de la planta.

Los antioxidantes son ampliamente utilizados como ingredientes en suplementos dietéticos y en bebidas con la esperanza de mantener la salud y de prevenir enfermedades. Es por ello que las betalaínas son consideradas como una buena opción en la elaboración de productos funcionales.

No obstante existe la problemática en la forma de conservación de las betalaínas que está directamente relacionado con la estabilidad y la funcionalidad que estas tendrán al momento de ser ingeridas por los consumidores. La principal limitante es que son altamente degradables a ciertas condiciones, como el cambio de pH, la temperatura, la luz, etc., con lo cual se pierden las propiedades funcionales en un lapso de tiempo corto.

Una de las opciones a tomar en consideración para proteger los compuestos activos presentes en la bugambilia es mediante su encapsulación.

Por ello, el estudio de una técnica de encapsulación para el extracto de las brácteas de bugambilia debe ser estudiado como una opción de la conservación y estabilidad de los metabolitos secundarios (Antioxidantes) que se encuentran en dichos extractos.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la protección y liberación del extracto de las brácteas de bugambilia encapsulado en perlas de alginato y almidón de maíz.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el extracto de bugambilia (betalaínas, capacidad antioxidante, fenoles totales).
- Formular perlas a partir de alginato de sodio y almidón de maíz.
- Encapsular el extracto obtenidoutilizando como matriz las perlas formuladas.
- Evaluar la eficiencia de encapsulación.
- Determinar de la cinética de liberación del extracto encapsulado.
- Evaluar la estabilidad del extracto encapsulado.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

La encapsulación del extracto de las brácteas de bugambilia en perlas de alginato con almidón de maíz permitirá tener un mayor control sobre la preservación y liberación del mismo.

CAPÍTULO 5

MATERIALES

5.1 Material

El etanol y metanol se obtuvieron de J. T. Baker S.A. de C.V., el 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), reactivo comercial de Folin-Ciocalteu 2N, ácido gálico y el carbonato de sodio anhidro fueron obtenidos de Sigma Aldrich, para todos los experimentos se utilizó agua destilada.

5.2 Material biológico

Brácteas de bugambilia, las cuales fueron recolectadas en el mes de Abril del 2016 en la Ciudad de Toluca de Lerdo, Estado de México.

CAPÍTULO 6

METODOLOGÍA

6.1 Acondicionamiento del material vegetal

En la figura 4 se presenta la metodología utilizada para la obtención del polvo fino de las brácteas de bugambilia:

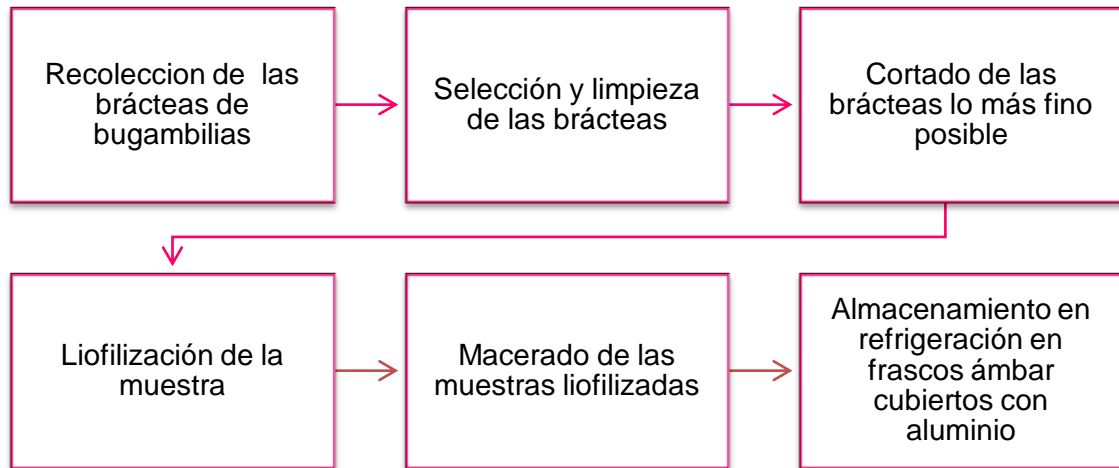


Figura 4 Procedimiento para el acondicionamiento y obtención de las muestras de brácteas de bugambilia deshidratadas

6.2 Obtención de los extractos

Se realizaron dos tipos de extracciones, una con agua destilada y otra con una solución etanol/agua (50:50). La obtención del extracto con agua (EA), se realizó de acuerdo a la figura 5:

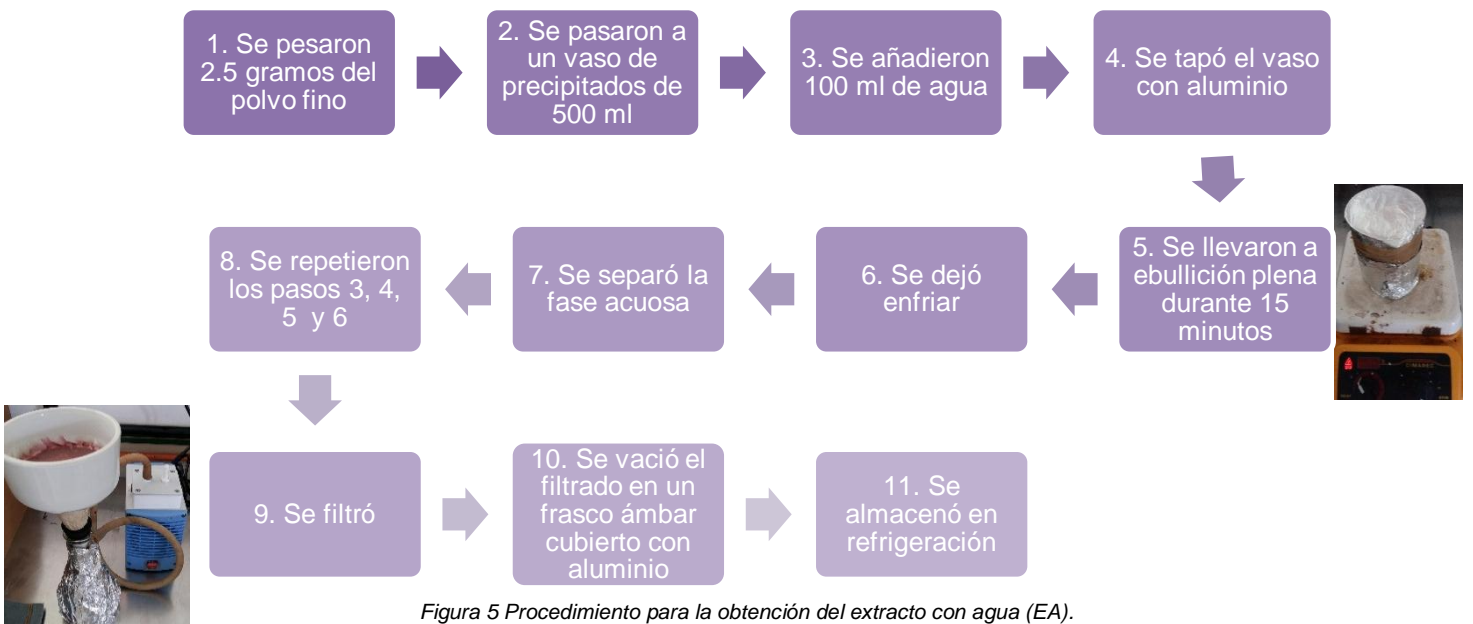


Figura 5 Procedimiento para la obtención del extracto con agua (EA).

Posteriormente se obtuvo el segundo extracto (EB), de acuerdo al procedimiento de la figura 6 que se muestra a continuación:



Figura 6 Procedimiento para la obtención del extracto con etanol-agua 50:50 (EB).

6.3 Determinación de Fenoles Totales

La determinación de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Trejo (2010) con pequeñas modificaciones, se utilizó una solución de carbonato de sodio anhidro 20% p/v, una solución patrón de ácido gálico 0.1 mg/ml, el reactivo de Folin-Ciocalteu y agua destilada, todas las reacciones se dejaron reposar 30 minutos a baño maria de 40°C en la obscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis Thermo Fisher Scientific. (Ver anexo 1).

6.4 Cuantificación de betalaínas

La cuantificación de betalaínas se realizó por el método descrito por Castellanos-Santiago (2008), en el cual se mide la absorbancia del extracto a una longitud de onda de 535 nm para betacianinas y 483nm para betaxantinas. (Ver anexo 2).

6.5 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó por medio del método de DPPH descrito por Brad-Williams y col. (1995) con algunas modificaciones; para el cual se tomaron 0.1 ml de cada muestra y se les añadió 3.9 ml de una solución del radical DPPH* (0.025 g/L), para la curva patrón se utilizó una solución stock 1.2 mM de TROLOX. Todas las reacciones se llevaron a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz, después se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro(Ver anexo 3).

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración.

6.6 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS

También se utilizó el método de ABTS para la determinación de la capacidad antioxidante descrito por López-Martínez y col. (2010) con algunas modificaciones. Se preparó una solución stock 7mM de ABTS y una de persulfato de potasio 140mM, se combinaron 5ml de la primera con 88µl de la segunda, se dejó reposar durante 12 horas a temperatura ambiente y protegido de la obscuridad, transcurrido el tiempo se diluyó hasta obtener una absorbancia de 0.74 a 734 nm. Se tomaron 0.1 ml de las diferentes muestras y se les añadió 3.0 ml de la solución ABTS, para la curva patrón se utilizó una solución stock 1 mM de TROLOX. Todas las reacciones se llevaron a cabo durante 10 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz, posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro(Ver anexo 4).

6.7 Cuantificación del color (Colorímetro)

La cuantificación del color se realizó por medio de un colorímetro CHROMA METER CR-400 obteniendo para cada muestra (extractos puros y agua de contacto de liberación de los extractos encapsulados) tres valores de tres variables diferentes las cuales son L, a, b, siendo que la primera se refiere a la luminosidad, la segunda va de rojo a verde y la tercera de amarillo a azul.

Primero se calibró el equipo, posteriormente se colocó la muestra en una caja Petri, se midió la muestra obteniendo los valores correspondientes a L, a, b, y se registraron.

6.8 Elaboración de las perlas

Los extractos de las brácteas de la bugambilia obtenidos mediante los dos métodos de extracción antes mencionados se encapsularon en perlas de alginato de acuerdo a la figura 7.

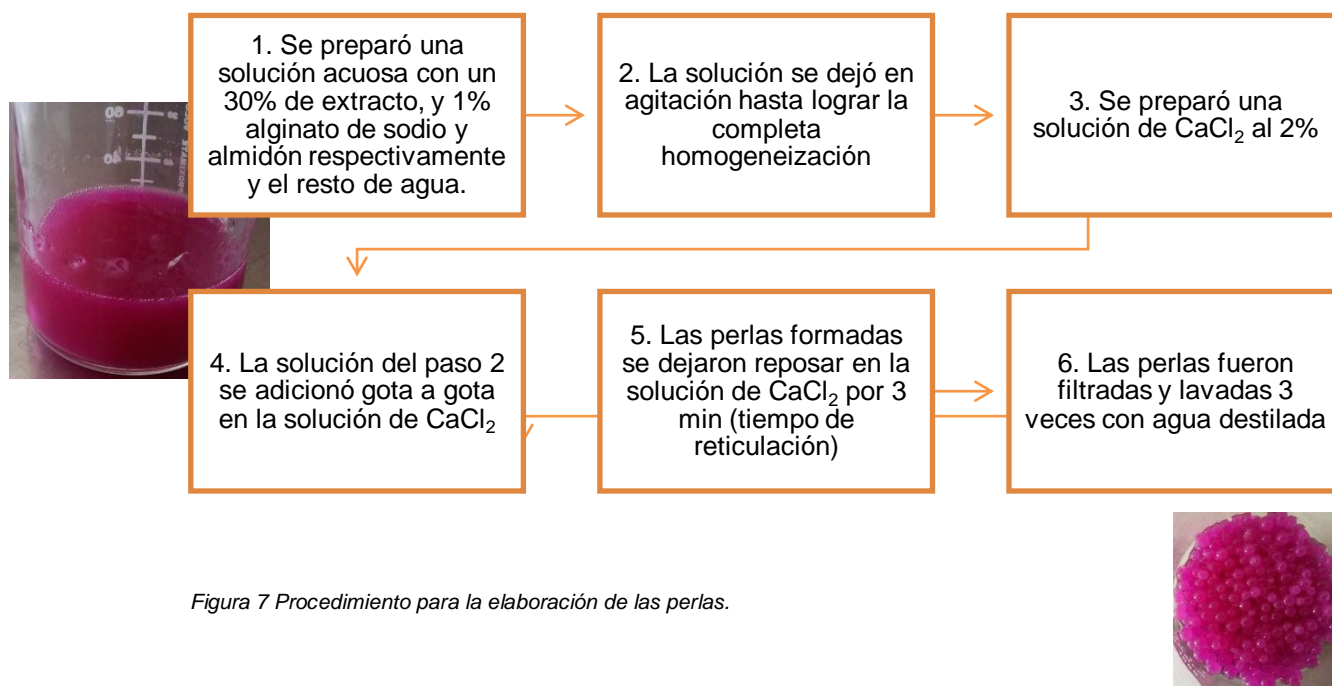


Figura 7 Procedimiento para la elaboración de las perlas.

