



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“PIGMENTOS BIOACTIVOS DE *Cosmos bipinnatus*
MICROENCAPSULADOS POR LIOFILIZACIÓN”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ EDUARDO GALLARDO SÁNCHEZ

ASESOR

DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE

COASESORA

DRA. MA. DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES



2023

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Capítulo 1. Marco teórico	6
1.1 Colorantes en la industria	7
1.1.1 Colorantes sintéticos.....	7
1.1.2 Pigmentos vegetales	7
1.1.2.1 Clasificación	8
1.1.2.1.1 Liposolubles.....	8
1.1.2.1.2 Solubles en agua	8
1.1.2.2 Extracción	9
1.1.2.2.2 Métodos convencionales	9
1.1.2.2.1 Nuevos métodos	10
1.1.3 Colorimetría	11
1.1.4 Espectrofotometría UV-vis.....	13
1.2 <i>Cosmos bipinnatus</i>	14
1.2.1 Pigmentos bioactivos de <i>C. bipinnatus</i>	15
1.3 Microencapsulación	15
1.3.1 Agentes encapsulantes	15
1.3.1.1 Maltodextrina	16
1.3.1.2 Goma arábica	16
1.3.2 Técnicas de microencapsulación.....	16
1.3.2.1 Secado por aspersión	16
1.3.2.2 Secado por enfriamiento	17
1.3.2.3 De lecho fluidizado	17
1.3.2.4 Por liofilización	18
Capítulo 2. Objetivos	20
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos particulares	21
Capítulo 3. Hipótesis.....	22
Capítulo 4. Materiales y métodos	24
5.1 Recolección y procesamiento de muestra	25
5.2 Extracción de pigmentos bioactivos a partir de biomasa seca.....	25
5.3 Obtención de pigmento	25
5.4 Cuantificación de color.....	25
5.5 Caracterización fitoquímica parcial del pigmento acuoso	25
5.5.1 Cuantificación de fenoles.....	25
5.5.2 Cuantificación de flavonoides	26
5.5.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas	26

5.5.4 Determinación de contenido de antocianinas poliméricas	26
5.5.5 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH	26
5.5.6 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS	26
5.6 Microencapsulación del pigmento acuoso	27
5.7 Análisis de microcápsulas.....	27
5.7.1 Microscopía óptica.....	27
5.7.2 Eficiencia de microencapsulación	27
5.7.3 Determinación de contenido de humedad	28
5.7.4 Densidad aparente.....	28
5.7.5 Cinética de liberación.....	28
5.8 Análisis estadístico	28
Capítulo 6. Resultados y discusión.....	29
6.1 Extracción de pigmentos bioactivos a partir de <i>C. bipinnatus</i>	30
6.2 Suspensión del extracto	30
6.2.1 Análisis de color del extracto	31
6.2.2 Caracterización fitoquímica del extracto	31
6.3 Microencapsulación del extracto.....	33
6.3.1 Rendimiento de encapsulación.....	34
6.3.2 Densidad aparente.....	34
6.3.3 Determinación de contenido de humedad	35
6.3.4 Eficiencia de microencapsulación	35
6.3.5 Microscopía óptica.....	36
6.4 Cinética de liberación.....	37
6.5 Comparación de color de las tres formulaciones	44
6.6 Cinética de liberación a tres temperaturas.....	45
6.7 Comparación de color de M-GA a tres temperaturas.....	51
Capítulo 7. Conclusiones	54
Capítulo 8. Perspectiva	56
Capítulo 9. Referencias	58
Capítulo 10. Anexos.....	65
Anexo 1. Cuantificación de fenoles totales	66
Anexo 2. Determinación de flavonoides totales.....	67
Anexo 3. Determinación de antocianinas monoméricas.....	69
Anexo 4. Determinación de color polimérico.....	69
Anexo 5. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH	70
Anexo 6. Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS.....	72

Anexo 7. Homogeneización y liofilización para la generación de microcápsulas.....	74
Anexo 8: Concentración de fenoles obtenidos de la cinética de liberación	75
Anexo 9: Concentración de antocianinas obtenidas de la cinética de liberación	75
Anexo 10: Concentración de antioxidantes obtenidos de la cinética de liberación	76
Anexo 11: Concentración de fenoles obtenidos de la cinética de liberación a distintas temperaturas	76
Anexo 12: Concentración de antocianinas obtenidas de la cinética de liberación a distintas temperaturas	77
Anexo 13: Concentración de antocianinas obtenidas de la cinética de liberación a distintas temperaturas	77

Resumen

Dentro de la industria alimentaria, el color es uno de los atributos más importantes, al ser la primera señal visible que percibe el consumidor, es asociado con el sabor, inocuidad y valor nutricional. Debido a la alta demanda que está teniendo la sustitución de insumos sintéticos por naturales en la industria alimentaria por parte del consumidor, actualmente se busca que los componentes alimenticios, incluidos los colorantes, sean de fuentes vegetales los cuales son considerados inocuos para la salud humana y amigables con el ambiente. Uno de los pigmentos vegetales más utilizados en la industria para coloraciones rojas y púrpuras son los denominados antocianinas, grupo de compuestos encontrados en una gran variedad de frutos y flores, entre ellos *Cosmos bipinnatus*, esta especie de planta se caracteriza por tener una variante de flor púrpura con gran concentración de dichos pigmentos. Uno de los problemas de los pigmentos vegetales, en comparación con los colorantes sintéticos, es que son menos estables, perdiendo color bajo diversas condiciones comunes por las que pasa un alimento, una técnica eficiente para la protección de estos es la microencapsulación, la cual consiste en el uso de materiales de pared para envolver el material, generando una barrera física que lo protege de todo lo exterior que pueda afectar su estructura o propiedades. La microencapsulación por liofilización es una técnica no agresiva que logra generar microcápsulas exitosas de pigmentos vegetales.

En el presente trabajo, con el objetivo de preservar las características bioactivas de un pigmento obtenido a partir de la extracción de pétalos de *Cosmos bipinnatus*, dicho extracto se microencapsuló por liofilización, evaluando la eficiencia de la protección mediante pruebas fisicoquímica y realizando análisis fitoquímicos.

Los pétalos de *C. bipinnatus* fueron procesados y pulverizados, este polvo fue tratado con solvente hidroalcohólico para realizar una extracción por maceración, asistida por ultrasonificación, obteniendo así un extracto con poder tintóreo. El extracto fue resuspendido en agua para hacer medición de fenoles, flavonoides, antocianinas monoméricas, color polimérico, capacidad antioxidante por DPPH y ABTS, y análisis de color, posteriormente se microencapsuló empleando tres tratamientos, en el primero se usó maltodextrina como material de pared en una proporción 70% extracto - 30% maltodextrina, en el segundo se usó 70% extracto - 30% goma arábiga y en el tercero se usó una proporción 70% extracto - 15% maltodextrina - 15% goma arábiga, las mezclas fueron liofilizadas y se obtuvo un polvo de microcápsulas. Las microcápsulas obtenidas con los tres tratamientos fueron colocadas a 25°C en agua destilada durante 60 minutos, se tomaron alícuotas de la liberación del extracto cada 5 minutos y se midieron fenoles, antocianinas monoméricas, capacidad antioxidante por ABTS y color, además de registrar el color al final de la liberación, posteriormente se eligió el tratamiento más representativo y se cambió la condición de temperatura, repitiendo la liberación y las mismas mediciones ahora a 4°C y a 65°C.

La extracción hidroalcohólica permitió extraer exitosamente metabolitos bioactivos de los pétalos de *C. bipinnatus*, obteniendo cantidades óptimas de fenoles (95.05 ± 0.51 mg EAG / g

peso seco), flavonoides (52.40 ± 3.20 mg EQ / g peso seco), antocianinas monoméricas (3.96 ± 0.22 mg Cyn-3-glu /g peso seco), metabolitos antioxidantes (7.30 ± 1.82 y 98.85 ± 6.84 mg ET / g peso seco con DPPH y ABTS respectivamente) y color ($L= 17.94 \pm 0.59$, $a^*= 23.60 \pm 3.03$, $b^* = 4.10 \pm 0.35$), para su uso en microencapsulación. Se obtuvieron rendimientos de encapsulación con valores mayores al 80%, valores de densidad < 0.5 g / mL, humedad $<5\%$, y eficiencias de microencapsulación con valores mayores a 80%. Los tres materiales de pared, maltodextrina, goma arábica y su combinación utilizados en los microencapsulados permitieron conservar las características de los pigmentos bioactivos por igual, no habiendo diferencias significativas entre los resultados principales de los tratamientos. En cuanto a los cambios de temperatura, se encontró que las características fisicoquímicas de los pigmentos bioactivos microencapsulados se conservan de mejor manera a 4 y 25 °C en comparación con 65 °C.

Introducción

El color es uno de los atributos más importantes en un producto alimenticio, al ser el primer estímulo sensorial que percibe el consumidor, este factor será vital para determinar su calidad, además de ser asociado con el sabor, inocuidad y valor nutricional (Juric et al. 2020). En la industria alimentaria son utilizados cuatro grupos de pigmentos naturales: antocianinas para coloración roja, azul y púrpura, betalainas para rojo, clorofila para verde y carotenoides para amarillo, naranja y rojo. La estabilidad de los pigmentos naturales dependerá de una combinación de factores ambientales y químicos, tales como pH, presencia de iones, exposición a la luz, temperatura, y oxígeno (Juric et al. 2020).

La clorofila, los carotenoides y flavonoides son los principales pigmentos de las plantas terrestres, los dos últimos son responsables del color de la mayoría de las flores (Iwashina, 2014). Se ha reportado que dentro de las propiedades de algunas especies vegetales se encuentra la capacidad de fungir como antioxidantes (Jang et al. 2008), esta capacidad antioxidante es principalmente otorgada por compuestos fenólicos, grupo de compuestos entre los que se encuentran los flavonoides (Wang et al. 2019), además, se ha observado que la actividad antioxidante de una planta está relacionada directamente con su contenido en fenoles (Bijani et al. 2021). Los flavonoides representan una alta variedad de metabolitos secundarios, de los cuales las antocianinas son la clase más representativa, teniendo una gran gama de colores resultantes de su síntesis (Holton et al. 1995), se han descubierto más de 540 tipos de antocianinas en la naturaleza (Wrolstand et al. 2005).

El uso de pigmentos de origen natural en la industria alimenticia se está volviendo muy demandado debido a que los consumidores cada vez se preocupan más por las implicaciones de salud que los colorantes artificiales conllevan, sin embargo, el uso de estos pigmentos naturales se ve limitado debido a su alta inestabilidad molecular, a un costo de manufactura mayor en comparación con los sintéticos, a la necesidad de una mayor concentración para lograr una coloración adecuada y a la menor cantidad de matices que hay con esta opción (Juric et al. 2020).

Cosmos bipinnatus es una especie de planta perteneciente a la familia Asteraceae, cuenta con una floración anual, presenta inflorescencia con pétalos color violeta, blanco, rosa o lavanda, nativa de México y Sudamérica (Saleem et al. 2017), su principal componente activo son los flavonoides (Bijani et al. 2021).

Cuando un pigmento natural es procesado para ser utilizado en alimentos, además de que su estabilidad se ve afectada por las condiciones anteriormente mencionadas, también influirán las condiciones de almacenamiento y los materiales con los que se combine (grasas, proteínas, humedad, etc.), existen diversos métodos para estabilizar este tipo de pigmentos, los más utilizados y sencillos de realizar son los métodos de encapsulación, los cuales permiten la separación física de las moléculas del pigmento con el ambiente externo, generando una barrera, y posteriormente liberar el compuesto de manera controlada bajo condiciones desencadenantes (Juric et al. 2020).

La encapsulación se define como un método de preservación de las características fisicoquímicas, biológicas y funcionales de determinado compuesto, evitando su degradación a través de una barrera, reduciendo reacciones con la luz, oxígeno, temperatura y agua (Desai et al. 2005), una encapsulación es lograda cuando un compuesto activo ya sea líquido, sólido o gas es introducido dentro de una matriz o sistema polimérico, estos compuestos utilizados para generar la barrera, son referidos como agentes encapsulantes o material de pared (Robert et al. 2015).

Capítulo 1. Marco teórico

1.1 Colorantes en la industria

Un aditivo de color alimenticio es cualquier colorante, pigmento o sustancia que agrega color a algún alimento de interés, y son agregados en algún momento del proceso de fabricación (Amchova et al. 2015). Los principales objetivos para su uso son, la compensación de pérdida de color durante algún paso del proceso, la mejora del color natural para volver a la comida más llamativa, proveer de color a productos totalmente incoloros, o permitir a los consumidores identificar visualmente productos con clasificación de acuerdo con este parámetro (López et al. 2023). Los colorantes alimenticios pueden ser clasificados de diferentes maneras, de acuerdo con su origen, solubilidad, tipo de cobertura, etc. De acuerdo con su origen, pueden ser divididos en naturales, semisintéticos y sintéticos (Amchova et al. 2015). Los colorantes naturales son aquellos obtenidos de fuentes vegetales, bacterianas, fúngicas, o algún otro material proveniente de la naturaleza, sin embargo, estos son poco estables; también existen colorantes producidos por síntesis química, con estructura igual o similar a los naturales. Los colorantes sintéticos son producidos por síntesis química, pero a diferencia de los colorantes semisintéticos, estos no son encontrados naturalmente, son obtenidos de productos de aceite altamente purificados, generalmente tienen un color más intenso y permanente. Existen diversas medidas regulatorias que rigen a este tipo de aditivos, la principal, perteneciente a la unión europea, pero utilizada en casi todo el mundo, es el Codex alimentario, dentro de la cual se encuentra el comité CCFAC (Codex Committe on Food Additives and Contaminants), el cual se enfoca en contaminantes y aditivos alimenticios, dando recomendaciones de niveles máximos permitidos para su uso en alimentos, además, también son utilizados los estudios NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect level), donde se determina la cantidad mínima necesaria de una sustancia para no generar efectos adversos en la salud, o el valor ADI (Acceptable Daily Intake), el cual indica la cantidad de aditivo en mg por peso corporal que puede ser consumido por día sin presentar un riesgo a la salud (Amchova et al. 2015).

1.1.1 Colorantes sintéticos

Los principales colorantes sintéticos utilizados en la industria alimentaria son los pertenecientes a los colorantes azoicos (colores brillantes), xantenos, anilinas y antraquinónicos, estos son muy utilizados por sus propiedades de color, uniformidad, estabilidad y bajo costo (El-Wahab et al. 2013). Sin embargo, estos tienen diversas afectaciones a la salud, por ejemplo, algunos estudios han determinado que los colorantes azoicos en altas exposiciones son cancerígenos (Feng et al. 2012), aumentando la probabilidad de este padecimiento en el intestino, o el colorante eritrosina, del grupo de los xantenos, el cual se concluyó que tiene efectos negativos en la glándula tiroidea (Jennings et al. 1990).

1.1.2 Pigmentos vegetales

Los pigmentos vegetales son metabolitos secundarios producto del metabolismo, fotosíntesis, desarrollo, defensa y protección de una gran variedad de plantas (López et al. 2013), los principales pigmentos utilizados en la industria son carotenoides, clorofilas, betalainas y

antocianinas, estos tipos de colorante tienen la ventaja de ser poco o cero dañinos para el ambiente y la salud humana, comparados con sus antagonistas sintéticos, siendo que su consumo ha sido asociado con la disminución en el riesgo de desarrollar diversas enfermedades en humanos (Gosh et al. 2022), además, su fuente de obtención puede ser una solución a los problemas de residuos de la agricultura, siendo estos una pieza clave en la obtención de dichos pigmentos, reduciendo las dificultades ambientales de su manejo. Este tipo de pigmentos, sin embargo, cuentan con una inestabilidad química, limitando sus aplicaciones en la industria, viéndose afectados por pH, temperatura, luz y oxígeno, volviendo su incorporación a alimentos un reto de estabilización, siendo la encapsulación el método más empleado para lograrlo. Los pigmentos vegetales más empleados en la industria alimentaria debido a su biodisponibilidad y a sus aportaciones a la salud, son clorofilas, carotenoides, betalaínas y antocianinas. Este tipo de colorantes pueden ser clasificados dependiendo de su solubilidad, teniendo liposolubles, en los cuales se encuentran las clorofilas y carotenoides, y los acuasolubles compuestos principalmente por antocianinas y betalainas.

1.1.2.1 Clasificación

1.1.2.1.1 Liposolubles

1.1.2.1.1.1 Carotenoides

Los carotenoides son el segundo pigmento vegetal más abundante, son metabolitos hidrofóbicos con alta solubilidad en aceites, tienen un rol vital en mecanismos de fotoprotección contribuyendo en la absorción de luz durante la fotosíntesis (López et al. 2013). Este colorante tiene una absorción de luz en longitudes de onda de 400-500 nm, causando coloraciones anaranjadas, amarillas y rojizas, son encontrados en fuentes bióticas como plantas, microalgas, bacterias y hongos, son divididos de acuerdo con su grupo funcional en carotenos, los cuales contienen solo su cadena de carbono funcional y B-carotenos, los cuales tienen oxígeno como grupo funcional (Gosh et al. 2022).

1.1.2.1.1.2 Clorofilas

Las clorofilas son el grupo más grande de pigmentos vegetales que existe, son encontradas en algas, plantas y cianobacterias, y son componente clave en la fotosíntesis, en el proceso catabólico de la senescencia en hojas y madurez en frutos (Gosh et al. 2022). Las clorofilas a y b son las principales, las primeras juegan un rol principal en la fotosíntesis envolviendo oxígeno, las segundas se encargan de asimilar la luz azul en plantas, además, este tipo de pigmentos contienen actividad antioxidante y antimutagénica (López et al. 2023), sin embargo, su estabilidad depende principalmente del pH y la temperatura.

1.1.2.1.2 Solubles en agua

1.1.2.1.2.1 Betalaínas

Las betalaínas son aquellos pigmentos encargados de dar coloraciones rojas y amarillas a las plantas, dentro de los pigmentos vegetales son los que poseen una mayor capacidad antioxidante (López et al. 2023), pueden ser clasificadas de acuerdo con su estructura química, en

betaxantinas, amarillo-naranja, y en betacianinas, rojo-violeta, y dependiendo de la pigmentación de la parte de la planta estas se encuentran en diversas combinaciones (Gosh et al. 2022), son acumuladas en vacuolas (Sadowska-Bartosz et al. 2021).

1.1.2.1.2.2 Antocianinas

Las antocianinas son el pigmento más grande del grupo de flavonoides, otorgando coloraciones rojas, azules y púrpuras en las plantas, esta coloración es dependiente del pH (Boo et al. 2012), teniendo participación clave en la propagación vegetal y en los mecanismos de defensa (Gosh et al. 2022). Las antocianinas más comunes encontradas en plantas son cianidinas, peonidinas, pelargonidinas, delphinidinas, pentunidinas y malvidinas, las cuales tendrán diferentes metilaciones en sus grupos hidroxilo en su cadena B, teniendo que generalmente las metilaciones incrementan las tonalidades rojas y la estabilidad, mientras que las hidroxilaciones incrementan las tonalidades azules, pero disminuyen la estabilidad (López et al. 2023). Se ha demostrado que las antocianinas tienen efectos de protección en cerebro, hígado, riñón, y en el sistema cardiovascular de animales y humanos, además de contribuir al cáncer y en el control de la obesidad (Bendokas et al. 2020).

1.1.2.2 Extracción

Los pigmentos dentro de las plantas representan solo una pequeña porción de sus componentes, también se encuentran compuestos como fibras, carbohidratos, proteínas u otros metabolitos no colorantes; en la industria o investigación, para poder obtener solamente el pigmento deseado existen diversos métodos para extraerlos y purificarlos, basados en la naturaleza química, física y estructural de los mismos o del material vegetal que los envuelve. Estos métodos no son exclusivos para pigmentos vegetales, pueden ser utilizados para otros metabolitos, sin embargo, con modificaciones pueden ser enfocados a cualquier objetivo, y si son aplicados adecuadamente, logran extraer de manera exitosa los pigmentos, con buenos rendimientos y sin degradarlos (Lopez et al. 2023).

1.1.2.2.2 Métodos convencionales

Los métodos convencionales, fueron los primeros ideados para la extracción de compuestos vegetales, se caracterizan por ser simples, de bajo costo y fáciles de llevar a cabo, requieren de un solvente para obtener el colorante, los más utilizados son agua, etanol y metanol, para extraer compuestos polares y solubles en agua, mientras que hexano, acetona y ácido trifluoroacético son los utilizados para extraer pigmentos lipofílicos (López et al. 2023).

1.1.2.2.2.1 Maceración

El proceso de maceración consiste en la pulverización y mezclado de la muestra con un solvente, agitación y finalmente filtración del líquido, el sólido es centrifugado o prensado y se repite la extracción con el solvente hasta que este resulte incoloro (Azmir et al. 2013). Esta técnica tiene las ventajas de ser de bajo costo, fácil de realizar, y no genera calor, algo conveniente para cuando se trabaja con pigmentos termosensibles.

1.1.2.2.2 Extracción de Soxhlet

Este método comienza con la pulverización de la muestra, esta es depositada en bolsas porosas o filtros de celulosa, las cuales son puestas en el aparato de Soxhlet, los solventes son calentados en un matraz inferior, estos vaporizan en el compartimento donde se encuentra la muestra, condensan y gotean de nuevo en el matraz, siendo este un proceso circular (Patel et al. 2021). La ventaja de esta técnica es que requiere una cantidad mucho menor de solvente en comparación con la maceración, sin embargo, al requerir de calor para la evaporación lo vuelve una desventaja al existir la probabilidad de degradar los pigmentos sensibles al calor.

1.1.2.2.3 Extracción por CO₂

Esta técnica es una alternativa al uso de solventes orgánicos, se basa en el cambio de estado físico del CO₂ con presión y temperatura, utilizando su estado líquido, o supercrítico, como solvente, este solvente es eliminado regresando el dióxido de carbono a su estado gaseoso (Sakai et al. 2020)

1.1.2.2.1 Nuevos métodos

Los métodos convencionales, a pesar de ser baratos, fáciles de usar y de carácter simple, tienen el problema de necesitar volúmenes grandes de solvente y de requerir tiempos largos de proceso para obtener buen rendimiento, es por esto, que se han ideado metodologías más avanzadas para extraer un pigmento, las cuales buscan reducir los tiempos de extracción, utilizar cantidades mínimas o nulas de solventes, e incrementar el rendimiento y la calidad, por estas razones también son conocidos como tecnologías verdes de extracción (López et al. 2023).

