



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**POSGRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y
USO INTEGRAL DEL AGUA**

**DESARROLLO DE UN PROCESO PARA OBTENER MICROCÁPSULAS
DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRAÍDOS DE
FRUTOS DE CAPULÍN (*Prunus serotina*)**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y USO INTEGRAL DEL AGUA**

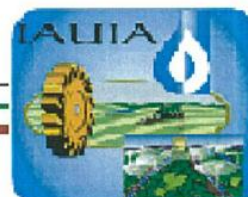
PRESENTA

GUILLERMINA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ



**DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES**

Chapingo, Texcoco, México, Septiembre 2015

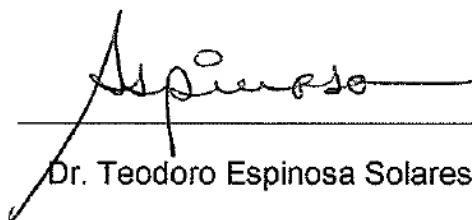


DESARROLLO DE UN PROCESO PARA OBTENER MICROCÁPSULAS DE
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRAÍDOS DE FRUTOS
DE CAPULÍN (*Prunus serotina*)

Tesis realizada por Guillermina Hernández Rodríguez bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

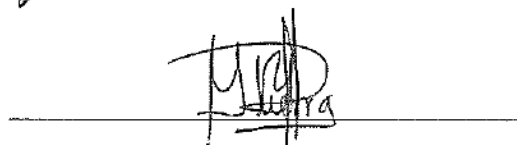
MAESTRO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA
Y USO INTEGRAL DEL AGUA

DIRECTOR:



Dr. Teodoro Espinosa Solares

CO-DIRECTOR:



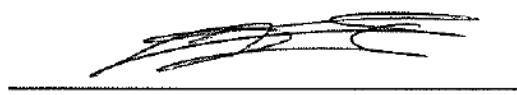
Dra. Diana Guerra Ramírez

ASESOR:



Dra. Matilde Villa García

ASESOR:



M. C. Genaro Iván Cerón Montes

DATOS BIOGRÁFICOS

Guillermina Hernández Rodríguez nace en Chignahuapan, Puebla, el 26 de Junio de 1989, realizó sus estudios de primaria en la escuela “José María Morelos y Pavón”. Cursó secundaria en la escuela “Telesecundaria Miguel Cástulo de Alatríste”. En el año 2004 ingresa al Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos Plantel Chignahuapan, en la ciudad de Chignahuapan, Puebla. En el año 2007 ingresa al nivel de propedéutico en la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México. Para el año 2008 inicia sus estudios de Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial, mismos que concluyeron en el año 2012. Un año después (2013) se postuló para ingresar al Posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua, y fue aceptada para iniciar cursos en agosto de 2013, la orientación que resultó de su interés fue Biosistemas, con el tema de investigación DESARROLLO DE UN PROCESO PARA OBTENER MICROCÁPSULAS DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRAÍDOS DE FRUTOS DE CAPULÍN (*Prunus serotina*).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento que me otorgaron a través de la beca de estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo y en particular al Posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua por haberme brindado la oportunidad de ampliar y mejorar mis conocimientos profesionales.

Al laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola y a las personas que laboran ahí, por brindarme el apoyo y confianza para usar sus instalaciones y laboratorios.

A la Universidad Tecnológica de Tecámac por la colaboración en este trabajo, principalmente agradezco el apoyo brindado para poder hacer uso de sus instalaciones y equipo.

Al Dr. Teodoro Espinosa Solares por su dirección, apoyo, revisión y acertados consejos para la realización de esta investigación.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez por su apoyo, asesoría, entusiasmo y compromiso para llevar a cabo esta investigación, le agradezco además sus consejos, ayuda y amistad brindada.

A la Dra. Matilde Villa García y al Dr. Genaro Cerón Montes por su participación y apoyo en este trabajo.

A la Dra. Irma Salgado y el Dr. Benito Reyes Trejo por sus consejos y por haberme dirigido durante mi trabajo en el laboratorio.

A mis padres J. Guillermo Hernández Hernández y M. Amalia Rodríguez Rivera por colaborar en la fase de campo de esta investigación.

A mis compañeros de trabajo con quienes compartí algunas vivencias durante mi estancia en el posgrado: Ricardo, Graciela, Cyndybell, Edith, Yesy, José María, José Carlos, David, Jesús, Edinson, María del Carmen, Abraham, Yesenia, Osmar, Rafael, Viky, Ulises y Diana.

Y a todos los que de manera indirecta contribuyeron para concluir con éxito este trabajo.

Gracias

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres Ma. Amalia Rodríguez Rivera y José Guillermo Hernández

Hernández.

A mis abuelos: Agapita y Matias.

A mis hermanos: Pedro, Simplicio, Adriana, Daniel y Yasmin.

A Ricardo,

A mis amigos y a todas las personas que han llenado de amor mi vida.

Guille

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE CUADROS	ii
RESUMEN, ABSTRACT	iii
.....	1
PRÓLOGO	1
CAPÍTULO 1	2
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1.1 INTRODUCCIÓN	4
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	5
1.2.1 Características de la muestra	5
1.2.2 Preparación de extractos	6
1.2.3 Determinación de Fenoles Totales	6
1.2.4 Optimización del proceso de extracción de fenoles totales	7
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
1.3.1 Contenido de Fenoles Totales	11
1.3.2 Efecto de los factores considerados en la determinación de Fenoles Totales	12
1.3.3 Análisis del contenido de fenoles totales	18
1.4 CONCLUSIÓN	19
1.5 REFERENCIAS	20
.....	23
CAPÍTULO 2	23
RESUMEN	23
ABSTRACT	24
2.1 INTRODUCCIÓN	25
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	26
2.2.1 Reactivos	26
2.2.2 Instrumentación	26
2.2.3 Material vegetal	26
2.2.4 Identificación del ejemplar de herbario	26

2.2.5 Preparación de extractos	28
2.2.6 Determinación de Fenoles Totales	28
2.2.7 Determinación de flavonoides	29
2.2.8 Determinación de capacidad antioxidante	29
2.2.9 Determinación del contenido de antocianinas.....	30
2.2.10 Análisis estadístico	31
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
2.3.1 Cambios en las características morfológicas durante la maduración del fruto	32
2.3.2 Contenido fenólico durante la maduración	34
2.3.3 Capacidad antioxidante durante la maduración de los frutos de <i>P. serotina</i>	40
2.4 CONCLUSIÓN.....	41
2.5 REFERENCIAS	42
CAPÍTULO 3	45
RESUMEN.....	45
ABSTRACT	46
3.1 INTRODUCCIÓN.....	47
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
3.2.1 Preparación del extracto.....	49
3.2.2 Proceso de separación.....	50
3.2.3 Preparación de microcápsulas	53
3.2.4 Métodos analíticos.....	53
3.2.5 Microscopía electrónica de barrido	55
3.2.6 Distribución del tamaño de partícula	56
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
3.3.1 Condiciones de trabajo para la microencapsulación.....	61
3.3.2 Efecto del tipo de maltodextrina en las propiedades de microcápsulas elaboradas a base de extracto de capulín purificado.....	65
3.3.3 Contenido de antocianinas y fenoles totales	65
3.3.4 Morfología de las microcápsulas.....	68
3.4 CONCLUSIÓN.....	71
3.5 REFERENCIAS	72
CONCLUSIONES GENERALES.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Diagrama de Box and Whiskers, para el contenido de FT en los extracto de los tratamientos.....	12
Figura 1.2 Efecto de los principales factores en unidades SN_L	15
Figura 1.3 Interacción de los principales factores en unidades SN_L	16
 Figura 2.1 Ejemplar de herbario del árbol de capulín (<i>Prunus serotina</i> ssp. <i>Capulí</i> (Cav). McVaught <i>capulí</i> Cav) en el herbario “HORTORIO JES” de la Universidad Autónoma Chapingo.....	27
Figura 2.2. Peso, diámetro menor, longitud y diámetro mayor en los frutos de capulín (<i>Prunus serotina</i>) durante su desarrollo. Las barras de error indican el error estándar de 53 réplicas.....	34
Figura 2.3 Contenido de Fenoles Totales (a) y flavonoides (b) en los extractos de mesocarpio y epicarpio de frutos de capulín (<i>Prunus serotina</i>) a diferentes estados de desarrollo.....	37
Figura 2.4 Ruta biosintética de flavonoides y antocianinas (Holton and Cornish, 1995).....	38
Figura 2.5 Contenido de antocianinas totales (a) y actividad antioxidante (b) en los extractos de mesocarpio y epicarpio de frutos de capulín (<i>Prunus serotina</i>) a diferentes estados de desarrollo.	39
 Figura 3.1 Proceso de purificación y secado por aspersion de antioxidantes extraídos de frutos de capulín (<i>Prunus serotina</i>).....	51
Figura 3.2 Evolución del contenido de azúcares y sólidos totales en cada corriente durante el proceso de microfiltración, ultrafiltración y desorbido... 60	60
Figura 3.3. Evolución del contenido de antocianinas y polifenoles totales en cada corriente durante el proceso de microfiltración, ultrafiltración y desorbido.	61
Figura 3.4 Condiciones de trabajo para las concentraciones evaluadas.....	64
Figura 3.5 Imágenes de microscopia electrónica de barrido..	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1 Niveles de los factores del experimento.....	7
Cuadro 1.2 . Arreglo ortogonal del diseño del experimento y las variables respuesta: <i>y</i> , <i>SNL</i>	8
Cuadro 1.3 Análisis de varianza para la variable respuesta <i>y</i>	13
Cuadro 1. 4 . Análisis de varianza de la variable respuesta <i>SNL</i>	14
Cuadro 1.5 Niveles óptimos de los factores significativos.	17
Cuadro 2.1 . Atributos físicos empleados para definir la maduración de los frutos capulín (<i>Prunus serotina</i>).	33
Cuadro 3.1. Concentraciones obtenidas de las diferentes corrientes del extracto de Capulín (<i>Prunus serotina</i>) durante la purificación por adsorción.	58
Cuadro 3.2. Propiedades de las microcápsulas de extracto de capulín purificado elaboradas mediante spray dryer.	67

**DESARROLLO DE UN PROCESO PARA OBTENER MICROCÁPSULAS DE
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXTRAÍDOS DE FRUTOS
DE CAPULIN (*Prunus serotina*)**

**DEVELOPMENT OF A PROCESS TO OBTAIN MICROCAPSULES OF
COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY EXTRACTED FROM CAPULIN
(*Prunus serotina*) FRUIT**

Guillermina Hernández-Rodríguez¹ and Teodoro Espinosa-Solares²

RESUMEN

El capulín (*Prunus serotina*) es una especie distribuida en casi todo el territorio de México; sus frutos tienen actividad antioxidante y antimicrobiana, y se ha reportado que presentan propiedades antihipertensivas. Este estudio tuvo los tres objetivos siguientes: determinar las condiciones óptimas de extracción de antioxidantes en frutos de capulín, evaluar los cambios en los compuestos antioxidantes a lo largo del proceso de maduración de los frutos, y desarrollar el proceso de

ABSTRACT

The capulin (*Prunus serotina*) is a species distributed throughout almost all of Mexico; its fruits have antioxidant and antimicrobial activity, and it has been reported that they have antihypertensive properties. This study had three goals: to determine the optimal condition for extracting antioxidants from capulin fruits, to evaluate changes in antioxidant compounds during the fruit maturation process, and to develop the process for encapsulating the active compounds in capulin fruits using

encapsulación de compuestos activos de frutos de capulín utilizando diferentes matrices de maltodextrina. Las condiciones óptimas de extracción fueron etanol:agua (1:1v/v) y 30 min de agitación. La mayor actividad antioxidante en los frutos de capulín fue observada a los 93 días después de la floración. Se desarrolló un proceso para microencapsulas de capulín usando maltodextrina como material de pared: este incluyó micro- y nano-filtración, adsorción y spray drying; el proceso fue efectivo para preservar el contenido de antocianinas y fenoles totales.

Palabras clave: *Prunus serotina*, condiciones optimas de extracción fenoles totales, antocianinas, actividad antioxidante, microcápsulas, maltodextrina.

different maltodextrin matrices. The optimal extraction conditions were ethanol:water (1:1 v/v) and 30 min of stirring time. The highest antioxidant activity in capulin fruits was observed at 93 days after bloom. A process for making capulin microcapsules was developed using maltodextrin as wall material; it included purification by micro- and nano-filtration, adsorption and spray drying; the process was effective in preserving the anthocyanin content and total phenols.

Key words: *Prunus serotina*, optimal extraction conditions, total phenols, anthocyanins, antioxidant activity, microcapsules, maltodextrin.

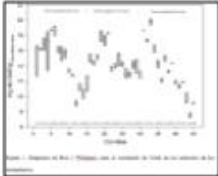
¹ Tesista, ² Director de tesis



Acetona 7:3	Tiempo de agitación
Metanol 8:2	30 min
Etanol 1:1	40 min
Etanol 7:3	50 min
Etanol 8:2	



Método de Taguchi



Condiciones óptimas
Acetona 7:3
Metanol 8:2 30 min
Etanol 1:1

Optimización de la extracción de fenoles totales por el método de Taguchi



Evaluación de la variación de la actividad antioxidante durante la maduración del fruto



Purificación del extracto a través de membranas acopladas al proceso de adsorción/desorción



Resumen Gráfico



Microcápsulas de antioxidantes de capulín

PRÓLOGO

En la actualidad existe un creciente interés por investigar los frutos silvestres para encontrar sus posibles usos, beneficios a la salud, fomentar su consumo y producción. El capulín (*Prunus serotina*) es una especie distribuida en casi todo el territorio de México, principalmente en las regiones montañosas desde Chihuahua hasta Chiapas. Los frutos de esta especie son consumidos en fresco, en infusión o en jaleas. En los últimos años han sido investigados principalmente por su presunta actividad antioxidante y antimicrobiana. Como resultado de las investigaciones algunos autores han sugerido que las antocianinas obtenidas a partir de los frutos probablemente pudieran ser empleadas en la industria de los alimentos. Sin embargo la mayoría de las investigaciones hasta ahora existentes han sido enfocadas principalmente a la identificación de estos compuestos.

El presente trabajo de investigación se abordó con el objetivo de conservar los compuestos antioxidantes de frutos de capulín, principalmente las antocianinas. En la primera etapa de la investigación se aplicó la metodología de Taguchi para encontrar las condiciones óptimas de extracción de fenoles totales en frutos de capulín, los factores que se variaron fueron mezcla de disolvente y tiempo de agitación. En la segunda etapa, aplicando las condiciones óptimas de extracción encontradas se determinó la variación de la capacidad antioxidante y del contenido fenólico de los frutos durante su maduración. En la tercera etapa de este estudio se desarrolló un procedimiento para microencapsular compuestos antioxidantes extraídos de frutos de capulín, usando maltodextrina como material de pared.

UN MÉTODO DE OPTIMIZACIÓN PARA EXTRAER FENOLES DE FRUTOS DE CAPULÍN (*Prunus serotina* Ehrh)

RESUMEN

La extracción de fenoles de frutos de *Prunus serotina* Ehrh con mezclas de acetona:agua, metanol:agua y etanol:agua en diferentes proporciones se optimizó por el método de Taguchi. Los factores evaluados fueron mezcla de disolventes y tiempo de agitación. La cuantificación de fenoles totales fue por el método de Folin-Ciocalteu. La extracción óptima fue de 20.3 ± 0.86 mg GAE gdb-1 con la mezcla acetona:agua (7:3, v/v) y un tiempo de agitación de 30 min.

Palabras clave adicionales: Método de Taguchi, disolventes polares, Folin-Ciocalteu, antioxidantes, black cherry, Rosaceae.

ABSTRACT

The phenol extraction of *Prunus serotina* Erhr with different ratios acetone:water, methanol:water and ethanol:water were optimized using the Taguchi method. The evaluated factors were solvent mixture and agitation time. The total phenols quantification was carried out using Folin-Ciocalteu method. The optimum extraction resulted at 20.3 ± 0.86 mg GAE gdb-1 using acetone:water (7:3, v/v) as dissolvent and 30 min of agitation time.

Additional key words: Taguchi method, polar solvents, Folin-Ciocalteu, antioxidants, black cherry, *Rosaceae*.