6.9 Eficiencia de encapsulación

La determinación de la eficiencia de encapsulación del extracto de bugambilia se llevó a cabo midiendo las absorbancias de acuerdo a la siguiente ecuación (López, 2012):

$$\% EE = \left(\frac{Abs_{(EA)}}{Abs_{(L)} + Abs_{(CaCl_2)}} \right) \times 100$$

Donde:

$Abs_{(EA)}$ = corresponde a la absorbancia del extracto acuoso libre

$Abs_{(L)}$ = corresponde a la absorbancia obtenida en el agua utilizada para lavar los extractos

$Abs_{(CaCl_2)}$ = corresponde a la absorbancia obtenida en la solución de $CaCl_2$ después del tiempo de reticulación de las perlas.

Para el extracto etanólico-acuoso es la misma ecuación solo se sustituye $Abs_{(EA)}$ por $Abs_{(EB)}$ donde este último corresponde a la absorbancia del extracto metanólico-acuoso libre.

6.10 Cinética de liberación

Las cinéticas de liberación se realizaron de acuerdo al método propuesto por Lopretti (2007) con algunas modificaciones. Para el EA se realizaron tres cinéticas. Dos de ellas se realizaron utilizando perlas frescas (a temperatura ambiente y otra a 70°C), la tercera se realizó con perlas secas (temperatura ambiente). La cinética de EB sólo se llevó a cabo a temperatura ambiente. En todos los casos, las cinéticas de liberación se llevaron a cabo como se describe a continuación. Para cada punto de la cinética, se pesaron 15 g de perlas y se colocaron en 30 ml de agua. Cada punto se dejó diferente tiempo. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 290 nm (máxima absorbancia registrada en el previo barrido realizado a la muestra).

6.11 Determinación de la estabilidad del extracto encapsulado

La estabilidad del extracto encapsulado se determinó mediante las técnicas utilizadas para la caracterización del extracto (fenoles totales, cuantificación de batalaínas, capacidad antioxidante y color) por medio del agua en la cual se realizó la liberación del extracto encapsulado en las perlas. Los diferentes resultados de las muestras obtenidas a diferentes tiempos se compararon con los resultados del extracto sin encapsular.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

En un análisis de cromatografía de capa fina (TLC) realizado por Murillo y col. (2013) mostró que los compuestos cromóforos que se encuentran en la bugambilia presentaban carácter polar, debido a que los disolventes con los que se muestra un valor más alto de coeficientes de retención (R_f) eran los de este tipo. Los disolventes mejor evaluados fueron el agua, metanol y etanol; los coeficientes de retención que obtuvieron fueron 0.5142, 0.7875 y 0.8375, respectivamente; por lo anterior se decidió que los solventes a utilizar para obtener los extractos serían agua y una mezcla de agua-etanol, el metanol no se utilizó debido a su toxicidad. Los extractos obtenidos tuvieron una coloración muy similar, por no decir idéntica a la coloración que presentan las brácteas en su estado natural. Los extractos fueron analizados en el espectrofotómetro, se obtuvo un espectro de absorción, el cual resultó ser muy parecido al típico espectro de absorción correspondiente a las betalaínas, donde se observan diferentes picos característicos a este tipo de compuestos.

En las imágenes 2 y 3 se pueden observar los espectros de absorción de 400 a 600 nm de los extractos A y B respectivamente.

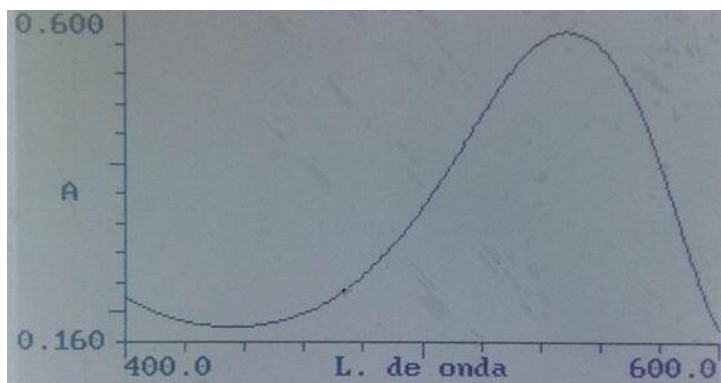


Imagen 2 Espectro de absorción del extracto A

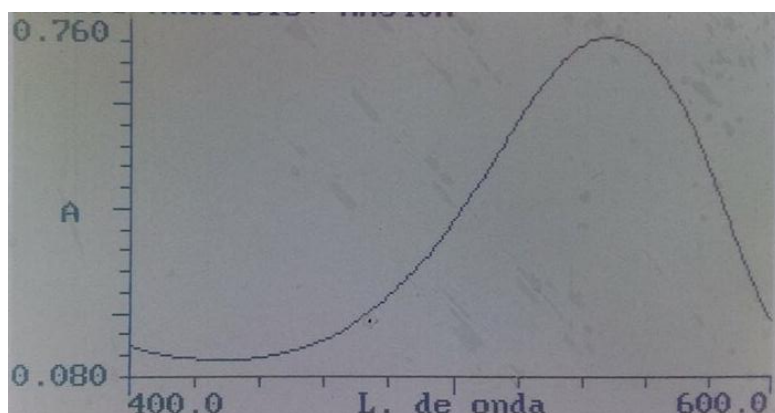


Imagen 3 Espectro de absorción del extracto B

7.1.1 Determinación de Fenoles Totales

Los fenoles totales contenidos en el extracto acuoso y en el extracto de etanol-agua de la bugambilia (A y B respectivamente) muestran diferencias significativas, el extracto A tiene menos contenido de fenoles totales en comparación con el extracto B, 5.7903 y 6.7843 mgEAG/g de muestra, respectivamente; tal y como se puede observar en la figura 8.

De acuerdo a Lee y col. (2002) los tallos de tuna contienen 3.7 mg de compuestos fenólicos totales/g como ácido gálico. Repo de Carrasco y col. (2008) reportan que el aguaymanto, la papaya de monte, la papaya tropical, el tomate de árbol y la tuna roja presentan una concentración de fenoles totales de 1.54, 1.67, 0.576, 1.30 y 0.52 mgEAG/g respectivamente. Los extractos obtenidos de la bugambilia poseen mayor cantidad de fenoles totales en comparación con los que reportan Lee y col. y Repo de Carrasco y col. Dichos valores se muestran en la figura 8.

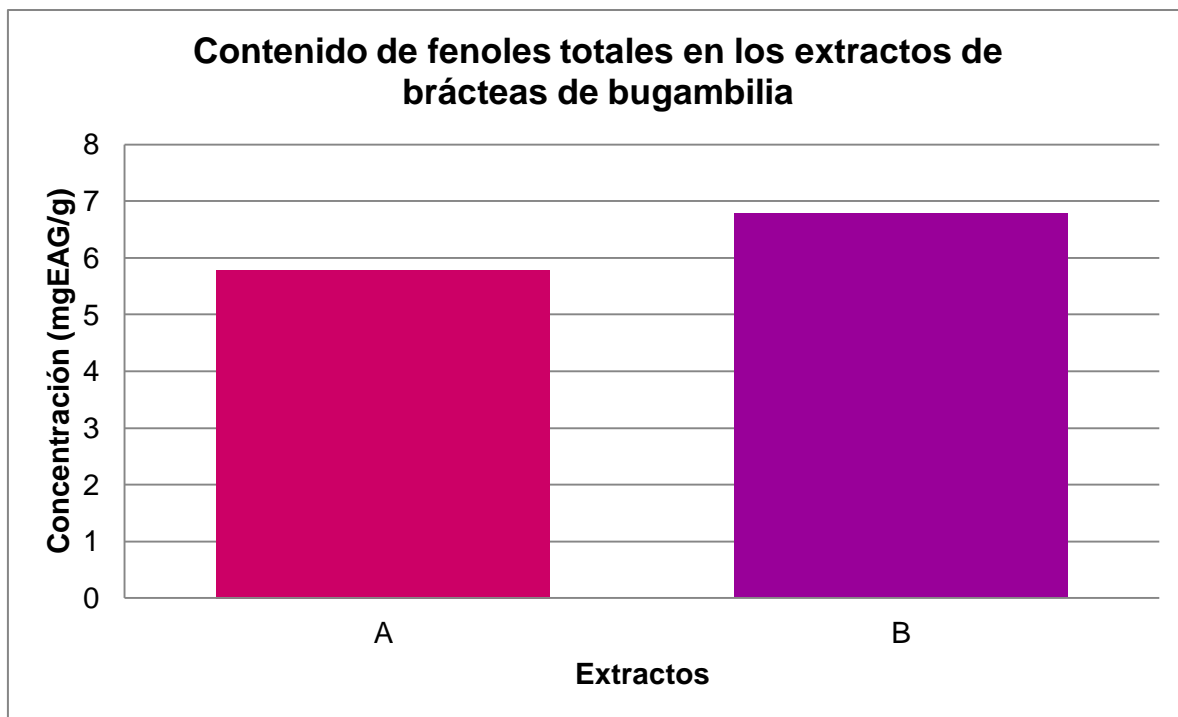


Figura 8 Concentración de Fenoles Totales presentes en los extractos A y B

7.1.2 Cuantificación de betalainas

La determinación del contenido de betalainas se realizó a través de la medición del contenido de betacianinas (BC) y betaxantinas (BX), dado que las betalainas totales (BT) es el resultado de la suma de BC Y BX. En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos de la determinación del contenido de betalainas totales. Se puede observar que el contenido de BT para el extracto acuoso fue de 5.1435 mg/g de muestra y para el etanólico de 6.2895 mg/g de muestra.

El contenido de BC en ambos extractos, A y B, es significativamente mayor que el contenido de BX. Por otra parte el contenido de BC en el extracto B es significativamente mayor que el del extracto A, 3.9013 ± 0.0025 y 4.9683 ± 0.0016 mg/g de muestra respectivamente; pero el contenido de BX es igual, 1.2422 ± 0.0019 y 1.3212 ± 0.0015 mg/g de muestra.