1.1.2.2.2.1. Extracción asistida por ultrasonificación

En la ultrasonificación, la muestra sumergida en un solvente es sometida a ondas de ultrasonido, estas lo que harán es generar microburbujas que crecen y colapsan de manera agresiva, haciendo que las paredes celulares se rompan liberando el contenido, posteriormente el residuo celular es eliminado, ya sea por centrifugación o filtración (Nirmal et al. 2021), esta técnica reduce la cantidad de solvente empleado e incrementa los rendimientos de extracción.

1.1.2.2.2.2 Tecnología de alta presión

Esta tecnología se basa en la aplicación de presión transmitida instantánea y uniformemente a la muestra, sin gradiente de presión, estas presiones altas generan un daño a la célula, lo cual hace que el contenido se difunda a través del solvente (Luzardo-Ocampo et al. 2021).

1.1.2.2.2.3 Extracción por fluido supercrítico

Esta extracción consiste en la separación utilizando fluidos supercríticos como solventes, empleando la modificación de variables como presión, tiempo, flujo de CO₂, y uso de otros solventes, un ejemplo es el incremento en la presión, esto hará que la densidad de fluido incremente, aumentando a su vez la interacción con el compuesto a extraer (Panja et al. 2018).

1.1.2.2.2.4 Extracción asistida por campo eléctrico

Este método consiste en la aplicación de picos cortos de campos eléctricos de alto voltaje a la muestra, está ubicada entre dos electrodos, modificando así la permeabilidad de la membrana,

estos pulsos al viajar a través de la membrana separan sus moléculas, permitiendo el paso del contenido celular (Sousa et al. 2020).

1.1.3 Colorimetría

El color puede ser definido como la sensación que es experimentada por un individuo cuando ondas dentro del espectro visible (380-770 nm) son percibidas por su retina (Wrolstand et al. 2017). Por otro lado, la colorimetría es un método analítico con la finalidad de clasificar ese color en una escala, empleado desde el inicio del desarrollo de productos con color, actualmente ésta requiere del procesamiento extensivo de datos (Jia et al. 2023). Existen diferentes técnicas y escalas de medición para evaluar el color de un producto. Hablando del análisis de color en productos alimenticios, la variación del color puede ser utilizada para detectar defectos, para clasificar productos con diferentes características o para marcar un estándar del producto (Pathare et al. 2013).

CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) es una comisión internacional que se ha encargado de establecer un espacio de color definido matemáticamente (Pecho et al. 2016), involucrado ampliamente en la colorimetría de alimentos, siendo responsable de introducir los principales sistemas de medición y del concepto diferencia de color (ΔE). El sistema de espacio de color CIELAB es un eje de coordenadas que involucra los valores en coordenadas L (Luminosidad), a^* (Eje rojo-verde) y b^* (eje amarillo-azul), el primer eje mencionado, L, cuenta con valores de 0 a 100, donde 0 es ausencia de luz y 100 es ausencia de oscuridad, a^* y b^* , tienen valores de -128 a 128, donde los valores negativos para el caso de a^* , indican mayor presencia de verde, mientras que para b^* , valores negativos indican mayor presencia de azul, en cambio los valores positivos en a^* indican la presencia de rojo, mientras que para b^* indican amarillo (Konica Minolta, 2023)(Figura 1).

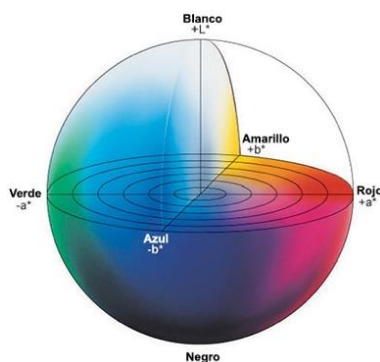


Figura 1. Espacio de color CIELAB (L, a^* , b^*); imagen obtenida de Konica Minolta.

La comparación de color entre muestras es algo realizado desde hace décadas tanto en investigación como en la industria. En la búsqueda por comparar la desviación de las dimensiones (coordenadas) de color de determinada muestra de un estándar, cambio de color de lote a lote, o su cambio con el tiempo, se decidió crear un valor único para medir esta variación de color, el

cual es representado por ΔE , denominado diferencia total de color, y es calculado con la siguiente formula:

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Donde ΔL^* es la diferencia entre las L de las muestras a comparar, Δa^* es la diferencia entre las a^* , y Δb^* es la diferencia entre las b^* (Wrolstad et al. 2017). ΔE solo indica la magnitud de la diferencia de color, sin embargo, no indica la dirección, significando que muestras que presenten el mismo valor de ΔE no necesariamente tienen la misma apariencia visual, además de que no proporciona ningún dato relacionado con el color, no indica cual es más claro, más oscuro, más rojo, más amarillo, etc., para determinar esto se necesitaría analizar por separado las diferencias L, a^* y b^* de manera independiente, siendo un valor establecido para determinar límites de aceptación o rechazo dentro de la industria, o incluso muchas veces para determinar si la diferencia es visualmente notable o no, dependiendo la tonalidad en las que se encuentren las muestras, ya que en tonos purpuras el ojo humano tendrá dificultades para diferenciar muestras con valores ΔE de hasta 5, pero podrá identificar variaciones en escalas de grises con variaciones de ΔE 0.5 (Microgamma. 2017).

ΔE ha sido un parámetro estándar clásico para determinar la diferencia de color entre dos muestras, en donde en el sistema CIELAB, mientras mayor sea la diferencia de su valor mayor será la percepción en el cambio de color (Pecho et al. 2016). La primer formula ΔE fue desarrollada en 1976, siendo denominada CIE76, sin embargo, esta fórmula fue modificada en 1994 (CIE94) debido a que la ΔE de la primera es exacta en un 75% mostrando la diferencia que ve el humano entre dos colores, exagerando la diferencia entre amarillos y comprimiendo la distancia perceptual entre azules, finalmente, en el 2000 se realizó un ligero refinamiento donde se hicieron ajustes adicionales a los colores azules y neutros, y compensaciones de luminosidad (CIE DE2000), siendo una corrección mucho menor que la que hubo entre CIE94 y CIE76 (BCcampus. 2015). La fórmula de CIE DE2000 con los ajustes realizados luce de la siguiente manera:

$$\Delta E_{00} = \left[\left(\frac{\Delta L'}{K_L S_L} \right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C} \right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_H} \right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C} \right) \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_H} \right) \right]^{1/2}$$

Esta fórmula está definida en el espacio de color L, c^* (Croma), h^* (Matiz), estos son calculados a partir de las coordenadas L, a^* , b^* .

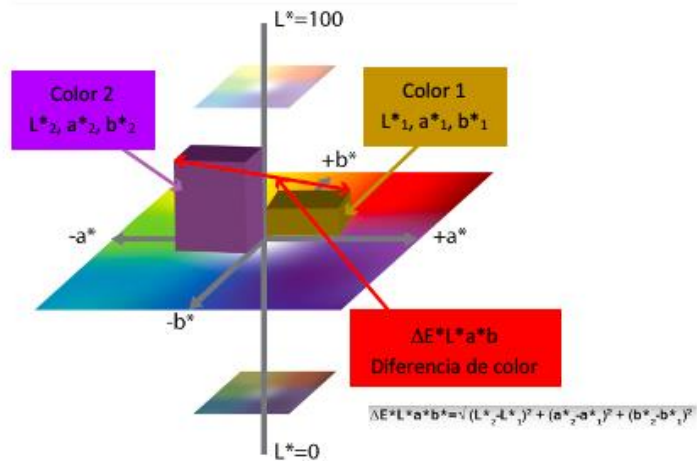


Figura 2. Diferencia total de color (ΔE) en el espacio de color

1.1.4 Espectrofotometría UV-vis

El espectro electromagnético incluye una gran variedad de frecuencias energéticas, las más útiles y comunes para los seres vivos se encuentran dentro del rango de los rayos- γ ($>10^9$) y las radioondas (10^3), dentro de este espectro se encuentra una pequeña región que le pertenece a la región de luz visible. La absorción de luz UV y visible (180-800 nm) sucede con una gran variedad de moléculas, entre ellas moléculas orgánicas, pudiendo emplear esto para su medición y análisis, cuantificando la cantidad de esa absorción con instrumentos especializados, el más común de ellos, espectrofotómetro. El espectrofotómetro UV-vis es empleado en una gran variedad de aplicaciones en campos específicos, pueden ser para uso ambiental, farmacéutico, o en la detección exacta y cuantificación de analitos, tales como compuestos orgánicos y elementos individuales; esta técnica se basa en la medida de la atenuación de la radiación electromagnética por una sustancia capaz de absorberla, usando rangos de espectro de entre 190 a 800 nm, generalmente registrando y utilizando la absorbancia para medir dicha atenuación (Passos et al. 2018). La absorbancia es proporcional a la concentración del analito, así como a la distancia de la luz cuando pasa a través de la muestra, empleando estos factores se emplea una relación conocida como la ley de Beer, escrita de la siguiente manera:

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

Donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de absorbancia molar, b es el largo del recorrido del haz de luz, y c es la concentración del absorbente. La función del detector del espectrofotómetro es convertir la señal de luz en una señal eléctrica, con gran selectividad y poca desviación (Passos et al. 2018).

Existen cerca de 3,000,000 especies vegetales, las cuales cuentan con fitoquímicos de diversas estructuras y propiedades, estos, son divididos en dos grandes categorías, metabolitos primarios y metabolitos secundarios, los primeros son responsables del crecimiento y desarrollo de las plantas, mientras que los secundarios tienen un rol importante en los mecanismos de defensa,

dentro de estos se encuentran compuestos fenólicos y flavonoides, considerados una clase muy importante de metabolitos (Patle et al. 2020). Para poder identificar y cuantificar estos metabolitos es muy común el uso de técnicas espectrofotométricas UV-vis, en donde la absorbancia de estos es registrada y procesada para así poder determinar una concentración.

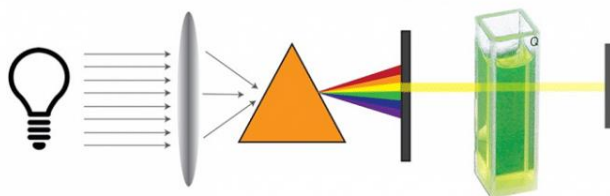


Figura 3. Representación del funcionamiento interno de un espectrofotómetro UV-vis.

1.2 *Cosmos bipinnatus*

Cosmos bipinnatus, conocido coloquialmente como girasol morado, es una especie de planta perteneciente a la familia Asteraceae, cuenta con una floración anual, presenta inflorescencia con pétalos color violeta, blanco, rosa o lavanda, nativa de México y Sudamérica (Saleem et al. 2017). Esta flor es de interés farmacológico, debido a que es usada tradicionalmente como remedio casero contra infecciones bacterianas (Saleem et al. 2017), fiebre, ictericia, dolor de cabeza y como anti-inflamatorio (Jang et al. 2008), además de ser farmacológicamente efectiva contra leucemia e infecciones bacterianas (Olajuyigbe & Ashafa. 2014). Se ha reportado que los flavonoides son los principales compuestos activos en esta planta (Bijani et al. 2021; Wang et al. 2019; Iwashina et al. 2015; Amamiya et al. 2016), razón por la que mantienen una buena capacidad antioxidante, diversos estudios han confirmado esta capacidad antioxidante, además de que previenen daño oxidativo en el DNA (Kaisoon et al. 2012).



Figura 4. Flor de *Cosmos bipinnatus*.

1.2.1 Pigmentos bioactivos de *C. bipinnatus*

El sabor, olor y color característico de las flores es otorgado por la asociación de compuestos volátiles y no volátiles, dentro de los segundos, se encuentran constituyentes químicos como compuestos fenólicos, azúcares y ácidos orgánicos (Fernandes et al. 2019). Existen diversas variedades de *Cosmos bipinnatus*, teniendo flores con diferentes tinciones, blancas, rosas, naranjas y púrpuras principalmente (Jang et al. 2008). Para el caso de la variedad de color púrpura, el principal componente que le otorga su color característico son las antocianinas monoméricas (Oh et al. 2008), dentro de las cuales se encuentra en mayor proporción cianidin – 3- glucósido (Iwashina et al. 2015).

1.3 Microencapsulación

La microencapsulación es definida como una tecnología de empaquetamiento de materiales líquidos, sólidos o gaseosos en cápsulas miniatura selladas que pueden liberar el contenido bajo condiciones específicas (Choudhury et al. 2021). Para el caso del empaquetamiento de alimentos, lo que se busca con la microencapsulación es la protección de partículas de ingredientes, tales como colorantes, acidulantes, saborizantes, antioxidantes, etc. las cuales darán un valor agregado al alimento en algún momento de su proceso de elaboración o consumo, liberándolo a demanda del productor o del consumidor, estas microcápsulas tienen diferentes formas y tamaños que dependerán del material utilizado para envolver y de la técnica para introducir el ingrediente. En la industria alimentaria existen diversos motivos para emplear la microencapsulación en sus productos, y es que esta técnica protege el material introducido de la degradación al reducir su reactividad con el ambiente externo, evita su evaporación, se puede diseñar para que este sea liberado de manera gradual y lenta, o liberado en algún punto del proceso, el sabor del material introducido puede ser enmascarado totalmente por este proceso, o puede ser usado para separar componentes que de otra manera reaccionarían entre sí (Desai et al. 2005). Hay diversas propiedades de las microcápsulas que pueden ser cambiadas para otorgarle diversas características y así ajustarlas a las necesidades buscadas, estas propiedades pueden incluir la composición, al usar en combinaciones distintas los materiales de pared, el mecanismo de liberación, el tamaño de partícula y la forma.

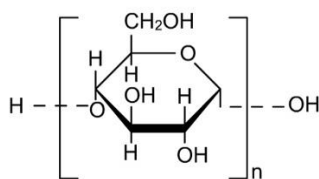
1.3.1 Agentes encapsulantes

Un factor clave al momento de microencapsular es la selección del agente encapsulante, también conocido como material de pared, ya que sus propiedades físicas y químicas, y la proporción en que se use modificará la manera en cómo se comportan las cápsulas a formar, estos materiales son polímeros naturales o sintéticos, y deben cumplir con algunas características para ser denominados como buenos o ideales, las cuales incluyen, buenas propiedades reológicas para un manejo fácil, la habilidad de estabilizar la emulsión o la mezcla formada, no debe reaccionar con las partículas a encapsular, la habilidad de sellar bajo estímulo y mantenerse así, la habilidad de liberar bajo estímulo, proveer protección al núcleo, solubilidad en solventes aceptados por la

industria alimentaria, y ser de bajo costo (Desai et al. 2005), ninguno de los materiales de pared actualmente utilizados cumplen con todas las características anteriormente mencionadas, es por esto que es muy común que sean utilizados en diversas combinaciones o incluso modificados químicamente para que adquieran mejores propiedades físicas y mecánicas. Como se mencionó, las microcápsulas deben de poder ser disrupidas bajo un estímulo específico, estos desestabilizadores que promueven la liberación del material interno varían, de nuevo basado en el agente encapsulante elegido, puede ser un cambio en el pH, estrés mecánico, temperatura, actividad enzimática, tiempo, fuerza osmótica, etc. Las fuentes de donde son obtenidos los materiales de pared utilizados en la encapsulación de alimentos pueden ser clasificadas en categorías dependiendo su composición, estos son carbohidratos (almidón, maltodextrina, ciclodextrina), celulosa (metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa), gomas (agar, alginato de sodio, goma arábica, goma acacia), lípidos y proteínas (gluten, caseína y gelatina) (Cortez et al. 2017).

1.3.1.1 Maltodextrina

La maltodextrina es una mezcla de polisacáridos hidrolizados, obtenidos por reacción enzimática o hidrólisis ácida de almidones, es un polvo blanco soluble en agua e insoluble en alcoholes, a pesar de ser un derivado de la glucosa no tiene sabor dulce, es un producto sin sabor, aunque si es considerada como una buena fuente de energía, es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como excipiente en cápsulas y comprimidos, agente de recubrimiento, o como espesante (Rowe et al. 2009).



maltodextrinas
 $2 < n < 20$

1.3.1.2 Goma arábica

La goma arábica es un extracto vegetal obtenido del árbol Acacia, se trata de un polisacárido con cantidades variables de D-galactosa, L-arbinosa, L-ramnosa, y algunos ácidos derivados, de apariencia es un polvo blanco, se utiliza en la industria alimentaria como emulsionante, encapsulante, espesante, clarificante, etc., (Rowe et al. 2009).

1.3.2 Técnicas de microencapsulación

1.3.2.1 Secado por aspersion

Esta técnica de microencapsulación consiste en la mezcla del material de pared y el material a ser encapsulado para generar una sola solución, la cual será atomizada y distribuida dentro de una cámara, donde se distribuye aire caliente con el objetivo de evaporar el agua contenida en

la mezcla y volverla un sólido, en forma de polvo (Choudhury et al. 2021). Este tipo de encapsulación es la técnica más utilizada en la industria alimenticia, y es utilizada para la estabilización y secado de aditivos y saborizantes, y es que es una técnica flexible, al ser que permite el uso de diversos materiales de pared, adaptable, genera cápsulas de buena calidad, y puede ser escalable muy fácilmente (Desai et al. 2005). Sin embargo, cuenta con algunas desventajas, los materiales de pared utilizados en esta técnica deben ser solubles en agua, al ser este líquido el evaporado para generar los sólidos, y el hecho de usar calor hace que el método sea más efectivo encapsulando algunos tipos de materiales que otros, disminuyendo la calidad del material introducido o de las cápsulas mismas (Santos et al. 2018).

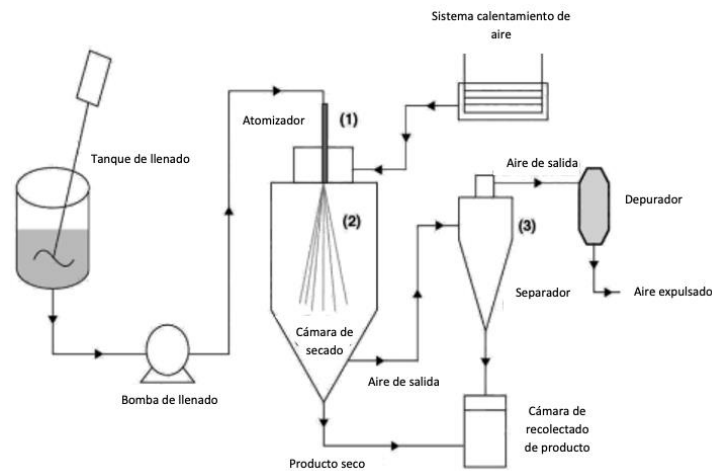


Figura 5. Proceso de encapsulación por secado por aspersión.

1.3.2.2 Secado por enfriamiento

Este tipo de técnica tiene básicamente el mismo fundamento que el secado por aspersión, con la diferencia de que en lugar de distribución de aire caliente existe la distribución de aire frío, donde la mezcla de material de pared y material a encapsular se solidifican generando microgotas dejando un polvo (de Abreu Figueiredo et al. 2022), los materiales de pared utilizados con esta técnica generalmente son aceites vegetales o sus derivados, y al no haber transferencia de masa las esferas generadas son prácticamente perfectas (Desai et al. 2005), sin embargo, suelen ser cápsulas no tan estables generando la expulsión del núcleo durante su almacenamiento (Jenning et al. 2000).

1.3.2.3 De lecho fluidizado

Este tipo de microencapsulación consiste en la suspensión de partículas sólidas a encapsular en una cámara con humedad y temperatura controladas, además de tener un flujo de aire de alta velocidad, dentro de esta cámara el material de pared es atomizado, este material encapsulante puede ser utilizado de dos maneras, fundido o disuelto en solvente evaporable, dependiendo de cómo se use es como se solidificará la mezcla completa, si se usa fundido, se utilizará aire frío para endurecer, y posteriormente, su contenido será liberado con el incremento de temperatura

o con una ruptura física, si se usa disuelto, se utilizará aire caliente para evaporar el solvente, y el contenido será liberado cuando sean disueltos de nuevo en solvente (Desai et al. 2005). La eficiencia de encapsulación de este método depende de parámetros como la tasa de suministro de material de pared, la presión de atomización, la temperatura del aire y su velocidad (Coronel-Aguilera et al. 2015).

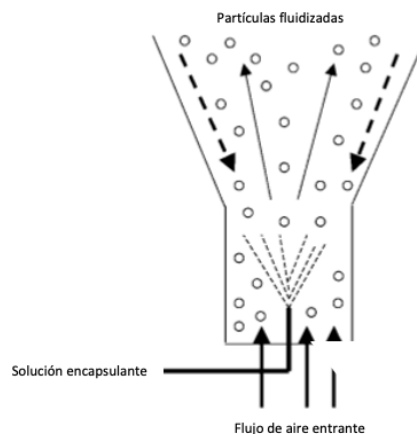


Figura 6. Encapsulación de lecho fluidizado por aspersión desde el fondo.

1.3.2.4 Por liofilización

La microencapsulación por liofilización, también conocida como secado en frío, es un proceso de deshidratación utilizado principalmente para componentes o ingredientes sensibles al calor, es una técnica simple a excepción del periodo largo de secado que requiere, el cual generalmente es de mínimo 20 horas (Desai et al. 2005). El proceso consiste en la mezcla homogénea del o de los materiales de pared con el material a encapsular, esta mezcla es sometida a un proceso de liofilización hasta que esté completamente deshidratada, lo que dará un sólido como resultado, el cual puede ser macerado y tamizado para obtener un polvo con microcápsulas homogéneas en tamaño. La liofilización es una de las técnicas más eficientes para proteger componentes en contra de la descomposición química. Gracias a su proceso de baja temperatura y a la mínima cantidad de humedad que conserva al final, hace que haya una reducción grande en la pérdida de bioactividad (Goncalves et al. 2012), manteniendo en condiciones estables lo que está dentro de las cápsulas, además, de que, al deshidratar el sistema los microorganismos no pueden prosperar gracias a esta falta de agua. La encapsulación de materiales por liofilización ha sido realizada para diversos componentes, se ha determinado que el material encapsulante tiene una gran influencia en la eficiencia, rendimientos y características de las cápsulas, lo materiales de pared más empleados para encapsular por liofilización son quitosano (Deladino et al. 2008; Gonçalves et al. 2013), alginato de sodio (Deladino et al. 2008; Tassinari et al. 2021), proteína de soya (Nogueira et al. 2017; Tassinari et al. 2021), β -ciclodextrina (Gonçalves et al. 2013), xantano (Gonçalves et al. 2013; Tassinari et al. 2021), maltodextrina (Hamid et al. 2020) y goma arábiga (Tassinari et al. 2021), pudiendo ser empleados en combinaciones distintas dependiendo de

cómo interactúan entre sí, de las características deseadas en las microcápsulas y del material a encapsular.

Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Microencapsular metabolitos secundarios presentes en extracto de pétalos de *Cosmos bipinnatus* por medio de liofilización para el mantenimiento de las características fisicoquímicas de sus pigmentos bioactivos.

2.2 Objetivos particulares

- Obtener extractos hidroalcohólicos con poder tintóreo de flores de *Cosmos bipinnatus*.
- Determinar el contenido de metabolitos secundarios, así como la actividad antioxidante de extractos de pétalos de *C. bipinnatus* para su uso en un proceso de microencapsulación.
- Evaluar la protección de los extractos microencapsulados por liofilización con diferentes materiales de pared y temperaturas, a través de la cuantificación de fenoles y antocianinas totales, actividad antioxidante y color.

Capítulo 3. Hipótesis

La encapsulación por liofilización de los pigmentos de *Cosmos bipinnatus* mantendrá su vida útil mediante la conservación del color, de sus propiedades fitoquímicas y antioxidantes.

Capítulo 4. Materiales y métodos

5.1 Recolección y procesamiento de muestra

Se recolectaron flores de girasol morado (*Cosmos bipinnatus*) en el Campus “El Cerrillo” de la Universidad Autónoma del Estado de México, durante los meses de septiembre y octubre del año 2022. Las flores fueron desprovistas de sus pétalos, siendo estos la materia prima a trabajar. Los pétalos fueron seleccionados descartando los dañados o decolorados, posteriormente fueron ultracongelados a -85°C , liofilizados y macerados hasta obtener un polvo fino (biomasa seca), este fue almacenado en frascos ámbar, en oscuridad y a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

5.2 Extracción de pigmentos bioactivos a partir de biomasa seca

Para la extracción del pigmento a partir de la biomasa seca, se implementó un método de extracción por maceración, asistido por ultrasonificación, empleando etanol-agua (80:20) como solvente. La biomasa seca se disolvió en el solvente en una proporción de 165 mg/10 mL, después se colocó en agitación durante 5 minutos previo a una sonicación en un baño ultrasónico a 40°C por 40 min. Posteriormente la muestra se sometió a agitación durante una hora (120 rpm y 40°C), terminado el tiempo se filtró al vacío, este último paso se realizó dos veces para asegurar la eliminación de los sólidos. La parte alcohólica del extracto fue eliminada en rotavapor (IKA RV10). El líquido resultante fue ultracongelado y puesto a liofilizar durante 24 horas, obteniendo así un sólido al cual se le denominó extracto seco.

5.3 Obtención de pigmento

Para obtener un pigmento en forma acuosa, el extracto seco obtenido fue resuspendido en agua en una proporción de 60 mg/10 mL.

5.4 Cuantificación de color

Se determinó el color de la muestra basado en el sistema de espacio de color CIELAB, empleando un colorímetro Konica minolta. Se tomó una alícuota de 9 mL de la muestra y se utilizó el colorímetro para determinar los valores L , a^* y b^* .

5.5 Caracterización fitoquímica parcial del pigmento acuoso

5.5.1 Cuantificación de fenoles

El contenido de fenoles totales (TPC) fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu reportado por Skerget et al. (2005), con ligeras modificaciones. A 200 μL de muestra se le añadieron 100 μL de reactivo de Folin, se homogenizó y puso en reposo por 8 minutos en

oscuridad, posteriormente se añadieron 200 μL de Na_2CO_3 (14 g/100 mL) y 1.5 mL de agua destilada, volviéndose a homogenizar, dejando en reposo durante 60 minutos. A la mezcla de reacción se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en espectrofotómetro. La curva estándar se realizó con ácido gálico. (Anexo 1)

5.5.2 Cuantificación de flavonoides

La cuantificación de contenido de flavonoides se hizo mediante el método reportado por Pękal et al. (2014), con ligeras modificaciones. A una alícuota de 1000 μL de muestra se le agregaron 500 μL de AlCl_3 2% y 500 μL de agua destilada, se homogenizó e incubó por 10 minutos en oscuridad. A la mezcla de reacción se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 425 nm utilizando un espectrofotómetro. Se realizó una curva estándar con quercetina. (Anexo 2)

5.5.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas

Para evaluar el contenido de antocianinas se utilizó el método del pH diferencial reportado por Giusti et al. (2001). Se prepararon dos buffers, uno de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M con valor pH de 1.0, y otro de acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$) 0.4 M con valor pH de 4.5. Se tomaron dos alícuotas de la muestra, una alícuota se diluyó con el buffer pH 1.0 y la segunda con el buffer pH 4.5, posterior a esto se realizó un barrido de 400 a 700 nm en un espectrofotómetro. (Anexo 3)

5.5.4 Determinación de contenido de antocianinas poliméricas

Para determinar la cantidad de color dado por la presencia de antocianinas poliméricas se empleó el método reportado por Giusti et al. (2001). Se preparó una solución de bisulfito de potasio al 20%, se tomaron dos alícuotas de 1400 μL de la muestra, a una se le añadieron 100 μL de solución de bisulfito y a la otra 100 μL de agua destilada, se dejó reposar durante 15 minutos y se realizó un barrido en el espectrofotómetro. (Anexo 4)

5.5.5 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

La determinación de la actividad antioxidante se realizó por dos métodos, el primero fue el método DPPH, descrito por Brand-Williams et al. (1995). Se mezclaron 50 μL de la muestra con 1.95 mL de una dilución de DPPH 0.1 mM, homogenizando y dejando reaccionar por 30 minutos en oscuridad. A la reacción se le midió absorbancia a una longitud de onda de 515 nm utilizando un espectrofotómetro. Se realizó una curva estándar con Trolox. (Anexo 5)

5.5.6 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS

El segundo método para determinar actividad antioxidante fue el de ABTS reportado por Pellegrini et al. (1999), con ligeras modificaciones. Para la preparación de la solución ABTS, se mezclaron 5 mL de ABTS 7 mM con 88 μL de persulfato de potasio 140 mM, dejando esta solución en reposo durante 12 horas en oscuridad. La disolución anterior fue diluida con metanol hasta obtener una absorbancia de 0.740 a 734 nm. Se llevó a cabo una reacción combinando 50 μL de la muestra de extracto con 1.5 mL de disolución de ABTS, se homogenizó y dejó incubando 10

minutos en obscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro. Se realizó una curva estándar con Trolox. (Anexo 6)

5.6 Microencapsulación del pigmento acuoso

Para la microencapsulación del pigmento se utilizó el método de Stoll et al. (2015) con ligeras modificaciones. Se prepararon tres formulaciones, una utilizando maltodextrina como material de pared (30%), otra usando goma arábica (30%), y la tercera formando una combinación de ambos materiales (15% maltodextrina-15% goma arábica), todas usando la resuspensión del pigmento como material a encapsular (70%). El pigmento acuoso fue mezclado con el material de pared disuelto en agua, el cual fue usado en una proporción del 30% p/v, se realizó una homogeneización (IKA T50 digital ULTRA TURAX), la cual consistió en lapsos de 2 minutos y descansos de 1, hasta alcanzar 10 minutos totales homogeneizando o hasta que los materiales estuvieran totalmente dispersos. El homogeneizado resultante fue sometido a dos lapsos de liofilización, cada uno de 24 horas, obteniendo así un material seco, este fue pulverizado en mortero y tamizado, resultando en un polvo fino compuesto de los materiales de pared microencapsulando el pigmento seco.

5.7 Análisis de microcápsulas

5.7.1 Microscopia óptica

Se realizó una observación de las microcápsulas formadas en un microscopio óptico, con los objetivos 10, 25 y 40X.

5.7.2 Eficiencia de microencapsulación

Para determinar la eficiencia de microencapsulación se utilizó el método descrito por Stoll et al. (2015) con ligeras modificaciones. Se consideró el contenido de fenoles en la muestra como parámetro. Para obtener este dato, se usaron tres factores, la cantidad total de fenoles introducida en las microcápsulas (FT), la cantidad de fenoles en la superficie de las microcápsulas (FS), y la cantidad de fenoles cuantificados en las microcápsulas al momento final de la liberación (FL). Para obtener los fenoles de superficie, se tomó una muestra de 100 miligramos de microcápsulas, esta fue suspendida en 1 mL de etanol-metanol (1:1), se agitó en vortex durante un minuto y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, al sobrenadante se le realizó el análisis fitoquímico para fenoles descrito previamente, estos fenoles de superficie fueron restados a los fenoles cuantificados en la liberación de las microcápsulas, y el resultado fue dividido entre los fenoles introducidos a las cápsulas multiplicado por 100, obteniendo así un porcentaje de eficiencia de encapsulación. Lo anterior se puede observar en la siguiente expresión matemática:

$$\%EM = \frac{FL - FS}{FT} * 100$$

5.7.3 Determinación de contenido de humedad

El contenido de humedad se realizó usando el método descrito por Hamid et al. (2020). Se tomó una muestra de 1 g de cada formulación, estas fueron puestas en horno a 65°C durante 48 horas hasta obtener un peso constante. Para determinar el porcentaje de humedad en las microcápsulas se dividió el peso final (PF) entre el peso inicial (PI).

$$\%Humedad = \frac{PF}{PI} * 100$$

5.7.4 Densidad aparente

Para determinar la densidad de las microcápsulas, se empleó el método descrito por Kaderiedes et al. (2015). Se tomaron 500 mg de muestra de microcápsula de cada formulación, estas fueron puestas en una probeta y agitadas con el fin de eliminar el aire entre los espacios, esto se realizó hasta obtener un volumen constante, dividiendo la masa (M) sobre el volumen (V) dado se obtuvo la densidad de las microcápsulas.

$$\rho = \frac{M}{V}$$

5.7.5 Cinética de liberación

Se realizó una liberación gradual del contenido de las microcápsulas basándose en el método descrito por Oidtmann et al. (2012) con ligeras modificaciones. Se implementó la liberación del polvo formado en agua destilada, en una proporción de 100 mg/mL. La liberación de las tres formulaciones fue realizada a 25°C, posterior a esto, se eligió una sola formulación para evaluar la liberación a 4° y 65°C, con el objetivo de visualizar el comportamiento en condiciones de temperatura semejantes a las empleadas en el procesamiento, manejo y almacenamiento de un alimento. Una alícuota de muestra fue tomada cada 5 minutos durante una hora, resultando un total de 12 puntos de cinética, a estas alícuotas se les hicieron análisis de fenoles, antocianinas monoméricas, capacidad antioxidante y medida de color, siguiendo las mismas metodologías fitoquímicas y colorimétricas mencionadas anteriormente.

5.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) y un test de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$), usando el software Statgraphics centurion 18, los gráficos y tablas fueron realizados en el programa Microsoft Excel (versión 16.66.1), todas las mediciones y pruebas fueron realizadas por triplicado ($n=3$), reportando el promedio con su respectiva desviación estándar (\pm).

Capítulo 6. Resultados y discusión

6.1 Extracción de pigmentos bioactivos a partir de *C. bipinnatus*

La extracción de pigmentos bioactivos a partir de *C. bipinnatus* mediante un proceso de extracción combinando el método de maceración y de ultrasonificación, y una mezcla de solventes compuesta por etanol y agua (80:20); permitió obtener un polvo sólido de color púrpura (Figura 7).



Figura 7. Extracto de pétalos de *Cosmos bipinnatus* obtenido después de la liofilización.

6.2 Suspensión del extracto

El extracto fue suspendido en agua con el fin de tener una idea de su poder tintóreo. Se suspendió en una proporción de 60 mg / 10 mL, generando así un líquido color rojizo (Figura 8), con un valor de pH de 4.55 ± 0.05 . El extracto resultó no ser 100% soluble en agua, teniendo cierta cantidad mínima de sólidos que precipitaron cuando fue puesto en agitación, esta porción insoluble puede deberse a la cantidad de compuestos no polares contenidos en el extracto, por ejemplo, se ha reportado que dentro del contenido de las flores de *C. bipinnatus*, están las calconas (Iwashina et al. 2015) y cetonas aromáticas que forman parte del núcleo central de muchos compuestos biológicos importantes, dentro de la cuales existen algunas que contienen múltiples residuos hidrofóbicos (Arzola. 2020), compuestos como estos, que al momento de ser procesados y liberados muestran sus propiedades hidrofóbicas, son los responsables de dichos sólidos, precipitando al momento de ser suspendidos en agua; se tuvo que filtrar la suspensión para obtener un producto totalmente líquido, este extracto en agua al cumplir las características de color deseadas es el que dará color al aplicarse en alimentos.

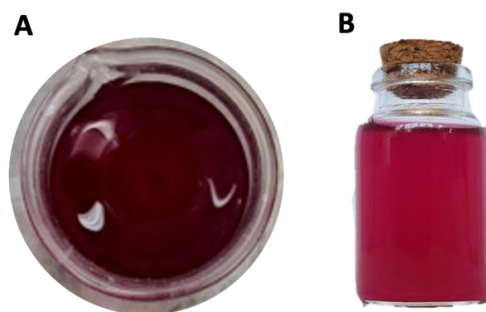


Figura 8. Extracto suspendido en agua a una concentración de 6 mg / mL. A) Extracto siendo diluido en agua con agitación magnética. B) Pigmento acuoso resultante.

6.2.1 Análisis de color del extracto

Tabla 1. Coordenadas L, a* y b* en sistema CIELAB del color del extracto

Parámetros	Extracto
Luminosidad (L)	17.94 ± 0.59
Coordenadas rojo-verde (a*)	23.60 ± 3.03
Coordenadas amarillo-azul (b*)	4.10 ± 0.35

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, todos los valores son promediados con desviación estándar (\pm).

El color del extracto es reportado en coordenadas del sistema CIELAB (L, a*, b*) (Tabla 1). Se puede observar que, basado en sus valores a* y b* es un pigmento con coloración roja y poca tendencia al amarillo, esta coordenada b* al ser cercana a 0 no es visualmente notable, volviendo la muestra en su mayoría roja, algo que se aprecia en la Figura 8, donde el extracto presenta un color púrpura-rojizo. Haciendo análisis del valor en L, se está hablando de una muestra oscura, al tener valores por debajo de 50, recordando que esta coordenada cuenta con valores de 0 a 100, donde los valores bajos indican ausencia de luminosidad (Konica Minolta, 2023). En la Figura 9 se muestra representado el color de la muestra y sus coordenadas en el espacio de color CIELAB, estas coordenadas se encuentran situadas en el espectro de colores púrpuras.

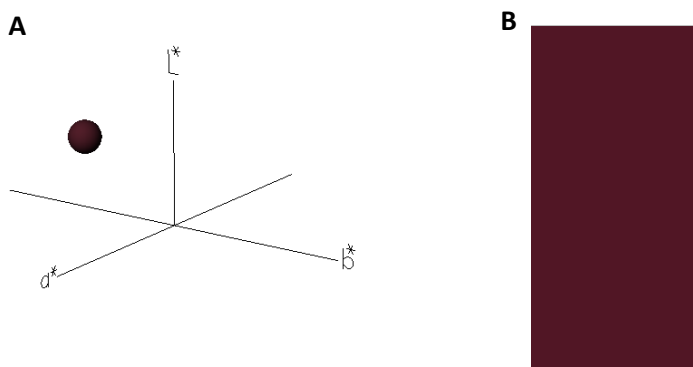


Figura 9. A) Coordenadas L, a* y b* del pigmento acusoso en el espacio CIELAB. B) Producción de color de las coordenadas en el sistema CIELAB, obtenido en NIX color sensor (<https://www.nixsensor.com/free-color-converter/>).

6.2.2 Caracterización fitoquímica del extracto

Para caracterizar fitoquímicamente el extracto obtenido, se realizó el análisis de 6 compuestos, dentro de la especie de *Cosmos bipinnatus* se ha reportado que sus principales componentes químicos bioactivos son flavonoides, dentro de los cuales gran proporción son antocianinas (Iwashina et al. 2015), además, la actividad antioxidante de un extracto vegetal está relacionado directamente con su contenido en fenoles (Bijanji et al. 2021), es por esto que se decidió hacer análisis de contenido de fenoles, flavonoides, antocianinas monoméricas, porcentaje de color polimérico, y capacidad antioxidante (Realizada por método DPPH y ABTS).

El análisis fitoquímico fue realizado al extracto en suspensión acuosa, los resultados son expresados en concentraciones de mg del compuesto fitoquímico por mL de dicha suspensión (Tabla 2). *Cosmos bipinnatus* al no ser una especie actualmente usada como fuente de pigmentos

para la industria, tiene una cantidad limitada de estudios fitoquímicos al respecto, variando los métodos de extracción, las concentraciones utilizadas y los rendimientos obtenidos en dichos estudios. Para este trabajo se determinó el método de extracción, las concentraciones de disolución, y las condiciones de trabajo basado en las propiedades del colorante buscado, color que se obtiene gracias a las antocianinas presentes en esta especie, debido a su naturaleza foto y termosensible fue que se pensó en un método no agresivo. El método de extracción empleó condiciones de temperatura no mayores a 40°C y siempre trabajando en oscuridad, ahora bien, se eligió una concentración de disolución del extracto seco en agua buscando una coloración atractiva al ojo humano con el propósito de teñir alimentos y buscando obtener el mayor rendimiento de extracción basado en las características del compuesto buscado.

Tabla 2. Resultados del análisis fitoquímico del extracto.

Parámetros	Extracto
Fenoles totales (mg EAG / g)	95.05 ± 0.51
Flavonoides totales (mg EQ / g)	52.40 ± 3.20
Antocianinas monoméricas totales (mg Cyn-3-glu / g)	3.96 ± 0.22
Porcentaje de color polimérico	49.53 ± 7.19
Capacidad antioxidante por DPPH (mg ET / g)	7.30 ± 1.82
Capacidad antioxidante por ABTS (mg ET / g)	98.85 ± 6.84

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, los valores presentados son el promedio de las medias con desviación estándar (±).

Se sabe que el principal compuesto que le da a los pétalos de *C. bipinnatus* su tinción violeta son las antocianinas, esta variedad de flor púrpura ha sido reportada como la variedad con mayor cantidad de fenoles en su especie, teniendo concentraciones incluso de más del doble en comparación con las variedades blancas, rosas y naranjas (Jang et al. 2008). Posiblemente esta diferencia de fenoles sea causada por su mayor contenido en antocianinas, de las cuales, se ha reportado que cianidin-3-glucosido es la principal en esta planta (Iwashina et al. 2015), otorgándole su color característico. La cantidad obtenida de flavonoides y antocianinas es similar a lo reportado por Fernandes et al. (2019), quienes emplearon un método de extracción similar, de maceración y ultrasonificación, con la diferencia de que estos autores usaron agua – acetona como solvente. A partir del pétalo lograron obtener valores de 44.5 mg EQ / g extracto seco y 4.18 mg Cyn-3-glu / g extracto seco, valores cercanos a los mostrados en la Tabla 2, manteniendo una relación similar de antocianinas – flavonoides, por otro lado, Jang et al. (2008) usaron un método de extracción que solo implicaba la inmersión de los pétalos en metanol como solvente y obtuvieron una cantidad mucho menor de fenoles (34.46 mg EAG / g extracto seco) a la obtenida en el presente estudio (95.05 ± 0.51 mg / g), esto sugiere que el método de extracción es un factor clave para obtener una mayor cantidad de compuestos, por lo que podemos decir que la combinación de maceración y ultrasonificación es más eficiente para la extracción de compuestos químicos en comparación con el uso de maceración por si sola.

Las antocianinas son pigmentos que fácilmente pasan por reacciones de degradación, teniendo una estabilidad muy variable dependiendo de su estructura y de las condiciones que la rodean. Existen diversos cambios reversibles e irreversibles por los que pueden pasar, determinados principalmente por el pH, la temperatura, la luz o incluso el tiempo mismo, las antocianinas después de cierto tiempo de ser liberadas condensarán con otros compuestos fenólicos o entre ellas mismas y formarán pigmentos poliméricos. De tal forma que, la presencia de luz puede promover su degradación, y la ausencia de agua puede mejorar esa estabilidad (Wrolstad et al. 2005). Estas interacciones pueden ser medidas en una muestra determinando el porcentaje de color polimérico de la misma, al momento de la degradación y polimerización, tiende a haber una inclinación hacia el color café (Giusti et al. 2001). En la Tabla 2 se puede observar que el porcentaje de color polimérico en la muestra es del 49.53%, indicando que una proporción importante del color en la muestra es dada por antocianinas polimerizadas o degradadas.

Con respecto a los resultados de la capacidad antioxidante, se puede observar que la mayor concentración de equivalentes de trolox se obtuvo con el método de ABTS en comparación con el método de DPPH, teniendo 98.85 ± 6.84 mg ET / g de peso seco para el primero, mientras que para DPPH se obtuvo una concentración de tan solo 7.30 ± 1.82 mg / g, y es que debido a las características del fundamento de las técnicas, cada una es aplicable para diferentes sistemas, la reducción del ABTS es aplicable para antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, mientras que el DPPH es aplicable en sistemas con antioxidantes hidrofóbicos (Floegel et al. 2011). En este caso, al realizar la extracción con solventes polares los antioxidantes no solubles en agua no fueron extraídos con efectividad, por lo que el método DPPH no fue el adecuado. A pesar de que las cianidinas son reportadas como las principales antocianinas responsables de las actividades biológicas de la variedad violeta de *C. bipinnatus*, incluyendo la actividad antioxidante y antimutagénica (Oh et al. 2008), no se puede establecer una relación directa entre la cantidad de cianidinas y la capacidad antioxidante debido a la gran cantidad de compuestos aparte que se encuentran en esta flor (Jang et al. 2008).