1.1 INTRODUCCIÓN

El capulín (*Prunus serotina* Erhr) pertenece a la familia Rosaceae (Calderón and Rzedowski, 2001), es un árbol nativo del norte de América y está ampliamente distribuido en México, comúnmente es llamado “capulín” o american black cherry (CONABIO, 1951, Ibarra-Alvarado et al., 2009). A esta especie se atribuyen propiedades medicinales tales como, expectorante, sedante y antiespasmódico, entre otras (Ibarra-Alvarado et al., 2009). Los frutos de capulín forman parte de la dieta mexicana y son consumidos frescos, secos o preparados en jalea, su infusión se usa especialmente para combatir la tos y tiene un contenido de fenoles totales más alto que las fresas (Vasco et al., 2009); la decocción de hojas de *Prunus serotina* tienen efectos benéficos para el tratamiento de la hipertensión (Ibarra-Alvarado et al., 2009). En uno de los primeros estudios sobre el fruto de *P. serotina* se describen los métodos de purificación e identificación de antocianinas; en dicho trabajo se aplicaron técnicas espectroscópicas, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas, con la cual fue posible identificar que los pigmentos encontrados en mayor cantidad fueron cianidina-3-glucosido y cianidina-3-rutinosido, sin grupos acilantes (Ordaz-Galindo et al., 1999). También fue demostrado que las inflorescencias y hojas de *Prunus serotina* son excelente fuente de antioxidantes (Olszewska, 2007). Adicionalmente, se encontró que la semilla de este fruto contiene en su mayoría ácidos grasos altamente poliinsaturados (Aguerrebere et al., 2011). La actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos polares de frutos de *P. serotina* ha sido evaluada previamente, los resultados indicaron que el extracto etanólico mostro el mayor

efecto antioxidante y antimicrobiano (Jiménez et al., 2011). Los estudios acerca del valor nutracéutico y las propiedades antihipertensivas de frutos de *P. serotina* sugieren que el extracto polar podría ser usado para prevenir la hipertensión y coadyuvar en su tratamiento (Luna-Vázquez et al., 2013). Dentro de los métodos de optimización, el método de Taguchi permite diseñar y optimizar productos o procesos, este método se puede aplicar cuando se tiene un número considerable de factores e interacciones ya que proporciona un número razonable de ensayos (Montgomery, 2009). La metodología del diseño se ha empleado para optimizar procesos tales como: calidad de alimentos (Chuaqui S et al., 2004), mejora en el rendimiento de reacciones químicas (Trejo et al., 1992), extracción de flavonoides (Meneses-Reyes et al., 2008) y formulación de procesos para elaborar nanopartículas (Lee et al., 2011), entre otros. Actualmente, no se han reportado las condiciones óptimas de extracción tales como tipo de disolvente y tiempo de agitación para extracción de fenoles totales en frutos de *P. serotina*. El objetivo de la presente investigación fue aplicar el método de Taguchi para determinar las variables óptimas de extracción de fenoles totales en frutos de capulín empleando como factores el tipo de disolvente y el tiempo de agitación.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Características de la muestra

Los frutos de capulín (*Prunus serotina* subsp. capulí) procedentes de la ciudad de Huejotzingo, Puebla, México fueron adquiridos en el mercado del municipio de Texcoco, Estado de México, México. Los capulines fueron cosechados

dos días antes de ser adquiridos y no presentaban daños físicos ni microbiológicos aparentes. Tres porciones de 10 g de frutos sin semilla, previamente molidos, fueron tomados para calcular el contenido de humedad.

1.2.2 Preparación de extractos

La extracción se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 50 mL, cada matraz contenía la mezcla de disolventes de prueba (10 mL) y la pulpa unida a la cascarilla previamente molida (1 g). Después de ajustar el pH entre 3.40 y 3.58 (con soluciones de HCl 5 % y NaOH 1 %), la mezcla se agitó en vortex durante 1 minuto a 1000 rpm (Vortéx Synergy, WVR International), se sonicó por 15 min (Ultrasonic Cleaner 8890, Cole-Parmer), se agitó en una incubadora a 130 rpm (Incubadora orbital Prendo INO-650 M) variando los tiempos de agitación (30, 40 y 50 min). Inmediatamente se sonicó nuevamente durante 15 min y finalmente se filtró.

1.2.3 Determinación de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales fue ensayado usando la muestra filtrada y aplicando el método de Folin-Ciocalteu adaptado a microplacas (Singleton and Rossi, 1965). Microplacas de 96 pozos fueron usadas, en cada pozo fue colocada una alícuota (25 μ L) de muestra con la dilución adecuada, 125 μ L de agua desionizada y 20 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla fue agitada y se dejó reposar durante 5 min, entonces 30 μ L de solución de Na_2CO_3 al 20 % fueron añadidos. Después se dejó incubar durante 60 min, la absorbancia frente a blanco preparado se leyó a 760 nm en un lector de microplacas (Synergy 2 Microplate reader, Biotek International, software Gen5). El contenido de fenoles totales de frutos secos de *P. serotina* (tres

repeticiones) fue expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de base en peso seco; la curva de calibración del ácido gálico se preparó en un rango de concentración de 2.5 to 29.0 $\mu\text{g GA mL}^{-1}$.

1.2.4 Optimización del proceso de extracción de fenoles totales

Los tratamientos para optimizar la extracción de fenoles totales de frutos de *P. serotina* se describen en el Cuadro 1.1. Para el análisis estadístico se consideraron dos factores controlables: disolvente y tiempo de agitación; ambos niveles se determinaron con base en investigaciones previas (Jiménez et al., 2011) y se complementaron con pruebas preliminares.

Cuadro 1.1 Niveles de los factores del experimento.

Factores	Niveles				
	1	2	3	4	5
A: proporción de disolvente (v/v)	(ac:a, 7:3)	(m:a,8:2)	(e:a, 1:1)	(e: a, 7:3)	(e:a, 8:2)
B: Tiempo de agitación (min)	30	40	50		

ac: acetona, m: metanol, e: etanol, a: agua.

Para encontrar los niveles óptimos de los factores evaluados (disolvente y tiempo), primero se obtuvo el promedio de cada corrida. Los valores SN_L fueron obtenidos sustituyendo el promedio de cada corrida en la Ecuación 2 (Cuadro 1. 2). Para el ANOVA se utilizó el paquete SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE.UU).

Cuadro 1.2 . Arreglo ortogonal del diseño del experimento y las variables respuesta:
y, SNL.

Observaciones	A	B	y = mg de GAE g ⁻¹ m s	SN _L
	Disolvente	Tiempo		
1	(ac:a, 7:3)	30 min	15.27	37.99
2	(ac:a, 7:3)	30 min	16.24	38.87
3	(ac:a, 7:3)	30 min	16.90	38.87
4	(ac:a, 7:3)	40 min	14.94	37.80
5	(ac:a, 7:3)	40 min	14.43	37.50
:	:	:	:	:
41	(e:a, 8:2)	40 min	13.72	37.06
42	(e:a, 8:2)	40 min	12.85	36.49
43	(e:a, 8:2)	50 min	9.63	33.99
44	(e:a, 8:2)	50 min	7.50	31.82
45	(e:a, 8:2)	50 min	9.16	33.56

ac: acetona, e: etanol, a: agua.

Un diseño experimental con arreglo factorial asimétrico (5x3) con tres repeticiones fue aplicado. El modelo estadístico fue:

$$SN_{Lij} = \mu + tiempo_i + disolv_j + (tiempo \times disolv) + e_{ij} \quad (1)$$

donde:

$$SN_L = -10 \log_{10} \left(\frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^{n_r} \frac{1}{y_i^2} \right) \quad (2)$$

y = FT expresada en mg GAE g_{bs}^{-1}

n_r = número de repeticiones del tratamiento

Para optimizar un proceso maximizando la variable respuesta se define la Ecuación 2 (Taguchi, 1987). Esta transformación maximiza la señal sobre el ruido y se ha denominado como mayor es mejor (larger-the-better). SN_{Lij} significa el efecto que tiene el i -ésimo nivel de tiempo, del j -ésimo nivel de disolvente, transformando (Ecuación 2) μ = media general; $tiempo_i$ = tiempo al i -ésimo nivel; $i = 1, \dots, 5$; $disolv_j$ = disolvente al j -ésimo nivel; $j = 1, \dots, 3$; eij = error del i -ésimo nivel de tiempo, del j -ésimo nivel de disolvente.

Los valores máximos obtenidos por SN_L son los óptimos cuando el objetivo del proceso es alcanzar el valor máximo (Küçük and Kocakerim, 2005).

La Ecuación 3 describe el modelo general de producción para los factores significativos (Roy, 2010).

$$\hat{y}_{\text{óptimo}} = y + (F_{11} - y) + (F_{21} - y) + \dots + (F_{nm} - y) \quad (3)$$

donde:

$\hat{y}_{\text{óptimo}}$ = resultado de fenoles totales expresado en mg GAE g_{db}^{-1} , calculado a condiciones óptimas

F_{nm} = factor n a nivel m

y = promedio de las corridas

Para la predicción del valor óptimo, se define el intervalo de confianza con la Ecuación 4:

$$I.C. = \hat{y} \text{ óptimo} \pm \sqrt{\frac{F(n_1 * n_2) V_e}{N_e}} \quad (4)$$

donde:

$F(n_1 * n_2)$ = valor de F para los grados de libertad n_1 y n_2 con un nivel de confianza de 0.05, obtenido de

n_1 = grados de libertad de la media (g. l., 1)

n_2 = grados de libertad del error

V_e = varianza del error

N_e = número de réplicas equivalentes definido por la Ecuación 5

$$N_e = \frac{(\text{número de ensayos})}{[g.l. de la media (1) + g.l. de todos los factores de la estimación]} \quad (5)$$

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Contenido de Fenoles Totales

El contenido de humedad promedio de los frutos de capulín fue de 73.00 ± 0.05 %, el contenido de humedad fue menor al reportado para frutos de *Prunus avium* L (Vursavuş et al., 2006). El diagrama de Box y Whiskers para el contenido de fenoles totales se muestra en la Figura 1.1. El contenido de fenoles totales en los extractos se encuentra en un intervalo de 8.0 a 18.0 mg EAG g_{bs}⁻¹. En la mayoría de los tratamientos se observa un tiempo medio en el que la extracción fue favorecida, también en algunos tratamientos se aprecia que hubo variación al incrementar el tiempo de agitación. Los principales factores que influyen en el rendimiento de la extracción de fenoles totales son el material vegetal, el tipo de disolvente utilizado y el método de extracción (Ignat et al., 2013).

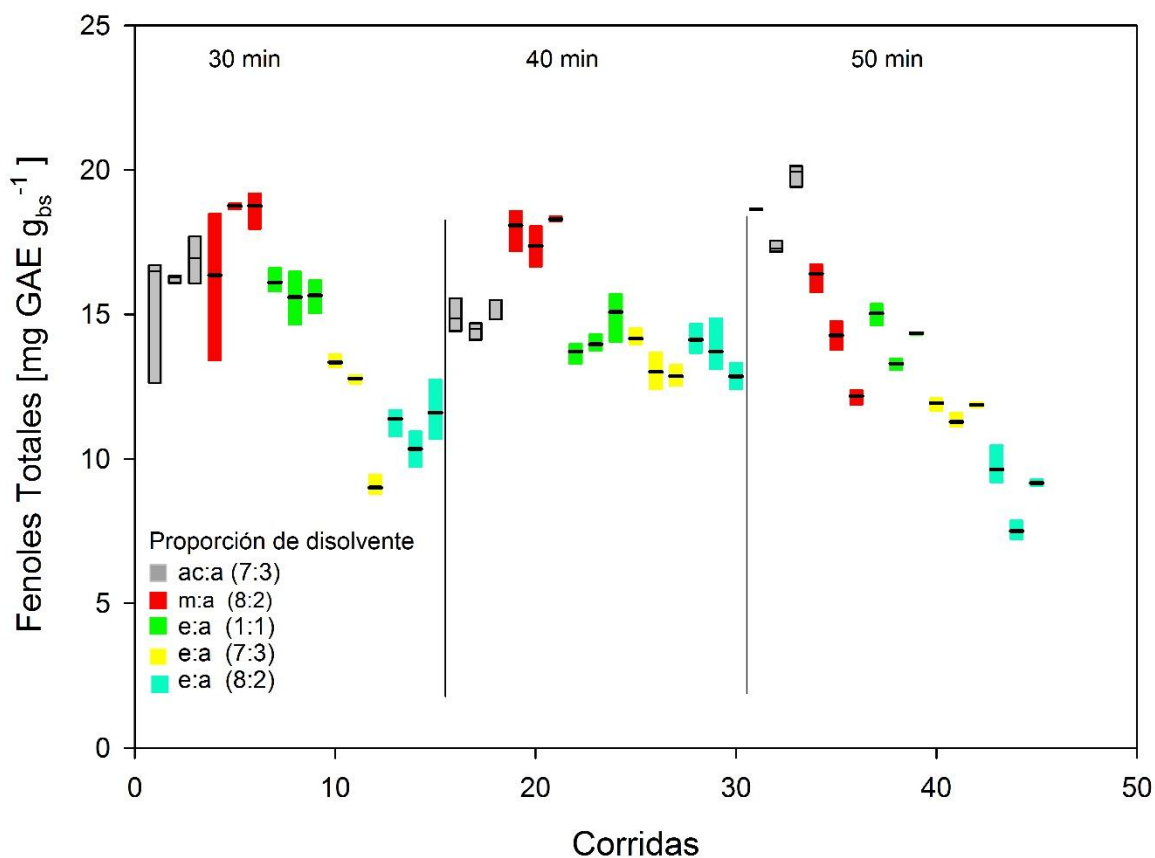


Figura 1.1. Diagrama de Box and Whiskers, para el contenido de fenoles totales en los extracto de los tratamientos. a:a= acetona:agua; m:a= metanol:agua; e:a = etanol:agua.

1.3.2 Efecto de los factores considerados en la determinación de Fenoles Totales

En los Cuadros 1.3 y 1.4 se presenta un análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos experimentalmente (y) y los calculados a partir de la Ecuación 2 (SN_L), tanto los factores evaluados como la interacción entre ellos, resultaron

significativos ($p < 0.05$). En el caso de la variable respuesta (y) la transformación “mayor es mejor”, no identifica las señales significativas sobre el ruido existente en cada corrida. En cambio cuando la variable se transforma SN_L , es posible detectar las diferencias entre los factores, el modelo usado para identificar los factores e interacciones significativas fue el presentado en la Ecuación 1.

Cuadro 1.3 Análisis de varianza para la variable respuesta y .

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Disolvente	4	226.97	56.74	45.41	<0.0001
Tiempo	2	13.77	6.89	5.51	0.0091
Tiempo x disolvente	8	79.03	9.88	7.91	<0.0001
Error	30	37.48	1.25		
Total correcto	44	357.27			

y = Datos experimentales

En la Figura 1.2 se muestra el comportamiento de las medias SN_L de los niveles de cada factor, así como sus interacciones. En esta Figura se puede observar que la cantidad de FT extraídos con las mezclas de disolventes acetona: agua (7:3, v/v), metanol: agua (8:2, v/v), etanol: agua (1:1, v/v) no presentaron diferencia significativa entre sí. Este conjunto de tratamientos fue estadísticamente diferente a las mezclas de disolventes etanol: agua (7:3 y 8:2, v/v), las cuales tuvieron menor rendimiento.

Cuadro 1.4 . Análisis de varianza de la variable respuesta SN_L

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr >F
Disolvente	4	92.58	23.13	36.98	<0.0001
Tiempo	2	8.46	4.23	6.77	0.0038
Tiempo x disolvente	8	31.81	3.97	6.36	<0.0001
Error	30	18.76	0.62		
Total correcto	44	151.54			

SN_L = Valores calculados con la Ecuación 2.

Respecto al factor tiempo de agitación, no hubo diferencia significativa entre 30 y 40 minutos; y el menor rendimiento de fenoles totales se obtiene cuando se aumenta el tiempo de agitación a 50 minutos, el cual, si bien es ligeramente menor si presenta diferencia estadística comparada con los tratamientos de 30 y 40 min. Esto podría explicarse por el efecto de la exposición prolongada a la luz y el tiempo de extracción que afectan la estabilidad de los fenoles totales (Hurtado and Pérez, 2014, Khanna et al., 1968). En la Figura 1.3 se muestra que hubo interacción significativa ($p \leq 0.05$) entre los factores proporción de disolvente y tiempo de agitación.

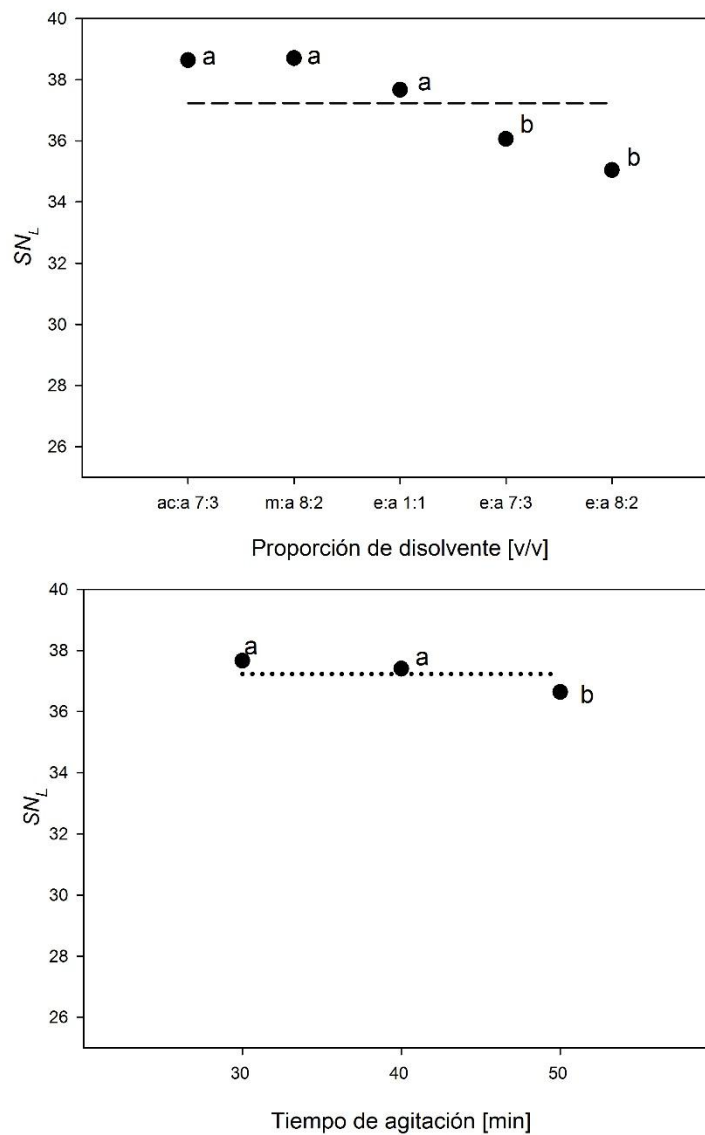


Figura 1.2 Efecto de los principales factores en unidades SN_L Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey; $P \leq 0.05$). a:a= acetona:agua; m:a= metanol:agua; e:a = etanol:agua.

