Evaluación de extracción, encapsulación y capacidad antioxidante de las antocianinas de la flor de Jamaica *(Hibiscus sabdariffa L.)*

Vanesa Gisela Chicaiza Guishcaso
Erasmo Alexander Flores Granados

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Evaluación de extracción, encapsulación y capacidad antioxidante de las antocianinas de la flor de Jamaica *(Hibiscus sabdariffa L.)*

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Vanesa Gisela Chicaiza Guishcaso
Erasmo Alexander Flores Granados

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2016

Evaluación de extracción, encapsulación y capacidad antioxidante de las antocianinas de flor de Jamaica *(Hibiscus sabdariffa L.)*

Vanesa Gisela Chicaiza Guishcaso
Erasmo Alexander Flores Granados

Resumen: Los objetivos del estudio fueron optimizar la extracción de antocianinas del residuo de flor de Jamaica, evaluar la metodología de encapsulación por gelificación iónica y la evaluación de estos componentes como antioxidantes naturales. Se optimizó la extracción de las antocianinas con la metodología de superficie de respuesta con tres factores: Solvente Agua:Metanol (0-100%), tiempo (0-24 horas) y pH (1.5-5.5). El punto óptimo de extracción de antocianinas se obtuvo con una relación 30%:70% de Agua:Metanol a un pH de 2.37 durante 6 horas en el solvente. Tiempos mayores no resultaron en un incremento de antocianinas. Se encapsuló las antocianinas extraídas (BCA 2×2×2) con dos concentraciones (1,000 y 2,000 mg/L), dos matrices: alginato 2 y 4% (p/v) y alginato/almidón en proporciones iguales. Se evaluó eficiencia de carga, rendimiento y dimensión de microcápsulas. Se obtuvieron cápsulas entre 2.08 y 2.93 mm de diámetro. La eficiencia de carga máxima (64%) se observó al utilizar almidón/alginato (4%). Las microcápsulas con mayor porcentaje de materia seca obtuvieron mayor rendimiento. Se evaluó la capacidad antioxidante en aceite de soya (DCA) por Rancimat. Los tratamientos fueron antocianinas libres y encapsuladas en comparación con un antioxidante convencional (BHT) y una muestra libre de antioxidantes. No se determinaron diferencias entre control, BHT y antocianinas encapsuladas. El extracto de antocianinas libres cuadriplicó la vida útil del aceite (7.64 horas). Se debe explorar aplicaciones para antocianinas encapsuladas y otros métodos de evaluación antioxidante.

Palabras clave: Alginato de sodio, Almidón, Microcápsulas, Polifenoles.

Abstract: The study objectives were to optimize the extraction of anthocyanins obtained from Roselle residue, evaluate the encapsulation methodology through ionic gelation and evaluate these components as natural antioxidants. Anthocyanin extraction was optimized using a surface response methodology with three factors: Solvent Water:Methanol (0-100%), time (0-24 hours) and pH (1.5-5.5). The optimum extraction of anthocyanins was obtained with 30%:70% Water:Methanol at pH 2.37 during 6 hours of soaking. Higher times did not result in an increase of anthocyanin concentration. Anthocyanins were encapsulated (RCB) at two concentrations (1,000 and 2,000 mg/L) using two matrices: alginate 2 and 4% (w/v) and alginate/starch to the same proportions. Charging efficiency, performance and size of microcapsules were evaluated. Capsules obtained ranged between 2.08 and 2.93 mm in diameter. Maximum load efficiency (64%) was observed when using starch/alginate (4%). The microcapsules with a higher percentage of dry matter obtained higher yields. The antioxidant capacity was evaluated in soybean oil (CRD) by Rancimat. Treatments included free and encapsulated anthocyanins compared with a conventional antioxidant (BHT) and a control sample free of antioxidants. No differences were observed between control BHT and encapsulated anthocyanins. Non encapsulated anthocyanins quadrupled the evaluated oil shelf-life (7.64 hours). Applications should be explored for encapsulated anthocyanins and other methods of antioxidant assessment.