Debido a la inestabilidad que presentan las antocianinas ante diversos factores, principalmente a la luz, pH y temperatura; el almacén y transporte de estos componentes es mediante técnicas de protección, una muy utilizada es la encapsulación, la cual cuenta con diversas técnicas, debido a la termo sensibilidad de los compuestos se optó por utilizar una técnica poco agresiva, microencapsulando el extracto mediante liofilización.

6.3 Microencapsulación del extracto

Con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de agua posible, dado que las antocianinas son más estables en ausencia de esta, fueron necesarios 2 ciclos de liofilización de 24 horas cada uno, logrando obtener el extracto encapsulado en forma de polvo (Figura 10), donde de derecha a izquierda se muestran las microcápsulas de la formulación de maltodextrina – extracto (M), goma

arábiga – extracto (GA) y maltodextrina – goma arábica – extracto (M-GA), las cuales pasaron por un proceso de trituración posterior a la liofilización para ser convertidas en polvo.

Tabla 3. Resultados de microencapsulación

Parámetros	Tratamiento		
	M	GA	M-GA
Rendimiento de encapsulación (% peso / peso)	89.27 ± 0.17 ^a	87.14 ± 1.71 ^a	88.36 ± 1.03 ^a
Densidad aparente (g / mL)	0.323 ± 0.015 ^a	0.276 ± 0.018 ^a	0.174 ± 0.026 ^b
Humedad (%)	0.92 ± 0.15 ^a	2.50 ± 0.35 ^b	1.13 ± 0.21 ^a
Eficiencia de microencapsulación (%)	81.51 ± 3.74 ^a	82.64 ± 0.99 ^a	80.62 ± 5.09 ^a

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3); Todos los valores son promedios con desviación estándar (±); Las letras superíndice diferentes (^{a-b}) en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05).

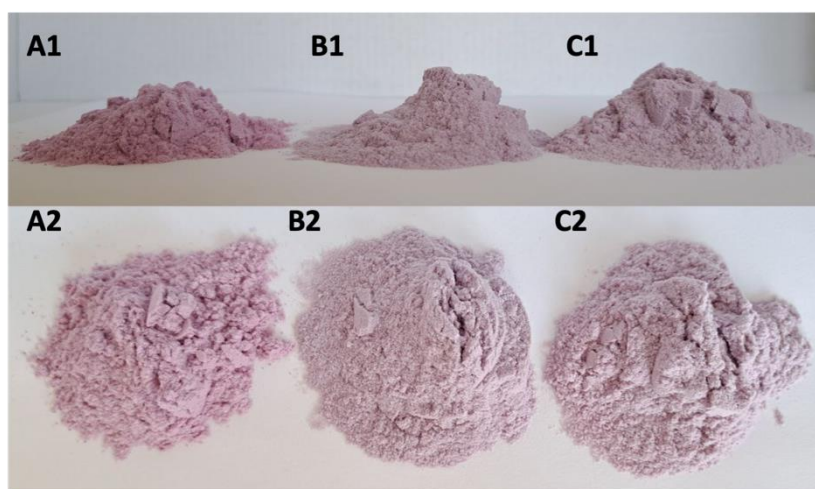


Figura 10. Extracto de *C. bipinnatus* encapsulado por liofilización. A1) Formulación maltodextrina-pigmento (M) vista desde arriba. A2) Formulación maltodextrina-pigmento (M) vista de costado. B1) Formulación goma arábica – pigmento (GA) vista desde arriba. B2) Formulación goma arábica – pigmento (GA) vista de costado. C1) Formulación maltodextrina – goma arábica- pigmento (M-GA) vista desde arriba. C2) Formulación maltodextrina – goma arábica- pigmento (M-GA) vista de costado.

6.3.1 Rendimiento de encapsulación

Con la comparación de los pesos obtenidos de microcápsula de cada formulación con el peso seco de extracto y material de pared introducido inicialmente (Tabla 3), se obtuvieron valores de 89.27 ± 0.17% para la formulación con material de pared de maltodextrina, de 87.14 ± 1.71% para goma arábica, y de 88.36 ± 1.03% para la que lleva ambos materiales, a pesar de que los valores son ligeramente diferentes, no se encontraron diferencias significativas con los materiales de pared utilizados. Estos valores indican que la gran mayoría de sólidos introducidos en la homogeneización están siendo recuperados en las microcápsulas posterior a la liofilización.

6.3.2 Densidad aparente

Los resultados de densidad obtenidos para las microcápsulas son similares a los reportados por Kaderiedes et al. (2015), quienes usaron goma arábica, maltodextrina y otros dos materiales de

pared, solos y en combinaciones obteniendo valores de 0.13 a 0.74 g/mL. La formulación M-GA fue la que obtuvo un valor menor en comparación con las otras dos, resultando un valor de densidad de 0.1743 ± 0.0255 g/mL, este siendo significativamente menor que la densidad de las otras dos muestras, esta disminución en la densidad al ser utilizados ambos materiales de pared se debe quizá a su interacción al ser mezclados, algo también reportado por Rowe et al. (2009). Los polisacáridos al momento de ser procesados juntos modifican sus estructuras dejando un componente menos denso que si estuvieran por separado, además, sus pesos moleculares también pueden verse involucrados en la densidad final, siendo que un peso molecular grande les permite generar estructuras más densas, caso que pudiera estar sucediendo al mezclar ambos materiales. Esta densidad principalmente es otorgada por los materiales de pared, dándole no solo mayor o menor volumen y peso a las microcápsulas, si no que al momento de ser liberadas pueden modificar las características del pigmento resultante, pudiendo volverlo más viscoso o con colores distintos al deseado, debido a la mayor cantidad de material encapsulante para cada tratamiento al momento de ser liberado, un incremento significativo en la densidad de las microcápsulas significaría un incremento en las proporciones del material de pared, lo cual ocasionaría cambios en las características de la liberación, o incluso de las características del polvo, lo cual, para los fines del presente estudio no es deseado; así mismo, una disminución en la densidad significaría menor cantidad de materiales de pared, lo que cambiaría su capacidad de protección del extracto. Concluyendo así, que la densidad de las microcápsulas obtenidas es óptima para la protección y mantenimiento de características del extracto.

6.3.3 Determinación de contenido de humedad

Para el caso de contenido de humedad se encontró que la formulación que más humedad retiene es la del tratamiento de goma arábiga (GA), con un valor de $2.50 \pm 0.35\%$ de humedad, siendo significativamente mayor que las otras dos, esto es consistente con lo reportado por Stoll et al. (2016), donde, haciendo las mismas formulaciones en las mismas proporciones, los porcentajes de humedad mayores fueron obtenidos por la formulación de goma arábiga, seguido de la mezcla entre ambos materiales de pared y de maltodextrina sola. Sin embargo, los porcentajes de humedad obtenidos por ellos fueron mucho mayores, siendo de 12.54% para GA, 11.61% para la formulación maltodextrina-goma arábiga (M-GA), y 10.65% para maltodextrina (M), esto es debido a que en dicho estudio se realizó la liofilización del material a encapsular una sola vez, mientras que en este estudio fueron hechas dos sesiones de liofilización, dejando las cápsulas con un porcentaje menor de humedad. Este bajo contenido de humedad es algo benéfico, ya que un alto contenido de humedad promueve el movimiento molecular, aumentando las reacciones químicas y degradación, disminuyendo la estabilidad de las moléculas (Jafari et al. 2015).

6.3.4 Eficiencia de microencapsulación

La eficiencia de la microencapsulación está directamente relacionada con la vida útil de las antocianinas en el polvo (Idham et al. 2012), esta se refiere al potencial del material de pared para encapsular o mantener un material dentro de la microcápsula. La eficiencia de las tres formulaciones realizadas en este experimento se mantuvo cerca del 80%, no hubo diferencia

significativa entre ellas, indicando que la mayor parte de los componentes se encuentran dentro de las microcápsulas. Diversos autores han comparado el uso de maltodextrina y goma arábica como materiales de pared para la elaboración de microcápsulas (Stoll et al. 2016; Idham et al. 2012; Silva et al. 2013; Souza et al. 2015), sin llegar a conclusiones definitivas sobre cual es mejor como encapsulante. En este trabajo se obtuvieron resultados similares a los reportados, dado que no se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de encapsulación entre los materiales de pared utilizados o en su combinación, esto se debe a que los dos materiales utilizados presentan características similares. Se ha reportado, que es la proporción material encapsulante - material encapsulado el que afecta las características del encapsulado, así como la eficiencia de microencapsulación (Mahdavi et al. 2016), en este estudio al ser utilizados en mismas proporciones no hay variación en la eficiencia de encapsulación.

6.3.5 Microscopia óptica

La morfología estructural de las microcápsulas es un indicador de la calidad de encapsulación, ya que la superficie estructural está relacionada con el éxito de encapsulación y las propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas (Cam et al. 2014). Las microcápsulas formadas fueron observadas con diferentes magnitudes al microscopio, a simple vista parece ser que las tres formulaciones forman estructuras de características morfológicas similares, los tres tratamientos mostraron estructuras planas e irregulares de diferentes tamaños, estas son acordes a las resultantes en las investigaciones de Stoll et al. (2016) y Hamid et al. (2020), donde los primeros, al realizar los mismos tratamientos con las mismas cantidades, obtuvieron las mismas morfologías de microcápsula. Es importante destacar que se ha reportado que el incremento en la concentración de maltodextrina incrementa la homogeneidad del material encapsulante en las microcápsulas, volviéndolas más uniformes estructural y morfológicamente (Hamid et al. 2020).

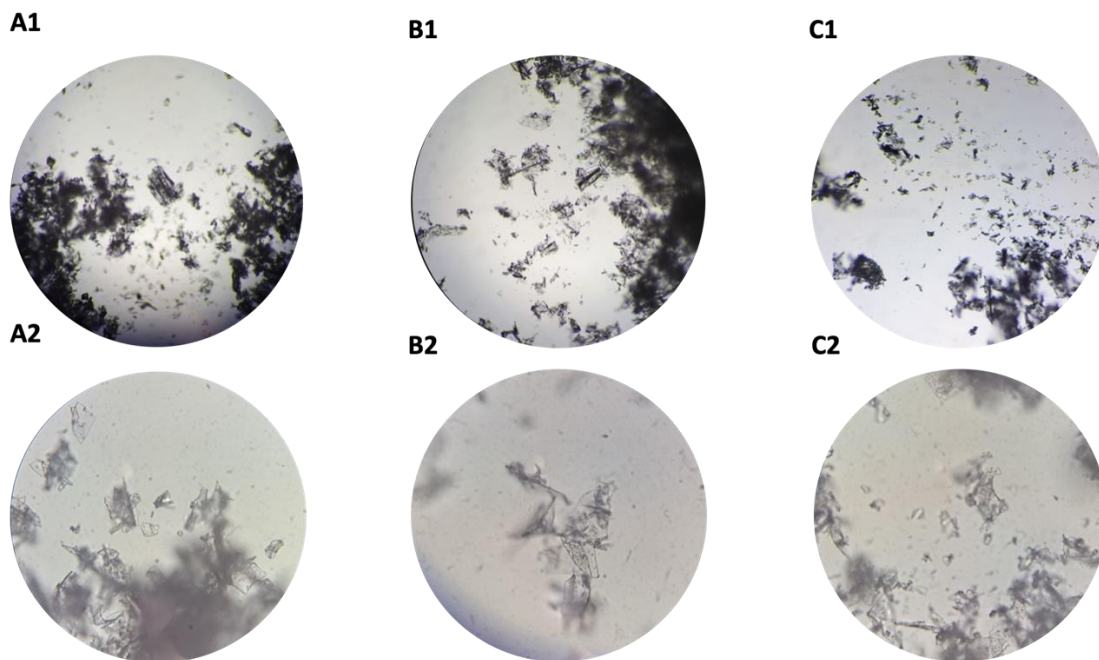


Figura 11. Polvo de microcápsulas vistas al microscopio. A1) Formulación maltodextrina-pigmento (M) vista en objetivo 10X. A2) Formulación maltodextrina-pigmento (M) vista en objetivo 40X. B1) Formulación goma arábica – pigmento (GA) vista en objetivo 10X. B2) Formulación goma arábica – pigmento (GA) vista en objetivo 40X. C1) Formulación maltodextrina – goma arábica- pigmento (M-GA) vista en objetivo 4X. C2) Formulación maltodextrina – goma arábica- pigmento (M-GA) vista en objetivo 40X.

6.4 Cinética de liberación

La liberación de los tres tratamientos se realizó en un sistema acuoso a temperatura ambiente (25 ± 3 °C), midiendo cada 5 minutos los componentes fitoquímicos más relevantes para el estudio, así como el color, con el fin de obtener una cinética de liberación; para el caso de fenoles, los datos son mostrados en la Figura 12. En cuanto a porcentaje de liberación, este es significativamente diferente entre los tratamientos GA y M-GA, siendo mayor en el primero, en cambio, la liberación entre GA y M, y M-GA y M se mantienen sin diferencia significativa ($p < 0.05$) (Figura 12), indicando que la retención y liberación de fenoles es ligeramente más efectiva con el tratamiento que solo lleva goma arábica como material de pared. En cuanto a las propiedades estructurales de la goma arábica, es un polisacárido altamente ramificado con un contenido bajo de proteínas ancladas covalentemente a la cadena de carbohidratos (Mahdavi et al. 2016), lo que lo hace un excelente formador de capas encapsulantes aislante del exterior, encapsulando y reteniendo una buena cantidad de fenoles. A pesar de que los porcentajes de liberación de fenoles para el tratamiento GA es ligeramente mayor, las eficiencias de microencapsulación de los tres tratamientos resultaron sin diferencias significativas (Tabla 3), esto se debe quizá a que al momento de obtener la eficiencia se están contemplando los fenoles que quedaron fuera de las microcápsulas, restándolas a lo que está en el interior, mientras que en la liberación se contemplan todos los fenoles presentes en el medio.

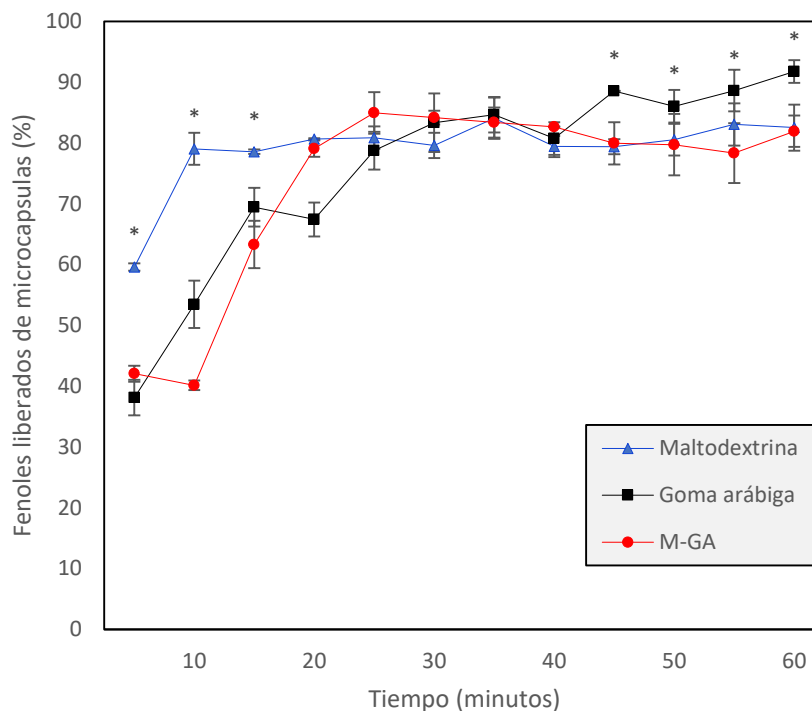


Figura 12. Perfiles de liberación de fenoles de las tres diferentes formulaciones a 25°C.

Los perfiles de liberación de los tres tratamientos presentaron una diferencia en la velocidad de liberación de cada uno. Para el caso de M la liberación máxima, la cual se mantiene cerca del 80%, ocurre desde el minuto 10, con M-GA, esta liberación máxima, ocurre en el minuto 25, en cambio, para GA, su liberación máxima, cercana al 90%, ocurre hasta el minuto 45, momento en el que su liberación es significativamente mayor en comparación con los otros dos tratamientos, esto es debido a la velocidad de solubilidad de los materiales de pared, siendo destacable que M-GA mantiene una velocidad de liberación intermedia entre M y GA, algo coherente al ser una mezcla de las dos últimas.

Por otro lado, la liberación de antocianinas se mantuvo sin diferencias significativas al final de la cinética para los tres tratamientos, liberando cerca de 0.19 mg EAG / g microcápsula (Tabla 5), al igual que el porcentaje de liberación (Figura 13), donde los tres tratamientos liberaron prácticamente el mismo porcentaje de antocianinas, teniendo liberaciones cerca del 95% al final de la cinética, indicando que los materiales de pared y el método es muy bueno reteniendo y liberando antocianinas monoméricas. Esta liberación está relacionada con el mantenimiento del color, al ser que las antocianinas monoméricas son las que le dan su color violeta al pigmento (Oh et al. 2008), que como se verá más adelante, este color también es conservado de manera óptima.

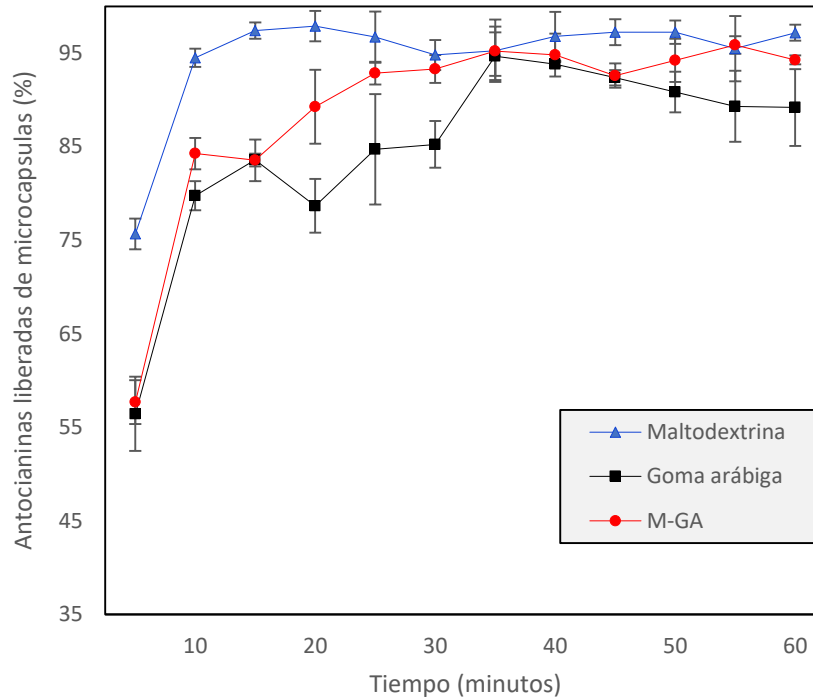


Figura 13. Perfiles de liberación de antocianinas de las tres diferentes formulaciones a 25°C.

La diferencia entre la liberación de fenoles y de antocianinas incluso dentro de un mismo tratamiento se debe quizá a las propiedades mismas del material de pared y su capacidad de retener los diversos fenoles extra a las antocianinas en el pigmento, indicando que GA está reteniendo y liberando mejor otro tipo de fenoles en comparación con las otras dos formulaciones, pero para el caso de antocianinas, los tres tratamientos tienen prácticamente la misma capacidad de retención y liberación, apuntando a que las características fisicoquímicas y estructurales de este último grupo, hacen que interaccionen de forma similar con los dos materiales de pared y su combinación, algo también reportado por Jafari et al. (2015), donde empleando los mismos materiales de pared evaluaron la capacidad de proteger antocianinas, con azafrán como fuente de obtención, microencapsulándolas por liofilización y cuantificándolas a lo largo de 10 semanas, concluyendo que no existen diferencias significativas entre tratamientos, donde ambos, maltodextrina, goma arábica y su combinación pudieron preservar las antocianinas en mismas concentraciones a lo largo de todo el experimento. De igual manera, Stoll et al. (2016), no encontraron diferencias significativas en la liberación de antocianinas, obtenidas a partir de granada, empleando los mismos tratamientos de encapsulación realizados aquí, obteniendo porcentajes de liberación similares a los de la Figura 13, con valores de entre 92% a 98%, indicando que el uso de goma arábica, maltodextrina y su combinación como agentes encapsulantes son opciones excelentes para la preservación de antocianinas monoméricas.

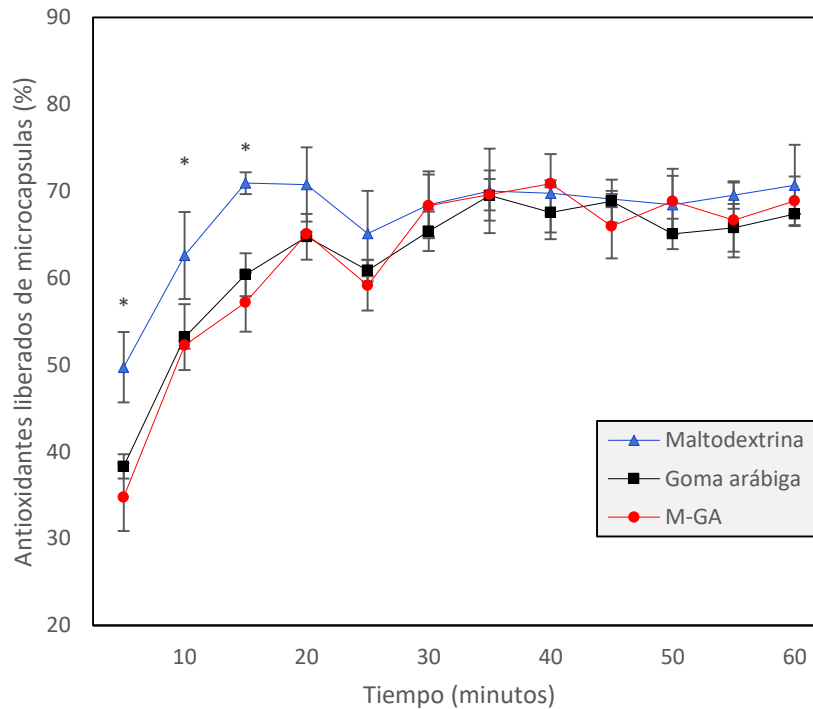


Figura 14. Perfiles de liberación de antioxidantes de las tres diferentes formulaciones a 25°C.