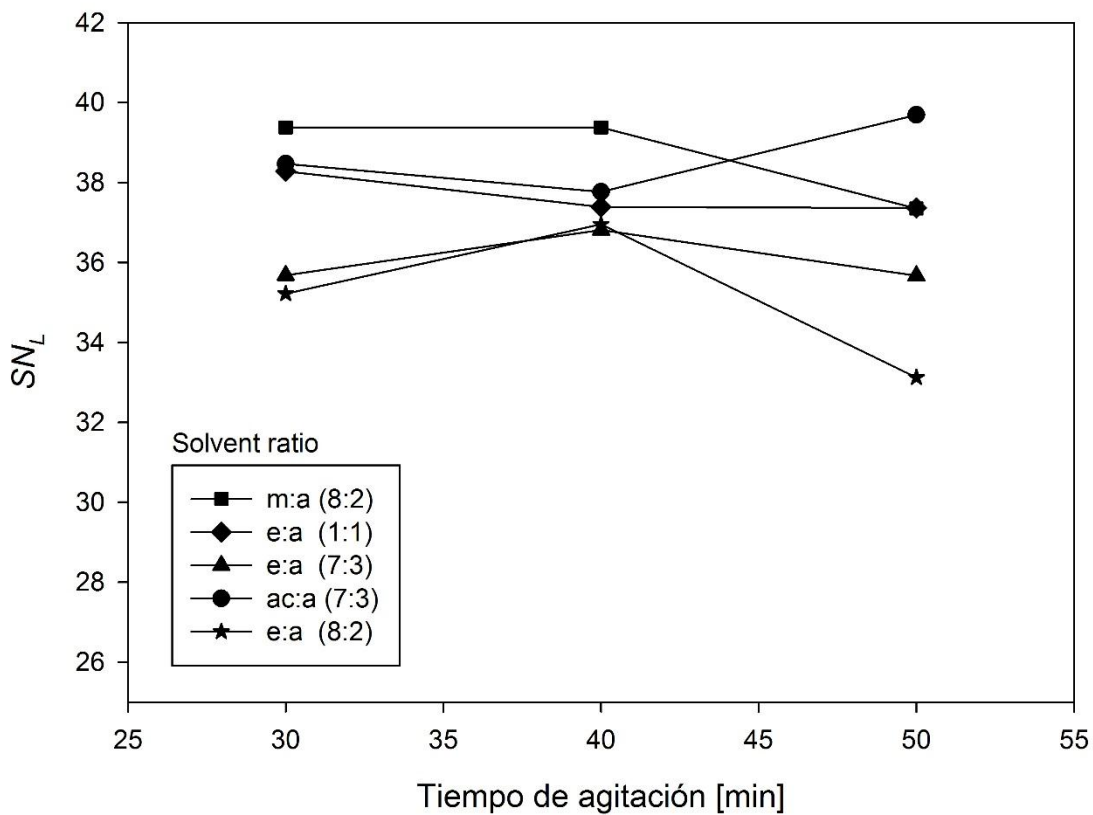


Figura 1.3 Interacción de los principales factores en unidades SN_L . a:a= acetona:agua; m:a= metanol:agua; e:a = etanol:agua.

En el Cuadro 1.5 se presentan los valores máximos de los niveles óptimos de extracción de fenoles totales, el valor óptimo en términos de los valores calculados experimentalmente ($\bar{y}$) se obtuvo con la Ecuación 6 derivada de la Ecuación 3.

$$\hat{y}_{\text{óptimo}} = \bar{y} + (F_{11} - y\bar{y}) + (F_{13} - \bar{y}) + (F_{31} - \bar{y}) + (F_{33} - \bar{y}) \quad (6)$$

Cuadro 1.5 Niveles óptimos de los factores significativos.

Factores	Proceso óptimo	
	Valores	Nivel
A: Proporción de disolvente (v/v)	ac:a (7:3)	1
	m:a (8:2)	2
	e:a (1:1)	3
B: Tiempo de agitación (min)	30	1
	40	2

ac: acetona, e: etanol, a: agua.

Al sustituir los valores significativos de la extracción de FT en la Ecuación 6, se encontró el nivel máximo que se puede obtener bajo condiciones óptimas.

$$\hat{y}_{\text{óptimo}} = 14.28 + (F_{11} - 14.28) + (F_{12} - 14.28) + (F_{21} - 14.28) + (F_{22} - 14.28) + (F_{31} - 14.28) + (F_{32} - 14.28) = 21.58 \text{ mg EAG g}_{\text{bs}}^{-1}$$

Para calcular el intervalo de confianza (IC) se utilizó la Ecuación 4 y al sustituir los valores del intervalo de confianza al 95 % resulta:

$$\begin{aligned} IC \text{ de } \hat{y}_{\text{óptimo}} &= 21.58 \pm \sqrt{\frac{(4.171) \cdot (1.25)}{\frac{45}{15}}} \\ &= 21.58 \pm 1.32 \text{ mg EAG g}_{\text{bs}}^{-1} \end{aligned}$$

donde,

$$F(n_1 * n_2) = F_{0.05, n_1 = 1, n_2 = \text{g.l. del error } 30, 4.171};$$

$$V_e = \text{cuadrado medio del error, } 1.25, N_e = 45/15 (14 \text{ g.l.} + 1).$$

Los valores F y V_e fueron calculados en función del ANOVA de los datos obtenidos experimentalmente presentados en el Cuadro 1.3. Para hacer la estimación de $\hat{y}$ óptimo, se consideraron los factores significativos del análisis de varianza correspondiente a SN_L (Cuadro 1.4) puesto que SN_L maximiza la señal y minimiza el ruido.

1.3.3 Análisis del contenido de fenoles totales

La media general del rendimiento de fenoles totales fue de $14.28 \text{ mg EAG g}_{bs}^{-1}$, el valor calculado como $\hat{y}$ óptimo fue de $21.58 \text{ mg EAG g}_{bs}^{-1}$ (IC de $\hat{y}$ óptimo = ± 1.32). Una vez definidas las condiciones óptimas del proceso (Cuadro 1.5) y establecido el intervalo de confianza (IC de $\hat{y}$ óptimo), se realizó la prueba de confirmación, bajo los parámetros óptimos. Para confirmar la eficiencia del proceso, el método indica que el resultado debe encontrarse dentro del IC calculado anteriormente y ser mayor a la media general del rendimiento.

En este caso, aunque la cuantificación de fenoles totales de las mezclas de disolventes acetona: agua (7:3, v/v), etanol: agua (1:1, v/v) y metanol: agua (8:2, v/v) resultaron estadísticamente iguales, la prueba se realizó con acetona: agua (7:3, v/v) dado que dio los rendimientos numéricamente mayores, el tiempo de agitación que se empleó fue 30 minutos. En la cuantificación de fenoles totales realizada con las condiciones óptimas (acetona: agua (7:3, v/v), 30 min de agitación) se obtuvo un rendimiento de $20.13 \text{ mg EAG g}_{bs}^{-1}$. La cantidad obtenida se encontró

dentro del intervalo establecido y fue superior a la media, lo cual confirma que la extracción de fenoles totales es la óptima bajo estas condiciones.

El valor óptimo obtenido en este trabajo para fenoles totales fue mayor que el valor reportado para jugo de diferentes cultivares de frutos maduros de frambuesa (13.82 ± 1.66 mg GAE g_{db}^{-1}), mora (13.45 ± 1.43 mg GAE g_{db}^{-1}) y fresa (12.29 ± 2.02 mg GAE g_{db}^{-1}) (Wang and Lin, 2000); sin embargo, este grupo de investigación utilizó un método de extracción diferente al procedimiento de extracción aplicado en este trabajo. Otros autores midieron el contenido de fenoles totales en frutos de arándano usando etanol acidificado como disolvente. El contenido de fenoles totales obtenido fue de 1.046 ± 0.16 mg GAE g_{bs}^{-1} , más bajo que el encontrado en este estudio para frutos de capulín usando etanol en las tres disoluciones aplicadas (Fabiani et al., 2013).

1.4 CONCLUSIÓN

El método de Taguchi permitió determinar las condiciones óptimas de extracción de fenoles totales del fruto de capulín (*Prunus serotina*). Éstas fueron con la mezcla acetona: agua (7:3, v/v) y un tiempo de agitación de 30 min. El rendimiento óptimo fue de 20.13 ± 0.86 mg EAG g_{bs}^{-1} . El tiempo de agitación y tipo de disolvente utilizado son factores que pueden incrementar o disminuir los rendimientos de fenoles totales contenidos en frutos de *P. serotina*.

1.5 REFERENCIAS

- AGUERREBERE, I. A., MOLINA, A. R., OOMAH, B. D. & DROVER, J. C. G. 2011. Characteristics of *Prunus serotina* seed oil. *Food Chemistry*, 124, 983-990.
- CALDERÓN, G. & RZEDOWSKI, J. 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*, Michoacán, México, CONABIO.
- CONABIO. 1951. *Prunus serotina* [Online]. Available: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/60-rosac6m.pdf [Accessed Agosto 2015].
- CHUAQUI S, P., WITTIG DE PENNA, E. & VILLARROEL T., M. 2004. MÉTODO DE TAGUCHI PARA OPTIMIZAR CALIDAD DE POSTRES FUNCIONALES DESTINADOS AL ADULTO MAYOR Y ESTUDIO DE PREFACTIBILIDAD TÉCNICO - ECONÓMICA. *Revista chilena de nutrición*, 31, 118-127.
- FABIANI, G. L., PÉREZ, E. E., CORRAL, L., SALGUERO, A. R., GONZÁLEZ, M., TERESCHUK, M. L. & BOGGETTI, H. J. Evaluación del contenido de antioxidantes en extractos convencionales y supercríticos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). CODINOA 2013, 2013.
- HURTADO, N. H. & PÉREZ, M. 2014. Identificación, Estabilidad y Actividad Antioxidante de las Antocianinas Aisladas de la Cáscara del Fruto de Capulí (*Prunus serótina* spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav). *Información tecnológica*, 25, 131-140.
- IBARRA-ALVARADO, C., ROJAS, A., LUNA, F., ROJAS, J. I., RIVERO-CRUZ, B. & RIVERO-CRUZ, J. F. 2009. Vasorelaxant constituents of the leaves of *Prunus serotina* "capulín". *Revista Latinoamericana de Química*, 37, 164-173.
- IGNAT, I., VOLF, I. & POPA, V. I. 2013. Analytical Methods of Phenolic Compounds. *Natural Products*. Springer.
- JIMÉNEZ, M., CASTILLO, I., AZUARA, E. & BERISTAIN, C. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp capuli) extracts. Actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de capulin (*Prunus serotina* subsp capuli). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10, 29-37.
- KHANNA, S. K., VISWANATHAN, P. N., KRISHNAN, P. S. & SANWAL, G. G. 1968. Extraction of total phenolics in the presence of reducing agents. *Phytochemistry*, 7, 1513-1517.

- KÜÇÜK, Ö. & KOCAKERIM, M. M. 2005. Optimization of dissolution of ulexite in water saturated with sulphur dioxide. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44, 1005-1011.
- LEE, S. H., HENG, D., NG, W. K., CHAN, H.-K. & TAN, R. B. H. 2011. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 403, 192-200.
- LUNA-VÁZQUEZ, F. J., IBARRA-ALVARADO, C., ROJAS-MOLINA, A., ROJAS-MOLINA, J. I., YAHIA, E. M., RIVERA-PASTRANA, D. M., ROJAS-MOLINA, A. & ZAVALA-SÁNCHEZ, M. Á. 2013. Nutraceutical Value of Black Cherry *Prunus serotina* Ehrh. Fruits: Antioxidant and Antihypertensive Properties *Molecules*, 18, 14597-14612.
- MENESES-REYES, J. C., SOTO-HERNÁNDEZ, R. M., ESPINOSA-SOLARES, T. & RAMÍREZ-GUZMÁN, M. E. 2008. Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencia*, 42, 425-433.
- MONTGOMERY, D. C. 2009. *Introduction to Statistical Quality Control*, Wiley.
- OLSZEWSKA, M. 2007. Quantitative HPLC analysis of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves and inflorescences of *Prunus serotina* Ehrh. *Acta chromatographica*, 19, 253.
- ORDAZ-GALINDO, A., WESCHE-EBELING, P., WROLSTAD, R. E., RODRIGUEZ-SAONA, L. & ARGAIZ-JAMET, A. 1999. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. *Food Chemistry*, 65, 201-206.
- ROY, R. K. 2010. *A primer on the Taguchi method*, Society of Manufacturing Engineers.
- SINGLETON, V. L. & ROSSI, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- TAGUCHI, G. 1987. *System of experimental design: engineering methods to optimize quality and minimize costs*, UNIPUB/Kraus International Publications.
- TREJO, R., RODRÍGUEZ, A. & ESCAMILLA, E. M. 1992. Aplicación de la metodología taguchi en la búsqueda de mejores rendimientos de la reacción de Friedel-Crafts para la obtención de cetonas aromáticas. *Tecnología, ciencia, educación*, 8, 10-15.

VASCO, C., RIIHINEN, K., RUALES, J. & KAMAL-ELDIN, A. 2009. Phenolic compounds in Rosaceae fruits from Ecuador. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 1204-1212.

VURSAVUŞ, K., KELEBEK, H. & SELLI, S. 2006. A study on some chemical and physico-mechanic properties of three sweet cherry varieties (*Prunus avium* L.) in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 74, 568-575.

WANG, S. Y. & LIN, H.-S. 2000. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 140-146.

VARIACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DEL CONTENIDO FENÓLICO DE LOS FRUTOS DE CAPULÍN (*Prunus serotina*) DURANTE SU MADURACIÓN

RESUMEN

Los frutos de capulín (*Prunus serótina*) están ganando importancia debido a las propiedades antioxidantes que se les han atribuido; en extractos de estos frutos se ha encontrado en su mayoría compuestos antioxidantes tales como ácido clorogénico, catequina, epicatequina, antocianidinas, cianidina-3-glicosido, entre otros. Hasta el momento no se han realizado estudios para determinar la etapa en que los frutos presentan la mayor actividad antioxidante. En este estudio se investigó el comportamiento de fenoles totales, flavonoides, antocianinas y actividad antioxidante durante la maduración de frutos de capulín. Los fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante tuvieron un comportamiento similar; su contenido fue mayor en las primeras etapas de maduración, y al final disminuyeron. Las antocianinas incrementaron a partir de que inició la maduración. Para conservar la actividad antioxidante de los frutos se recomienda que sean cosechados a los 93 días después de floración, etapa en la que los frutos presentan una coloración rojiza.

Palabras clave: maduración, floración, fenoles totales, flavonoides, antocianinas, actividad antioxidante.

ABSTRACT

Capulin fruit are becoming important because its antioxidant properties. Extracts of this fruit have showed to have antioxidant compounds as chlorogenic acid, catequin, epicatequin, antocidine, cyanidine-3-glucosyde, and so on. At this time, no research have been performed to study ripening stage which higher antioxidant activity is reached. In this research behavior of total phenols, flavonoids, anthocyanins along ripening process of this fruit. Total phenols, flavonoids and antioxidant activity showed a similar behavior; higher content was present in early ripening stages; meanwhile in the end of ripening these parameters showed lower content. The anthocyanin content incremented when the ripening process started. It is recommended to harvest capulin fruits at 93 day after bloom in order to preserve its antioxidant activity, when the fruits have a reddish pigmentation.

Palabras clave: ripening, flowering, total phenols, flavonoids, anthocyanins, antioxidant activity.

2.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha incrementado el interés por estudiar la actividad antioxidante de diversos frutillas silvestres con la finalidad de fomentar su aprovechamiento, consumo y producción (Jagadeeshwar Rao et al., 2005, Villanueva-Tiburcio et al., 2010). Los frutos de *Prunus serotina*, árbol perteneciente a la familia de las *Rosaceas*, poseen propiedades antioxidantes, antihipertensivas y antimicrobianas (Jimenez et al., 2011, Luna-Vázquez et al., 2013). Otras investigaciones sobre este fruto se han dirigido a encontrar la composición de las antocianinas presentes en el epicarpio (Castañeda-Ovando et al., 2012, Hurtado and Pérez, 2014, Ordaz-Galindo et al., 1999).

Los antioxidantes naturales son apreciados por su uso potencial en el diseño de alimentos, funcionales o nutraceuticos benéficos para la salud (Villanueva-Tiburcio et al., 2010). Para su aprovechamiento es necesario determinar la etapa de desarrollo del fruto en la que se registra la mayor actividad antioxidante. Algunos autores refieren que el contenido de compuestos fenólicos en los frutos puede ser afectado por diversos factores tales como el grado de madurez en el momento de su cosecha, las diferencias genéticas, las condiciones ambientales y de almacenamiento poscosecha y el procesamiento (Zadernowski et al., 2005). Otras investigaciones se han enfocado a entender el mecanismo de la variación de compuestos antioxidantes de diferentes frutos durante su desarrollo y maduración (Ayaz et al., 2008, Ding et al., 2001).