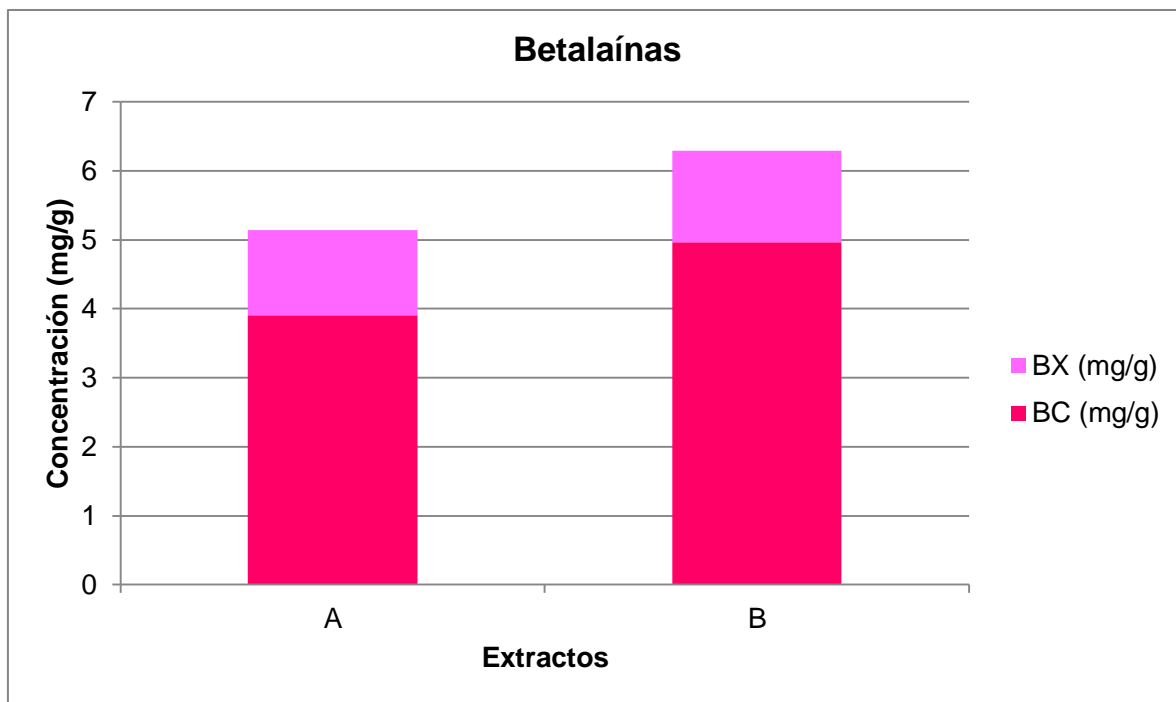


Figura 9 Concentración de BT (BX y BC) de los extractos A y B

En un estudio realizado por Ayala (2007) reportan que el betabel contiene 87.649 mg de betalaínas (BC y BX) por cada gramo de pulpa, así mismo reportan los resultados obtenidos en cuatro variedades de pitaya, roja, amarilla, anaranjada y morada, los cuales tienen una concentración de 17.916, 10.382, 13.954 y 21.846 mg/g de muestra respectivamente; las muestras con las que trabajamos tienen una concentración menor, sin embargo, nuestra materia prima son brácteas y no frutos, siendo esta comparación tal vez poco adecuada.

7.1.3 Capacidad antioxidante

Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y es de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

7.1.3.1 Capacidad antioxidante por el método DPPH

Los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante por medio del método DPPH se muestran en la figura 10.

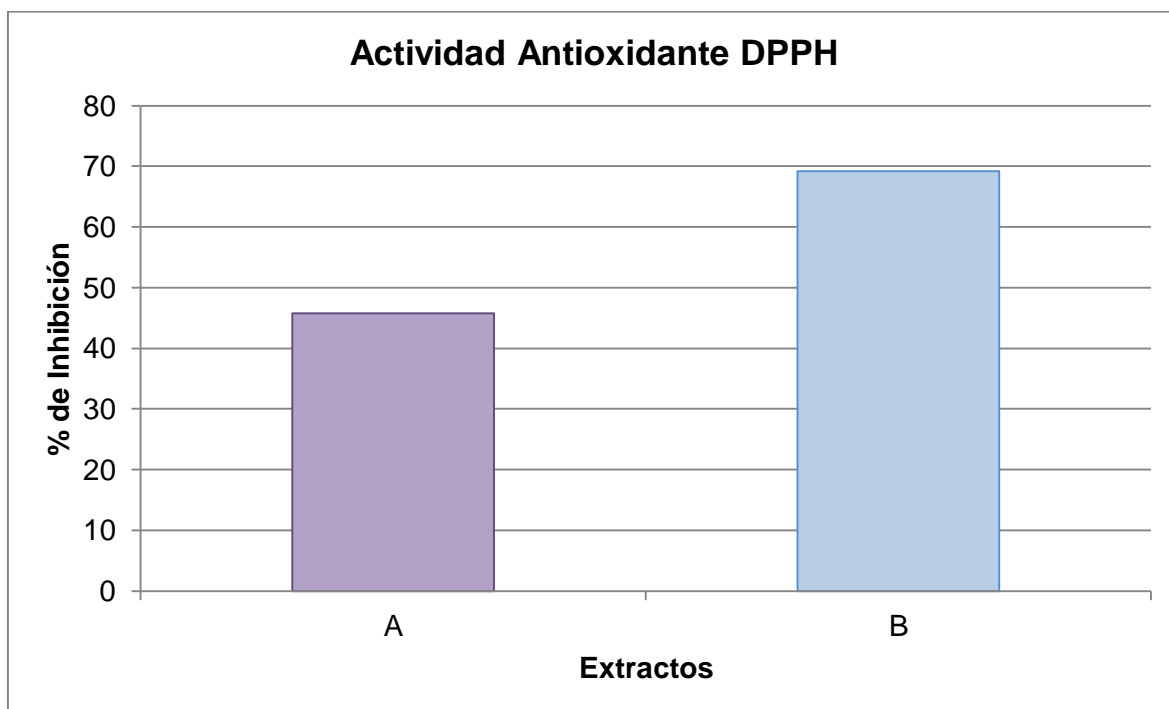


Figura 10 Resultados de la Capacidad Antioxidante por el método DPPH de los extractos A y B

Existen en la literatura varios estudios de determinación de actividad antioxidante reportada como porcentaje de inhibición evaluada en diferentes plantas. Repo de Carrasco y col. (2008) determinaron el porcentaje de Inhibición (%I) en extracto de tuna verde, encontrando valores de 34.20%. Los extractos de bugambilia obtenidos en el laboratorio presentaron un %I de 45.73% y 69.15% para el extracto A y el extracto B, respectivamente. Por lo tanto se puede decir que las brácteas de bugambilia presentan una mayor capacidad antioxidante en comparación con el extracto de tuna independientemente del tipo de extracción que se utilice, por otro lado Tovar del Rio (2013) reportó que las plantas: *Topobeacfdiscolory* *Alchorneagrands* tienen valores de porcentaje de inhibición de 46,58% y 39,27% respectivamente. El porcentaje obtenido en el extracto A tiene un valor equivalente al reportado por *Topobeacfdiscolory* en comparación con *Alchorneagrands* presenta un valor significativamente mayor.

En cuanto al porcentaje obtenido en el extracto B se puede decir que es mayor que el reportado para ambas plantas (*Topobeacfdiscolory* *Alchorneagrands*).

Los extractos obtenidos de la bugambilia presentan valores de 45.73% para el extracto A y de 69.17% para el extracto B.

7.1.3.2 Capacidad antioxidante por el método de ABTS

La capacidad antioxidante de los extractos determinada por el método ABTS son los que se muestran en la figura 11.

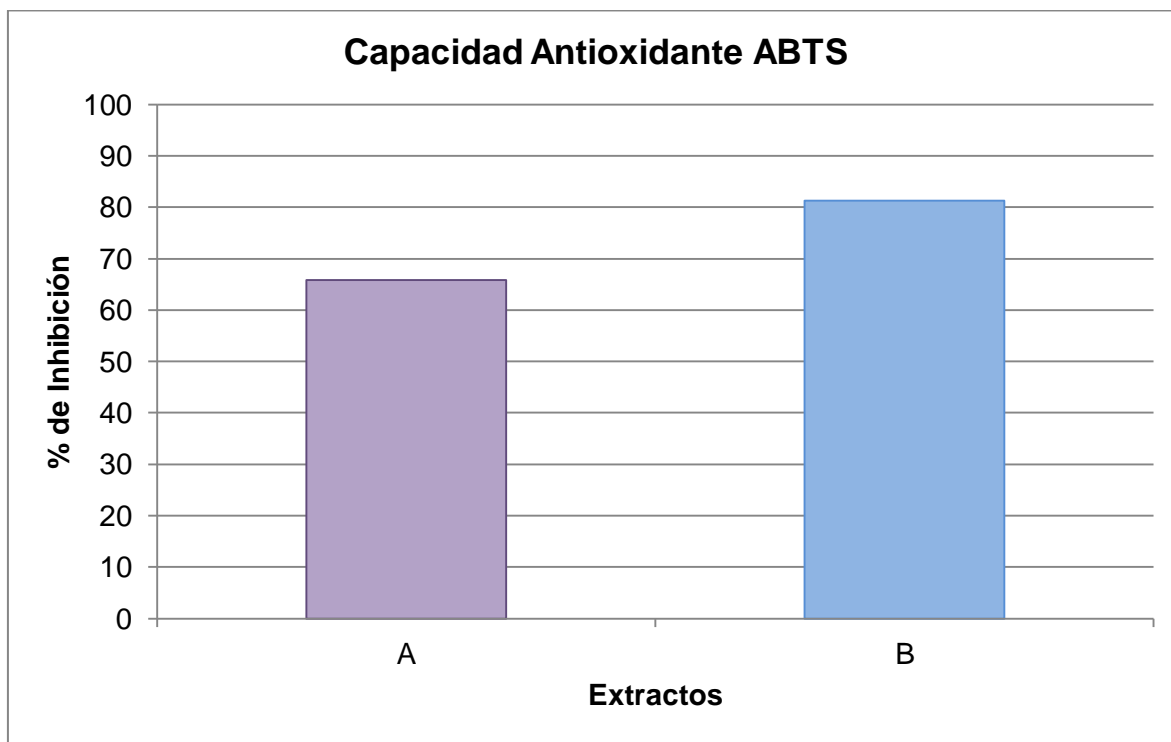


Figura 11 Capacidad Antioxidante (%) por el método ABTS de los extractos A y B

En un estudio presentado por Wettasinghe y col. (2002), se demostró que las betalaínas son muy eficientes en la reducción del radical $ABTS^{\bullet+}$ (hasta en un 85%); este porcentaje se encuentra por arriba en comparación con el obtenido por los extractos A y B (65.42% y 81.29%). Se puede observar de manera general que el contenido de betalaínas y la capacidad antioxidante para inhibir el radical $ABTS^{\bullet+}$ está directamente relacionado.

Figuroa y col. (2011) reportaron que la cáscara de pitahaya posee un porcentaje de inhibición del radical $ABTS^{\bullet+}$ de 12.17%, siendo así que los extractos de bugambilia A y B presentan un mayor porcentaje de inhibición de dicho radical con 65.42 Y 81.29% respectivamente.

Se puede observar que se obtuvieron mayores porcentajes de inhibición con el método ABTS que con el de DPPH, para dar una explicación a este hecho en primer lugar nos enfocaremos a la longitud de onda, Beserra y col. (2011) realizaron estudios en diferentes frutas como ciruela, papaya, tamarindo, etc., y nos dicen que: para el

ensayo ABTS●+ se tomó una longitud de onda de 732 nm, mientras que, para el ensayo DPPH● se midió a 517 nm. Desde la región del visible hay interferencias en la medición de compuestos coloreados como antocianinas y carotenoides que estén presentes en los extractos evaluados a 517 nm.

Otra razón podría ser el mecanismo de reacción del DPPH● con los antioxidantes, lo cual está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos; es decir un antioxidante pequeño con mayor acceso al radical mostrará mejor actividad antioxidante, teniendo presente que el DPPH● está impedido estéricamente (Beserra y col., 2011). Por último, esta diferencia podría estar basada en la reacción reversible del radical DPPH● con fenoles como eugenol y sus derivados, lo cual llevaría a bajas lecturas de actividad antioxidante (Brand- Willians y col., 1997).

7.1.4 Cuantificación del color (Colorímetro)

Los resultados de la evaluación de color se muestran en la tabla 1, se puede observar que los dos extractos fueron evaluados en los atributos de color L, a, y b. Se puede observar que existe diferencia y esto se debe a que a pesar de que las dos muestras fueron tratadas bajo las mismas condiciones, el tipo de extracción de cada una nos da como resultado una diferencia entre las mismas.

- Luminosidad

L son los valores de luminosidad del color, éste va de 0 (negro) a 100 (blanco). Los extractos son diferentes, siendo el extracto B menos luminoso que el extracto A, estos valores se pueden observar en la tabla 1.