Los compuestos antioxidantes son clave en la preservación de alimentos o ingredientes contra procesos oxidativos degradativos, evitando que con dicha oxidación exista la pérdida de sabor, lípidos, vitaminas y otras biomoléculas, además, los antioxidantes promueven la salud en un organismo evitando estrés oxidativo en células y enfermedades asociadas a estas (Shahidi et al. 2015). Es por esto por lo que mantener la capacidad antioxidante de un extracto destinado a alimentos es de suma importancia, no solo ayuda a la conservación de este, sino que tiene beneficios para el consumidor. En los porcentajes de liberación (Figura 14), se puede observar la misma tendencia de liberación para los tratamientos GA y M-GA, mientras que M tiene una liberación significativamente más rápida durante los primeros 15 minutos, con valores de liberación cercanos al 50% a los 5 minutos, y de 70% a los 15, mientras que las otras dos formulaciones se mantienen con porcentajes de entre 15 y 10 % menores a estos, algo similar a lo observado con las cinéticas para fenoles y antocianinas, donde la liberación de las microcápsulas de maltodextrina tienen una liberación rápida y poco controlada (Valores cercanos a 70% desde el minuto 15), a diferencia de las otras dos formulaciones, donde la liberación es lenta (Valores cercanos a 70% hasta el minuto 30) hasta liberar todo su contenido, el cual se mantiene hasta el final de la cinética.

Se ha demostrado que el uso de maltodextrina y goma arábica como materiales de pared en la elaboración de microcápsulas logra mantener de manera eficiente la actividad antioxidante de compuestos fenólicos. Karaaslan et al. (2020), concluyeron que el uso de la combinación de estos dos materiales es excelente manteniendo la actividad antioxidante de un compuesto

encapsulado. Por otro lado, Stoll et al. (2016) emplearon los mismos tratamientos y encontraron que la formulación que mayor actividad antioxidante mantenía era la de GA, seguida de M-GA y al final M. Estos autores además midieron la capacidad de ambos materiales de pared, y reportaron que presentan la misma actividad antioxidante entre ellos, y esta es tan baja que puede ser despreciable, estos resultados coinciden con lo obtenido en el presente trabajo ya que al calcular la capacidad antioxidante por separado de ambos materiales de pared se encontró que no afecta significativamente el resultado final, además de ser prácticamente la misma para ambos materiales. Hamid et al. (2020) encontraron que sus tratamientos de microcápsulas con más actividad antioxidante son aquellos con mayor cantidad de fenoles y flavonoides, esto coincide con lo encontrado en este trabajo, ya que, los tres tratamientos presentaron porcentajes de liberación altos de fenoles, que como se mencionó, el contenido de fenoles de una planta está directamente relacionado con su capacidad antioxidante (Bijani et al. 2021).

Para los valores de color durante la cinética se obtuvieron los resultados los gráficos de las Figuras 15, 16 y 17, donde, analizando, se puede observar que al inicio de la cinética la luminosidad (L) de la muestra es mayor, disminuyendo conforme pasa el tiempo hasta tomar los valores finales, cuando la liberación es completa, alcanzando este valor final en el minuto 20. Para el caso de intensidad de rojo (a^*), el tratamiento M, alcanzó su tonalidad final desde el minuto 5, mientras que los otros dos tratamientos alcanzaron su tonalidad final desde el minuto 10, algo a destacar aquí es que la formulación GA es ligeramente menos rojiza que las otras dos formulaciones, esto se debe quizá a la mayor densidad de este material de pared, al ser disuelto genera una turbidez mayor, generando un poco de ruido al color.

Los valores en la coordenada b^* para los tres tratamientos se mantuvieron cercanos a 0, con un comportamiento similar por parte de los tres, donde se inicia con valores negativos, de -4 a -2, y terminan con valores positivos, de 1 a 4, este cambio de valores en la coordenada b no son visualmente apreciables en la liberación debido a la cercanía que tienen con el 0, no apreciándose un incremento de amarillo ni una disminución de azul.

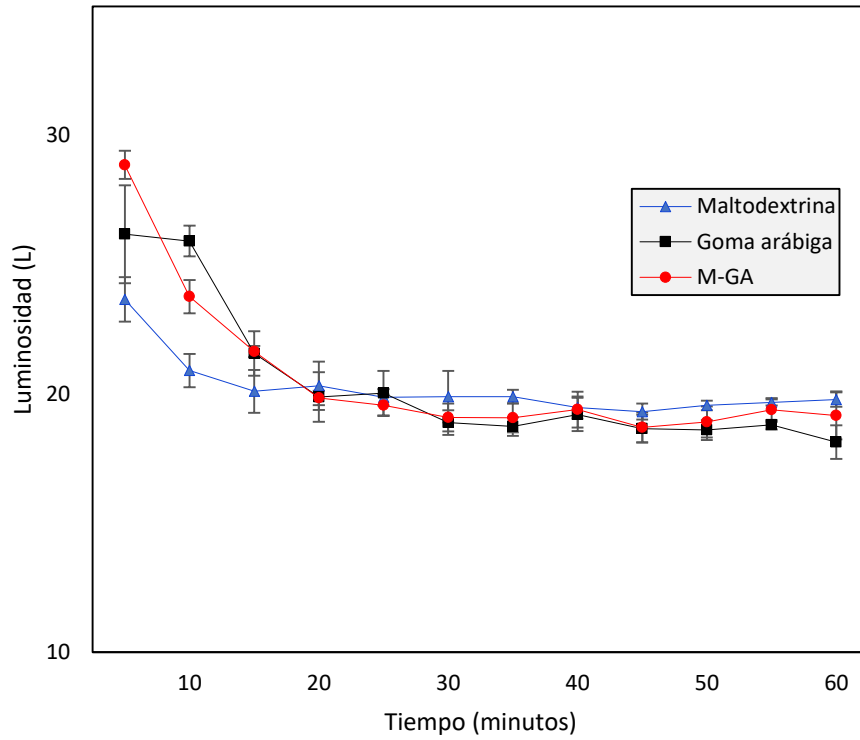


Figura 15. Perfiles de liberación de color en coordenadas L de las tres diferentes formulaciones a 25°C.

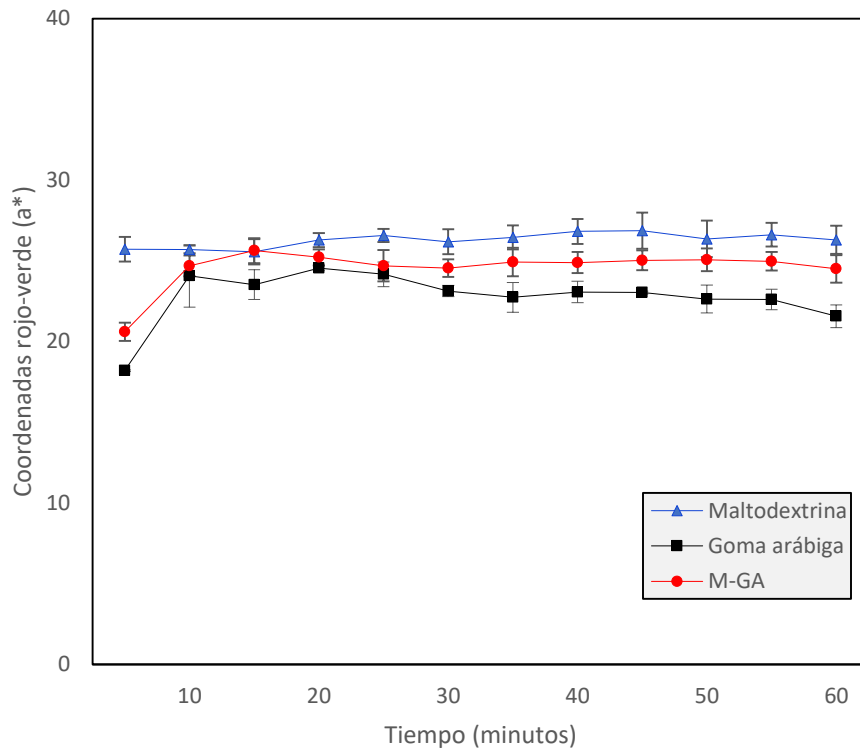


Figura 16. Perfiles de liberación de color en coordenadas a* de las tres diferentes formulaciones a 25°C.

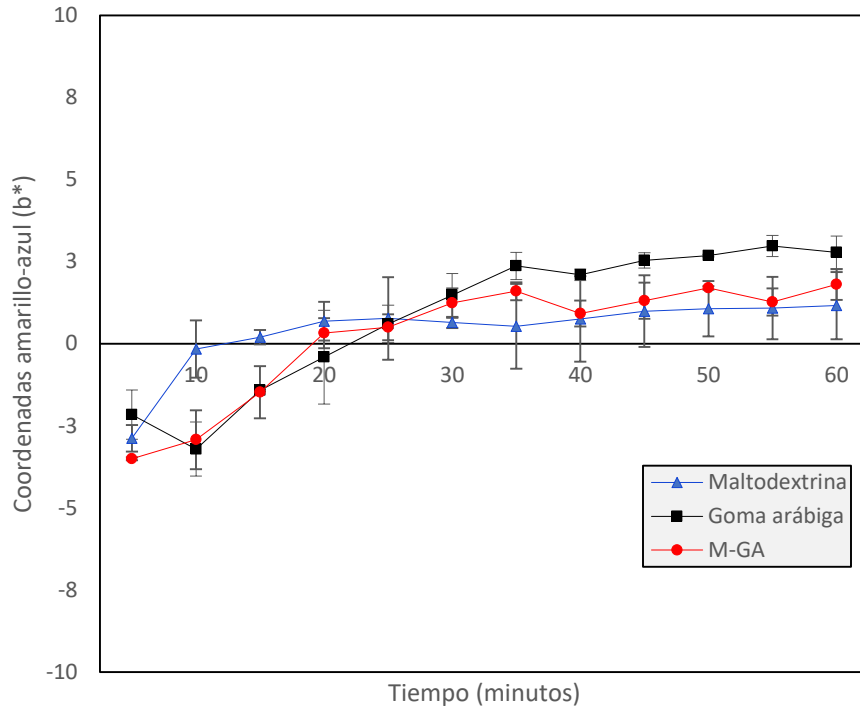


Figura 17. Perfiles de liberación de color en coordenadas b* de las tres diferentes formulaciones a 25°C.

La disminución de la luminosidad a lo largo de la cinética se debe a la liberación del compuesto activo que da color al pigmento, lo cual le da al medio una tonalidad más cercana a la del pigmento inicial sin encapsular. Mientras más tiempo pasa más antocianinas son liberadas, al ser estas la que otorgan el color rojizo al medio, incrementan el valor en a*, disminuyendo la luminosidad a su vez; en la encapsulación de antocianinas, disminución en el valor de a* e incremento en el valor L, se consideran indicadores de la degradación de las mismas dejando a la decoloración del medio, algo reportado por Jiménez-Aguilar et al. (2011) y Stoll et al. (2016), donde los segundos, al probar la estabilidad de sus microcápsulas contenidas de antocianinas notaron esa decoloración con el paso del tiempo, obteniendo disminuciones en el valor a* e incrementos en el valor L. El mantenimiento de a* durante todo el proceso de la cinética indica que las antocianinas se están conservando a lo largo de los 60 minutos, algo concordante con lo mostrado en la Figura 13, donde se observa que efectivamente las antocianinas liberadas mantienen los mismos valores sin degradación.

6.5 Comparación de color de las tres formulaciones

Tabla 4. Color en el extracto y en microencapsulados.

Parámetros	Tratamiento			
	Extracto	M	GA	M-GA
Luminosidad (L)	17.94 ± 0.59	19.75 ± 0.29	18.86 ± 0.51	19.23 ± 0.35
Coordenadas rojo-verde (a*)	21.86 ± 0.28	26.49 ± 0.24	23.24 ± 0.72	24.87 ± 0.24
Coordenadas amarillo-azul (b*)	4.10 ± 0.35	0.85 ± 0.22	2.57 ± 0.31	1.49 ± 0.24

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3); Todos los valores son promedios con desviación estándar (±).

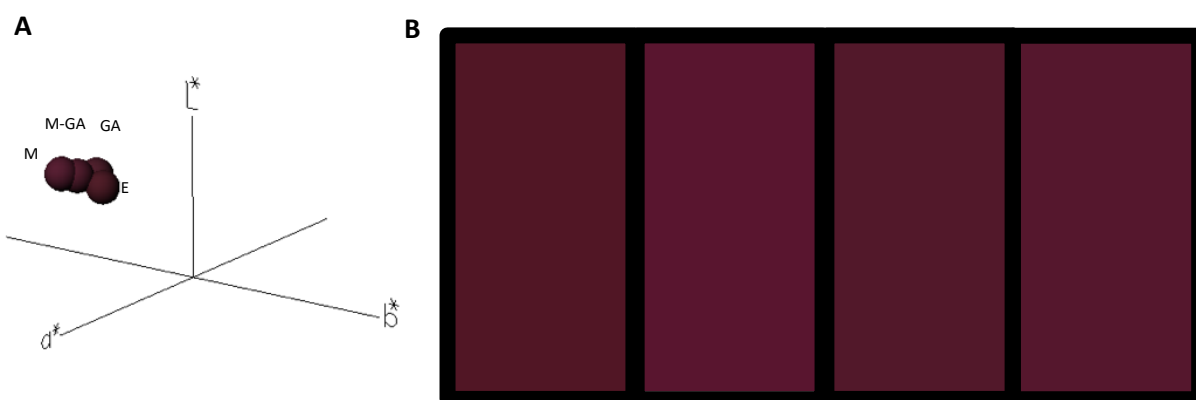


Figura 18. A. Coordenadas L, a* y b* del extracto y tratamientos en el espacio CIELAB. B. Producción de color de las coordenadas en el sistema CIELAB, obtenido en NIX color sensor (<https://www.nixsensor.com/free-color-converter/>), de izquierda a derecha: Color de extracto; Color de M; Color de GA; Color de M-GA.

Tabla 5. Valor de ΔE entre el promedio de color de los tratamientos y extracto.

Tratamiento	Extracto	M	GA	M-GA
Extracto		5.6585	0.7791	2.717
M	5.6585		3.2626	1.0805
GA	0.7791	3.2626		0.7823
M-GA	2.717	1.0805	0.7823	

Valores mostrados usando la fórmula CIE DE2000 de diferencia de color, valores calculados empleando el software CIE2000 Calculator de ColorMine.org (<http://colormine.org/delta-e-calculator/cie2000>).

En la tabla 5, se puede observar que las muestras comparadas que cuentan con un valor ΔE mayor son el extracto y el tratamiento de maltodextrina, con un valor de 5.6585, indicando que son los colores más alejados entre sí, mientras que las muestras con un valor ΔE menor son las del tratamiento GA con el extracto y con M-GA, con un valor de 0.7791 y 0.7823 respectivamente, indicando que la diferencia de color entre esas muestras es mínima. No existe un estándar de valor de ΔE para determinar si una muestra es visualmente diferente al ojo humano, ya que, depende del espectro donde se encuentren las muestras, y es que en colores neutros las diferencias mínimas se pueden detectar fácilmente, mientras que los colores saturados

requieren ΔE más grandes para tener diferencias detectables, aunque algunos autores han mencionado que el delta mínimo para ver una diferencia es de 2 (BCcampus. 2015). El tratamiento M es el tratamiento más alejado en color del resto de tratamientos y del extracto, teniendo valores ΔE mayores a 1 con estos últimos tres, sin embargo, al encontrarse las muestras en el espectro púrpura, los valores ΔE necesitan ser muy altos para encontrar diferencias visuales notables. En la Figura 18A, se muestra visualmente la posición de cada tratamiento en el espacio de color, notando que no quedan alejados entre sí, ahora si se observa la Figura 18B, se puede observar que efectivamente M es la más diferente al resto, siendo más clara ($L = 19.75 \pm 0.29$) y más rojiza ($a^* = 26.49 \pm 0.24$), aunque esta imagen es subjetiva al estar sujeta a estándares visuales, sin embargo, es demostrativa de la diferencia ΔE mayor de M entre el resto. Estas ligeras diferencias de color entre los tratamientos y el extracto indican que cualquiera de los tratamientos podría ser utilizado si lo que se desea es mantener el color del extracto, con excepción de M, el cual mantiene una diferencia visual con respecto al extracto, por lo que si se definiera un estándar de ΔE para eliminar o aceptar colores, probablemente M quedaría descartado con respecto al extracto (estándar).

6.6 Cinética de liberación a tres temperaturas

Como se mencionó en la metodología, se eligió una de las tres formulaciones generadas para ser probada en una cinética de liberación agregando el factor de cambio de temperatura, emulando condiciones a las que un alimento es sometido, llevando dicha formulación a una liberación a 4°C y 65°C para ser comparadas con la liberación a 25°C (temperatura ambiente) descrita anteriormente, para analizar la diferencia o la similitud en los comportamientos, se seleccionó la formulación M-GA por contener ambos materiales de pared y por mantener un color cercano al del extracto ($\Delta E = 2.717$), pero principalmente por tener comportamientos intermedios entre los otros dos tratamientos, manteniendo valores de porcentajes de liberación cercanos a ambos y teniendo una liberación controlada, donde se mantuvo un incremento hasta la mitad del tiempo (20-35 minutos), para posteriormente mantenerse constante para todos los compuestos fitoquímicos analizados.

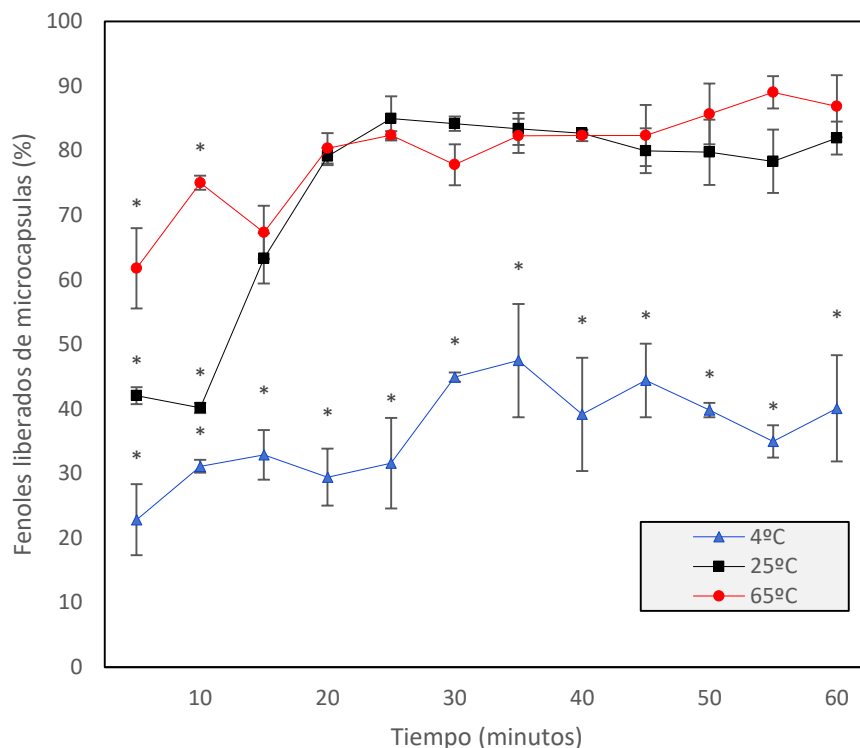


Figura 19. Perfiles de liberación de fenoles del tratamiento M-GA a tres temperaturas.

Los fenoles en una planta son de suma importancia, ya que cumplen diversas funciones dentro de la misma, en la industria alimentaria son buscados debido a que otorgan color, sabor y actúan como antioxidantes (López et al. 2023). Durante los procesos industriales son sometidos a diversas condiciones como cambios abruptos de temperatura, los cuales ocasionan modificaciones en su estructura, afectando su estabilidad, disponibilidad u otras características. Con la modificación de temperatura durante la liberación de las microcápsulas, se pudo observar que la concentración de fenoles liberados al medio es mayor a 25°C y 65°C (sin diferencias significativas entre ellas) (Figura 19), en comparación con la liberación a 4°C, esta diferencia se mantiene a lo largo de la mayoría de los puntos de la cinética, haciendo notar que la temperatura es un factor influyente en la liberación de fenoles de las microcápsulas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Acosta et al. (2014), quienes probaron diferentes condiciones de extracción de fenoles a partir de materia vegetal y llegaron a la conclusión de que estos compuestos se obtienen de mejor manera al incrementar la temperatura, estos autores obtuvieron mayores concentraciones de fenoles en los tratamientos con temperaturas mayores a la ambiental. Esto puede deberse a que con el incremento de temperatura hay una mejor disrupción de las moléculas que retienen a los fenoles, logrando mejores tasas de liberación (Wang et al. 2014).

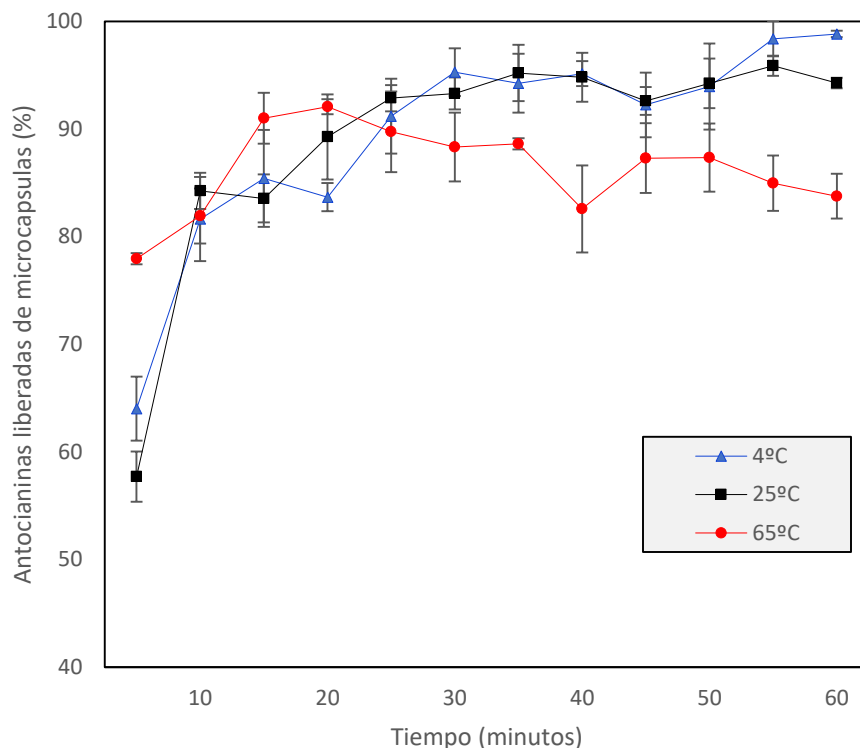


Figura 20. Perfiles de liberación de antocianinas del tratamiento M-GA a tres temperaturas.