El propósito de esta investigación fue cuantificar el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de los frutos de capulín (*Prunus serotina*) a lo largo de su maduración,

para determinar el momento propicio para su cosecha, tomado como parámetro la máxima capacidad antioxidante.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Reactivos

El reactivo de Folin-Ciocalteu, el ácido gálico, el carbonato de sodio anhidro, el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), la catequina, el 2,4,6 tripiridil-s triazina (TPTZ), el acetato de sodio, el ácido acético glacial, el ácido clorhídrico y el cloruro férrico hexahidratado fueron adquiridos de Sigma Aldrich.

2.2.2 Instrumentación

La medición de absorbancias para cuantificar los fenoles totales, flavonoides, antocianinas y evaluar la actividad antioxidante se llevó a cabo en un lector de microplacas, equipado con bombas de inyección automática y el software de análisis de datos Gen5™data (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)

2.2.3 Material vegetal

Los frutos de capulín fueron cosechados en el municipio de Zacatlán, Estado de Puebla en Junio de 2014. Después de la etapa de floración (89 días), fueron seleccionados cinco árboles, de cada uno de ellos se colectaron 5 muestras de 100 g de frutos, cada tercer día, hasta llegar al día 97. Los frutos, libres de semillas, fueron liofilizados y conservados en congelación hasta su uso.

2.2.4 Identificación del ejemplar de herbario

El material vegetal herborizado del capulín (Figura 2.1) fue identificado por la M. C. Ernestina Cedillo Portugal y el Ing. José María Cunill F., de acuerdo a la descripción

indicada en Flora Fanerogámica de México (Calderón and Rzedowski, 2001), encontrando que corresponde a *Prunus serotina* subsp. *Capulí* (Cav). McVaught, un espécimen con número de registro 25499 fue depositado en el herbario HORTORIO JES del departamento de preparatoria Agrícola, área de Biología, de la Universidad Autónoma Chapingo.



Figura 2.1 Ejemplar de herbario del árbol de capulín (*Prunus serotina* ssp. *Capulí* (Cav). McVaught *capulí* Cav) en el herbario “HORTORIO JES” de la Universidad Autónoma Chapingo.

2.2.5 Preparación de extractos

Una muestra de 0.5 g de los frutos de capulín previamente liofilizados y molidos se mezclaron con 5 mL de una disolución etanol /agua (50:50, v/v). Después se ajustó el pH a 3.3 ± 0.05 con disoluciones de HCl 5 %, la mezcla se agitó en vortéx (1000 rpm, 3 min), se sonicó (15 min) y se agitó (150 rpm, 30 min). Finalmente, se sonicó nuevamente (15 min) y fue centrifugada (2500 rpm, 15 min). El sobrenadante se aforó a 5 mL. A partir de esta mezcla se cuantificó el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante. Cada muestra fue analizada por triplicado.

2.2.6 Determinación de Fenoles Totales

Los fenoles totales fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu adaptado a microplacas (Singleton and Rossi, 1965). En una microplaca de 96 pozos se mezclaron, en cada pozo, 25 μL de extracto de frutos de capulín. Posteriormente a cada pozo de la placa se adicionaron 30 μL de Na_2CO_3 al 20 %, 125 μL de agua destilada y 20 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:10 con agua destilada). El agua y el reactivo de Folin-Ciocalteu se adicionarán automáticamente haciendo uso del sistema de inyección automática del equipo de microplacas. Después, la microplaca, con las mezclas de reacción, se dejó en la oscuridad durante 30 minutos y se leyeron las absorbancias a 760 nm. Las mediciones se hicieron por cuatriplicado. Los resultados del contenido de fenoles totales se expresaron en miligramos de fenoles equivalentes a ácido gálico por gramo de muestra en base seca ($\text{mg EAG g}_{\text{bs}}^{-1}$). La curva de calibración de ácido gálico se preparó en un rango

de concentración de 0.005 a 0.027 mg mL⁻¹. La ecuación obtenida de la curva tipo fue utilizada para determinar la concentración de fenoles totales en la muestra.

2.2.7 Determinación de flavonoides

Los flavonoides totales fue determinado de acuerdo con el procedimiento Kubola and Siriamornpun (2011) adaptado a microplacas. Se mezclaron 0.5 mL de extracto de frutos de capulín, 2.5 mL de agua destilada y 0.15 mL de solución de NaNO₂ al 5%. Después de 6 minutos, se añadieron 0.3 mL de AlCl₃·6H₂O al 10 %. La mezcla anterior se dejó reposar durante 5 minutos y enseguida se añadió 1 mL de NaOH al 5%. La mezcla se agitó en vortéx (3000 rpm, 3 min). Finalmente se transfirieron 200 µL de cada muestra a los pozos de la microplaca y se midió la absorbancia a 510 nm en un lector de microplacas. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra en base seca (mgEC g_{bs}⁻¹). El intervalo de la curva de calibración de catequina fue de 0.7 a 34.5 µg mL⁻¹. La ecuación obtenida de la curva tipo fue utilizada para determinar la concentración de flavonoides totales en la muestra.

2.2.8 Determinación de capacidad antioxidante

El ensayo de FRAP descrito por Benzie and Strain (1996) adaptado a microplacas, fue utilizado para medir el poder reductor de los extractos de frutos de capulín. Se prepararon las siguientes disoluciones: buffer pH = 3.6 (4.624 g C₂H₃NaO₂·3H₂O y 18.2 mL C₂H₄O₂), TPTZ (2,4,6-Tripiridil-s triazina) 10 mM en HCl 40 mM, y disolución FeCl₃·6H₂O 20 mM. La disolución FRAP fue preparada al momento de su

uso mezclando 10 mL de buffer pH = 3.6, 1 mL de disolución TPTZ (10mM) y 1 mL de disolución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM). En una microplaca de 96 pozos se mezclaron, en cada pozo, 20 μL de extracto de frutos de capulín, 180 μL de la disolución FRAP y 60 μL de agua (el agua fue dispensada automáticamente con los inyectores del equipo), como blanco, se inyectaron 260 μL de disolución FRAP. Las mediciones se hicieron por cuatuplicado. Después de agitar por 30 s se midió la absorbancia a 513 nm. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ETg}_{\text{bs}}^{-1}$). El intervalo de la curva de calibración de Trolox fue de 3.8-46.0 μM . La ecuación obtenida de la curva tipo fue utilizada para determinar la actividad antioxidante de las muestras.

2.2.9 Determinación del contenido de antocianinas

Se prepararon dos muestras, de 20 mg cada una, de los frutos liofilizados y molidos. La primera muestra se disolvió en 5 mL de una disolución buffer pH1. La segunda muestra se disolvió en 5 mL de una disolución buffer pH=4.5 (Lee et al., 2005). Ambas muestras se agitaron en vortéx (15 min) y fueron centrifugadas (15 min, 2500 rpm). Una alícuota de 100 μL del sobrenadante se colocó en un pozo de la microplaca. La absorbancia de las muestras fue determinada a 513 y 700 nm en un lector de microplacas.

La concentración de pigmentos de antocianinas, se expresó como miligramos equivalentes de Cianidina 3-glucósido por gramo de muestra en base seca ($\text{mgEC} - 3 - \text{Gg}_{\text{bs}}^{-1}$), fue calculada como sigue:

Pigmento de antocianina (Equivalentes de Cyanindina 3 – glucosido, mgL⁻¹)

$$= \frac{(A * PM * FD * 10^3)}{(\epsilon * 0.38)}$$

Dónde:

$$A = (A_{520\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{520\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}})_{\text{pH}4.5}$$

PM = 449.2 g mol⁻¹ para Cianidina 3-glucósido

FD es el factor de dilución establecido

ϵ = Coeficiente de extinción molar de Cyanidina 3-glucosido (26 900 mol⁻¹ cm⁻¹)

10³ = factor de conversión de g a mg

0.38 cm = longitud de trayectoria, factor de corrección por uso de microplacas.

2.2.10 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (diseño completamente al azar con tres repeticiones) a los datos de peso, tamaño, fenoles totales, flavonoides, antocianinas y actividad antioxidante para identificar diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se usó la prueba de Tukey para las comparaciones de medias. Los datos se analizaron con el paquete SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE.UU).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Cambios en las características morfológicas durante la maduración del fruto

Las características físicas y apariencia de los frutos colectados y analizados se muestran en el Cuadro 2.1. Los parámetros que se consideraron para colectar las muestras fueron principalmente la aparición de color en el fruto y su consistencia.

El peso fresco, diámetro menor, longitud y diámetro mayor incrementaron de forma significativa (Figura 2.2) con el crecimiento y desarrollo de los frutos. El peso fresco fue estadísticamente diferente durante todo el periodo de desarrollo, el valor máximo registrado fue de 2.6 g. El diámetro menor, la longitud y el diámetro mayor se dividieron estadísticamente en dos fases: a partir del día 30 hasta el 74 se llevó a cabo un crecimiento rápido, mientras que del día 74 al 97 el crecimiento fue más lento. El tamaño máximo del fruto fue de 0.92, 0.98 y 1.14 cm para diámetro menor, longitud y diámetro mayor, respectivamente. Un comportamiento similar de los cambios en las características morfológicas durante el desarrollo y maduración ha sido reportada en otros frutos tales como wolfberry (Zhao et al., 2015) y melón (Miccolis and Saltveit, 1991).

Cuadro 2.1 . Atributos físicos empleados para definir la maduración de los frutos capulín (*Prunus serotina*).

Días después de floración	Color del epicarpio	Consistencia del fruto	Imagen
89	Pigmentación verde/rojiza	Rígido y duro	
91	Pigmentación amarillo/rojiza	Rígido	
93	Pigmentación rojiza	Rígido/Frágil	
95	Pigmentación rojiza/purpura	Frágil	
97	Pigmentación purpura	Frágil	

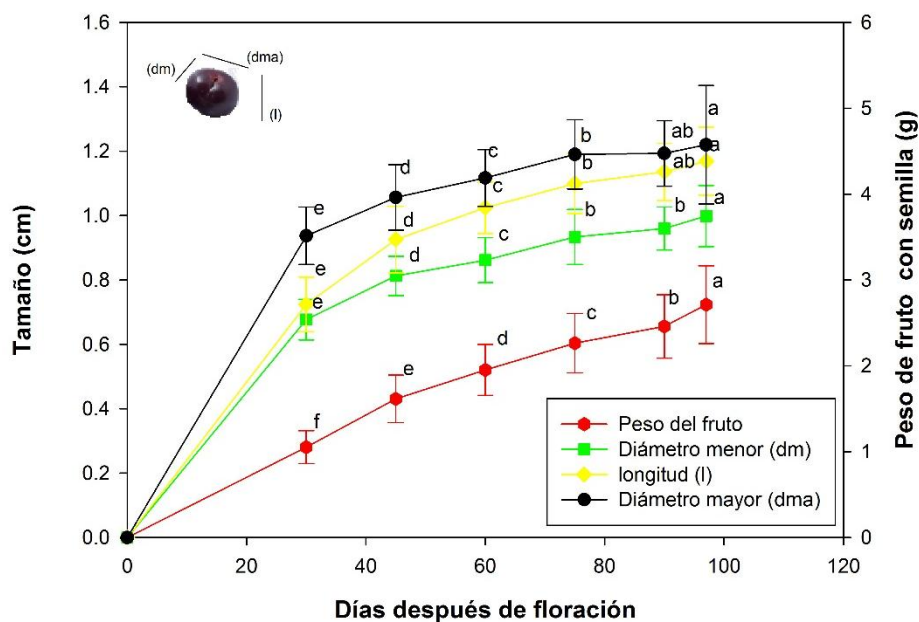


Figura 2.2. Peso, diámetro menor, longitud y diámetro mayor en los frutos de capulín (*Prunus serotina*) durante su desarrollo. Las barras de error indican el error estándar de 53 réplicas. a – b – c – d – e – f medias de la dimensión y peso con la misma letra son estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

2.3.2 Contenido fenólico durante la maduración

La variación en el contenido de fenoles totales (FT) de los extractos polares del fruto de capulín a lo largo de su maduración se muestra en la Figura 2.3a. El mayor contenido de FT fue de $23.13 \pm 3.96 \text{ mg EAG g}_{bs}^{-1}$ a los 89 días después de la floración y disminuyó hasta $13.08 \pm 5.94 \text{ mg EAG g}_{bs}^{-1}$ en el día 97. Se puede observar que desde el día 89 hasta el 93 el contenido de FT es similar, sin embargo a partir del día 94 se observa una disminución significativa. Un comportamiento similar del contenido de FT a lo largo de la maduración fue encontrado en frutos como fresas y zarzamoras (Wang and Lin, 2000), arándano azul (Castrejón et al., 2008) y

níspero (Ayaz et al., 2008, Ding et al., 2001). Sin embargo, en frutos de frambuesa (Wang and Lin, 2000) y mora (Lou et al., 2012) se encontró un comportamiento opuesto.

El contenido de flavonoides varió desde 14.79 ± 1.76 hasta 9.23 ± 1.72 mg EC mL⁻¹. En la Figura 2.3b se muestra el comportamiento de los flavonoides totales durante el periodo de maduración del fruto. Desde el día 89 hasta el 93 el contenido de flavonoides fue estadísticamente igual, incrementándose a partir del día 94. Un comportamiento similar al encontrado en este trabajo se presentó cuando se estudiaron cambios en flavonoides durante el desarrollo de frutos de mulberry (Lou et al., 2012).

Uno de los primeros cambios observados durante la madurez de los frutos del capulín fue el desarrollo de una coloración rojiza debido a la formación de antocianinas, en la Figura 2.5a se muestra que las antocianinas tienen un aumento considerable (98 %) desde el inicio hasta el final de la maduración. Estudios similares de maduración muestran que cuando los frutos se tornaron rojizos o purpura (en las etapas finales de maduración) se alcanza la cantidad máxima de antocianinas (Castrejón et al., 2008, Villanueva-Tiburcio et al., 2010, Wang and Lin, 2000).

De manera general, se observa que a lo largo del proceso de maduración, tanto los fenoles totales, como los flavonoides disminuyen, sin embargo se muestra un aumento en las antocianinas. Para explicar estos cambios se debe tener en cuenta que, al igual que los compuestos fenólicos, los azúcares y algunas proteínas son

capaces de reducir el reactivo utilizado en el ensayo de Folin-Ciocalteu (Sun-Waterhouse et al., 2013). Por otro lado, la ruta de biosíntesis de las antocianinas, estudiada por Mol et al. (1996) y Forkmann (1991), involucra en las primeras etapas, la formación de flavonoides como la hidroxichalcona, la naringenina y dihidrokaempferol entre otros (ver Figura 2.4), al final la enzima dihidroflavonoid-4 reductasa (DFR) reduce los dihidroflavoles a leucoanticianidinas, las cuales experimentan oxidación, deshidratación y glicosilación, con azúcares como la D-glucosa, lactosa l-ramnosa y la D-xylosa, para formar las antocianinas. De esta manera, la incorporación de flavonoides y azúcares para biosintetizar antocianinas, explica la disminución de fenoles y flavonoides totales y el aumento de antocianinas a lo largo de la maduración de los frutos de *P. serotina*.

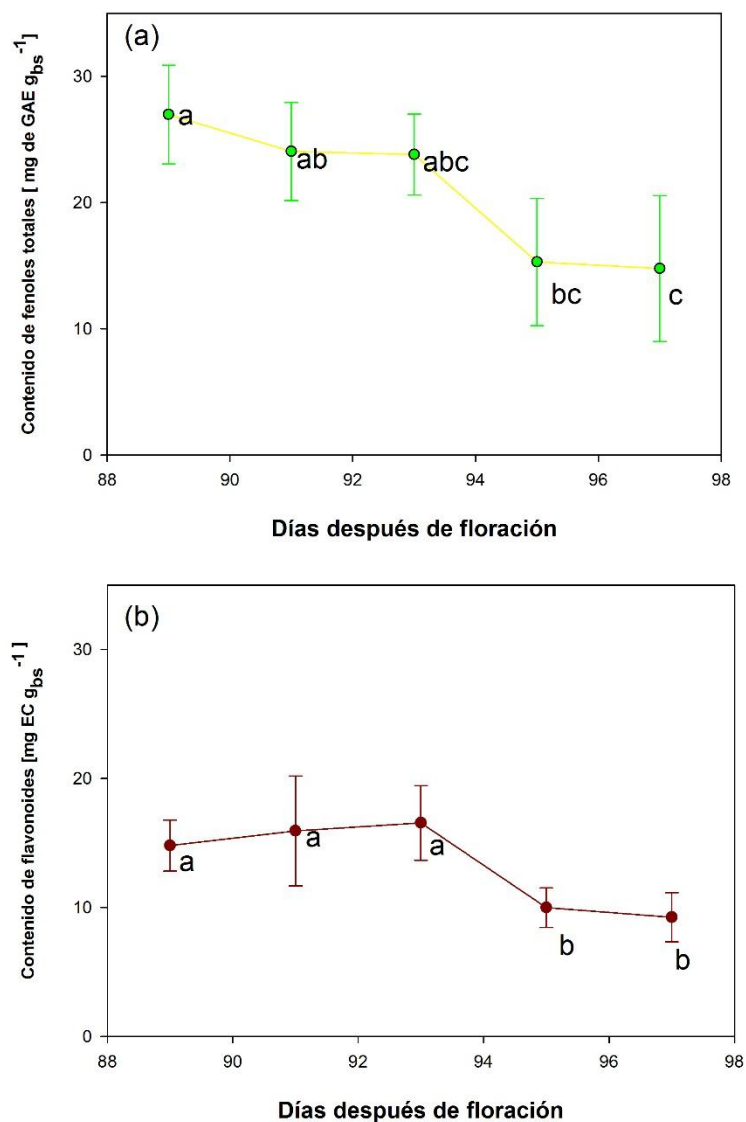


Figura 2.3 Contenido de Fenoles Totales (a) y flavonoides (b) en los extractos de mesocarpio y epicarpio de frutos de capulín (*Prunus serotina*) a diferentes estados de desarrollo. Las barras de error indican el error estándar de frutos colectados de cinco árboles diferentes. a - b - c - d - e - f medias con la misma letra son estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