- Valor a

El parámetro **a** va de verde a rojo (**-a** son tonalidades verdes y **+a** son tonalidades rojas). Los valores de ambos extractos fueron positivos, lo cual nos quiere decir que existe la presencia de tonalidades rojas, encontrando diferencia entre ellas, siendo

más bajo el extracto A y un poco más alto el extracto B, esto se puede observar en la tabla 1.

- Valor b

Por último en el parámetro **b**, que va de azul a amarillo (**-b** para tonalidades azules y **+b** para tonalidades amarillas), se obtuvieron valores negativos en ambos extractos, lo cual nos indica la presencia de tonalidades azules, existiendo diferencia significativa, teniendo el valor más alto el extracto B y el extracto A tuvo un valor un poco más bajo, tal y como se puede observar en la tabla 1. Estos resultados obtenidos servirán como punto de referencia para los resultados obtenidos en las liberaciones de los extractos.

Colorímetro			
Extracto	L	a	B
A	29.24	44.09	-10.23
B	23.32	48.68	-12.01

Tabla No.1 Resultados del colorímetro a los extractos A y B

7.2 ENCAPSULACIÓN

7.2.1 Eficiencia de encapsulación

Se encapsularon por separado los extractos (A y B) en las perlas de alginato y se calculó el porcentaje de eficiencia de encapsulación para cada uno. Obteniendo valores de 76.92% y 79.35% para el extracto A y el extracto B respectivamente.

En un estudio realizado por López (2012) se reportaron porcentajes de encapsulación del 65% utilizando en su sistema alginato y almidón, ambos al 2%; por lo cual se

puede decir que el porcentaje de eficiencia de encapsulación obtenido en el presente trabajo es aceptable.

7.2.2 Cinética de liberación

Se realizó la liberación del extracto encapsulado en las perlas de alginato y almidón de maíz en agua, se tomaron medidas a diferentes tiempos de contacto y con lo cual se obtuvieron cuatro diferentes cinéticas de liberación. En la figura 12 se muestran las tres cinéticas realizadas con el extracto A. Las cinéticas se realizaron con ciertas especificaciones las cuales se muestran en la tabla 2.

Código	Perlas	Temperatura de liberación
1A	Frescas	Ambiente
2A	Frescas	60 – 70°C
3A	Secas	Ambiente

Tabla 2 Características para las cinéticas de liberación 1A, 2A Y 3A.

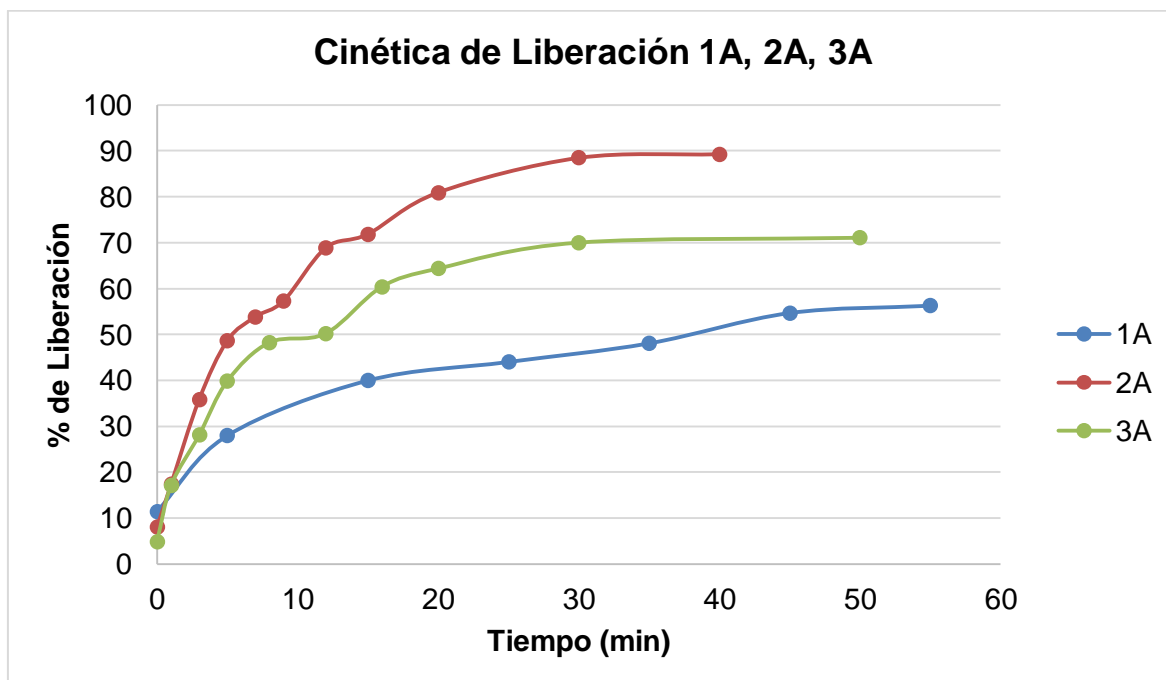


Figura 12 Cinética de liberación 1A, 2A y 3A.

Como se puede observar se obtuvieron diferentes porcentajes de liberación en diferentes tiempos de contacto con el agua, obteniendo un mayor porcentaje de

liberación en la cinética 2A, seguida por la 3A y por último la 1A, con porcentajes de liberación de 89.25, 71.05 y 56.25% respectivamente.

Así mismo los tiempos en los cuales se liberó el extracto encapsulado fueron diferentes teniendo el mayor tiempo la 3A con 50 minutos seguido de 1A y 2A, ambos con 30 minutos; considerando el tiempo de liberación cuando la curva se hace constante.

La cuarta cinética de liberación se realizó con las perlas que contenían encapsulado el extracto B, la liberación se efectuó a temperatura ambiente y los resultados se pueden observar en la figura 13 el porcentaje de liberación logrado fue de 92.70% y el tiempo en el cual transcurrió la misma fue de 12 minutos.

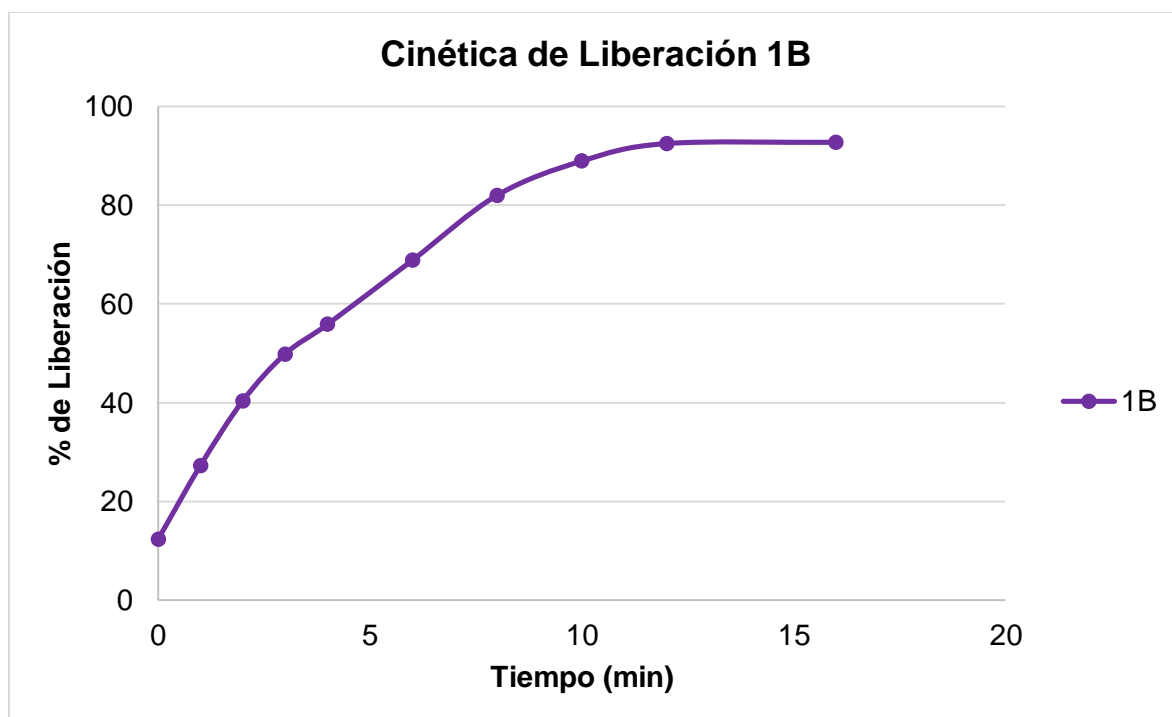


Figura 13 Cinética de liberación 1B.

Tomando en cuenta las 4 cinéticas se obtuvo mayor liberación y en menor tiempo en el extracto B que del extracto A. Tomando en cuenta la aplicación de las perlas en un producto alimenticio se puede decir que dependiendo del tipo de producto que sea se requerirá una liberación rápida o una lenta, por ejemplo, en alimentos como bebidas alcohólicas es preferible la utilización de las perlas utilizadas en la liberación 1B, si el producto es un té se podrían utilizar las perlas utilizadas en la liberación 3A.

Como se puede observar en la imagen 4 las perlas con el extracto B (perlas del lado derecho de la imagen) son más brillantes y de tonalidad más fuerte que las perlas con el extracto A (perlas de lado izquierdo de la imagen).



Imagen 4. Comparación de las perlas con extracto A y las perlas con extracto B.

En la imagen 5 se muestran las perlas de alginato con el extracto A de la cinética 1A, del lado izquierdo se encuentran las perlas antes de la liberación y del lado derecho se muestran las mismas perlas después de la liberación.



Imagen 5 Perlas antes y después de la liberación de la cinética 1A.

Las perlas utilizadas en la liberación para la cinética 2A se muestran del lado izquierdo de la imagen 6 y del lado derecho de la misma se muestran las perlas después de la liberación.

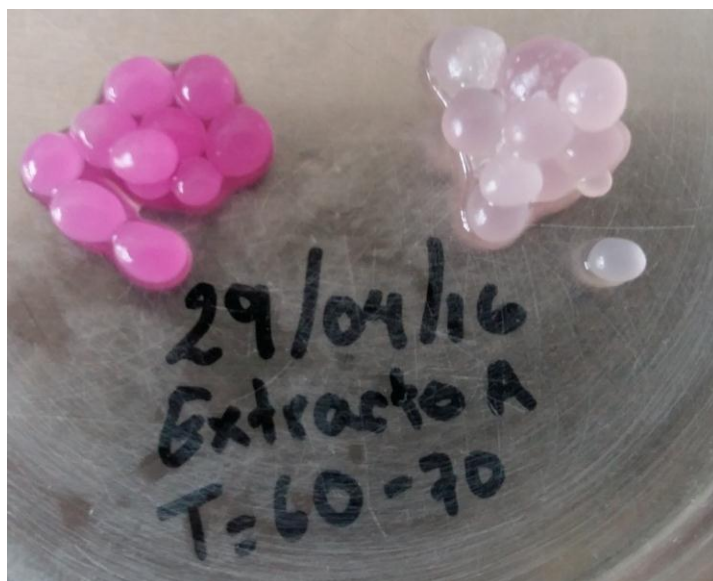


Imagen6 Perlas antes y después de la liberación de la cinética 2A.

En la imagen7 se pueden observar de las perlas secas utilizadas en la cinética 3A.

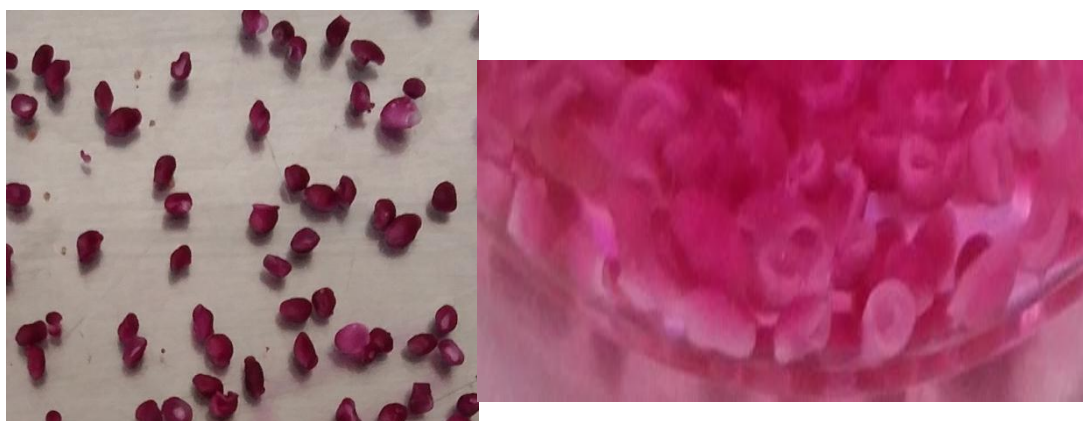


Imagen 7 Perlas utilizadas en la elaboración de la cinética 3A.