La liberación de antocianinas, en cambio, se vio afectada por la temperatura de 65°C, donde el porcentaje de liberación al final de la cinética fue significativamente menor en comparación con las otras dos temperaturas (4 y 25°C) (Figura 20). El porcentaje de liberación fue diferente, siendo significativamente menor para la mayoría de los puntos al final de la cinética a 65°C, este porcentaje de antocianinas liberadas indica que las condiciones en las que mejor se están liberando y preservando las antocianinas son a bajas temperaturas y a temperatura ambiente. Algo destacable es que la liberación de antocianinas a 65°C es más rápida en comparación con las otras dos temperaturas, se puede observar que para esa liberación se mantiene un incremento hasta el minuto 20 y a partir de ese punto comienza una ligera disminución en los porcentajes liberados conforme pasa el tiempo. Este comportamiento también fue reportado por Jiang et al. (2018) y Alburquerque et al. (2020), quienes probaron diferentes condiciones, de temperatura y tiempos de exposición para el tratamiento de extracción, concluyendo que entre más tiempo duran las antocianinas expuestas a temperaturas altas durante la extracción, menores son sus concentraciones obtenidas, indicando una posible degradación térmica, algo que probablemente está sucediendo en la liberación a 65°C, donde conforme pasa el tiempo disminuye poco a poco la concentración de antocianinas liberadas, además, los segundos autores mencionados, concluyeron que las mejores condiciones de temperatura y tiempo de exposición para obtener mayores cantidades de extracción de antocianinas fueron a 34.4°C durante 9 minutos, y que a partir de ahí, al incrementar los valores de temperatura o los tiempos de exposición comenzaba a disminuir la cantidad obtenida de antocianinas.

Algo destacable, si se comparan las gráficas de liberación para fenoles y antocianinas (Figura 19 y 20), es que el comportamiento para la condición de 65°C es contrario hablando de fenoles y antocianinas, mientras que para fenoles es en la condición a la que más porcentaje de liberación hay, y conforme pasa el tiempo van en aumento, para antocianinas ocurre lo contrario, al ser la que menores porcentajes de liberación tiene y conforme pasa el tiempo van disminuyendo, esto se debe quizá a que la porción de fenoles presentes en el extracto que no son antocianinas son liberados de manera más eficiente a temperaturas altas, mientras que las antocianinas, comparándose con las otras dos condiciones de temperatura se liberan en porcentajes menores, indicando que son más termosensibles que el resto de fenoles presentes en dicho extracto.

Los compuestos con actividad antioxidante son de suma importancia en los productos alimenticios ya que no solo tienen beneficios en la salud humana, sino que influyen en la preservación del alimento inhibiendo procesos oxidativos, los cuales ocasionan inestabilidad, pérdida de sabor, color y de características deseables (Shahidi et al. 2015). Es por esto por lo que se buscan preservar a lo largo de todo el proceso de producción de un alimento, procesos en los cuales se ven involucradas diversas temperaturas. En este caso, la capacidad antioxidante no se vio afectada por la temperatura, se encontró solo una diferencia significativa en la liberación de antioxidantes por g de microcápsula entre las tres condiciones de temperatura durante toda la cinética, existiendo diferencias significativas a los 5 minutos de la liberación en la temperatura de 65°C (Figura 21), en el resto de puntos se obtuvo el mismo porcentaje de liberación y como se vio con fenoles y antocianinas, la liberación a esta temperatura alta es muy rápida.

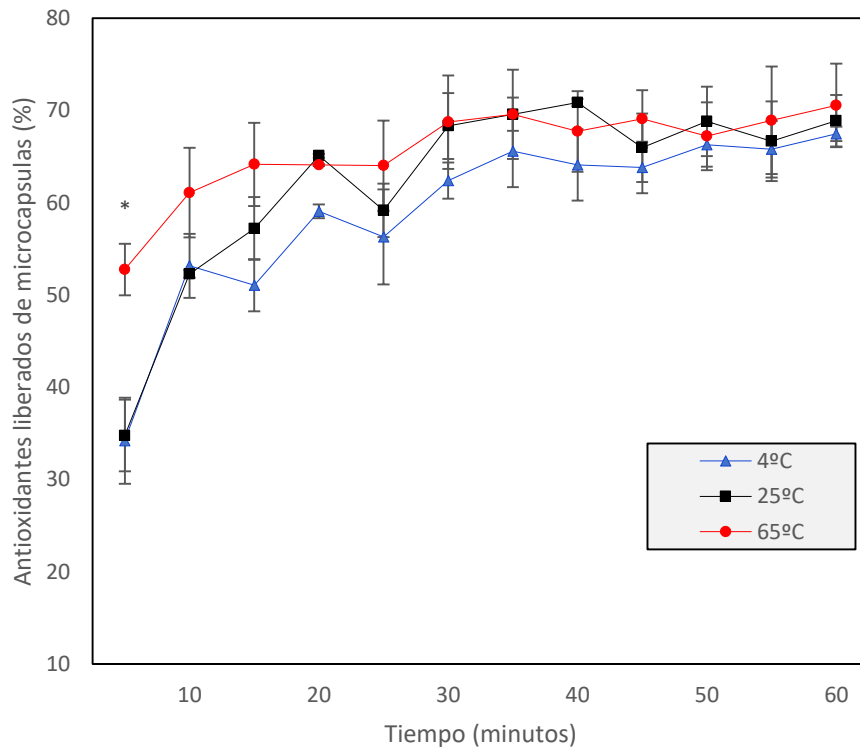


Figura 21. Perfiles de liberación de antioxidantes del tratamiento M-GA a tres temperaturas.

Este mantenimiento en la capacidad antioxidante para las tres condiciones de temperatura se debe quizá a la liberación que tienen las microcápsulas a 4°C y 65°C de diversos componentes con buenas capacidades antioxidantes, mientras que a 4°C se está liberando un mayor porcentaje de antocianinas, las cuales fungen como buenos antioxidantes (Wu et al. 2018), a 65°C se está liberando un mayor porcentaje de fenoles, los cuales están directamente relacionados con la capacidad antioxidante (Bijani et al. 2021), compensando así el menor porcentaje de liberación de antocianinas que se tiene a altas temperaturas, siendo igual la capacidad antioxidante de la liberación en las tres condiciones.

Para el caso de color durante la liberación (Figuras 22, 23 y 24), los valores más afectados en comparación con los obtenidos a temperatura ambiente (25°C) fueron los de luminosidad (L) e intensidad de rojo (+a*), la temperatura que más afectó estos dos valores fue la de 65°C. Desde el inicio de la cinética, 65°C es la condición que se caracterizó por ser más luminosa y con menos intensidad de rojo, esto puede ser explicado por el menor porcentaje de antocianinas liberadas por las microcápsulas bajo esta temperatura, este cambio de valores en L y a* son característicos de una disminución en la cantidad de las mismas, algo también reportado por Jiang et al. (2018), quienes concluyeron que el aumento de la temperatura hace que las antocianinas cambien drásticamente de color, habiendo un incremento en tonalidades café, y disminuciones irreversibles de rojo, además de un incremento en L, muy probablemente por degradaciones.

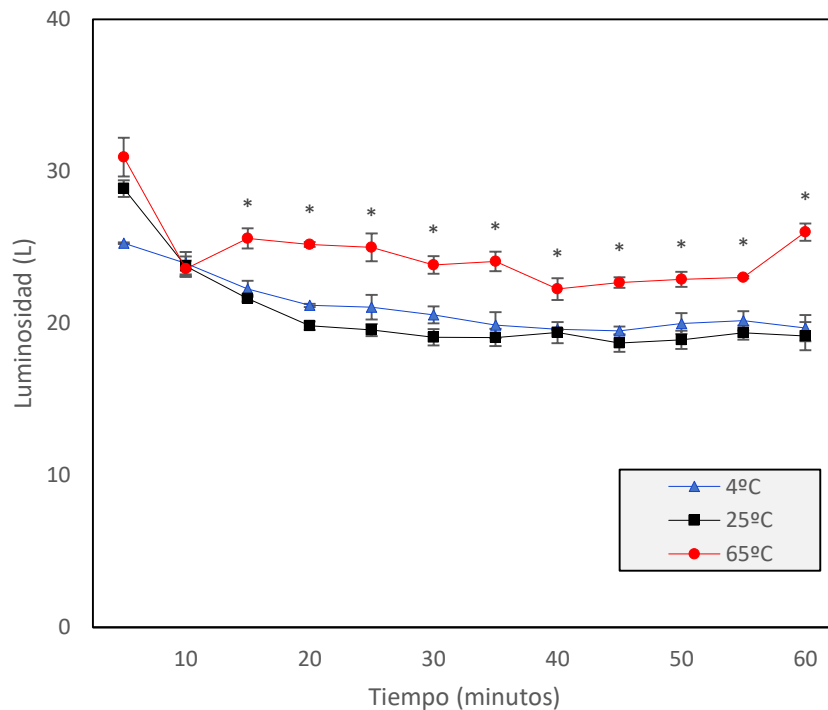


Figura 22. Perfiles de liberación de color en coordenadas L de la formulación M-GA a tres temperaturas de liberación.

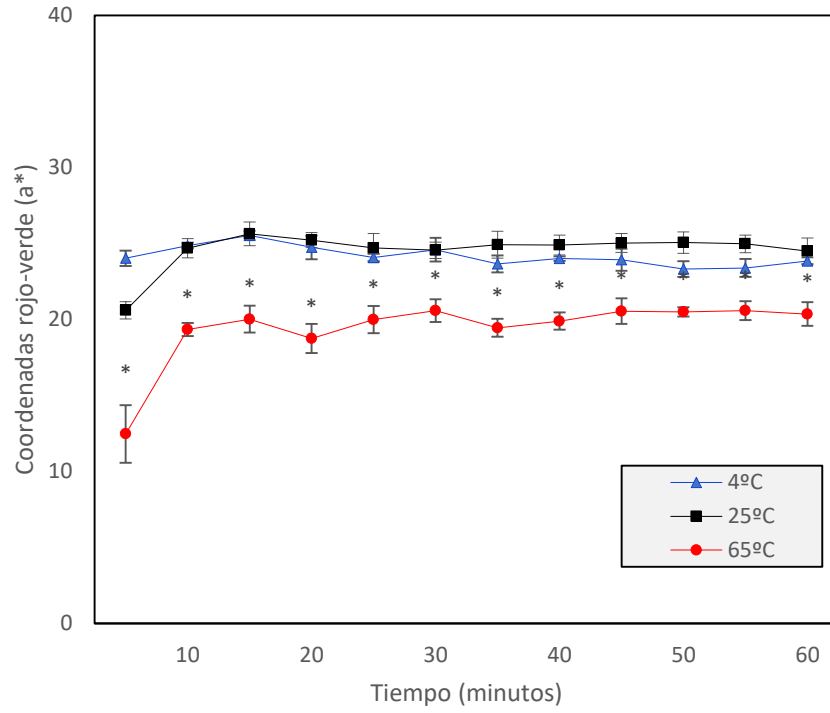


Figura 23. Perfiles de liberación de color en coordenadas a* de la formulación M-GA a tres temperaturas de liberación.

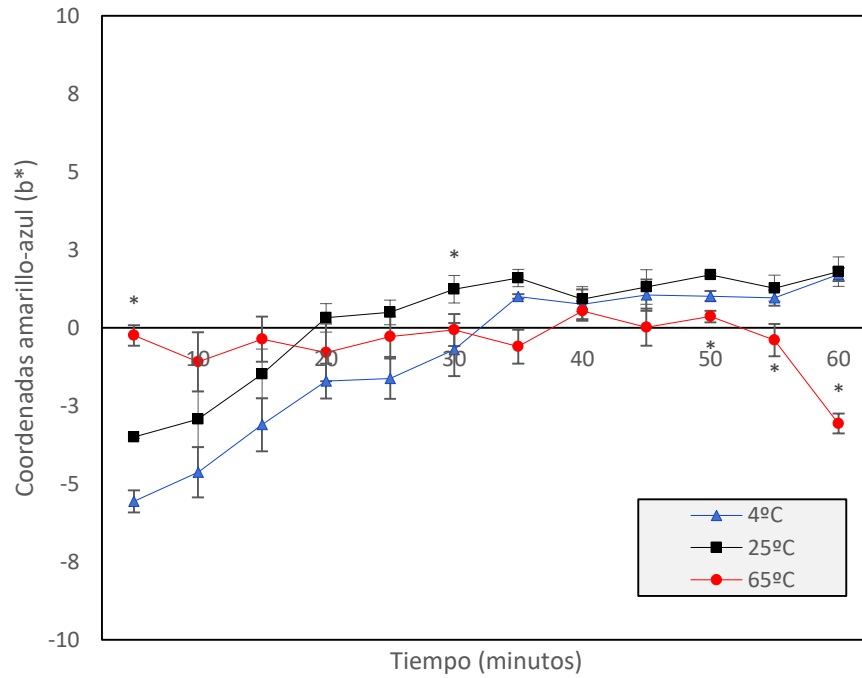


Figura 24. Perfiles de liberación de color en coordenadas b* de la formulación M-GA a tres temperaturas de liberación.

Sin embargo, en este caso la temperatura y el tiempo de exposición no fueron suficientes para hacer que se perdiera totalmente el color rojo de la muestra, manteniéndose más bajo que a 25°C, pero no como para ser considerado cercano a cero, y es que las antocianinas presentan cierta resistencia al calor y buena estabilidad de color en pH ácido (Wu et al. 2018). Cabe mencionar que el pH del extracto presentó valores entre 4 y 5 de pH, siendo el pH el principal factor que influye en la coloración de las antocianinas. Los valores en b*, presentaron cambios pequeños que no se aprecian a simple vista.

Al ser las antocianinas las principales responsables del color en el extracto son lo que más interesaría conservar con la microencapsulación, buscando preservar el color, la capacidad antioxidante, y la cantidad de antocianinas monoméricas, por lo tanto, se puede decir que las mejores condiciones de temperatura para liberar los extractos son 25°C y 4°C dado que es donde se conservan mejor estos atributos.

6.7 Comparación de color de M-GA a tres temperaturas

Tabla 6. Color en el extracto y en microencapsulados de M-GA a distintas temperaturas.

Parámetros	Temperatura de liberación			
	Extracto	4°C	25°C	65°C
Luminosidad (L)	17.94 ± 0.59	20.18 ± 0.62	19.23 ± 0.35	24.82 ± 0.89
Coordenadas rojo-verde (a*)	21.86 ± 0.28	23.94 ± 0.48	24.87 ± 0.24	20.07 ± 0.63
Coordenadas amarillo-azul (b*)	4.10 ± 0.35	1.08 ± 0.32	1.49 ± 0.24	-0.02 ± 0.48

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3); Todos los valores son promedios con desviación estándar (±).

En la Tabla 6 se muestran los valores para las coordenadas L, a* y b* del extracto y de la liberación de color del tratamiento M-GA a las tres temperaturas probadas. Hablando solo de los valores de la liberación a distintas temperaturas, se puede notar que la liberación a 25°C mantiene una luminosidad menor e intensidad de rojo mayor en comparación a las otras condiciones, mientras que la muestra con más claridad y menor intensidad de rojo es la que se liberó a 65°C.

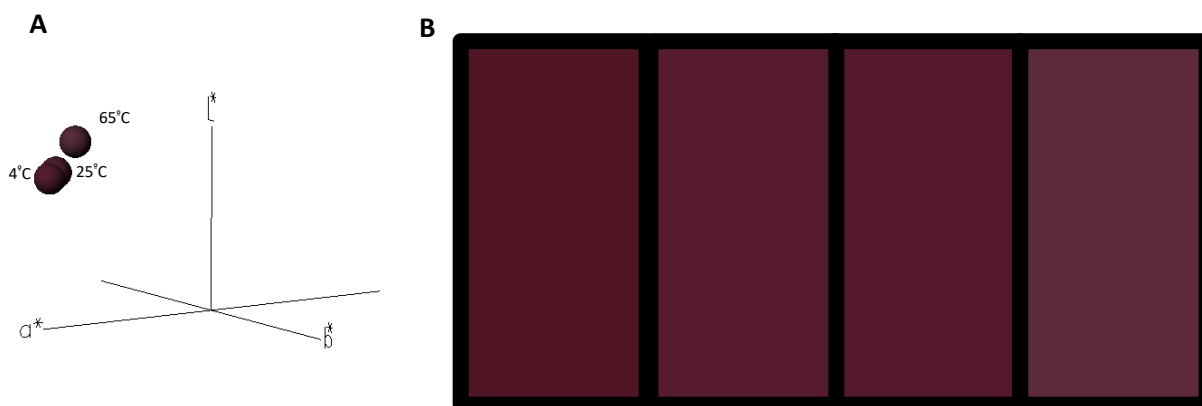


Figura 25. A. Coordenadas L, a* y b* del extracto y liberación a tres temperaturas en el espacio CIELAB. B. Producción de color de las coordenadas en el sistema CIELAB, obtenido en NIX color sensor (<https://www.nixsensor.com/free-color-converter/>), de izquierda a derecha: Color de extracto; Color a 4°C; Color a 25°C; Color a 65°C.

Tabla 7. Valor de ΔE entre el promedio de color de M-GA a tres temperaturas y extracto.

Tratamiento	Extracto	4°C	25°C	65°C
Extracto		2.0661	2.717	4.8064
4°C	2.0661		0.906	3.369
25°C	2.717	0.906		5.0937
65°C	4.8064	3.369	5.0937	

Valores mostrados usando la fórmula CIE DE2000 de diferencia de color, valores calculados empleando el software CIE2000 Calculator de ColorMine.org (<http://colormine.org/delta-e-calculator/cie2000>).

Analizando ΔE entre los colores obtenidos de la liberación de color a distintas temperaturas (Tabla 7), como es de esperar, la liberación a 65°C fue la que presentó mayores diferencias en cuanto al color, si se toma como referente la muestra a temperatura ambiente, la liberación en condiciones de calor tiene una ΔE de 5.0937, un valor notable incluso para las tonalidades rojizas, recordando que en estas tonalidades se requieren valores mayores de ΔE para ser visualmente perceptibles al ojo humano. Por el contrario, el cambio de color a 4°C es mínimo, correspondiendo a un valor ΔE de 0.906, una diferencia visual relativamente pequeña, Si bien ahora se comparan las muestras con el extracto sin encapsular, la que presentó mayor diferencia es la de 65°C, con un valor ΔE de 4.8064, un valor suficiente para ser percibido a simple vista, estas diferencias son mostradas en la Figura 25 donde se muestra la posición de los colores de la liberación a distintas temperaturas en las coordenadas L, a* y b*, y sus tonalidades. En la Figura 25A, se observa que efectivamente las coordenadas de color a 65°C se encuentran separadas de las otras dos temperaturas, y visualmente en la Figura 25B la muestra que presentó mayor diferencia en color es la de 65°C, de nuevo un parámetro subjetivo al ojo humano. Esta diferencia de color significativa en la temperatura a 65°C es concordante con lo reportado por Jiang et al. (2018), Wang et al. (2014) y Wu et al. (2018), donde todos encontraron que a temperaturas altas se pierde intensidad del color rojo y se gana luminosidad cuando se habla de antocianinas, además, los últimos autores, al medir ΔE encontraron una tendencia, donde entre más alta es la temperatura más incrementa este valor en comparación con un estándar. A 70°C su valor de ΔE fue de 4.11 a pH 4, similar a los valores obtenidos en este trabajo, ya que, en la liberación, con condiciones de pH 4.5 ± 0.3 y temperatura de 65°C, resultó un valor de ΔE de 4.8064 con respecto al extracto.

Si bien la temperatura no es el principal factor que afecta el color en las antocianinas, si es una condición determinante para marcar una diferencia, siendo que cuando se trata de color las muestras liberadas a 65°C presentaron una disminución en intensidad del color rojo y un aumento en el valor de L, obteniendo mayor claridad de muestra, algo no buscado en la industria alimentaria al querer conservar una muestra con valores los más cercanos a un color estándar. La temperatura de 4°C, mantuvo prácticamente la misma tonalidad de rojo que el estándar a

temperatura ambiente. Con base en los resultados obtenidos se puede decir que si se deseara utilizar las microcápsulas a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente el color no tendría variaciones importantes. Por otro lado, a temperaturas altas (65°C) la variación de color será mayor al igual que el contenido de antocianinas.

Capítulo 7. Conclusiones

La microencapsulación de metabolitos secundarios obtenidos de extracto de pétalos de *Cosmos bipinnatus* por medio de liofilización permite conservar su vida útil, manteniendo sus propiedades fisicoquímicas.

La extracción hidroalcohólica permite la obtención de extractos tintóreos a partir de flores de *Cosmos bipinnatus*.

El contenido de compuestos fenólicos (95.05 ± 0.51 mg EAG / g peso seco), flavonoides (52.40 ± 3.20 mg EQ / g peso seco), antocianinas (3.96 ± 0.22 mg Cyn-3-glu /g peso seco), compuestos antioxidantes (7.30 ± 1.82 y 98.85 ± 6.84 mg ET / g peso seco con DPPH y ABTS respectivamente), y color ($L= 17.94 \pm 0.59$, $a^*= 23.60 \pm 3.03$, $b^* = 4.10 \pm 0.35$) de extractos de pétalos de *C. bipinnatus* son adecuados para su uso en un proceso de microencapsulación.