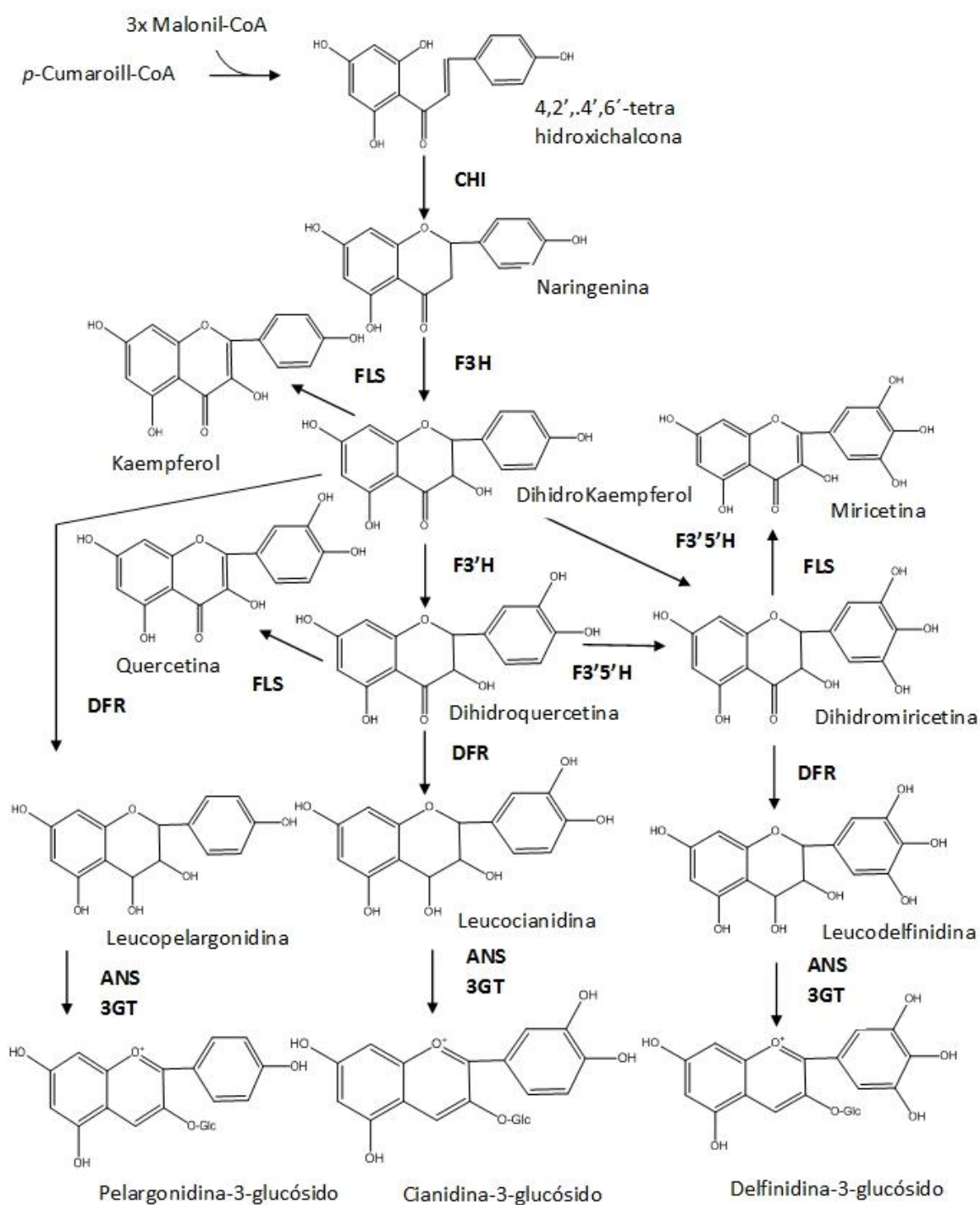


Figura 2.4 Ruta biosintética de flavonoides y antocianinas (Holton and Cornish, 1995).

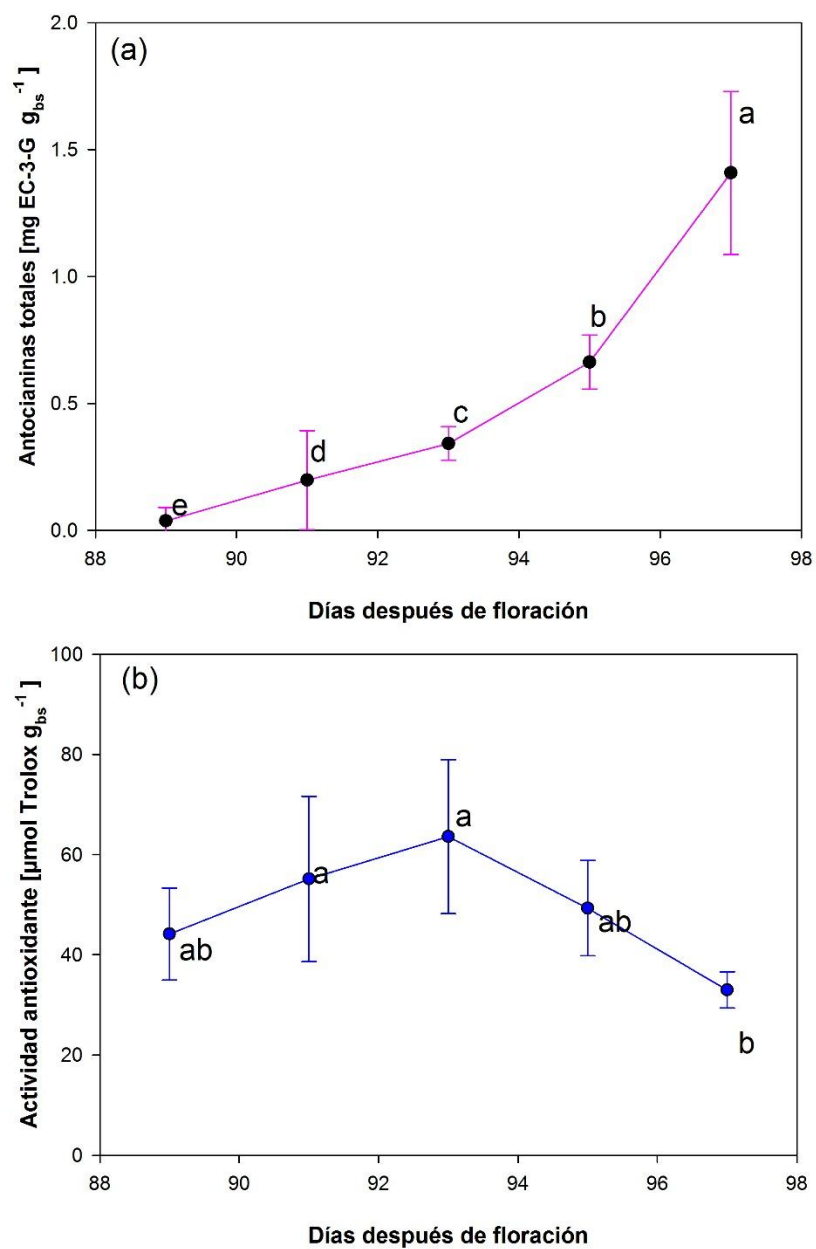


Figura 2.5 Contenido de antocianinas totales (a) y actividad antioxidante (b) en los extractos de mesocarpio y epicarpio de frutos de capulín (*Prunus serotina*) a diferentes estados de desarrollo.

2.3.3 Capacidad antioxidante durante la maduración de los frutos de *P. serotina*

La Figura 2.5b describe la capacidad antioxidante de los frutos evaluados. La mayor actividad fue al día 93 ($63.7 \pm 14.8 \mu\text{mol ET g}_{\text{bs}}^{-1}$) y la menor al 97 ($32.7 \pm 3.6 \mu\text{mol ET g}_{\text{bs}}^{-1}$). Los datos obtenidos indican que debido a la alta variación de la capacidad antioxidante en las réplicas no hubo diferencia significativa desde el día 87 hasta el 95, sin embargo los frutos colectados al día 97 tuvieron la menor actividad. La capacidad antioxidante durante las etapas de maduración en otros frutos ha sido evaluada por diversos autores (Ayaz et al., 2008, Castrejón et al., 2008, Lou et al., 2012, Villanueva-Tiburcio et al., 2010, Wang and Lin, 2000). En estos casos, la capacidad antioxidante fue determinada utilizando otras metodologías (DPPH, ABTS y ORAC); sin embargo, el comportamiento en los diferentes frutos fue semejante al obtenido en este trabajo (menor en la etapa final de maduración). Kähkönen et al. (2001) muestran que las diferencias en la madurez de la fruta pueden tener efecto sobre los perfiles fenólicos a su vez estos compuestos son generalmente más altos en frutos jóvenes que en frutos maduros, con excepción de las antocianinas, que generalmente se acumulan durante la maduración. Gruz et al. (2011) indican que la sobremaduración en los frutos contribuye a la pérdida de sus propiedades funcionales y capacidad antioxidante. Por lo tanto, la contribución de los grupos de compuestos fenólicos a la capacidad antioxidante puede variar (Castrejón et al., 2008). En la evaluación de frutos de arándano azul (Connor et al., 2002) encontraron que la capacidad antioxidante está fuertemente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos y antocianinas.

Otros investigadores refieren que en frutos de mora existen otros componentes, no las antocianinas y flavonoles, que contribuyen al contenido de flavonoides totales en las últimas etapas de maduración (Lou et al., 2012). De la misma forma Castrejón et al. (2008) indican que otros compuestos fenólicos diferentes a las antocianinas pueden contribuir positivamente a la actividad antioxidante total.

Los resultados en el presenta trabajo indican que los factores a los que se les podría atribuir la disminución de la capacidad antioxidante son los siguientes: I) la disminución de flavonoides que están involucrados en la biosíntesis de las antocianinas (Figura 2.4), II) la unión enzimática de los azúcares reductores oxidables a las antocianidinas para dar origen a las antocianinas y III) a la interacción que se da entre los polifenoles y las proteínas del fruto durante la maduración (Ozawa et al., 1987).

2.4 CONCLUSIÓN

La evidencia experimental mostró que el contenido de FT, flavonoides y actividad antioxidante en frutos de capulín disminuye en las últimas etapas de maduración. Por consiguiente, la etapa idónea en la que se deben cosechar los frutos para conservar sus propiedades antioxidantes es a los 93 días después de la floración, debido a que en este periodo se tiene la mayor cantidad de FT, flavonoides y actividad antioxidante. En esta etapa los frutos presentan coloración rojiza, tienen un peso aproximado de 2.3 g y un tamaño de 0.9, 1.1 y 1.2 cm para diámetro menor, longitud y diámetro mayor, respectivamente.

2.5 REFERENCIAS

AYAZ, F. A., DEMIR, O., TORUN, H., KOLCUOGLU, Y. & COLAK, A. 2008. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*, 106, 291-298.

BENZIE, I. F. F. & STRAIN, J. J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

CALDERÓN, G. & RZEDOWSKI, J. 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*, Michoacán, México, CONABIO.

CASTAÑEDA-OVANDO, A., SEDO, O., HAVEL, J., PACHECO, L., GALÁN-VIDAL, C. A. & CONTRERAS LÓPEZ, E. 2012. Identification of Anthocyanins in Red Grape, Plum and Capulin by MALDI-ToF MSPY -2012KW - MALDI-ToF MS. *Journal of the Mexican Chemical Society* 56, 378-383.

CASTREJÓN, A. D. R., EICHHOLZ, I., ROHN, S., KROH, L. W. & HUYSKENS-KEIL, S. 2008. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109, 564-572.

CONNOR, A. M., LUBY, J. J., HANCOCK, J. F., BERKHEIMER, S. & HANSON, E. J. 2002. Changes in Fruit Antioxidant Activity among Blueberry Cultivars during Cold-Temperature Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 893-898.

DING, C.-K., CHACHIN, K., UEDA, Y., IMAHORI, Y. & WANG, C. Y. 2001. Metabolism of Phenolic Compounds during Loquat Fruit Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2883-2888.

FORKMANN, G. 1991. Flavonoids as Flower Pigments: The Formation of the Natural Spectrum and its Extension by Genetic Engineering. *Plant Breeding*, 106, 1-26.

GRUZ, J., AYAZ, F. A., TORUN, H. & STRNAD, M. 2011. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. *Food Chemistry*, 124, 271-277.

HOLTON, T. A. & CORNISH, E. C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 1071.

HURTADO, N. H. & PÉREZ, M. 2014. Identificación, Estabilidad y Actividad Antioxidante de las Antocianinas Aisladas de la Cáscara del Fruto de Capulí (*Prunus serótina* spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav). *Información tecnológica*, 25, 131-140.

JAGADEESHWAR RAO, R., SAMPATH KUMAR, U., VENKAT REDDY, S., TIWARI, A. K. & MADHUSUDANA RAO, J. 2005. Antioxidants and a new germacrane sesquiterpene from *Carissa spinarum*. *Natural Product Research*, 19, 763-769.

JIMENEZ, M., CASTILLO, I., AZUARA, E. & BERISTAIN, C. I. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp capuli) extracts. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10, 29-37.

KÄHKÖNEN, M. P., HOPIA, A. I. & HEINONEN, M. 2001. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076-4082.

KUBOLA, J. & SIRIAMORNpun, S. 2011. Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127, 1138-1145.

LEE, J., DURST, R. W. & WROLSTAD, R. E. 2005. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269-1278.

LOU, H., HU, Y., ZHANG, L., SUN, P. & LU, H. 2012. Nondestructive evaluation of the changes of total flavonoid, total phenols, ABTS and DPPH radical scavenging activities, and sugars during mulberry (*Morus alba* L.) fruits development by chlorophyll fluorescence and RGB intensity values. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 19-24.

LUNA-VÁZQUEZ, F., IBARRA-ALVARADO, C., ROJAS-MOLINA, A., ROJAS-MOLINA, J., YAHIA, E., RIVERA-PASTRANA, D., ROJAS-MOLINA, A. & ZAVALA-SÁNCHEZ, Á. M. 2013. Nutraceutical Value of Black Cherry *Prunus serotina* Ehrh. Fruits: Antioxidant and Antihypertensive Properties. *Molecules*, 18, 14597.

MICCOLIS, V. & SALTVEIT, M. E. 1991. Morphological and physiological changes during fruit growth and maturation of seven melon cultivars. *Journal of the American Society for horticultural science*, 116, 1025-1029.

- MOL, J., JENKINS, G., SCHÄFER, E., WEISS, D. & WALBOT, V. 1996. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15, 525-557.
- ORDAZ-GALINDO, A., WESCHE-EBELING, P., WROLSTAD, R. E., RODRIGUEZ-SAONA, L. & ARGAIZ-JAMET, A. 1999. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. *Food Chemistry*, 65, 201-206.
- OZAWA, T., LILLEY, T. H. & HASLAM, E. 1987. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26, 2937-2942.
- SINGLETON, V. L. & ROSSI, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- SUN-WATERHOUSE, D., WANG, W., WATERHOUSE, G. N. & WADHWA, S. 2013. Utilisation Potential of Feijoa Fruit Wastes as Ingredients for Functional Foods. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 3441-3455.
- VILLANUEVA-TIBURCIO, J. E., CONDEZO-HOYOS, L. A. & ASQUIERI, E. R. 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Food Science and Technology (Campinas)*, 30, 151-160.
- WANG, S. Y. & LIN, H.-S. 2000. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140-146.
- ZADERNOWSKI, R., NACZK, M. & NESTEROWICZ, J. 2005. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2118-2124.
- ZHAO, J., LI, H., XI, W., AN, W., NIU, L., CAO, Y., WANG, H., WANG, Y. & YIN, Y. 2015. Changes in sugars and organic acids in wolfberry (*Lycium barbarum* L.) fruit during development and maturation. *Food Chemistry*, 173, 718-724.

ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE CAPULÍN (*Prunus serotina*) EMPLEANDO DIFERENTES MATRICES DE MALTODEXTRINA

RESUMEN

Los pigmentos naturales que se obtienen de las flores y los frutos han resultado de interés para la industria de los alimentos ya que proveen una alternativa para restablecer el color de los alimentos sometidos a procesamiento. Las antocianinas de los frutos de capulín han sido propuestas para ser aplicadas en los alimentos debido a su color atractivo y actividad antioxidante. En el presente trabajo se implementó un proceso de purificación preliminar de antocianinas de frutos de capulín (*Prunus serotina*), y se desarrolló un procedimiento para obtener microcápsulas del extracto purificado utilizando maltodextrina como material de pared. La purificación se llevó a cabo usando membranas de separación y mediante el procedimiento de adsorción. La adsorción se realizó usando una resina XAD-4. Durante el proceso de purificación y adsorción se llevó a cabo la cuantificación de sólidos totales, azúcares reductores, antocianinas y fenoles totales. Así mismo, durante el proceso de microencapsulación se cuantificó el contenido de antocianinas y fenoles totales. Los resultados indicaron que aplicando el proceso de purificación propuesto se logró eliminar un alto contenido de hidratos de carbono y proteínas; además con el proceso de adsorción se logró concentrar el contenido de antocianinas y fenoles totales. Los resultados de la microencapsulación indicaron que a una concentración de sólidos totales de 0.1 % se logró conservar el contenido de antocianinas y fenoles totales mayormente.