Las perlas utilizadas para la elaboración de la cinética de liberación del extracto de la prueba 1B se muestran en la imagen 8.



Imagen8 Perlas utilizadas en la elaboración de la cinética 1B.

En las imágenes9 y 10 se observan las soluciones de los diferentes puntos de las cinéticas 3A y 1B respectivamente; se puede observar como aumenta gradualmente la concentración del color conforme paso el tiempo de liberación.

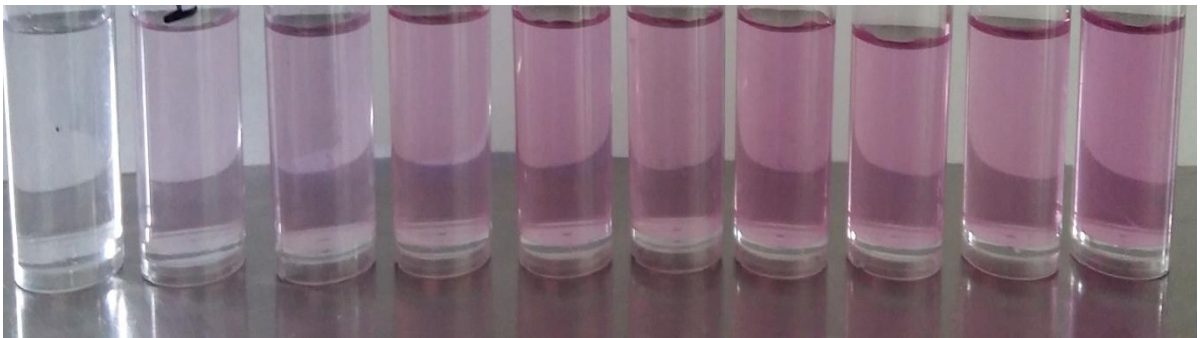


Imagen 9 Aumento gradual de la concentración del color de la cinética 3A.



Imagen 10 Aumento gradual de la concentración del color de la cinética 1B.

A cada punto obtenido en diferentes cinéticas de liberación se le realizaron las mismas pruebas que a los extractos (fenoles totales, cuantificación de betalainas, capacidad antioxidante y color).

7.2.3 Determinación de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales presentes en cada punto de las cinéticas se muestran en las figuras 14 (1A, 2A, Y 3A) y 15 (1B) en equivalentes de ácido gálico (EAG) (mgEAG/g de muestra).

Se puede observar que el mayor contenido de Fenoles totales en equivalentes de ácido gálico se encuentra en la cinética 1B (figura 15), seguido de la 3A, posteriormente la 2A y por último la 1A con una concentración de 5.012, 4.039, 3.844 y 3.030 mgEAG/g de muestra respectivamente.

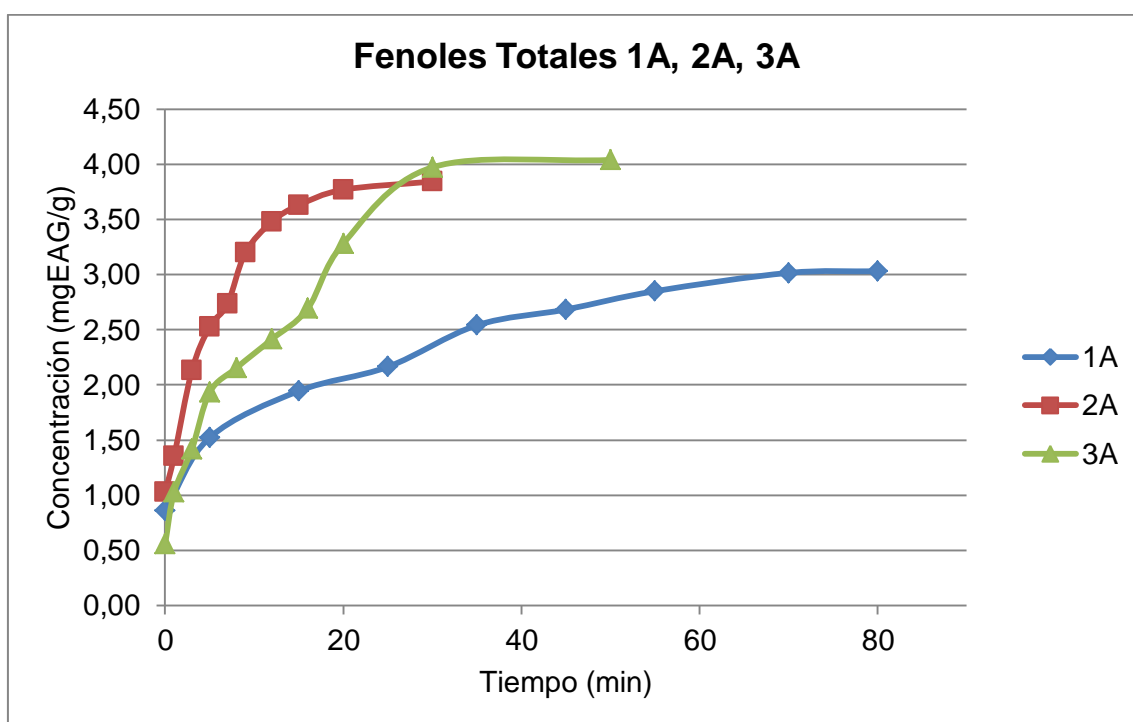


Figura 14 Concentración de Fenoles Totales presentes en las cinéticas 1A, 2A y 3A.

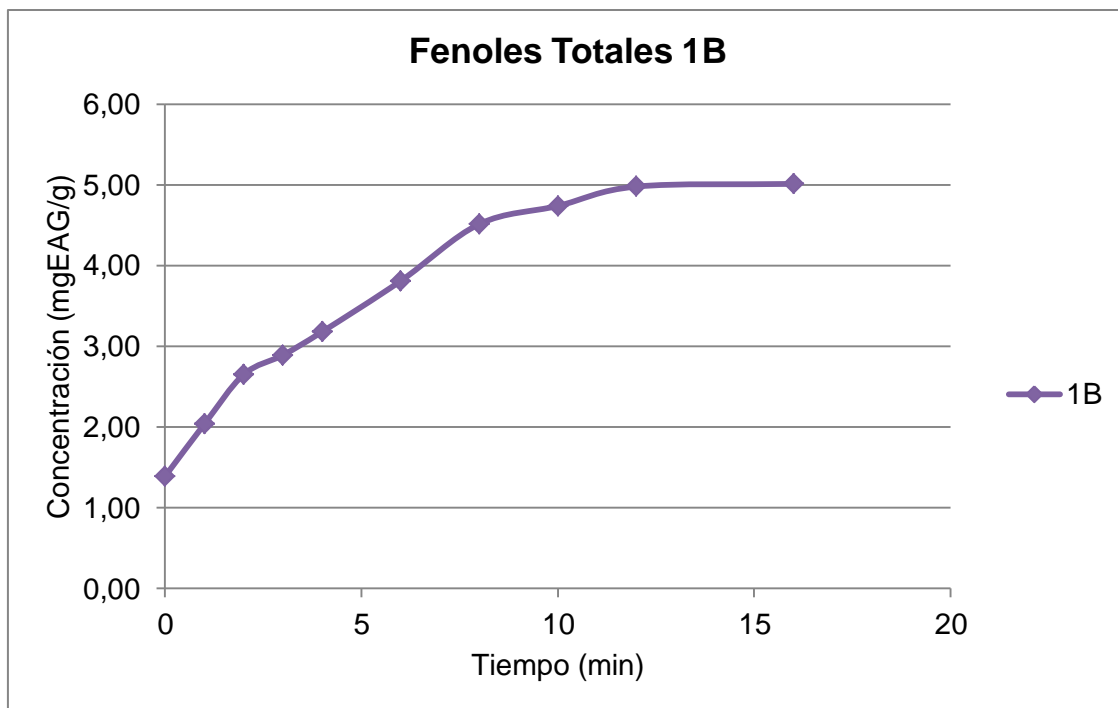


Figura 15 Concentración de Fenoles Totales presentes en la cinética 1B

7.2.4 Cuantificación de betalaínas

En las siguientes cuatro figuras (figuras 16, 17, 18 y 19) se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de las betalaínas de las diferentes cinéticas.

Como se puede observar en la cinética 1B es la que presenta una mayor concentración de betalaínas totales, seguida por las cinéticas 3A, 2A y 1A, con concentraciones de 4.669, 3.50, 3.316 y 2.616 mg de betalaínas por gramo de muestra respectivamente. La concentración de betalaínas obtenidas es buena, en un estudio realizado por Kugler(2007) también utilizan bugambilia obtuvieron resultados de 2.5941, 4.3298, 5.2882 y 5.5176 mg/g de muestra para la bugambilia morada, amarilla, naranja y roja respectivamente.

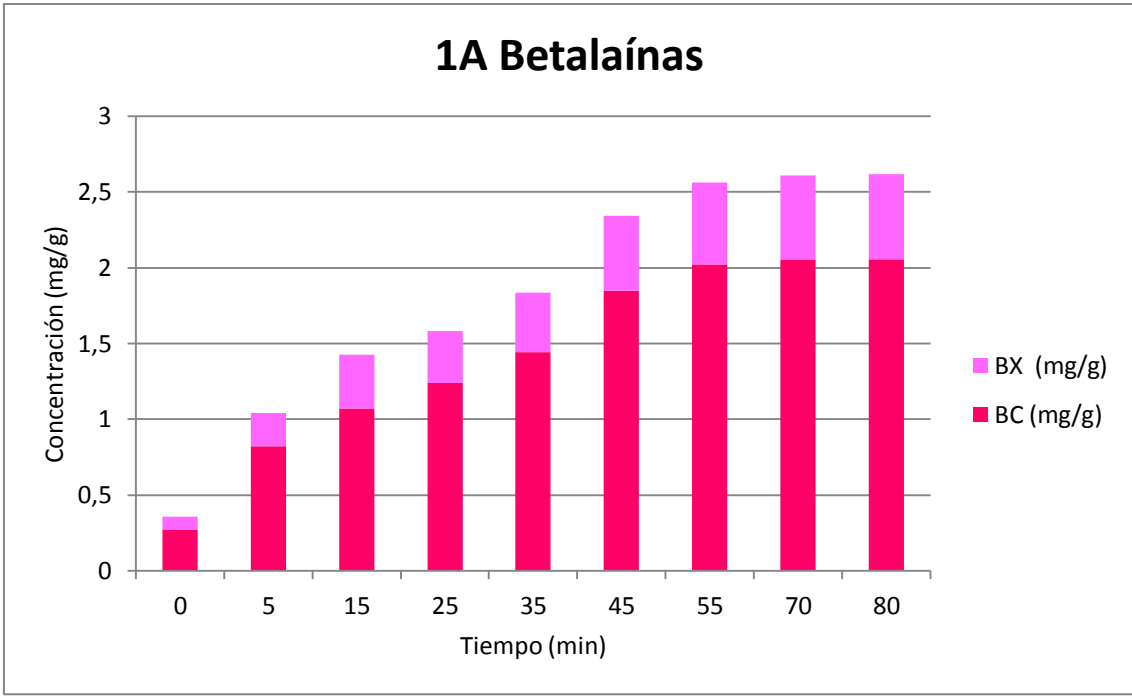


Figura 16 Concentración de BT (BX y BC) de la cinética 1A.