Los microencapsulados de pigmentos bioactivos de extracto de *C. bipinnatus* se caracterizan por tener rendimientos de encapsulación con valores mayores al 80%, densidad < 0.5 g/mL, humedad <5%, y eficiencias de microencapsulación con valores mayores a 80%.

Maltodextrina, goma arábica y su combinación utilizados como materiales de pared en microencapsulados permiten conservar las características fisicoquímicas de los pigmentos bioactivos presentes en extractos de pétalos de *C. bipinnatus*.

Temperaturas de 4 y 25 °C permiten mantener las características fisicoquímicas de pigmentos bioactivos microencapsulados de mejor manera en comparación con una temperatura de 65 °C.

Capítulo 8. Perspectiva

Es necesario evaluar los materiales de pared (Maltodextrina, goma arábica y su combinación) en la vida de anaquel de pigmentos bioactivos provenientes del proceso de extracción hidroalcohólico y microencapsulados por liofilización.

Es preciso evaluar las microcápsulas en diferentes condiciones de pH, que permitan determinar los rangos en los cuales es óptimo trabajar las microcápsulas contenidas del extracto tintóreo.

Finalmente se debe realizar una evaluación de diferentes tiempos e intensidades de pigmentación de microcápsulas con pigmentos bioactivos provenientes de proceso de extracción hidroalcohólico a un alimento, como ejemplo, el yogurt, el cual cuenta con propiedades óptimas para el mantenimiento de color y características de dichos pigmentos, como lo es la temperatura y pH.

Capítulo 9. Referencias

Acosta, B. Gutiérrez, J. & Serna, S. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food chemistry*, 152, 46-55. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>

Amamiya, K. & Iwashina, T. (2016). Qualitative and quantitative analysis of flower pigments in chocolate *Cosmos*, *Cosmos atrosanguineus*, and its hybrids. *Natural Product Communications*, 11(1). Doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100122>

Amchova, P. Kotolova, H. & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 73(3), 914-922. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>

Arzola, S. (2020). *Chalconas, bioactividad y aplicaciones sintéticas*. Universidad de la Laguna.

Azmir, J. Zaidul, I. Rahman, M. Sharif, K. Mohamed, A. Sahena, F. Jahurul, M. Ghafoor, K. Norulaini, N. & Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

BCcampus. (2015). Mediciones del espacio de color de laboratorio y Delta E. Contenido editado para página web, proveniente del libro *Graphic Design and Print Production Fundamentals*. URL: https://espanol.libretexts.org/Vocacional/Artes%2C_Tecnolog%C3%ADa_Audio/Visual_y_Comunicaciones/Libro%3A_Fundamentos_de_Dise%C3%B1o_Gr%C3%A1fico_y_Producci%C3%B3n_Impresa/04%3A_Gesti%C3%B3n_del_Color_en_las_Tecnolog%C3%ADas_Gr%C3%A1ficas/4.07%3A_Mediciones_del_espacio_de_color_de_laboratorio_y_Delta_E

Bendokas, V. Skemiene, K. Trumbeckaite, S. Stanys, V. Passamonti, S. Borutaite, V. & Liobikas, J. (2020). Anthocyanins: from plant pigments to health benefits at mitochondrial level. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(19), 3352–3365. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1687421>

Bijani, S. Gharari, Z. Ahmadnia, A. Danafar, H. & Sharafi, A. (2021). A Comparative Study of Apigenin Content and Antioxidant Potential of *Cosmos Bipinnatus* Transgenic Root Culture. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 7(2), 87-96. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.042>

Boo, H. Hwang, S. Bae, C. Park, S. Heo, B. & Gorinstein, S. (2012). Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products*, 40, 129-135. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.02.042

Cam, M. Icyer, N. & Erdogan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and ingredient for functional food development. *LWT- Food Science and Technology*, 55, 117–123. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.011>

Choudhury, N., Meghwal, M., & Das, K. (2021). Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. *Food Frontiers*, 2(4), 426-442. Doi: 10.1002/fft2.94

Coronel-Aguilera, C. & San Martín-González, M. (2015). Encapsulation of spray dried β -carotene emulsion by fluidized bed coating technology. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 187–193.

Cortez, R. Luna-Vital, D. Margulis, D. & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 180-198. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>

de Abreu Figueiredo, J. de Paula Silva, C. Oliveira, M. Norcino, L. Campelo, P. Botrel, D. & Borges, S. (2022). Microencapsulation by spray chilling in the food industry: Opportunities, challenges, and innovations. *Trends in Food Science & Technology*, 120, 274-287. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.026>

Desai, K. & Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394. Doi: 10.1081/DRT-200063478

Dubey, R. (2009). Microencapsulation technology and applications. *Defence science journal*, 59(1), 82.

El-Wahab, H. & Moram, G. (2013). Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicology and Industrial Health*, 29(2), 224–232. doi:10.1177/0748233711433935

Feng, J. Cerniglia, C. Chen, H. (2012). Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 4, 568-586. doi: 10.2741/400

Fernandes, L. Casal, S. Pereira, J. Malheiro, R. Rodrigues, N. Saraiva, J. & Ramalhosa, E. (2019). Borage, calendula, cosmos, Johnny Jump up, and pansy flowers: volatiles, bioactive compounds, and sensory perception. *European Food Research and Technology*, 245, 593-606. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3183-4>

Floegel, A. Kim, D. Chung, S. Koo, S. & Chun, O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048. Doi: 10.1016/j.jfca.2011.01.008

Ghosh, S. Sarkar, T. Das, A. & Chakraborty, R. (2022). Natural colorants from plant pigments and their encapsulation: An emerging window for the food industry. *Lwt, Food, science and technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112527>

Idham, Z. Muhamad, I. & Sarmidi, M. (2012). Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *Hibiscus Sabdariffa L.* *Journal of Food Process Engineering*, 35(4), 522-542. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00605.x>

Iwashina, T. (2015). Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. *Natural product communications*, 10(3), 1934578X1501000335.

- Jafari, S. Mahdavi-Khazaei, K. & Hemmati-Kakhki, A. (2016). Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying. *Carbohydrate polymers*, 140, 20-25. Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2015.11.079>
- Jang, I. Park, J. Park, E. Park, H. & Lee, S. (2008). Antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from cosmos (*Cosmos bipinnatus*) flowers. *Plant foods for human nutrition*, 63, 205-210. Doi: 10.1007/s11130-008-0086-8
- Jenning, V. Thünemann, A. & Gohla, S. (2000). Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International Journal of Pharmaceutics*, 199(2), 167– 177.
- Jennings, A. Schwartz, S. Balter, N. Gardner, D. Witorsch, R. (1990). Effects of oral erythrosine (2',4',5',7'-tetraiodofluorescein) on the pituitary-thyroid axis in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103, 549-556. doi: [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(90\)90327-Q](https://doi.org/10.1016/0041-008X(90)90327-Q)
- Jiménez-Aguilar, D. Ortega-Regules, A. Lozada-Ramírez, J. Pérez-Pérez, M. Vernon-Carter, E. & Welti-Chanes, J. (2011). Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 889–894. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.012>
- Kaderides, K. Goula, A. & Adamopoulos, K. (2015). A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 204-215. Doi: 10.1016/j.ifset.2015.08.006
- Kaisoon, O. Konczak, I. & Siriamornpun, S. (2012). Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. *Food Res Int.* 46(2):563–571.
- Karaaslan, M. Şengün, F. Cansu, Ü. Başığit, B. Sağlam, H. & Karaaslan, A. (2021). Gum arabic/maltodextrin microencapsulation confers peroxidation stability and antimicrobial ability to pepper seed oil. *Food Chemistry*, 337, 127748. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127748>
- Konica Minolta. (2023). Entendiendo el espacio de color CIE L*A*B*. <https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>
- López, R. Sandoval, T. & Iñiguez, M. (2023) Plant pigments: classification, extraction, and challenge of their application in the food industry. *Food Bioprocess Technol.* <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03075-4>
- Luzardo-Ocampo, I. Ramírez-Jiménez, A. Yañez, J. Mojica, L. & Luna-Vital, D. (2021). Technological applications of natural colorants in food systems: a review. *Foods*, 10(3), 634. <https://doi.org/10.3390/foods10030634>

Mahdavi, S. Jafari, S. Assadpoor, E. & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum arabic and gelatin. *International journal of biological macromolecules*, 85, 379-385. Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>

Microgamma. (2017). Que es ΔE (Delta E). Página web del libro Calibración y perfilación de monitores. URL: https://www.microgamma.com/calibracion_perfilacion_monitores/delta_e.php

Nirmal, N. Mereddy, R. & Maqsood, S. (2021). Recent developments in emerging technologies for beetroot pigment extraction and its food applications. *Food Chemistry*, 356, 129611. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129611>

Oh, W. Jang, I. Jeon, G. Park, E. Park, H. & Lee, S. (2008). Antioxidative activity of extracts from *Wisteria floribunda* flowers. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*.

Olajuyigbe O. & Ashafa A. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Cosmos bipinnatus* Cav. leaves from South Africa. *Iran J Pharm Res*. 13(4):1417–1423.

Oregon Chem Group. (2020). Maltodextrina, Química industrial, URL: <https://quimicaindustrial.cl/producto/maltodextrina/#:~:text=F%C3%B3rmula%20molecular%3A%20C6nH10n%2B2O5n%2B,504%2C169035%20g%2Fmol.>

Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 23, 173– 182. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>

Passos, M. & Saraiva, M. (2019). Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement*, 135, 896-904. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045>

Patel, M. Patel, P. & Kothari, F. (2021). Advance ecological approach to new assessment in red plant pigments. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 10(2), 274–279. <https://doi.org/10.5530/ajbls.2021.10.39>

Patle, T. Shrivastava, K. Kurrey, R. Upadhyay, S. Jangde, R. & Chauhan, R. (2020). Phytochemical screening and determination of phenolics and flavonoids in *Dillenia pentagyna* using UV–vis and FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 242, 118717. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118717>

Rowe, R. Sheskey, P. & Quinn, M. (2009) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed.

Sadowska-Bartosz, I. & Bartosz, G. (2021). Biological properties and applications of betalains. *Molecules*, 26(9), 1–36. <https://doi.org/10.3390/molecules26092520>

- Sakai, H. Ono, K. Tokunaga, S. Sharmin, T. Aida, T. & Mishima, K. (2020). Extraction of natural pigments from *Gardenia jasminoides* J. Ellis fruit pulp using CO₂-expanded liquids and direct sonication. *Separations*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.3390/separations8010001>
- Saleem, M. Ali, H. Akhtar, M. Saleem, U. Saleem, A. & Irshad, I. (2017). Chemical characterisation and hepatoprotective potential of *Cosmos sulphureus* Cav. and *Cosmos bipinnatus* Cav. *Natural Product Research*, 1–4. doi:10.1080/14786419.2017.1413557
- Santos, D. Maurício, A. Sencadas, V. Santos, J. Fernandes, M. & Gomes, P. (2018). Spray drying: an overview. *Biomaterials-Physics and Chemistry-New Edition*, 9-35.
- Shahidi, F. & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Silva, P. Stringheta, P. Teófilo, R. & De Oliveira, I. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 538-544. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.039>
- Silva, V. Vieira, G. & Hubinger, M. (2014). Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. *Food Research International*, 61, 132-143. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.052>
- Sousa, D. Pereira, F. Nascentes, C. Moreira, J. Boratto, V. & Orlando, R. (2020). Cellulose cone tip as a sorb-ent material for multiphase electrical field-assisted extraction of cocaine from saliva and determination by LC-MS/MS. *Talanta*, 208, 120353. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120353>
- Souza, V. Thomazini, M. de Carvalho Balieiro, J. & Fávaro-Trindade, C. (2015). Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing*, 93, 39-50. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.11.001>
- Stoll, L. Costa, T. Jablonski, A. Flôres, S. & Oliveira Rios, A. (2016). Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films. *Food and Bioprocess Technology*, 9(1), 172–181. doi:10.1007/s11947-015-1610-0
- Wang, Q. Yang, Z. Du, S. He, Z. & Chen, Y. (2019), Constitutens of *Cosmos bipinnatus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 55(3), 542-544. doi:10.1007/s10600-019-02736-1
- Wang, T. He, F. & Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, 7, 101-111. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.033>

Wrolstad, R. & Smith, D. (2017). Color analysis. *Food analysis*, 545-555. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_31

Wrolstad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 423-428. Doi: 10.1016/j.tifs.2005.03.019

Capítulo 10. Anexos

Anexo 1. Cuantificación de fenoles totales

Las soluciones para la determinación de fenoles totales se realizaron de la siguiente manera:

- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 14% p/v. Se pesaron 14 g del reactivo y se disolvieron en 100 mL de agua destilada, dejándose en agitación hasta que no se vieran residuos sólidos, se filtró por gravedad y se aforó a 100 mL con agua destilada.
- Solución patrón de ácido gálico 0.1 mg / mL. Se pesaron 0.005 g de ácido gálico y se disolvieron en 1 mL de etanol, se aforó a 50 mL con agua destilada.

A partir de la solución patrón se realizaron diferentes diluciones con el fin de obtener la curva patrón (Figura 26), realizando las siguientes reacciones con las diluciones:

Tabla 8. Concentraciones y cantidades empleadas en curva patrón de fenoles totales

No. de tubo	Concentración de ácido gálico (mg/mL)	Solución patrón Á. gálico (μL)	Agua destilada (μL)	Reactivo de Folin		Na_2CO_3 (μL)	Agua destilada (μL)	Volumen Total (μL)
Blanco	0	0	200	100	Reposo	200	1500	2000
1	0.02	40	160	100		200	1500	2000
2	0.04	80	120	100		200	1500	2000
3	0.06	120	80	100		200	1500	2000
4	0.08	160	40	100		200	1500	2000
5	0.1	200	0	100		200	1500	2000

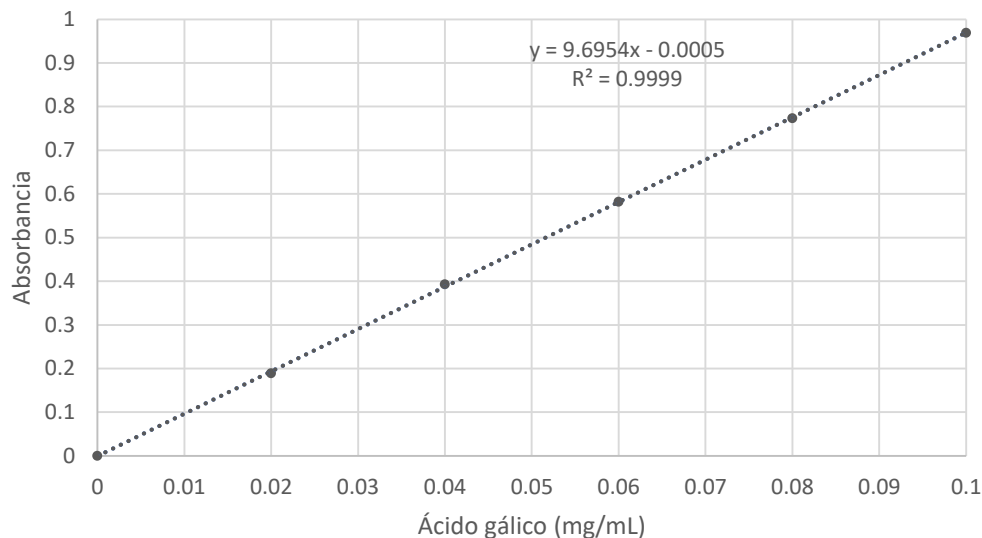


Figura 26. Curva patrón de fenoles totales

En un tubo eppendorf se adicionó la cantidad descrita de las diluciones de ácido gálico o 200 μ L de la muestra a analizar, se agregaron 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, y se agitó en vórtex, después de 8 minutos de reposo se añadieron 200 μ L de la solución de Na_2CO_3 y 1500 μ L de agua destilada, se volvió a agitar en vórtex y se dejó reposar durante una hora en oscuridad a temperatura ambiente. Posterior a la reacción de una hora se leyeron en espectrofotómetro con una longitud de onda de 760 nm, determinando la cantidad de fenoles totales con la siguiente ecuación obtenida de la curva patrón:

$$\frac{\text{mg EAG}}{\text{ml}} = \left(\frac{\text{Abs} + 0.0005}{9.6954} \right) * \text{FD}$$

EAG: Equivalentes de ácido gálico

Abs: Absorbancia de la muestra a 760 nm

FD: Factor de dilución

Anexo 2. Determinación de flavonoides totales

Las soluciones para la determinación de fenoles totales se realizaron de la siguiente manera:

- Tricloruro de aluminio (AlCl_3) 2%. Se pesaron 1.81063 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se disolvieron y aforaron a 25 mL en agua destilada.
- Solución patrón de quercetina (0.2 mg/mL). Se pesaron 0.002 mg de quercetina, se disolvieron y aforaron a 10 mL en etanol 98%.

A partir de esta solución se realizaron diferentes diluciones con el fin de obtener la curva patrón, realizando las siguientes reacciones con las diluciones:

Tabla 9. Concentraciones y cantidades empleadas en curva patrón de flavonoides totales

No. de tubo	Concentración de quercetina (mg/mL)	Solución patrón Quercetina (μL)	Etanol (μL)	AlCl ₃ (μL)	Agua destilada (μL)	Volumen Total (μL)
Blanco	0	0	1000	500	500	2000
1	0.04	200	800	500	500	2000
2	0.08	400	600	500	500	2000
3	0.12	600	400	500	500	2000
4	0.16	800	200	500	500	2000
5	0.2	1000	0	500	500	2000

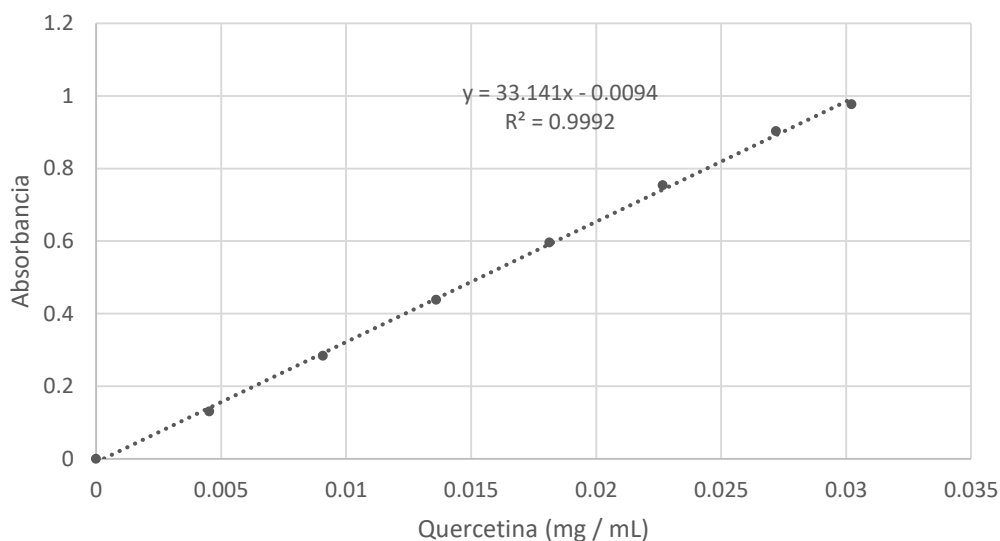


Figura 27. Curva patrón de flavonoides totales

En un tubo eppendorf se adicionó la cantidad descrita de las diluciones de quercetina o 200 μL de la muestra a analizar, se agregaron 500 μL de AlCl₃, 500 μL de agua destilada, se agitó la mezcla en vórtex y se dejó reposar durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posterior a la reacción de media hora se leyeron en espectrofotómetro con una longitud de onda de 425 nm, determinando la cantidad de flavonoides totales con la siguiente ecuación obtenida de la curva patrón:

$$\frac{mg EQ}{ml} = \left(\frac{Abs + 0.0094}{33.141} \right) * FD$$

EQ: Equivalentes de quercetina

Abs: Absorbancia de la muestra a 425 nm

FD: Factor de dilución

Anexo 3. Determinación de antocianinas monoméricas

Las soluciones para la determinación de antocianinas monoméricas se realizaron de la siguiente manera:

- a) Buffer de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M. Se pesaron 0.279 g de KCl, se disolvieron en 10 mL de agua destilada, se aforó a 15 mL y se ajustó el pH con HCl concentrado, buscando un valor de 1.
- b) Buffer de acetato de sodio (CH₃CO₂Na) 0.4 M. Se pesaron g de CH₃CO₂Na, se disolvieron en 10 mL de agua destilada, se aforó a 15 mL y se ajustó el pH con HCl concentrado, buscando un valor de 4.5.

Se tomaron 2 alícuotas de la muestra a analizar, de 400 µL cada una, una de ellas se diluyó en 1600 µL del buffer pH 1, la segunda fue diluida en 1600 µL del buffer pH 4.5, posterior se realizó un barrido en el espectrofotómetro de 400 a 700 nm, registrando la absorbancia del pico más alto, adicionalmente se leyó la absorbancia a 700 nm de cada dilución con el fin de eliminar ruidos por turbidez.

La cantidad de antocianinas totales fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{mg \text{ Cyn} - 3 - glu}{L} = \frac{(A)(PM)(FD)(1000)}{\epsilon * 1}$$

Donde

A: (A_{máx} - A₇₀₀)_{pH=1.0} - (A_{máx} - A₇₀₀)_{pH=4.5}

PM: peso molecular de antocianina (449.02 g/mol)

FD: factor de dilución

ε: coeficiente de extinción molar (26,900 L/cm mol)

Anexo 4. Determinación de color polimérico

Las soluciones para la determinación de color polimérico se realizaron de la siguiente manera:

- a) Solución de metabisulfito de potasio (K₂S₂O₅) 20%. Se pesó 1 g de K₂S₂O₅, se disolvió y aforó a 5 mL con agua destilada, posterior se puso en baño ultrasónico durante 30 minutos, en potencia 100% a temperatura ambiente.

Se tomaron 2 alícuotas de la muestra a analizar, de 1400 µL cada una, a una de ellas se le añadieron 100 µL de la solución de metabisulfito de potasio (20%), a la segunda se le adicionaron 100 µL de agua destilada, posterior se realizó un barrido en el espectrofotómetro de 400 a 700 nm, registrando la absorbancia del pico más alto, y de los valores de absorbancia a 420 y 700 nm.