Palabras clave: capulín, purificación, adsorción, microencapsulación, maltodextrina.

ABSTRACT

Natural pigments obtained from flowers and fruits have been of interest to the food industry because they provide an alternative to reestablish the color of processed food. Anthocyanins of capulín (*Prunus serotina*) fruits have been proposed to be applied in food products because their attractive color and antioxidant activity. In this research a preliminary purification process of anthocyanin capulín fruits was implemented. In addition a procedure was developed to obtain microcapsules with the purified extract using maltodextrin as wall material. Purification was carried out using separation membranes and an adsorption process. The adsorption was performed using a XAD-4 resin. Total solids, reducing sugars, total phenols and anthocyanins measurements were realized along entire the purification and adsorption processes. Also during the microencapsulation process the content of total phenols and anthocyanins were quantified. The results indicated that applying the proposed purification process was eliminated a high content of carbohydrates and proteins; in addition to the adsorption process it was achieved concentrate anthocyanins and total phenols. Results from microencapsulation process indicated that using total solid concentration of 0.1% was achieved preserve almost the content of anthocyanins and total phenols.

Keywords: Capulín, purification, adsorption, microencapsulation, maltodextrin.

3.1 INTRODUCCIÓN

El color es uno de los atributos más importantes en los alimentos debido a que mejora su apariencia, fomenta su consumo y frecuentemente está relacionado con su calidad (Lawless and Heymann, 2010). Sin embargo, cuando un alimento se somete a procesamiento, generalmente pierde su color característico (Solymosi et al., 2015). Para reestablecer esta pérdida, se ha recurrido al uso de colorantes artificiales, no obstante, su uso ha causado polémica por sus posibles repercusiones a la salud (Suh and Choi, 2012). Como alternativa, se ha fomentado el uso de pigmentos naturales para obtener alimentos atractivos y con propiedades funcionales (Timberlake and Henry, 1986).

Las flores y los frutos de las plantas se encuentran entre las principales fuentes de pigmentos naturales. Algunos compuestos, obtenidos a partir de estos, han recibido un gran interés por la industria de los alimentos debido a las coloraciones que proporcionan son las antocianinas y los carotenoides (Delgado-Vargas et al., 2000). Las antocianinas son responsables de los colores, rosa, rojo, púrpura y azul en flores, hojas, frutos y vegetales (Delgado-Vargas et al., 2000); estos pigmentos hidrosolubles se acumulan en las células epidérmicas de las frutas en maduración y se han extraído principalmente de zarzamora, arándano, blueberry, mora, fresas, uvas, cerezas y otras frutillas silvestres (Wang and Lin, 2000, Ordaz-Galindo et al., 1999, Villanueva-Tiburcio et al., 2010). La naturaleza hidrofílica de las antocianinas permite su extracción con disolventes polares y facilita su posible incorporación a los alimentos. Actualmente se han desarrollado diversos métodos para extraer estos compuestos a partir del material vegetal, la mayoría de

estos procesos no son selectivos; en tanto los pigmentos obtenidos se acompañan de grandes cantidades de otros compuestos tales como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas que forman matrices complejas dificultando su aislamiento y purificación (Jampani et al., 2014). Los procesos de separación con membranas microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración y subsecuentes adsorción/desorción en resinas, han sido aplicados para la purificación de compuestos hidrofílicos como las antocianinas (Cerón-Montes et al., 2015, Cissé et al., 2011). La separación de las antocianinas de las matrices complejas en los frutos, incrementan su estabilidad (Buran et al., 2014, Jampani et al., 2014, Jampani and Raghavarao, 2015, Chandrasekhar et al., 2012). Por otra parte, las antocianinas purificadas tienden a ser inestables ante factores como el estrés térmico, cambios de pH, presencia de oxígeno y luz; con el fin de aumentar su vida útil y conservar sus propiedades es conveniente utilizar métodos de encapsulación para conservarlas. La microencapsulación es definida como una tecnología mediante la cual pequeñas partículas sólidas, gotas de líquido o gases son incrustadas en materiales de concha o de matriz que generalmente son polímeros, su tamaño puede ser desde 1 hasta 100 micras y pueden tener diferentes morfologías (Schrooyen et al., 2001). Esta tecnología provee una solución técnica al incremento de la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de compuestos bioactivos, derivados de las frutas y los vegetales. Dentro de los métodos de encapsulación, los más usados para la conservación de fitoquímicos son el secado por aspersión, secado en frío, la formación de liposomas y la coacervación y formación de complejos de inclusión molecular. El método de secado por aspersión es el más común en la industria de alimentos, comparado con otras técnicas, presenta ventajas tales como la amplia

disponibilidad de equipo, producción a gran escala, fácil manipulación de condiciones de operación y bajos costos de proceso (Kwak, 2014). El secado por aspersión se ha utilizado para la microencapsulación de extractos de zanahoria negra, *Garcinia indica*, *Myrica rubra* Sieb. Et Zucc y jugo de Acai, la matriz utilizada para estas investigaciones fue maltodextrina con diferentes equivalentes de dextrosa. Aplicando este método de microencapsulación se logró preservar el color de los extractos, sus propiedades funcionales y prolongar su vida útil (Ersus and Yurdagel, 2007, Fang and Bhandari, 2011, Nayak and Rastogi, 2010, Tonon et al., 2010).

Con base en lo anterior y tomando en cuenta que no se conoce reporte alguno sobre la microencapsulación de los antioxidantes contenidos en los frutos de capulín, el objetivo del presente trabajo fue obtener microcápsulas, usando como matriz maltodextrina con diferentes equivalentes de dextrosa, a partir de un extracto acuoso acidificado de frutos de *Prunus serotina*, previamente sometido a los procesos de microfiltración, ultrafiltración y adsorción/desorción.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Preparación del extracto

Los frutos de capulín sin semilla, previamente liofilizados, se mezclaron con una disolución acuosa de ácido fosfórico 0.08 M en una proporción 1:20 p/p. La extracción consistió en agitar la mezcla en un vortéx (1000 rpm/3 min) (Vortéx Synergy, WVR International), se sonicó (15 min) (Ultrasonic Cleaner 8890, Cole-Parmer), se agitó en una incubadora (150 rpm/30 min, 37 °C) (Prendo INO-650 M),

se sonicó nuevamente (15 min). Al extracto obtenido se le aplicó el proceso de separación descrito a continuación.

3.2.2 Proceso de separación

El proceso de separación para obtener el pigmento preliminar purificado consistió de las operaciones descritas en la Figura 3.1(a) muestra el proceso inicial de la purificación del extracto hasta el proceso de adsorción. El proceso de desorción y secado por aspersion se muestra en la Figura 3.1 (b).

La pre-clarificación se aplicó para remover los sólidos suspendidos, el extracto fue filtrado utilizando papel filtro en pliego de fabricación nacional (P.V. N01021, abertura de poro de 8 μm y una bomba de vacío (FELISA Modelo FE-1500L). El permeado de la pre-clarificación fue sometido a un proceso de microfiltración (MF) utilizando un filtro de cápsula de fibra hueca MINNTECH FiberFlo con membrana de polisulfona (tamaño de poro 0.05 μm , área de 0.1858 m^2) a presión transmembrana de 206.8 kPa y flujo axial de 6 Lmin^{-1} . Después se llevó a cabo la ultrafiltración utilizando un sistema de Prep/Scale Millipore usando una membrana de material de celulosa regenerada de 1 kDa (0.09 m^2 , modelo CDF 001 LA) y una bomba peristáltica Cole Palmer (Modelo 7553-70). Bajo las condiciones de operación: presión de transmembrana (206.8 kPa), y un flujo axial de 6 Lmin^{-1} .

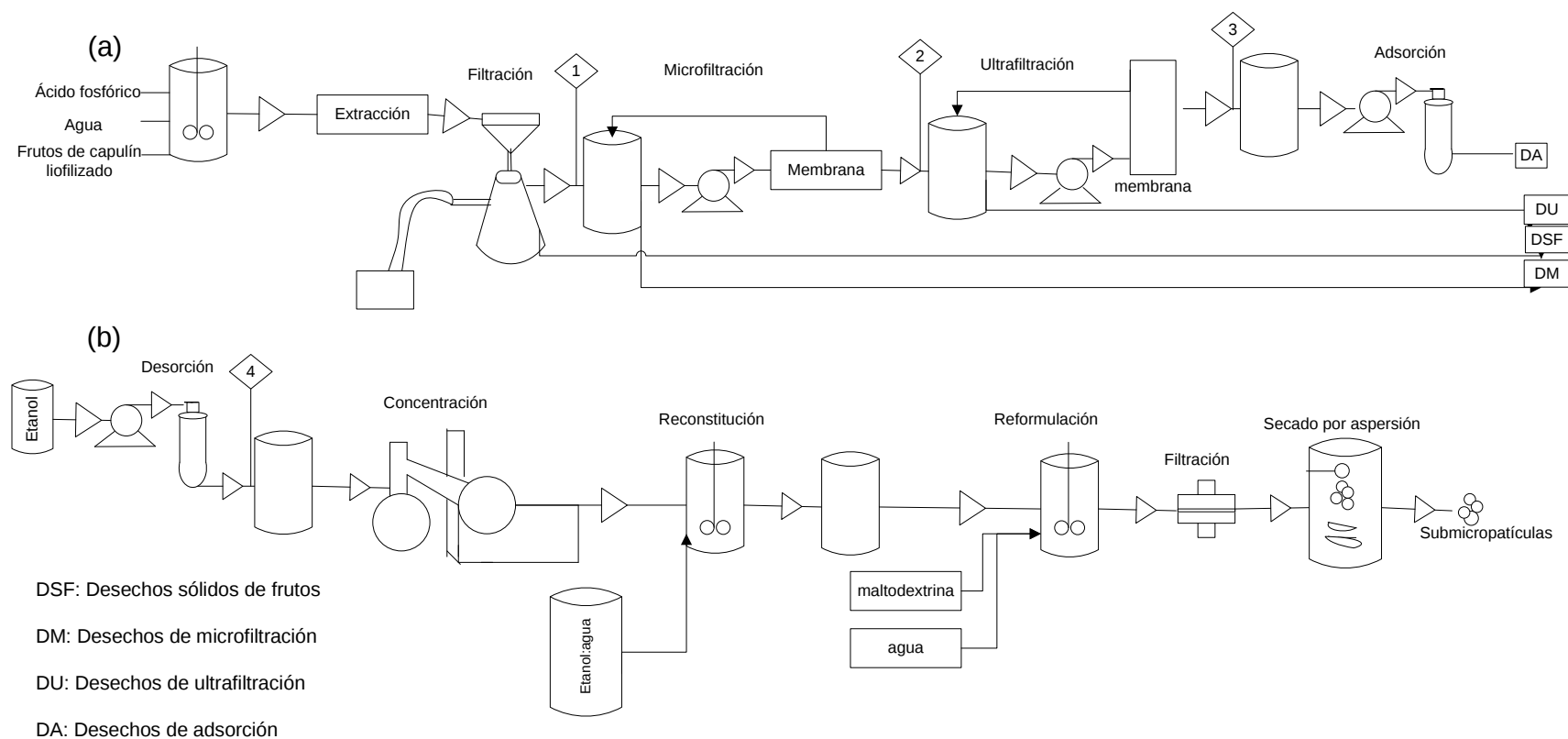


Figura 3 1 Proceso de purificación y secado por aspersión de antioxidantes extraídos de frutos de capulín (*Prunus serotina*).

1. Corriente de extracto clarificado (EC), 2. Corriente de extracto microfiltrado (EMF), 3. Corriente de extracto ultrafiltrado (EU), 4. Corriente de extracto desorbido (D).

La adsorción se llevó a cabo usando 50 g de resina (XAD-4 Amberlite, Rohm and Haas Company, Philadelphia, U.S.A.) activada. Para activar la resina se hicieron aproximadamente 10 lavados con etanol y después se dejó reposar en el mismo durante 12 h, posteriormente se retiró el exceso de etanol y la resina fue empacada en una columna para su uso. XAD-4 Amberlite es un polímero reticulado no iónico que deriva sus propiedades de adsorción de su estructura macrorreticular, su alta área superficial, y la naturaleza aromática de su superficie. El extracto de capulín (3.700 kg) se hizo pasar por la columna empacada utilizando una bomba peristáltica (Masterflex L/S Easy-Load II) a una velocidad de 10 mL min^{-1} . El pigmento del extracto fue adsorbido por la resina, mientras que el disolvente incoloro fue colectado en otro recipiente. Terminado el proceso, la resina fue lavada con agua purificada. Posteriormente, se hizo pasar aire a través de la resina para eliminar el exceso de agua. El pigmento adsorbido en la resina se recuperó con 200 mL de etanol, el cual posteriormente se evaporó a sequedad a una temperatura de 29°C , usando un evaporador rotario; finalmente fue rehidratado utilizando una disolución de etanol/agua (3:1 p/p).

El contenido de antocianinas, fenoles totales, azúcares reductores y sólidos totales se cuantificó después de cada una de las operaciones unitarias llevadas a cabo para purificar el extracto, es decir, en el extracto inicial, después de la microfiltración y ultrafiltración. También se midieron los parámetros anteriores en los pigmentos obtenidos por desorción con etanol/agua (3:1 p/p).

3.2.3 Preparación de microcápsulas

La matriz para llevar a cabo la microencapsulación de las antocianinas fue con maltodextrina a tres diferentes concentraciones (5.0, 0.3 y 0.1 %). Para las dos primeras concentraciones se utilizó maltodextrina de 16.5 - 19.5 equivalentes de dextrosa (ED) y para la de 0.1 % se utilizó maltodextrina de 10 ED. Cada disolución de maltodextrina contenía 5.0 % de extracto de capulín purificado. Las disoluciones fueron homogenizadas (20 min) utilizando un agitador magnético y posteriormente filtradas a través de una membrana de 0.45 μm . Finalmente cada una de las mezclas fue alimentada a un nano secador por aspersion (Nano-Spray Dryer B-90, BÜCHI), el tamaño de membrana utilizada en el cabezal fue de 5 μm .

3.2.4 Métodos analíticos

3.2.4.1 Sólidos totales

Los sólidos totales fueron determinados durante el proceso de purificación y concentración de antocianinas usando una termobalanza Santorius Modelo Mark un gramo de extracto de capulín fue secado a 100 °C. Los resultados fueron expresados como gramos de sólido por kilogramo de extracto (g kg^{-1}).

3.2.4.2 Contenido de antocianinas totales

El contenido de antocianinas totales (AT) fue determinado por el método diferencial de pH. La absorbancia de las muestras fue medida a 520 y 700 nm en un lector de microplacas (Synergy 2, Biotek International, software Gen5). La concentración de pigmentos de antocianinas, se expresó como miligramos equivalentes de cianidina 3-glucósido por kilogramo de muestra (mg kg_m^{-1}), y se calculó de acuerdo con la ecuación (1):

$$AT (mgL^{-1}) = \frac{(A * PM * FD * 10^3)}{(\varepsilon * 0.38)} \quad (1)$$

Dónde:

A = Absorbancia determinada como $(A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH} 1.0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH} 4.5}$

PM = 449.2 g mol⁻¹ de la cianidina 3-glucósido

FD = Factor de dilución establecido

ε = Coeficiente de extinción molar de cianidina 3-glucosido (26 900 mol⁻¹ cm⁻¹)

10³ = Factor de conversión de g a mg

0.38 cm = Longitud de trayectoria, factor de corrección por uso de microplacas, expresada en cm.

3.2.4.3 Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) adaptado a microplacas. Cada análisis se realizó por triplicado colocando en cada pozo de la microplaca (96 pozos) una mezcla de 25 µL de extracto de frutos de capulín, 30 µL de Na₂CO₃ al 20 %, 125 µL de agua destilada y 20 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:10 con agua destilada). El agua y el reactivo de Folin-Ciocalteu se adicionaron automáticamente haciendo uso del sistema de inyección del equipo. Después, la microplaca, con las

mezclas de reacción, se dejó en obscuridad durante 30 minutos y finalmente se leyeron las absorbancias a 760 nm. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mgEAG g⁻¹). La curva de calibración de ácido gálico se preparó en un rango de concentración de 0.005 a 0.027 mg mL⁻¹. La ecuación obtenida de la curva tipo fue utilizada para determinar la concentración de fenoles totales en la muestra.

3.2.4.5 Contenido de azúcares reductores

La cantidad de azúcares reductores en la muestra fue determinada usando el método 3,5 dinitro salicílico (DNS) (Bello Gil et al., 2006). En un tubo de ensayo se mezclaron 1 mL de muestra y 1 mL de reactivo DNS, la mezcla se mantuvo dentro de agua en ebullición (6 min), en seguida se colocó en agua fría. Durante todo el proceso se evitó la exposición a la luz. La absorbancia de cada una de las muestras fue medida a 540 nm utilizando un espectrofotómetro (PerkinElmer's LAMBDA 25). Las mediciones se hicieron por triplicado. Los resultados fueron expresados como g de glucosa por kilogramo de muestra (g kg_m⁻¹). La curva de calibración de la glucosa se preparó en un rango de concentración de 0.015 a 0.220 mg L⁻¹.

3.2.5 Microscopía electrónica de barrido

La estructura de las microcápsulas fue evaluada utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL, JSM-6390LV. Los polvos fueron adheridos a un cartucho utilizando una cinta de carbono de dos caras, posteriormente fueron recubiertos con oro usando un equipo Vaccum Desk IV (15 min). Para las muestras con concentración de 5.0 % el equipo fue operado a 20 kV x 3 300 y 3 500, para las concentraciones de 0.3 y 0.1 % las condiciones fueron 20 kV x 10 000.