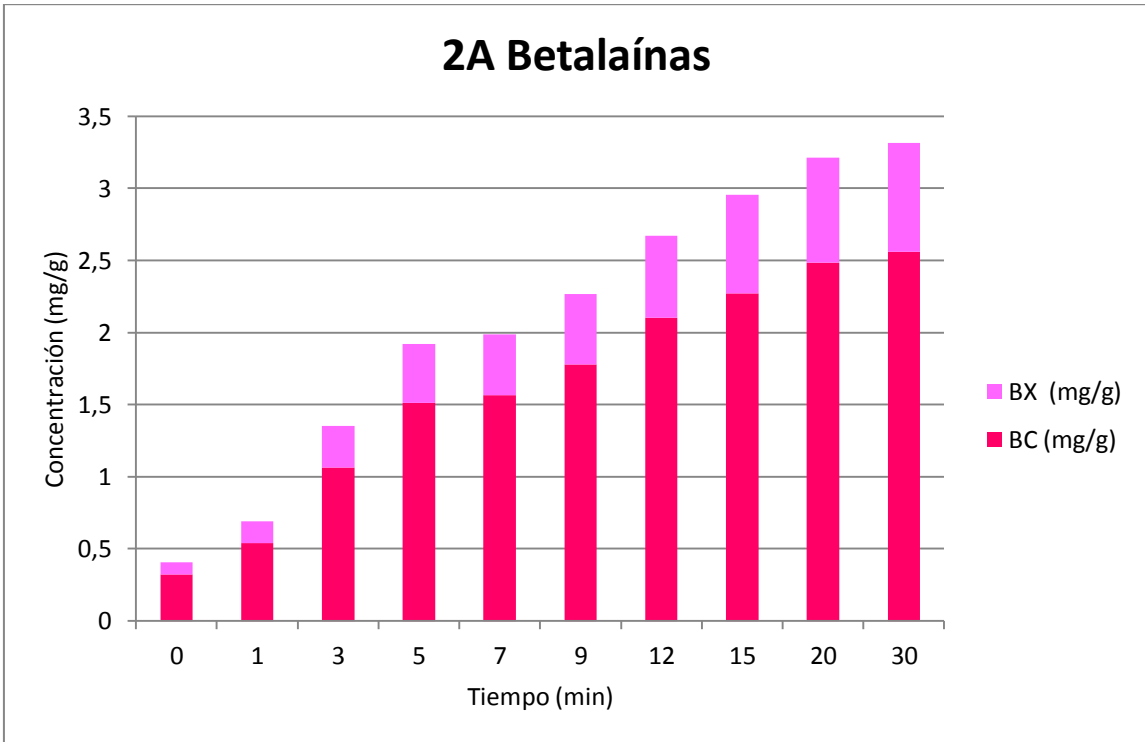


Figura 17 Concentración de BT (BX y BC) de la cinética 2A.

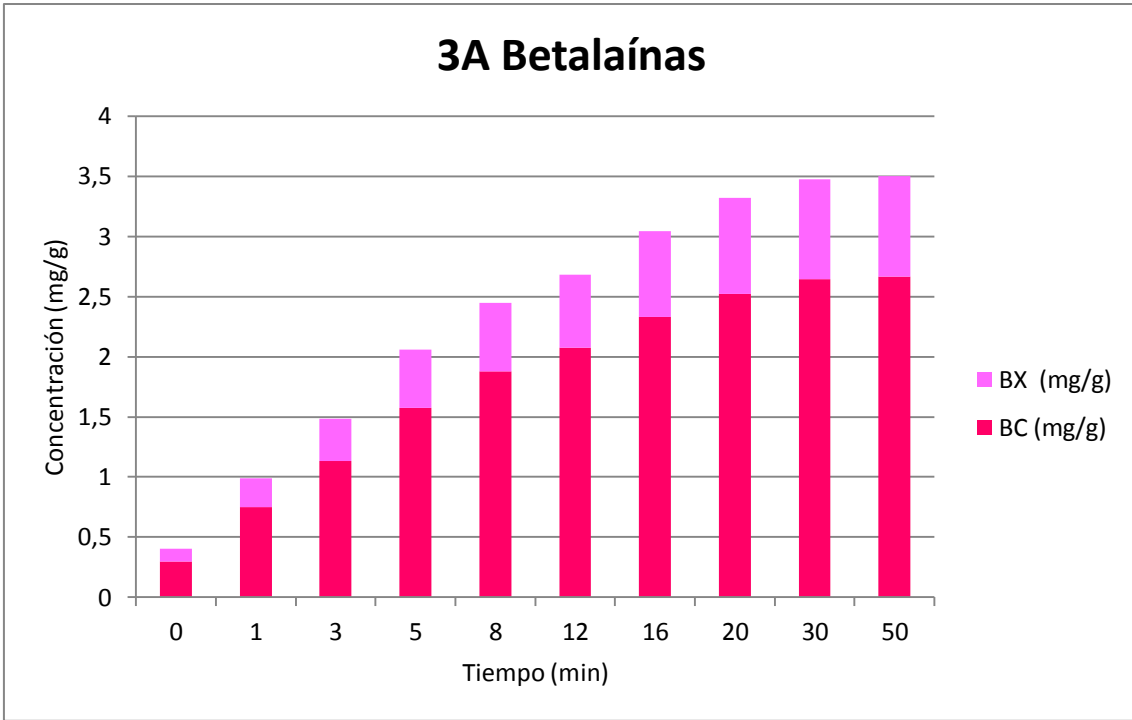


Figura 18 Concentración de BT (BX y BC) de la cinética 3A.

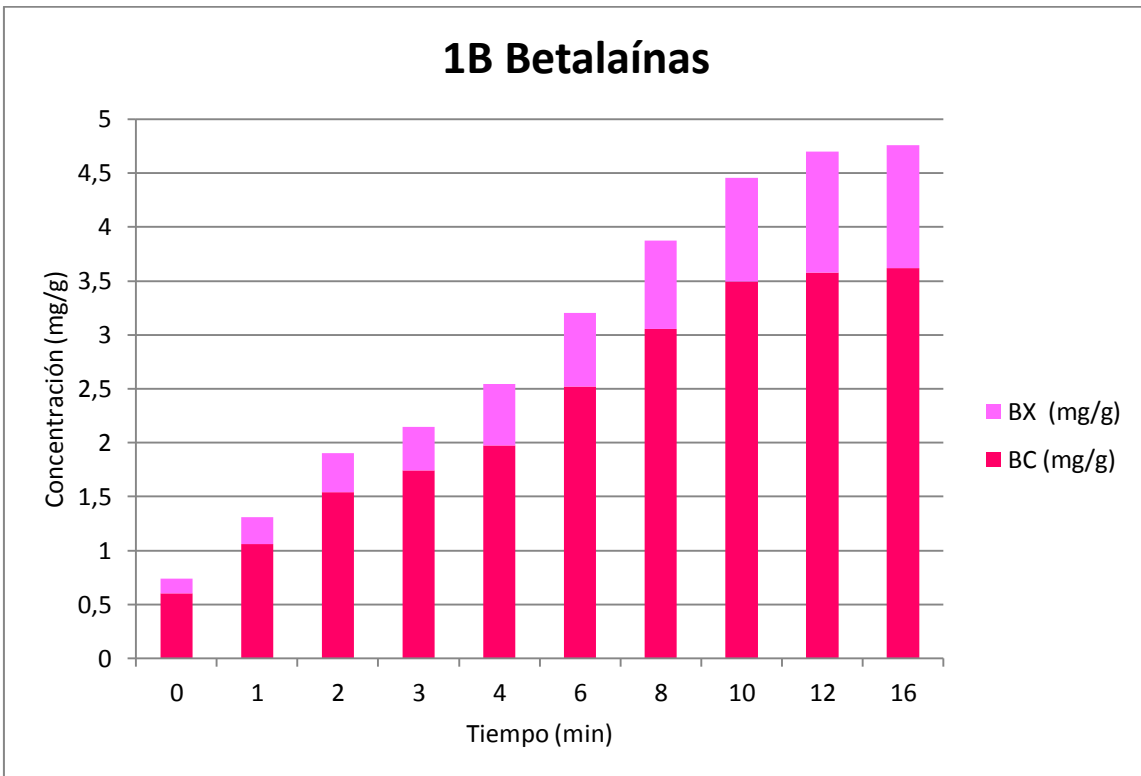


Figura 19 Concentración de BT (BX y BC) de la cinética 1B.

7.2.5 Capacidad antioxidante

El comportamiento obtenido al determinar el porcentaje de inhibición de los radicales DPPH y ABTS en las cinéticas 1A, 2A y 3A se muestran en la figura 20.

Se obtuvieron mayores porcentajes de inhibición cuando se utilizó el método ABTS que con el DPPH; se puede observar que para ambos métodos se obtuvo mayor porcentaje en la 3A (42.51% y 29.88%), seguido por la 2A (34.19% y 24.19%) y al final la 1A (33.67% y 20.72%).

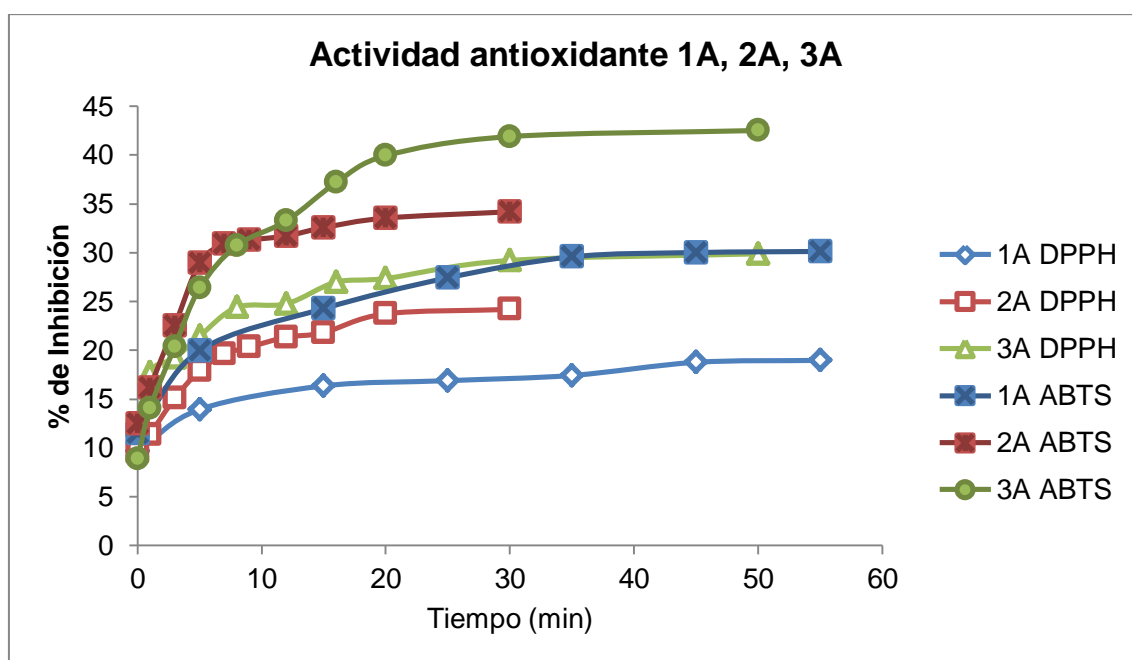


Figura 20 Capacidad Antioxidante (%) por los métodos DPPH y ABTS a las cinéticas 1A, 2A y 3A.

En relación al comportamiento obtenido de la cinética 1B al determinar el porcentaje de inhibición de los radicales DPPH y ABTS se muestra en la figura 21. Se obtuvo un porcentaje de inhibición del 54.27% y 69.42%.

Comparando los porcentajes de inhibición obtenidos en las cinéticas 1A, 2A y 3A, en donde se utilizó el extracto A, con la 1B, utilizando el extracto B, se obtuvo un mayor porcentaje en ésta última.