Los datos de absorbancia obtenidos de la muestra tratada con agua se emplearon en la siguiente formula:

$$\text{Densidad de color} = [(A_{420nm} - A_{700nm}) + (A_{max} - A_{700nm})] * FD$$

Donde

FD: Factor de dilución

Los datos de absorbancia obtenidos de la muestra tratada con metabisulfito de potasio se emplearon en la siguiente formula:

$$\text{Color polimérico} = [(A_{420nm} - A_{700nm}) + (A_{max} - A_{700nm})] * FD$$

Donde

FD: Factor de dilución

El porcentaje de color polimérico fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Color polimérico} = \frac{\text{Color polimérico}}{\text{Densidad de color}} * 100$$

Anexo 5. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH

Las soluciones para la determinación de capacidad antioxidante por DPPH se realizaron de la siguiente manera:

- a) Solución stock de trolox 2 mM. Se pesaron 0.0058 g de trolox, se disolvieron y aforaron en 10 mL de metanol.
- b) Solución stock de DPPH 0.1 mM. Se pesaron 0.0039 g de DPPH, se disolvieron y aforaron en 100 mL de metanol.

Para obtener el reactivo de DPPH a emplear en la reacción de determinación de capacidad antioxidante, se diluyó la solución adicionando metanol poco a poco hasta obtener un valor de absorbancia de 0.900 – 0.999 leyendo en espectrofotómetro a 515 nm, ajustado el valor de absorbancia con metanol.

Se realizó una curva patrón siguiendo la siguiente tabla:

Tabla 10. Concentraciones y cantidades empleadas en curva patrón de DPPH

No. de tubo	Concentración de trolox (mM)	Solución patrón trolox (μL)	Metanol (μL)	Volumen tomado (μL)	Solución DPPH (μL)	Volumen Total (μL)
0	0.012	6	994	50	1950	2000
1	0.03	15	985	50	1950	2000
2	0.15	75	925	50	1950	2000
3	0.3	150	850	50	1950	2000
4	0.6	300	700	50	1950	2000
5	0.9	450	550	50	1950	2000
6	1.2	600	400	50	1950	2000

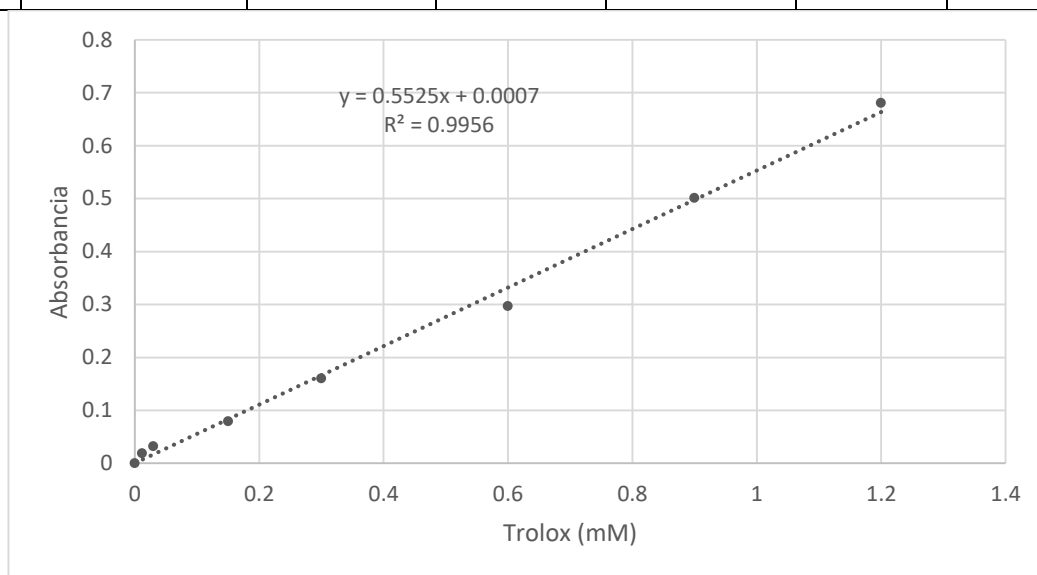


Figura 28. Curva patrón DPPH

Para la reacción, se tomaron 50 μL de las diluciones de trolox o de la muestra a medir, y se añadieron 1950 μL de la solución DPPH diluida, se agitaron en vortex y se dejaron reposar en temperatura ambiente y oscuridad durante 30 minutos; adicional se realizó un blanco con 50 μL de agua destilada y 1950 μL de DPPH diluido. El espectrofotómetro fue calibrado con metanol a 515 nm, la absorbancia de las reacciones y el blanco fue medida y registrada.

Con el objetivo de calcular la cantidad de equivalentes antioxidantes en la muestra se realizó el siguiente procedimiento:

Se hizo una resta del resultado de absorbancia de la muestra a medir al resultado de absorbancia del blanco con agua para obtener la absorbancia real de la cantidad de inhibición antioxidante.

$$Abs_{real} = Abs_{blanco} - Abs_{muestra}$$

Este resultado se añadió a la ecuación de la curva patrón, obtenida de la misma manera, restando la absorbancia de los resultados de las diluciones de trolox a un blanco.

$$mM ET = \frac{Abs_{real} + 0.0007}{0.5525} * FD$$

Donde:

ET: Equivalentes de trolox

Anexo 6. Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS

Las soluciones para la determinación de capacidad antioxidante por ABTS se realizaron de la siguiente manera:

- Solución stock de ABTS 7 mM. Se pesaron 0.0192 g de ABTS, se disolvieron y aforaron en 5 mL de metanol.
- Solución de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 140 mM. Se pesaron 0.3780 g de $K_2S_2O_8$, se disolvieron y se aforaron en 10 mL de metanol.
- Solución stock de trolox 2 mM. Se pesaron 0.0058 g de trolox, se disolvieron y aforaron en 10 mL de metanol.

Para obtener el reactivo de ABTS a emplear en la reacción de determinación de capacidad antioxidante, se mezclaron 5 mL de la solución stock de ABTS con 88 μ L de la solución stock de $K_2S_2O_8$, se dejó reposar durante 14 horas en refrigeración y oscuridad, posterior a este reposo se diluyó la solución tomando 1 mL y adicionando metanol poco a poco hasta obtener un valor de absorbancia de 0.740 leyendo en espectrofotómetro a 734 nm.

Se realizó una curva patrón siguiendo la siguiente tabla:

Tabla 11. Concentraciones y cantidades empleadas en curva patrón de ABTS

No. de tubo	Concentración de trolox (mM)	Solución patrón trolox (μ L)	Metanol (μ L)	Volumen tomado (μ L)	Solución ABTS (μ L)	Volumen Total (μ L)
1	0.01	5	995	50	1500	2000
2	0.1	50	950	50	1500	2000
3	0.2	100	900	50	1500	2000
4	0.4	200	800	50	1500	2000
5	0.6	300	700	50	1500	2000

6	0.8	400	600	50	1500	2000
---	-----	-----	-----	----	------	------

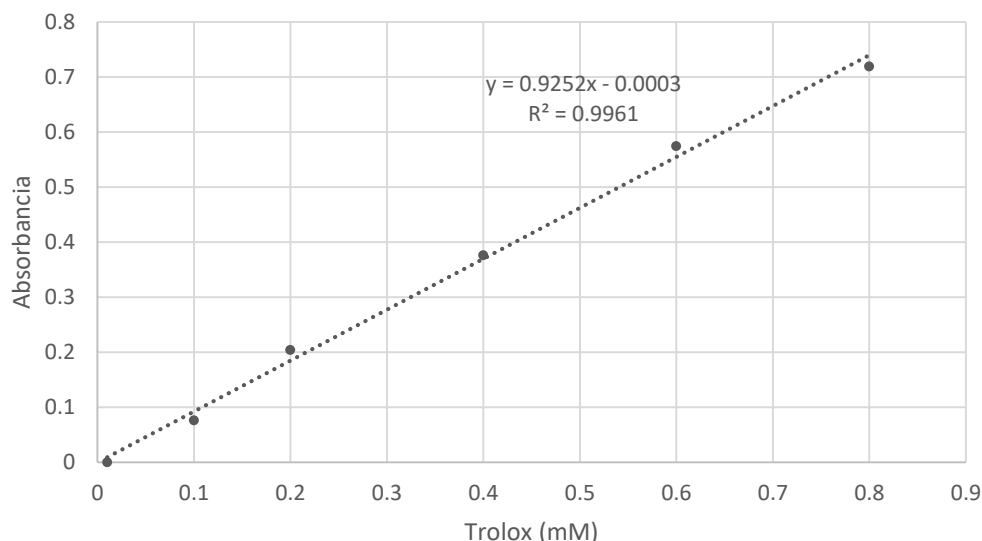


Figura 29. Curva patrón de ABTS

Para la reacción, se tomaron 50 μL de las diluciones de trolox o de la muestra a medir, y se añadieron 1500 μL de la solución ABTS diluida, se agitaron en vortex y se dejaron reposar en temperatura ambiente y oscuridad durante 10 minutos; adicional se realizó un blanco con 50 μL de agua destilada y 1500 μL de ABTS diluido. El espectrofotómetro fue calibrado con metanol a 734 nm, la absorbancia de las reacciones y el blanco fue medida y registrada.

Con el objetivo de calcular la cantidad de equivalentes antioxidantes en la muestra se realizó el siguiente procedimiento:

Se hizo una resta del resultado de absorbancia de la muestra a medir al resultado de absorbancia del blanco con agua para obtener la absorbancia real de la cantidad de inhibición antioxidante.

$$Abs_{real} = Abs_{blanco} - Abs_{muestra}$$

Este resultado se añadió a la ecuación de la curva patrón, obtenida de la misma manera, restando la absorbancia de los resultados de las diluciones de trolox a un blanco.

$$mM ET = \frac{Abs_{real} + 0.0003}{0.9252} * FD$$

Donde

ET: Equivalentes de trolox

Anexo 7. Homogeneización y liofilización para la generación de microcápsulas



Figura 30. Proceso de formación de microcápsulas. A) Homogeneización del extracto con el material de pared. B) Producto homogeneizado. C) Liofilización de homogeneizado. D) Liofilización de homogeneizado. E) Producto liofilizado. F) Maceración y filtrado de producto. G) Microcápsulas resultantes

Anexo 8: Concentración de fenoles obtenidos de la cinética de liberación

Tabla 12. mg EAG / g microcápsula durante cinética de liberación.

Tiempo	Tratamiento		
	Maltodextrina	Goma arábica	M-GA
5 min	2.8450 ± 0.0231 ^a	1.8843 ± 0.1759 ^b	2.0095 ± 0.0808 ^b
10 min	3.7569 ± 0.1103 ^a	2.6038 ± 0.1648 ^b	1.9391 ± 0.0255 ^c
15 min	3.7507 ± 0.0252 ^a	3.3775 ± 0.0298 ^{ab}	3.0251 ± 0.2133 ^b
20 min	3.8498 ± 0.0146 ^a	3.3315 ± 0.1933 ^b	3.7776 ± 0.0292 ^{ab}
25 min	3.8612 ± 0.0975 ^a	3.8367 ± 0.1867 ^a	4.0578 ± 0.1264 ^a
30 min	3.7995 ± 0.1076 ^a	4.0058 ± 0.1501 ^a	4.0204 ± 0.0529 ^a
35 min	4.0131 ± 0.1532 ^a	4.1242 ± 0.1259 ^a	3.9830 ± 0.1544 ^a
40 min	3.7698 ± 0.0450 ^a	3.9324 ± 0.0527 ^b	3.9495 ± 0.0365 ^b
45 min	3.7887 ± 0.0498 ^a	4.2606 ± 0.0875 ^b	3.8188 ± 0.1313 ^a
50 min	3.8288 ± 0.1052 ^a	4.1407 ± 0.2133 ^a	3.8076 ± 0.2079 ^a
55 min	3.9641 ± 0.1568 ^{ab}	4.3146 ± 0.0532 ^a	3.7844 ± 0.2619 ^b
60 min	3.9220 ± 0.1623 ^a	4.4686 ± 0.0270 ^b	3.9134 ± 0.0875 ^a

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3); Todos los valores son promedios con desviación estándar (±); Las letras superíndice diferentes (a-b) en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05); Estos valores no representan los porcentajes de liberación de la cinética, pero si comportamientos iguales.

Anexo 9: Concentración de antocianinas obtenidas de la cinética de liberación

Tabla 13. mg Cyn-3-glu / g microcápsula durante cinética de liberación.

Tiempo	Tratamiento		
	Maltodextrina	Goma arábica	M-GA
5 min	0.1540 ± 0.0033 ^a	0.1168 ± 0.0105 ^b	0.1176 ± 0.0062 ^b
10 min	0.1926 ± 0.0061 ^a	0.1670 ± 0.0148 ^a	0.1678 ± 0.0059 ^a
15 min	0.1986 ± 0.0101 ^a	0.1730 ± 0.0102 ^a	0.1714 ± 0.0141 ^a
20 min	0.1995 ± 0.0051 ^a	0.1630 ± 0.0135 ^b	0.1817 ± 0.0025 ^{ab}
25 min	0.1973 ± 0.0138 ^a	0.1758 ± 0.0217 ^a	0.1893 ± 0.0083 ^a
30 min	0.1912 ± 0.0094 ^a	0.1766 ± 0.0141 ^a	0.1901 ± 0.0058 ^a
35 min	0.1923 ± 0.0127 ^a	0.1982 ± 0.0190 ^a	0.1939 ± 0.0030 ^a
40 min	0.1952 ± 0.0095 ^a	0.1962 ± 0.0131 ^a	0.1933 ± 0.0115 ^a
45 min	0.1962 ± 0.0095 ^a	0.1932 ± 0.0116 ^a	0.1887 ± 0.0064 ^a
50 min	0.1961 ± 0.0079 ^a	0.1890 ± 0.0059 ^a	0.1920 ± 0.0048 ^a
55 min	0.1926 ± 0.0106 ^a	0.1848 ± 0.0114 ^a	0.1954 ± 0.0086 ^a
60 min	0.1981 ± 0.0066 ^a	0.1847 ± 0.0154 ^a	0.1921 ± 0.0069 ^a

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3); Todos los valores son promedios con desviación estándar (±); Las letras superíndice diferentes (a-b) en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05); Estos valores no representan los porcentajes de liberación de la cinética, pero si comportamientos iguales.

Anexo 10: Concentración de antioxidantes obtenidos de la cinética de liberación

Tabla 14. mg ET / g microcápsula durante cinética de liberación, por método ABTS.

Tiempo	Tratamiento		
	M	GA	M-GA
5 min	2.2773 ± 0.4752 ^a	1.6478 ± 0.1364 ^{ab}	1.2956 ± 0.0905 ^b
10 min	2.8274 ± 0.2290 ^a	2.2662 ± 0.3628 ^a	2.1766 ± 0.4017 ^a
15 min	3.0144 ± 0.5088 ^a	2.4747 ± 0.3776 ^a	2.4887 ± 0.3892 ^a
20 min	2.9896 ± 0.2735 ^a	2.7428 ± 0.3646 ^a	2.9571 ± 0.5204 ^a
25 min	2.9431 ± 0.2580 ^a	2.5144 ± 0.4271 ^a	2.6212 ± 0.6000 ^a
30 min	3.0996 ± 0.3220 ^a	3.0369 ± 0.2640 ^a	3.1346 ± 0.4128 ^a
35 min	3.1668 ± 0.2847 ^a	3.1612 ± 0.2972 ^a	3.0773 ± 0.0810 ^a
40 min	3.1419 ± 0.0351 ^a	2.9751 ± 0.2293 ^a	3.0200 ± 0.4008 ^a
45 min	3.1171 ± 0.4666 ^a	3.0144 ± 0.2291 ^a	3.0208 ± 0.3845 ^a
50 min	3.1037 ± 0.3725 ^a	3.0807 ± 0.4183 ^a	3.0707 ± 0.3402 ^a
55 min	3.1237 ± 0.0283 ^a	3.0985 ± 0.3556 ^a	3.3052 ± 0.0580 ^a
60 min	3.1438 ± 0.4821 ^a	3.2082 ± 0.0459 ^a	3.3386 ± 0.0306 ^a

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3); Todos los valores son promedios con desviación estándar (±); Las letras superíndice diferentes (a-b) en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05); Estos valores no representan los porcentajes de liberación de la cinética, pero si comportamientos iguales.

Anexo 11: Concentración de fenoles obtenidos de la cinética de liberación a distintas temperaturas

Tabla 15. mg EAG / g microcápsula durante cinética de liberación.

Tiempo	Temperatura de liberación		
	4°C	25°C	65°C
5 min	1.1023 ± 0.2589	2.0095 ± 0.0808	3.0196 ± 0.3707
10 min	1.5024 ± 0.0377	1.9391 ± 0.0255	3.6022 ± 0.0391
15 min	1.5875 ± 0.1750	3.0251 ± 0.2133	3.2321 ± 0.1703
20 min	1.4203 ± 0.2036	3.7776 ± 0.0292	3.8584 ± 0.1045
25 min	1.4878 ± 0.3792	4.0578 ± 0.1264	3.9568 ± 0.0716
30 min	2.1694 ± 0.0207	4.0204 ± 0.0529	3.7352 ± 0.1209
35 min	2.2678 ± 0.4431	3.9830 ± 0.1544	3.9477 ± 0.0656
40 min	1.9124 ± 0.4692	3.9495 ± 0.0365	3.9503 ± 0.0207
45 min	2.1441 ± 0.2607	3.8188 ± 0.1313	3.9761 ± 0.2030
50 min	1.9223 ± 0.0407	3.8076 ± 0.2079	4.7256 ± 0.0839
55 min	1.6889 ± 0.1331	3.7844 ± 0.2619	4.2997 ± 0.1495
60 min	1.8196 ± 0.4741	3.9134 ± 0.0875	4.1944 ± 0.2042

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3); Todos los valores son promedios con desviación estándar (±); Las letras superíndice diferentes (a-b) en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05); Estos valores no representan los porcentajes de liberación de la cinética, pero si comportamientos iguales.

Anexo 12: Concentración de antocianinas obtenidas de la cinética de liberación a distintas temperaturas

Tabla 16. mg Cyn-3-glu / g microcápsula durante cinética de liberación.

Tiempo	Temperatura de liberación		
	4°C	25°C	65°C
5 min	0.1303 ± 0.0044 ^a	0.1176 ± 0.0062 ^a	0.1589 ± 0.0067 ^b
10 min	0.1662 ± 0.0015 ^a	0.1678 ± 0.0059 ^a	0.1670 ± 0.0085 ^a
15 min	0.1741 ± 0.0124 ^a	0.1714 ± 0.0141 ^a	0.1854 ± 0.0082 ^a
20 min	0.1704 ± 0.0045 ^a	0.1817 ± 0.0025 ^{ab}	0.1888 ± 0.0090 ^b
25 min	0.1857 ± 0.0050 ^a	0.1893 ± 0.0083 ^a	0.1828 ± 0.0085 ^a
30 min	0.1941 ± 0.0047 ^a	0.1901 ± 0.0058 ^{ab}	0.1799 ± 0.0053 ^b
35 min	0.1920 ± 0.0062 ^a	0.1939 ± 0.0030 ^a	0.1817 ± 0.0090 ^a
40 min	0.1939 ± 0.0100 ^a	0.1933 ± 0.0115 ^a	0.1683 ± 0.0114 ^a
45 min	0.1880 ± 0.0106 ^a	0.1887 ± 0.0064 ^a	0.1778 ± 0.0051 ^a
50 min	0.1913 ± 0.0072 ^a	0.1920 ± 0.0048 ^a	0.1781 ± 0.0137 ^a
55 min	0.2018 ± 0.0145 ^a	0.1954 ± 0.0086 ^a	0.1732 ± 0.0087 ^a
60 min	0.2027 ± 0.0118 ^a	0.1921 ± 0.0069 ^{ab}	0.1716 ± 0.0053 ^b

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3); Todos los valores son promedios con desviación estándar (±); Las letras superíndice diferentes (^{a-b}) en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05); Estos valores no representan los porcentajes de liberación de la cinética, pero si comportamientos iguales.

Anexo 13: Concentración de antocianinas obtenidas de la cinética de liberación a distintas temperaturas

Tabla 16. mg ET / g microcápsula durante cinética de liberación.

Tiempo	Temperatura de liberación		
	4°C	25°C	65°C
5 min	2.1559 ± 1.1465 ^a	1.2956 ± 0.0905 ^a	2.2576 ± 0.4307 ^a
10 min	2.2772 ± 0.4623 ^a	2.1766 ± 0.4017 ^a	3.2227 ± 0.2857 ^a
15 min	2.8356 ± 0.7897 ^a	2.4887 ± 0.3892 ^a	3.1632 ± 0.0153 ^a
20 min	2.8976 ± 0.2219 ^a	2.9571 ± 0.5204 ^a	3.2485 ± 0.1207 ^a
25 min	2.5694 ± 0.1479 ^a	2.6212 ± 0.6000 ^a	3.3338 ± 0.2477 ^a
30 min	2.9932 ± 0.1951 ^a	3.1346 ± 0.4128 ^a	3.4400 ± 0.0778 ^a
35 min	3.3327 ± 0.1141 ^{ab}	3.0773 ± 0.0810 ^a	3.5009 ± 0.1186 ^b
40 min	3.0910 ± 0.0536 ^a	3.0200 ± 0.4008 ^a	3.4301 ± 0.1632 ^a
45 min	3.1769 ± 0.1368 ^a	3.0208 ± 0.3845 ^a	3.2538 ± 0.1173 ^a
50 min	3.2646 ± 0.1192 ^a	3.0707 ± 0.3402 ^a	3.3002 ± 0.0459 ^a
55 min	3.2930 ± 0.0306 ^a	3.3052 ± 0.0580 ^a	3.4977 ± 0.1109 ^a
60 min	3.2831 ± 0.1396 ^a	3.3386 ± 0.0306 ^a	3.4851 ± 0.0472 ^a

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3); Todos los valores son promedios con desviación estándar (±); Las letras superíndice diferentes (^{a-b}) en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05); Estos valores no representan los porcentajes de liberación de la cinética, pero si comportamientos iguales.