3.2.6 Distribución del tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula fue medida, por triplicado, usando un equipo de dispersión de luz dinámica, Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Una pequeña muestra de microcápsulas fue suspendida en acetato de etilo y homogenizada con un vortex (1 min). El tamaño de partícula se expresó como el diámetro medio del volumen de partícula.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 3.1 se muestran los valores de sólidos totales, azúcares, fenoles totales y antocianinas a lo largo del proceso de preclarificación y desorción del extracto hidroalcohólico de los frutos de capulín. De acuerdo con la información generada, durante el proceso de microfiltración y ultrafiltración se removieron el 47.70 % de sólidos totales del extracto inicial y aproximadamente el 39.70 % de azúcares; por otro lado, el contenido de antocianinas y fenoles totales con la ultrafiltración disminuyeron en 18.40 % y 25.25 %, respectivamente. El uso de membranas de flujo tangencial no sólo reduce el contenido de sólidos totales sino también una proporción de antocianinas y fenoles totales (Cassano et al., 2013, Cerón-Montes et al., 2015). Conviene destacar que, el extracto inicialmente tenía un aspecto turbio y después de los procesos de micro y ultrafiltración se observó translúcido. El mismo comportamiento se encontró en el proceso de purificación de antocianinas de col morada y fue atribuido a la eliminación de compuestos presentes en el extracto crudo, que generalmente causan turbidez, tales como: taninos, pectinas y sólidos en suspensión (Jampani and Raghavarao, 2015). Como los taninos forman parte del contenido fenólico su eliminación contribuye a la

disminución de fenoles totales. Durante la maduración de los frutos los polifenoles tienden a unirse a las proteínas (Ozawa et al., 1987). Por lo tanto la eliminación de proteínas durante la clarificación del extracto de frutos de capulín, contribuya a la disminución de fenoles totales.

Cuadro 3.1. Concentraciones obtenidas de las diferentes corrientes del extracto de Capulín (*Prunus serotina*) durante la purificación por adsorción.

Corriente *	Masa corriente (kg)	Sólidos totales (g kg ⁻¹)	Concentración de azúcares reductores (g Glucosa kg ⁻¹)	Concentración de antocianinas totales (mgEC – 3 – G kg ⁻¹)	Concentración de fenoles totales (mgEAG kg ⁻¹)
Extracto crudo	4.492 ± 0.001	38.36 ± 0.0001	-----	-----	-----
Extracto micro-filtrado	4.257 ± 0.001	28.88 ± 0.0001	8.9 ± 0.56	2.22 ± 0.061	293 ± 1.3
Extracto ultra-filtrado	3.783 ± 0.001	20.07 ± 0.0001	5.37 ± 0.56	1.81 ± 0.106	219 ± 2.1
Desorbido	0.180 ± 0.001	37 ± 0.0001	1.3 ± 0.59	36.2 ± 1.17	4187 ± 178

Valor medio de las determinaciones ± la desviación estándar de tres repeticiones. * Definidas en la Figura 1.

La aplicación del proceso de adsorción contribuye a la concentración de antocianinas totales e incrementa su estabilidad, también favorece la concentración del contenido de fenoles totales (Buran et al., 2014, Cerón-Montes et al., 2015). En este caso el proceso de adsorción logró concentrar el contenido de sólidos, antocianinas y fenoles totales, debido a la retención de componentes activos en la membrana de adsorción y a la estandarización que se hace en el proceso de elución y evaporación, además se eliminó un 75 % más de azúcares del extracto ultrafiltrado.

En la Figura 3.2 se muestran los cambios en las corrientes respecto al contenido de sólidos totales y azúcares, se puede observar que durante el proceso se presentó una disminución paulatina de la cantidad de sólidos totales a su vez el contenido de azúcares también disminuyó. De acuerdo con Jampani et al. (2014) los azúcares libres y la degradación de sus productos en los extractos de las antocianinas conducen a la reacción de Maillard y forman compuestos marrón; por lo tanto, su eliminación en los extractos es muy deseable para los pigmentos y facilita su aplicación en el procesamiento de alimentos.

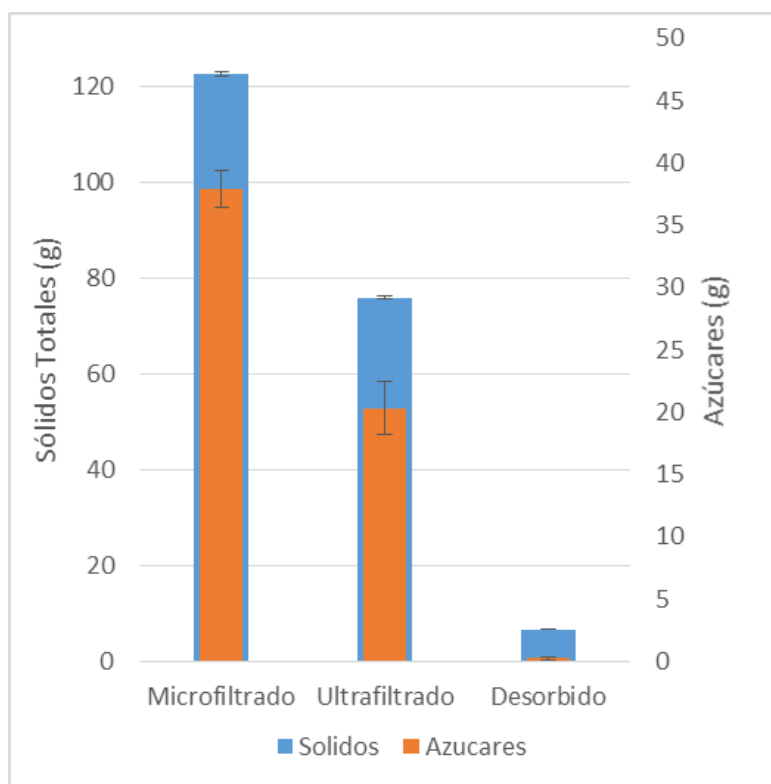


Figura 3.2 Evolución del contenido de azúcares y sólidos totales en cada corriente durante el proceso de microfiltración, ultrafiltración y desorbido.

En la Figura 3.3 se muestran los cambios en las corrientes respecto al contenido de antocianinas y polifenoles totales, se aprecia que al realizar el proceso de microfiltración y ultrafiltración hubo una reducción importante en el contenido de estos compuestos debido a la retención de un porcentaje de estas sustancias en la membrana. En el proceso de desorción podemos darnos cuenta que la cantidad de antocianinas y fenoles totales permanece casi constante con respecto a la obtenida en el extracto ultrafiltrado, esto es posible porque el objetivo de este proceso es reducir el contenido de sólidos que no son metabolitos secundarios, fenoles ni antocianinas.

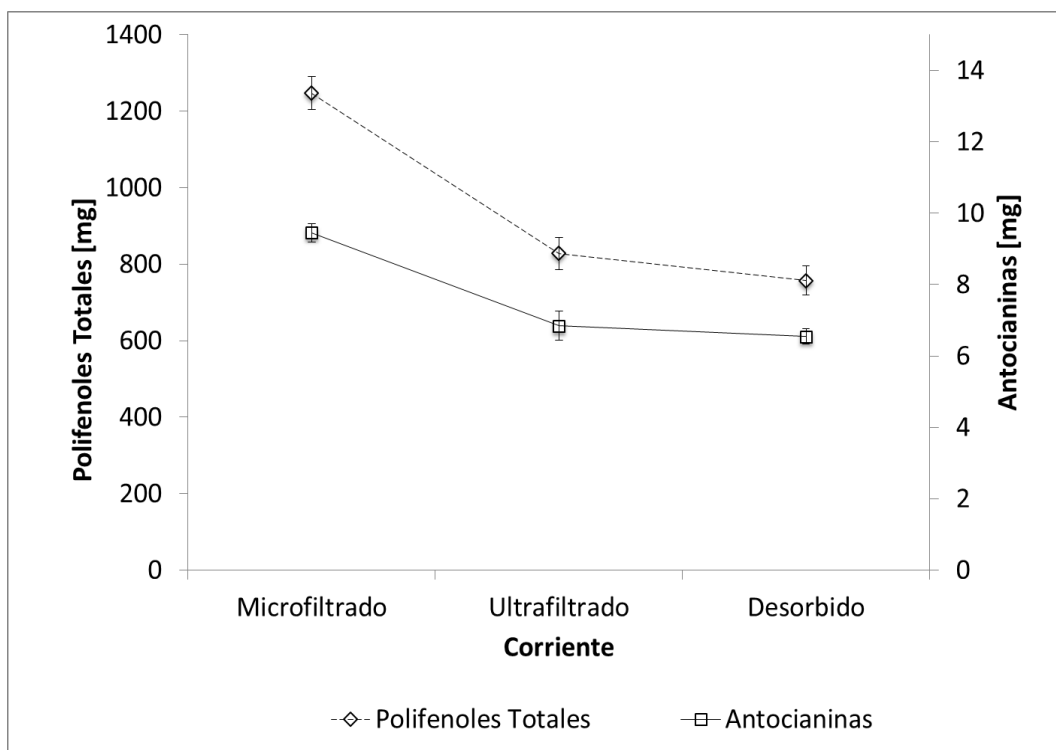


Figura 3 3. Evolución del contenido de antocianinas y polifenoles totales en cada corriente durante el proceso de microfiltración, ultrafiltración y desorbido.

3.3.1 Condiciones de trabajo para la microencapsulación

El equipo empleado (Nano Spray Dryer B-90) está especialmente diseñado para evaluar el secado por pulverización durante las primeras fases de desarrollo del producto; se puede emplear en varias aplicaciones, incluidas aquellas a escala muy pequeña, p.ej. soluciones de secado por pulverización, nanoemulsiones, nanosuspensiones, transformaciones estructurales y micro y nanoencapsulaciones. Consta de un sistema de calefacción de flujo laminar del gas de secado cuya temperatura máxima es de 120 °C, la transferencia de calor se realiza por convección entre la nube de gotas generada y el gas; una bomba

peristáltica para la alimentación con 4 selecciones fijas de velocidad de flujo y una viscosidad máxima de 100 mPa·s; un cabezal de pulverización piezo-eléctrico que produce un aerosol por medio de una fina membrana de acero inoxidable que vibra con frecuencia ultrasónica (60 kHz); y un colector de partículas electrostático con una capacidad de recuperación del 90 % lo que da como resultado un excelente rendimiento.

Como resultado de algunas investigaciones se ha encontrado que los parámetros tales como la concentración y viscosidad de la alimentación, temperatura de la aspersión, caudal de gas, el tipo de inyección del spray, y el contacto de la gota con el flujo de gas pueden influir en la morfología de las microcápsulas, por lo tanto, el ajuste de los parámetros puede producir partículas con morfología única (Iskandar et al., 2001, Widiyastuti et al., 2007, Okuyama et al., 2006)

En la Figura 3.4 se muestran las condiciones de trabajo aplicadas durante el proceso de microencapsulación. Las Figuras 3.4 a, 3.4 b y 3.4 c corresponden a 5.0, 0.3 y 0.1 % de sólidos respectivamente. En los tres casos la temperatura de entrada del aire al equipo se mantuvo constante (120 °C). El comportamiento de la temperatura de salida fue parecido para los tres tratamientos y varió de 39 a 46 °C. La mayor variación se observó en la temperatura del cabezal, para la concentración de 5.0 % de sólidos la temperatura varió desde 77 hasta 125 °C y empezó a ser constante a partir del minuto 23. Para la concentración de 0.3 % de sólidos la temperatura inicial del cabezal fue de 60 °C y la final de 126°C, el equilibrio se alcanzó a partir de los 35 minutos. La concentración de 0.1 % de

sólidos se microencapsuló a menor temperatura (de 62 a 77 °C). La presión manométrica en los tres casos se mantuvo casi constante (de 34 a 37 mbar). La temperatura de entrada de la muestra fue similar para ambas concentraciones. Otro factor que tuvo variaciones importantes fue la velocidad de flujo. La concentración de 0.3 % de sólidos presentó el flujo mayor (0.7 g min^{-1}), seguido por la concentración de 5.0 % de sólidos cuya velocidad de flujo promedio fue de 0.5 g min^{-1} y la menor velocidad de flujo fue para la concentración de 0.1 % de sólidos con un valor promedio de 0.2 g min^{-1} .

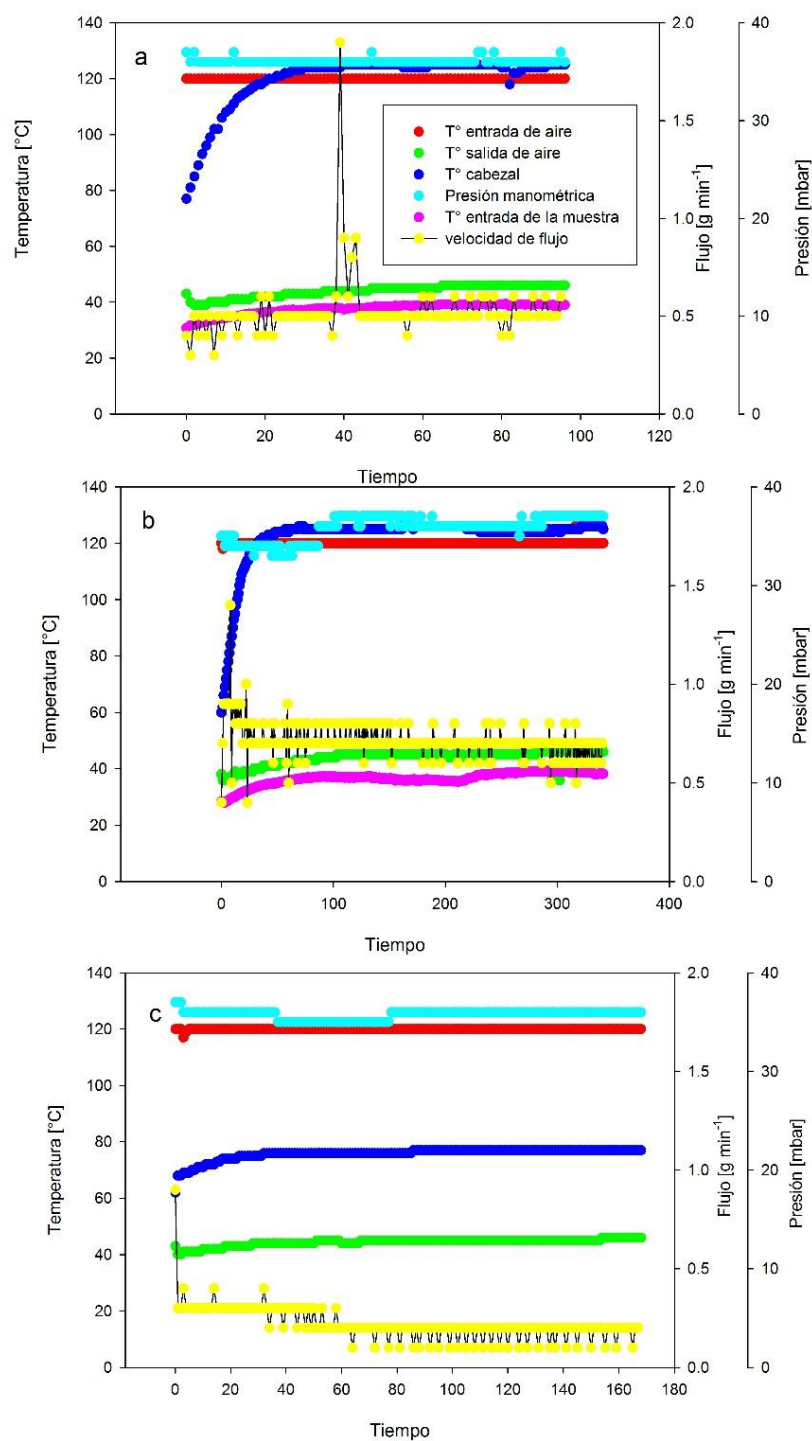


Figura 3.4 Condiciones de trabajo para las concentraciones evaluadas. (a) Concentración de 5.0 % de sólidos, (b) Concentración de 0.3 % de sólidos y (c) Concentración de 0.1 % de sólidos.

3.3.2 Efecto del tipo de maltodextrina en las propiedades de microcápsulas elaboradas a base de extracto de capulín purificado

El extracto de capulín purificado fue encapsulado utilizando maltodextrina de diferentes equivalentes de dextrosa (ED), los resultados obtenidos se presentan en la Cuadro 3.2. Las concentraciones de 5.0 y 0.3 % de sólidos se realizaron utilizando maltodextrina de 16.5 - 19.5 ED, para la concentración de 0.1 % de sólidos se utilizó maltodextrina de 10 ED. Del contenido total de sólidos el 95 % fue de maltodextrina y el 5 % de extracto de capulín, los resultados muestran que el tamaño de las microcápsulas varió desde 916 nm hasta 2 314 nm. Las partículas más grandes se obtuvieron con la concentración de 0.3 % sólidos, a su vez esta concentración presentó el contenido mayor de antocianinas totales y el menor de fenoles totales. La menor cantidad de antocianinas totales fue obtenida aplicando la concentración de 5.0 % sólidos. Con la concentración de 0.1 % de sólidos se obtuvieron partículas con tamaño menor a una micra.