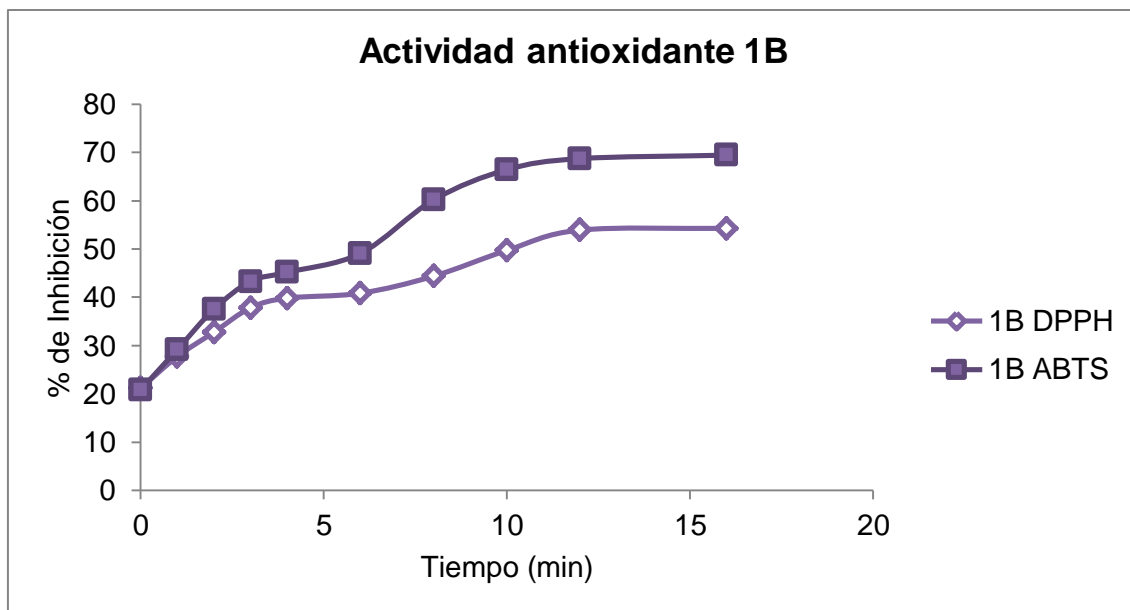


Figura 21 Capacidad Antioxidante (%) por los métodos DPPH y ABTS a la cinética 1B

7.2.6 Cuantificación del color (Colorímetro)

Al igual que en los extractos en cada punto de las cinéticas de liberación se tomaron lecturas con el colorímetro obteniendo tres parámetros: “L”, “a” y “b”, los cuales se muestran en la tabla 3.

L	1A	67,21	70,09	72,085	72,115	72,14	74,01	74,075	75,27	75,545	78,16
	2A	82,005	80,995	72,97	72,765	70,745	67,055	67,05	79,47	72,245	67,88
	3A	75,925	75,28	71,815	69,41	67,665	65,76	64,605	63,155	62,455	60,975
	1B	84,815	78,62	72,875	69,03	65,2	65,935	64,25	63,85	62,175	58,47
a	1A	5,295	7,32	8,28	8,4	8,705	10,82	11,61	12,48	14,06	15,14
	2A	3,62	5,48	6,28	12,775	12,805	12,82	13,43	13,715	13,84	18,445
	3A	2,81	6,19	6,405	7,2	7,94	9,4	9,99	13,49	14,955	15,85
	1B	8,54	9,51	10,895	13,87	16,965	21,015	24,84	26,585	28,22	30,275
b	1A	-2,24	-4	-5,14	-5,535	-5,7	-5,835	-6,91	-7,245	-8,42	-9
	2A	-3,19	-4,12	-4,505	-7,76	-7,985	-8,045	-8,175	-8,24	-8,45	-10,335
	3A	-4,01	-5,095	-5,205	-5,39	-5,6	-6,13	-6,435	-8,1	-8,855	-9,925
	1B	-8,075	-8,305	-8,525	-9,335	-10,16	-13,1	-15,465	-16,83	-17,905	-18,445

Tabla 3 Resultados del colorímetro a cada punto de las 4 diferentes cinéticas.

En la tabla 3 se puede apreciar el efecto del tiempo en la liberación del extracto, por ello a medida que pasaba el tiempo los resultados iniciales y finales de cada parámetro en las diferentes cinéticas se vio afectado, incrementándose; esto significa que el color en la solución sufrió cambios. Los valores de “a” en los tratamientos son positivos (+), por lo tanto, hay predominio del color rojo. El color en los términos del valor “b” son negativos (-), por lo cual quiere decir que el predominio es del color azul.

Además se puede observar que la luminosidad "L" (claridad) disminuye en el transcurso del tiempo, mientras que los parámetros "a" y "b" aumentan debido al aumento de la concentración del color. El color no es una buena variable para medir la estabilidad del color encapsulado, al menos en este experimento.

El color obtenido en las liberaciones y en los extractos puros es diferente; para la variable L en los extractos puros se obtuvieron valores cercanos al 0 y en las liberaciones se orientaron más al 100, indicando que son más oscuros los primeros que los segundos debido a que en los segundos no se mide solo el extracto liberado sino que se mide el extracto liberado diluido en el agua en la cual se pusieron en contacto las perlas.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

Se logró obtener un colorante natural a partir de las brácteas de bugambilia independientemente de la solución utilizada.

La extracción etanólico-acuosa permite una mejor extracción de los compuestos activos (fenoles totales y betalaínas) presentes en las brácteas de bugambilia, así como una mayor eficiencia de encapsulación además de una mayor cantidad y velocidad de liberación.

Los resultados obtenidos nos permitieron corroborar la presencia de actividad antioxidante en los extractos de las brácteas de bugambilia, independientemente del método del solvente utilizado.

La técnica de microencapsulación con alginato de sodio y almidón de maíz permite la protección de los compuestos activos extraídos de las brácteas de bugambilia.

Las liberaciones de los extractos encapsulados varían dependiendo de las condiciones a las cuales se realiza, se obtiene una mejor encapsulación y liberación de los compuestos activos en la cinética 1B seguido de la 3A, 2A y por último la 1A.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se puede decir que la bugambilia es una buena alternativa como fuente natural de compuestos activos con capacidad antioxidante. Convirtiéndola en una fuente potencial para su uso en diversas industrias como la alimentaria, farmacéutica y cosmética entre otras.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS

Una de las actividades que podrían realizarse en el futuro es la evaluación de la protección y liberación del extracto B encapsulado en las perlas de alginato y almidón de maíz cuando la utilización de las perlas requiera un secado previo, o bien cuando sea necesario llevarlas a altas temperaturas como parte del proceso.

Realizar estudios de aplicación en alimentos.

Evaluar la elaboración de las perlas con el colorante a diferentes tiempos de contacto con el cloruro de calcio para lograr mayores tiempos de liberación.

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS

Acosta, J González, J. L. 2000. Enraizamiento de Estacas Bouganvillea glabra Choisy. Agrícola Vergel.

Arrate Lacalle. 2007. Antioxidantes en alimentación: diferentes formas de expresar su actividad antioxidante. Tipos de unidades y métodos de análisis. Barcelona.

Astray, G., J. Mejuto, R. Rial, C. González and J. Simal. 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. FoodHydrocolloids. 1631-1640.

Attoe, E.L. y von Elbe, J.H. 1981. Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. Journal of Food Science. 46, 1934-1937.

Attoe, E.L. y von Elbe, J.H. 1985. Oxygen involvement in betanine degradation: effect of antioxidants. Journal of Food Science. 50, 106-110.

Aurstad K. y DahleH. K. 1973. The effect of heath treatment UV and gamma radiation on some beet root pigments, Z. Lebensm. Unters-Forsch.

Ayala K., Beltrán M. C. 2007. Determinación e Identificación Parcial del Contenido de Pigmentos Betaláinas en la Pulpa de Cuatro Variedades de PitayaStenocereusgriseus H. Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos. IX Congreso de ciencia de los alimentos y v foro de ciencia y tecnología de alimentos. 252-259.

Azeredo, H.M.C. 2008.Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. International Journal of Food Science & Technology. 2365–2376.

Badui, Dergal S. 1993. Química de los alimentos. Editorial Pearson Educación, 3ª Ed. México. 377-405, 438-439.

BaduiDergal S. 2006. Química de los alimentos. Editorial Pearson Educación. 4ta Ed. México. 402–432.

Bôhm, h. and Rink, E. 1988.Betalains. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants. Academic Press, New York. 449-463.

Borgogna, M.; Bellich, B.; Zorzin, L.; Lapasin, R. and Cesàro, A. 2010. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterization of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*. 416-423.

Brad-Williams W., Cuveller ME., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenswiss Technol – Food Science and Technology*. 25-30.

Butera, D. Tesoriere, L. Di Gaudio, F. Bongiorno, A. Allegra, M. y Pintaudi, A. M. 2002. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 6895–6901.

Cai, Y. y Corke, H. 2000. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*. 1248–1252.

Castellanos-Santiago E., Yahia K.E. 2008. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 5758-5764.

Castellar, M.R., Obón, J.M., Alacid, M. y Fernández-López, J.A. 2003. Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2772-2776.

Castellar, M.R., Obón, J.M. y Fernández-López, J.A. 2006. The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 122-128.

Cenzano I. 1994. *Color y Colorantes*. Nuevo Manual de Industrias Alimentarias, Madrid. 47-52.

Chan, Eng Seng; Lee, Boon Beng; Ravindra, Pogaku and Poncelet, Denis. 2009. Prediction models for shape and size of calcium-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 63-72.

Chipault J.R. 1962. Antioxidants for food use. In Lunderberg W.O. Autoxidation and antioxidants, Wiley, New York. 477-542.

Clarazo, N. 1998. Las Enredaderas en los Jardines. Edición G. Gilli, S. Argentina, Buenos Aires. 166.

Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R. y Paredes-Lopez, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 173–289.

Desobry, S., Nett, F. y Labuza, T. 1997. Comparison of Spray-drying, Drum-drying and Freeze-drying for b-carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*. 1158-1162.

Drdák M., y Vallová M. 1990. Kinetics of thermal degradation of betanine, *Die Nahrung*. 307-310.

Escamilla Pérez B.E., Moreno Casasola P. 2015. Recopilación Plantas medicinales de La Matamba y el Piñonal, municipio de Jamapa, Veracruz. Instituto de Ecología. 20-21.

Espinoza A.A., Espinoza L.J.J. 2008. Evaluar el crecimiento de estacas de veranera (*bouganvillea glabra choisy*) bajo el efecto de biofertilizante líquido a base de estiércol vacuno. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Departamento de producción vegetal. 3-4.

Fang, Zhongxiang and Bhandari, Bhesh. 2010. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*. 510-523.

Figuroa R., Tamayo J., González S., Moreno G., Vargas L. 2011. Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cáscara de pitahaya (*Hylocereus undatus*). *Revista Iberoamericana de Tecnología*. Vol. 12. 44-50.

Francis, F.J. 1999. "Colorants", en *Practical Guides for the Food Industry*. American Association of Color Chemists. Eagan Press, St. Paul, Minnesota.

Franco Zavaleta, M. 2004. Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de jiotilla(*Escontria chiotilla*) una cactácea subexplotada. Tesis de maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F.

Ge X., Z. Wan, N. Song, A. Fan and R. Wu. 2009. Efficient methods for the extraction and microencapsulation of red pigments from a hybrid rose. *Journal of Food Engineering*. 122–128.

Funami, Takahiro; Fang, Yapeng; Noda, Sakie; Ishihara, Sayaca; Nakauma, Makoto; Draget Kurt I. Nishinari, Katsuyoshi and Phillips, Glyn O. 2009. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*. 1746-1756.

George M., y Abraham T. E. 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan: a review. *Journal of Controlled Release*. 1-14.

Gibbs, B., Kermasha, S., Alli, I. y Mulligan, C. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 213–224.

González, S.J., Muñiz, R., y Valls, B., 2001. Alimentos Funcionales. *Nutrición hospitalaria*. 84-91.

Gordon M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vivo. *Food Antioxidants*, Elsevier, London. 1-18.

Herbach, K.M., Stintzing, F.C. y Carle, R. 2006. Betalain stability and degradation – structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*. 71.

Hernández Jaimes Ma. C. 2009. Encapsulación en nanoemulsiones de extractos de *Equisetum arvense*. 8.

Huang, A. S. y von Elbe, J. H. 1985. Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science*. 1115-1129.

Jackman R. L. and Smit J. L. 1996. Anthocyanins and betalains. In G. F. Hendry, and J. D. Houghton (Eds.), *Natural Food Colorants*. London. 244-309.

Jackman R. L. y Smith D. L. 1996. Anthocyanins and betalains. *Natural Food Colorants*, Ed. Por G.A.F. Hendry y J.D. Houghton. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Escocia.

Kugler F, Stintzing F.C., Carle R. 2007. Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrenaglobosa* L. and *Bougainvillea* sp. By HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Anal Bioanal Chem.* 637-648.

Lee J., Kim H., Jang Y. 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1222-1231.

Loksuwan, J. 2007. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids.* 928-935.

López C.A.F. 2012. Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. 56-60.

López-Martínez L.X., García-Galindo H.S. 2010. Actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de distintas variedades de maíz mexicano. *Nova Scientia Revista de Investigación de la Universidad De La Salle Bajío.* Vol. 2. No. 3. Versión On-line

Lopretti M., Barreiro F., Fernandes I. Damboriarena A., Ottati C., Olivera A. 2007. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. *Publicación anual del laboratorio tecnológico del Uruguay.* 19-23

Lugo Cervantes Eugenia del Carmen. 1998. Aprovechamiento Integral del Chile (*Capsicum annum*) y Pitaya (*Stenocereus queretaroensis*) para la Producción de Colorantes Naturales Rojos Sustituyentes de los Sintéticos. Cooperativa de productores de pitaya de Techaluta Jal. Y CIATEJ.

Mac. Millan, P. 2000. Multiplicación de las Plantas. Ediciones Folio, S. A Mantner. Barcelona, España. 371–373.

Mandujano R. R. R. 2006. Estudio preliminar de los pigmentos presentes en cascara de pitaya (*Stenocereus stellatus*) de la región mixteca. Universidad Tecnológica de la Mixteca. 29.

Marco G.J. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 594-598.

Marmi3n, D. 1984. Handbook of U.S. colorants for foods, drugs and cosmetics. 2a Ed. New York. John Wiley. 466

Marmi3n, D. 1991. Handbook of U.S. Colorants, foods, drugs, cosmetics and medical device. Third edition. Interscience publication.

Mofidi, N.; Aghai-Moghadam, M. and Sarbolouki, M.N. 2000. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. Process Biochemistry. 885-888.

Moßhammer, M.R., Stintzing, F.C. y Carle, R. 2005. Development of a process for the production of a betalain-based colouring food stuff from cactus pear. Innovative Food Science & Emerging Technology. 221– 231.

Moßhammer, M.R., Stintzing, F.C. y Carle, R. 2006. Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear. Innovative Food Science & Emerging Technology. 275– 287.

Murillo M. D. I., Osorio A. A. 2013. Extracci3n y caracterizaci3n de los colorantes presentes en las flores de *bougainvillea glabra* para su aplicaci3n como aditivo en alimentos. Facultad de Qu3mica. 52.

Namiki M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 29, 273-300.

Ojha H, Mishra K, Chaudhury N K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry. 1036-1043.

Parize, A., T. Rozone, I. Costa, V. Fávere, M. Laranjeira, A. Spinelli and E. Longo. 2008. Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. *African Journal of Biotechnology*. 3107-3114.

Parra-Huertas, Ricardo Adolfo. 2010. Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. 5669-5684.

Piatelli, M. 1981. The betalains: structure, Biosynthesis and Chemical Taxonomy. In: Conn, E. E., and the Biochemistry of plants: A Comprehensive Treatise. Vol. 17. Secondary Plant Products, Academy Press, New York. 557-575

Repo de Carrasco R., Encina Zelada C. R. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. Versión impresa ISSN 1810-634X. SciELO Perú.

Rayner P. B., 1993. Food and drink colors from natural sources, *Food Marketing Technol*. 9-10.

Reynoso R., García F., Morales D., González de Mejía E. 1997. Stability of betalain pigments from a cactaceae fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2984–2988.

Robert, P., Carlsson, R.M., Romero, N. y Masson L. 2003. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from rosamosqueta (*Rosa rubiginosa*) oleoresin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1115-1120.

Roginsky V., y Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 235-254.

Sánchez G. N. 2006. Extracción y caracterización de los principales pigmentos del *Opuntia jocoostec.v.* (xoconostle). Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada Instituto Politécnico Nacional. 24, 28-32, 36.

Santinho, A.J.P., Ureta, J.M., Freitas, O. y Pereira N.L. 2002. Physicochemical characterization and enzymatic degradation of casein microcapsules prepared by aqueous coacervation. *Journal of Microencapsulation*. 549-559.

Sapers, G. M. y Hornstein, J. S. 1979. Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *Journal of Food Science*. 1245-1248.

Schwartz, J.A. y Lorenzo, T.V. 1990. "Chlorophylls in Foods", *Crit. Rev. Food Sci. Technol.* 29.

Silveira, M., Monereo, S., y Molina B. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos? *Revista Española de Salud Pública* 317-331.

Souza, T.C.R., Parize, A.L., Brighente, I.M.C., Fávere, V.T. y Laranjeira, M.C.M. 2005. Chitosan microspheres containing the natural urucum pigment. *Journal of Microencapsulation*. 511-520

Stintzing, F., Herbach, K., Moßhammer, M., Carle R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh C. y Felker, P. 2005. Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 442-451.

Strack D., Steglich W., Wray V. 1993. Betalain. In: *Methods in plant Biochemistry* vol. 8, Academic Press Orlando. 421-450.

Sussane H., Sabine R., Jorg W.M., Víctor W., Manfred N. y Bieter S. 1999. Betacyanins from the bracts of *Bougainvillea glabra*. *Phytochemistry*. 361-767.

Tetlow I., J.M.K., Morell and M. J. Emes. 2004. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J. Exp. Bot.* 2131-2145.

Tovar del Rio J. 2013. Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA, Facultad de Tecnología, Escuela de Tecnología Química, Pereira.

Trejo Márquez Ma. A., Pascual Bustamante S. 2010. Taller Multidisciplinario de Procesos Tecnológicos de Frutos y Hortalizas. Práctica 4 Evaluación de capacidad antioxidante y determinación de fenoles totales para frutos. 10-11

UGAZ, O. 1997. Colorantes Naturales. Perú. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 274.

Von Elbe, J.H., Maing, I.Y. y Amundson, C.H. 1974. Color stability of betanin. Journal of Food Science. 334-337

Von Elbe, J.H. 1975. Stability of Betalains as Food Colors. Food Technol. 42-46.

Von Elbe, J.H. 1977. Current Aspects of Food Colorants, Furia.T., Ed., CRC Press, Cleveland, OH. 29-39.

Wang, J.P., Zhao, X.P., Guo, H.L. y Zheng Q. 2004. Preparation of microcapsules containing two-phase core materials. Langmuir. 10845-10850.

Wagner, L. y Warthesen, J. 1995. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. Journal of FoodScience. 1048-1053.

Wettasinghe, M., Bolling, B., Plhak, L., Xiao, H., & Parkin, K. (2002). Phase II enzyme-inducing and antioxidant activities of beetroot (*Beta vulgaris* L.) extracts from phenotypes of different pigmentation. Journal of agricultural and food chemistry. 6704-6709.

Yáñez-Fernández, J., Salazar-Montoya, J.A., Chaires-Martínez, L., JiménezHernández, J., Márquez-Robles, M. y Ramos-Ramírez, E.G. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Avance y Perspectiva. 313-319.

CAPÍTULO 11

ANEXOS

Anexo 1 Determinación de Fenoles Totales

Se realizó una solución de carbonato de sodio anhidro 20% p/v pesando 20 g de carbonato de sodio anhidro y disolviéndolos en 80ml de agua destilada hirviendo, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, después de 24 horas se filtró y aforó a 100 ml con agua destilada; para la curva patrón se preparó una solución patrón de ácido gálico 0.1 mg/ml, para la cual se pesaron 0.005 g de ácido gálico, se disolvió en 1 ml de etanol y se aforó a 50 ml con agua destilada; para la realización de la curva patrón se realizaron diferentes diluciones de la solución patrón de ácido gálico y se siguió la siguiente tabla:

No. De tubo	Ác. Gálico (mg/ml)	Ácido Gálico (µl)	Agua destilada (µl)	Reactivo Folin-Ciocalteu (µl)	Agitar y dejar reposar	Na ₂ CO ₃ (µl)	Agua destilada (µl)	Agitar y dejar reposar	Leer en espectro
Bco	0	0	200	100	8 min	200	1500	30 min	765 nm
1	0.02	40	160						
2	0.04	80	120						
3	0.06	120	80						
4	0.08	160	40						
5	0.10	200	0						

Tabla 4 Procedimiento para la realización de la curva patrón de Fenoles Totales

Se adicionaron en los tubos de ensaye la solución de ácido gálico, el agua destilada (para obtener las concentraciones deseadas de ácido gálico) y el reactivo de Folin-Ciocalteu, se homogeneizó y se dejó reposar 8 minutos en la obscuridad, posteriormente se le agregó la solución de carbonato de sodio, el agua destilada y se homogeneizo, se dejó reposar 30 minutos a 40 °C, o una hora a temperatura ambiente en la obscuridad y por último se leyó la absorbancia a una longitud de 765 nm.

$$\text{Ácido gálico (mg/ml)} = ((D.O. + b)/m) * FD$$

Donde

b = ordenada al origen

m = pendiente

FD = factor de dilución

Anexo 2 Cuantificación de betalainas

- 1.- Calibración del equipo
- 2.- Medición de la muestra a ambas longitudes de onda (483 nm para betacianinas y 535 para betaxantinas)
- 3.- Realización de los cálculos utilizando la siguiente fórmula:

$$BC \text{ o } BX \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{(A)(DF)(MW)(vd)}{(\epsilon)(L)(WD)}$$

Dónde:

A= absorbancia a 483 o 535 nm

DF= factor de dilución

MW= peso molecular (550g/mol para la betacianina y 308 g/mol para la betaxantina)

vd= volumen total del extracto

ϵ = coeficiente molar (60,000 L/molcm para la betacianina y 48,000 L/molcm para la betaxantina)

L= Longitud de la celda (1 cm)

WD= peso de la muestra

Anexo 3 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH

- 1.- Se preparó una solución del radical DPPH* (0.025 g/L) en metanol y se protegió con papel aluminio.
- 2.- Se tomaron 3.9 ml de la solución DPPH* y se colocaron en un tubo de ensayo cubiertos con papel aluminio para protegerlos de la luz.
- 3.- Posteriormente se agregaron al tubo de ensayo 0.1 ml de la muestra (extracto), se realizó lo mismo con todas las muestras.
- 4.- Después se agitaron vigorosamente los tubos de ensayo utilizando un VortexThermolyne Maxi Mix II y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente durante un lapso de tiempo de 30 minutos.
- 5.- Así mismo se preparó un blanco con 3.9 ml de solución DPPH*
- 6.- Transcurridos los 30 minutos se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm, calibrando el espectrofotómetro con metanol.
- 7.- Por último se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula mostrada a continuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

Donde:

Ab= absorbancia del blanco a 515 nm

Am=absorbancia de la muestra a 515 nm

Para la curva patrón se realizó el mismo procedimiento usando como antioxidante TROLOX (12 µM-1.2mM).

Anexo 4 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS

- 1.- Se preparó una solución stock de ABTS 7mM en metanol y se protegió de la luz con papel aluminio.
- 2.- Además se preparó una solución de persulfato de potasio 140mM en agua.
- 3.- Para la formación de los radicales se mezclaron 5ml de la solución ABTS con 88µl de la solución de persulfato de potasio y se dejaron reposar 12 horas.
- 4.- Transcurrido el tiempo de reposo se diluyó la solución hasta obtener una absorbancia de 0.74 a una longitud de onda de 734 nm.
- 5.- Se tomaron 3.0 ml de la solución ABTS y se colocaron en un tubo de ensaye cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz.
- 6.- Posteriormente se agregaron al tubo de ensaye 0.1 ml del extracto y se agitaron en un VortexThermolyne Maxi Mix II.
- 7.- Después de agitarlos se mantuvieron los tubos en la obscuridad a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 8.- Se preparó un blanco con 3.0 ml de solución ABTS
- 9.- Consecuentemente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm, calibrando el espectrofotómetro con metanol.
- 10.- Se obtuvo el porcentaje de inhibición, el cual fue calculado con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

Donde:

Ab= absorbancia del blanco a 734nm

Am=absorbancia de la muestra a 734nm

Para la curva patrón se realizó el mismo procedimiento usando como antioxidante TROLOX (1mM-0.01mM).