3.3.3 Contenido de antocianinas y fenoles totales

El contenido de antocianinas totales y fenoles totales se muestra en la Cuadro 2. La concentración de 0.1 % de maltodextrina de 10 ED no presentó diferencias significativas en el contenido total de antocianinas y fenoles totales durante el procesamiento de la muestra, es decir, existe una conservación de los compuestos antioxidantes. Por otro lado la concentración de 0.3 % de maltodextrina de 16.5 - 19.5 ED tuvo mayor eficiencia de encapsulación, el contenido de antocianinas fue estadísticamente igual y de fenoles totales fue menor el inicio del proceso. La concentración de 0.3 % de sólidos tuvo un mayor

contenido de antocianinas ($9.03 \text{ mgEC} - 3 - \text{G gsólido}^{-1}$) y menor de fenoles totales ($0.005 \text{ mgEAG gsólido}^{-1}$) en comparación con la concentración de 5.0 % de sólidos que presentó el menor contenido de antocianinas ($1.37 \text{ mgEC} - 3 - \text{G gsólido}^{-1}$) y mayor de fenoles totales ($0.0078 \text{ mgEAG gsólido}^{-1}$). Durante el procesamiento la concentración con 5.0 % de sólidos (16.5 - 19.5 ED) presentó diferencia significativa, la concentración de antocianinas y fenoles totales de la alimentación fue mayor al final del proceso ($1.5 \text{ mgEC} - 3 - \text{G gsólido}^{-1}$ y $0.0082 \text{ mgEAG gsólido}^{-1}$, respectivamente).

Cuadro 3.2 . Propiedades de las microcápsulas de extracto de capulín purificado elaboradas mediante spray dryer.

Concentración de sólidos totales (%)	Tamaño promedio (nm)	Antocianinas (mgEC – 3 – G) ⁻			Fenoles totales (mgEAG gsólido ⁻¹)		
		C. inicial	C. final	C. Reconstituido	C. inicial	C. final	C. Reconstituido
5.0	1644 ± 18	1.34 ^b	1.5 ^a	1.27 ^b	0.0077 ^b	0.0082 ^a	0.0076 ^b
0.3	2314 ± 281	9.2 ^a	9.0 ^a	8.9 ^a	0.0048 ^{ab}	0.0051 ^a	0.0054 ^a
0.1	916.6 ± 39	6.3 ^a	6.3 ^a	6.2 ^a	0.0073 ^a	0.0072 ^a	0.0073 ^a

^{a,b} Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

3.3.4 Morfología de las microcápsulas

Las microcápsulas preparadas a partir de maltodextrina de diferentes ED y obtenidas mediante secado por aspersión se observaron usando un microscopio electrónico de barrido para conocer su microestructura (Figura 3.5). Las micrografías muestran claras diferencias, las partículas de 5 % de maltodextrina tuvieron una variación de tamaño desde 250 nm hasta 3 μ m, en su mayoría presentan una forma esférica lisa (Figura 3.5a). Para la concentración de 0.3 % de maltodextrina (Figura 3.5b) el tamaño de las microcápsulas fue desde 300 nm hasta 4.5 μ m, en este caso se observan, en su mayoría, partículas esféricas con superficie lisa y en algunos casos presentan fracturas. En el caso de la concentración de 0.1 % de maltodextrina (Figura 3.5c) se observaron partículas colapsadas, con superficie irregular. La Figura 3.5d muestra las microcápsulas, elaboradas a base de maltodextrina y extracto de capulín, a una concentración de 5.0 % de sólidos, en este caso se observa aglomeración o apelmazamiento de las partículas y su tamaño es difícil de estimar debido a que no hay separación entre ellas. Para la concentración de 0.3 y 0.1 % de sólidos la formación de las microcápsulas fue esférica. Las partículas de la concentración de 0.3 % sólidos presentan en su mayoría superficie lisa (Figura 3.5e), mientras que las de 0.1 presentan en su mayoría superficie colapsada o irregular (Figura 3.5f).

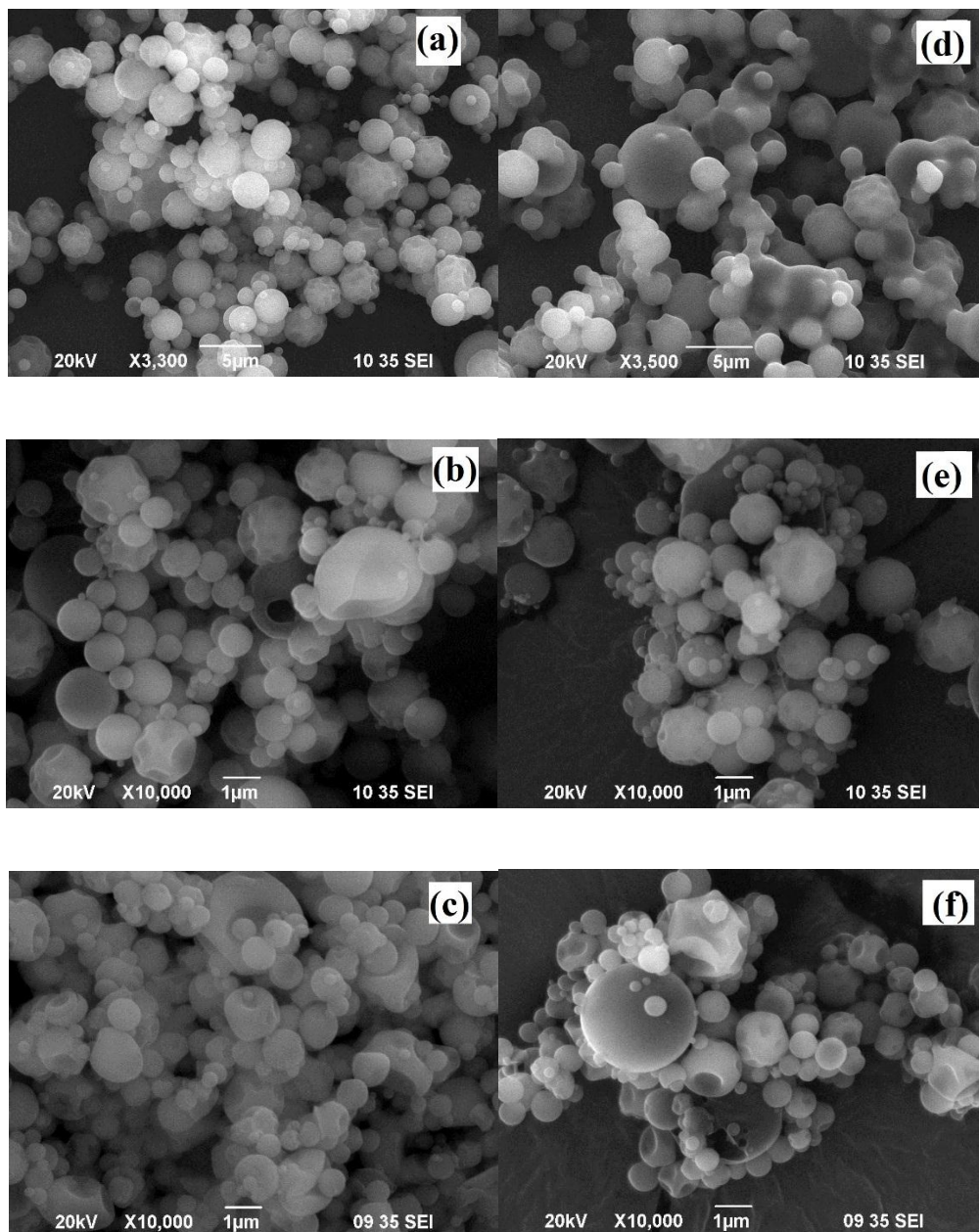


Figura 3.5 Imágenes de microscopia electrónica de barrido (a), (b) y (c) corresponden a una solución de 5.0, 0.3 y 0.1 % de maltodextrina, (d), (e) y (f) corresponden a una solución de 5.0, 0.3 y 0.1 % de sólidos de los cuales 5.0 % fue de extracto purificado de capulín y el resto maltodextrina.

Las variaciones de forma y tamaño probablemente sugieren que las condiciones de secado no fueron similares en ninguno de los tres casos, como se discutió anteriormente. Por otro lado, la formación de la superficie abollada en las microcápsulas se podría atribuir a la contracción que experimentan durante el proceso de secado. La superficie menos irregular de las partículas de 5.0 y 0.3 % de sólidos en comparación con la de 0.1 % sólidos podría atribuirse a las diferencias de ED en la maltodextrina. Las microcapsulas elaboradas a base de maltodextrina de 16.5 - 19.5 ED presentaron mayor esfericidad debido a que contenía una mayor cantidad de azúcares reductores de bajo peso molecular en comparación con las elaboradas a base de maltodextrina de 10 ED. De acuerdo con Loksuan (2007) estos azúcares de bajo peso molecular pueden actuar como un plastificante y prevenir la contracción de la superficie durante el secado. Otro factor al que se le puede atribuir las diferencias morfológicas es la tasa de secado y la temperatura de entrada de aire. En un estudio realizado para describir los cambios morfológicos de partículas secadas por aspersión se encontró que la temperatura influye en su morfología (Alamilla-Beltrán et al., 2005). Los investigadores encontraron que las partículas resultantes de secado con temperaturas bajas (110/74 °C) presentan mayor grado de contracción y menor tamaño en comparación con las que son secadas a mayor temperatura (170/145 °C y 200/173 °C) (Alamilla-Beltrán et al., 2005).

De las tres concentraciones estudiadas, las microcápsulas con 0.1 % de sólidos presentaron mejores resultados en comparación con las de 5.0 y 0.3 % de sólidos, lograron conservar de manera eficaz tanto el contenido de antocianinas

como de fenoles totales, además con las condiciones aplicadas a esta disolución (temperatura del cabezal entre 62-70 °C y flujo de alimentación 0.2 g min⁻¹) fue posible obtener partículas con tamaño menor a una micra.

3.4 CONCLUSIÓN

La purificación y concentración de antocianinas de capulín fue exitosa empleando procedimientos de separación con membranas acoplados a adsorción/desorción. Los procesos de micro y ultra filtración mostraron buena capacidad para disminuir el contenido de sólidos totales y principalmente el contenido de azúcares. Por otro lado al aplicar la purificación por adsorción con la resina Amberlite XAD-4 se logró conservar el 95.58 y 91.37 % del contenido total de antocianinas y fenoles totales, respectivamente. En el desarrollo de las microcápsulas, la maltodextrina resultó ser una matriz eficaz para conservar el contenido de antocianinas y fenoles totales durante el procesamiento de la muestra. Las microcápsulas obtenidas con la disolución de maltodextrina de 0.1 % de sólidos conservaron el contenido de antocianinas y fenoles totales, y su tamaño fue menor a 1 µm.

3.5 REFERENCIAS

- ALAMILLA-BELTRÁN, L., CHANONA-PÉREZ, J. J., JIMÉNEZ-APARICIO, A. R. & GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*, 67, 179-184.
- BELLO GIL, D., CARRERA BOCOURT, E. & DÍAZ MAQUEIRA, Y. 2006. "Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico". *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, num. Mayo-Agosto, 45-50.
- BURAN, T. J., SANDHU, A. K., LI, Z., ROCK, C. R., YANG, W. W. & GU, L. 2014. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. *Journal of Food Engineering*, 128, 167-173.
- CASSANO, A., CONIDI, C., GIORNO, L. & DRIOLI, E. 2013. Fractionation of olive mill wastewaters by membrane separation techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 248–249, 185-193.
- CERÓN-MONTES, G. I., MARTÍN-MARTÍNEZ, E. S., YAÑEZ-FERNÁNDEZ, J., QUEZADA-CRUZ, M. & CASTRO-MUÑOZ, R. 2015. Preliminary purification of anthocyanins from ble corn by adsorption and electrophoresis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14, 99-108.
- CISSÉ, M., VAILLANT, F., PALLET, D. & DORNIER, M. 2011. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Food Research International*, 44, 2607-2614.
- CHANDRASEKHAR, J., MADHUSUDHAN, M. C. & RAGHAVARAO, K. S. M. S. 2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 615-623.
- DELGADO-VARGAS, F., JIMÉNEZ, A. & PAREDES-LÓPEZ, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40, 173-289.
- ERSUS, S. & YURDAGEL, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, 805-812.

FANG, Z. & BHANDARI, B. 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129, 1139-1147.

ISKANDAR, F., LENGGORO, I. W., XIA, B. & OKUYAMA, K. 2001. Functional Nanostructured Silica Powders Derived from Colloidal Suspensions by Sol Spraying. *Journal of Nanoparticle Research*, 3, 263-270.

JAMPANI, C., NAIK, A. & RAGHAVARAO, K. S. M. S. 2014. Purification of anthocyanins from jamun (*Syzygium cumini* L.) employing adsorption. *Separation and Purification Technology*, 125, 170-178.

JAMPANI, C. & RAGHAVARAO, K. S. M. S. 2015. Process integration for purification and concentration of red cabbage (*Brassica oleracea* L.) anthocyanins. *Separation and Purification Technology*, 141, 10-16.

KWAK, H. S. 2014. *Nano- and Microencapsulation for Foods*, Wiley.

LAWLESS, H. T. & HEYMANN, H. 2010. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*, Springer Science & Business Media.

LOKSUWAN, J. 2007. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food hydrocolloids*, 21, 928-935.

NAYAK, C. A. & RASTOGI, N. K. 2010. Effect of Selected Additives on Microencapsulation of Anthocyanin by Spray Drying. *Drying Technology*, 28, 1396-1404.

OKUYAMA, K., ABDULLAH, M., LENGGORO, I. W. & ISKANDAR, F. 2006. Preparation of functional nanostructured particles by spray drying. *Advanced Powder Technology*, 17, 587-611.

ORDAZ-GALINDO, A., WESCHE-EBELING, P., WROLSTAD, R. E., RODRIGUEZ-SAONA, L. & ARGALIZ-JAMET, A. 1999. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. *Food Chemistry*, 65, 201-206.

OZAWA, T., LILLEY, T. H. & HASLAM, E. 1987. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26, 2937-2942.

SCHROOYEN, P., VAN DER MEER, R. & DE KRUIF, C. Microencapsulation: its application in nutrition. PROCEEDINGS-NUTRITION SOCIETY OF LONDON, 2001. Cambridge Univ Press, 475-479.

- SINGLETON, V. L. & ROSSI, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- SOLYMOSI, K., LATRUFFE, N., MORANT-MANCEAU, A. & SCHOEFS, B. 2015. 1 - Food colour additives of natural origin. *In*: SCOTTER, M. J. (ed.) *Colour Additives for Foods and Beverages*. Oxford: Woodhead Publishing.
- SUH, H. J. & CHOI, S. 2012. Risk assessment of daily intakes of artificial colour additives in food commonly consumed in Korea. *J. Food Nutr. Res.*, 51, 13-22.
- TIMBERLAKE, C. F. & HENRY, B. S. 1986. Plant pigments as natural food colours. *Endeavour*, 10, 31-36.
- TONON, R. V., BRABET, C. & HUBINGER, M. D. 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43, 907-914.
- VILLANUEVA-TIBURCIO, J. E., CONDEZO-HOYOS, L. A. & ASQUIERI, E. R. 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Food Science and Technology (Campinas)*, 30, 151-160.
- WANG, S. Y. & LIN, H.-S. 2000. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140-146.
- WIDIYASTUTI, W., WANG, W.-N., LENGGORO, I. W., ISKANDAR, F. & OKUYAMA, K. 2007. Simulation and experimental study of spray pyrolysis of polydispersed droplets. *Journal of materials research*, 22, 1888-1898.

CONCLUSIONES GENERALES

Con el desarrollo de los tres capítulos abordados en esta investigación se pudieron obtener las conclusiones siguientes:

1. El método de Taguchi permitió determinar las condiciones óptimas de extracción de fenoles totales del fruto de capulín (*Prunus serotina*). Éstas fueron con la mezcla acetona: agua (7:3, v/v) y un tiempo de agitación de 30 min. El tiempo de agitación y tipo de disolvente utilizado son factores que pueden incrementar o disminuir los rendimientos de fenoles totales contenidos en frutos de *P. serotina*.
2. El contenido de compuestos antioxidantes de frutos de capulín disminuye en las últimas etapas de maduración. Por consiguiente, la etapa idónea en la que se recomienda cosechar los frutos para conservar sus propiedades antioxidantes es a los 93 días después de la floración, debido a que en este periodo se tiene la mayor cantidad de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante.
3. La purificación y concentración de antocianinas de capulín fue exitosa empleando procedimientos de separación con membranas acoplados a adsorción/desorción. En el proceso de microencapsulación, la maltodextrina resultó ser una matriz eficaz para conservar el contenido de antocianinas y fenoles totales durante el procesamiento de la muestra.

De manera general, el proceso implementado para obtener microcápsulas de compuestos con actividad antioxidante extraídos de frutos de capulín (*Prunus serotina*) mostró resultados favorables en la formación de microcápsulas. En los

tres tratamientos aplicados las microcápsulas diseñadas presentaron forma esférica, sin embargo, hubo diferencias en cuanto a tamaño y presencia de superficie colapsada o irregular.

RECOMENDACIONES

En futuras investigaciones se recomienda aplicar el mismo procedimiento de extracción aplicado en el capítulo dos de esta investigación, debido a que dichas condiciones fueron las encontradas como óptimas según la metodología de Taguchi. Además, se propone aplicar el proceso de purificación a un extracto de frutos de capulín colectados en la etapa de maduración en la que se determinó que contenían la mayor cantidad de compuestos antioxidantes. Otra observación importante a considerar es cuantificar el contenido de azúcares, antocianinas y fenoles totales retenidos en el proceso de purificación con membranas para cuantificar la pérdida de estos compuestos. Durante el proceso de microencapsulación es necesario cerciorarse de que en los tratamientos que se estén evaluado se utilicen las mismas condiciones de trabajo.