Key words: Microcapsules, Polyphenols, Sodium alginate, Starch.

CONTENIDO

Portadilla i
Página de firmas ii
Resumen iii
Contenido iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos iv

1. INTRODUCCIÓN 1

2. MATERIALES Y MÉTODOS 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 10

4. CONCLUSIONES 21

5. RECOMENDACIONES 22

6. LITERATURA CITADA 23

7. ANEXOS 28

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros Página

1. Descripción del diseño experimental..... 4
2. Niveles de las variables independientes para la extracción de antocianinas.. 5
3. Delineamiento del diseño experimental completo.. 5
4. Formulación de los tratamientos para la extracción de antocianinas... 6
5. Diseño experimental de evaluación de microcápsulas.. 8
6. Efecto de variables independientes en la extracción de antocianinas…….. 10
7. Coeficientes de regresión para antocianinas en función de Agua: Metanol (X_1), Tiempo (h) (X_2) y pH (X_3).... 11
8. Tiempo de inducción de aceite de soya en Rancimat.... 20

Figuras Página

1. Efecto del solvente y Tiempo en la extracción de antocianinas 12
2. Efecto del solvente y pH en la extracción de antocianinas 13
3. Efecto del Tiempo y pH en la extracción de antocianinas. 14
4. Función de utilidad para la máxima extracción de antocianinas.. 15
5. Microscopia para cápsulas de alginato, alginato-almidón a 1000 y 2000 mg/L ….. 17
6. Eficiencia de carga de antocianinas capturadas en las microcápsulas.... 18
7. Rendimiento de microcápsulas en base a peso. 18
8. Diámetro de las microcápsulas.... 19
9. Relación de la conductividad electrica y tiempo de inducción del aceite de soya …. 20

Anexos Página

1. Valor F calculado $P < 0.10$ para la variable antocianinas 28
2. Microcápsulas con antocianinas 28
3. Sintaxis de SAS 9.4 de los análisis..... 29
4. Tabla de puntos de porcentaje de la distribucion F ($P < 0.10$) 34

1. INTRODUCCIÓN

La flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) pertenece a la familia *Malvaceae*, está conformada por alrededor de 82 géneros y 1,500 especies, siendo muy abundantes en el trópico de América (Soares 2014). La producción anual de flor de Jamaica en el mundo fue de más de 72,000 ton en el año 2011. Los principales países productores de flor de Jamaica son China, Sudan, India y México (Galicia *et al.* 2008). En Centroamérica países como Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Honduras forman parte de los productores de este cultivo.

Los extractos de Jamaica han sido propuestos como ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales (Castañeda y Cáceres 2014). Son usados en la industria de alimentos como bebidas refrescantes por su aporte de compuestos bioactivos (antocianinas y fenoles) así como en mermeladas, jaleas, jarabes, licores, harinas, galletas, o simplemente como colorantes ya que estas no presentan actividad toxica (Ortega y Beltrán 2015). Durante los últimos años ha tenido un gran uso en el área farmacológica debido a las propiedades benéficas como diuréticas, antifebriles, en la reducción de colesterol y la hipertensión. Por sus componentes como vitaminas (C y E), flavonoides, polifenoles y antocianinas, estudios demuestran que poseen actividad antioxidante y contribuyen a las acciones anticancerígenas (Venereo 2002; López *et al.* 2011). Esto es atribuido a la capacidad que tienen estos antioxidantes de secuestrar radicales libres en sistemas biológicos (Garzón 2008). Además, es una fuente importante de calcio, magnesio y oligoelementos esenciales para el hombre.

La flor de Jamaica es muy aprovechada comercialmente, sin embargo los desechos generados que están constituidos por los cálices de la flor de Jamaica, después de la infusión, son arrojados sin dar uso alguno. Aproximadamente el 95% son los desperdicios de flor de Jamaica, ya que solamente de un 2-5% de los sólidos migran a la fase líquida de la infusión y el resto permanecen en los cálices de la flor, por lo que el color rojo característico se mantiene por el contenido de las antocianinas aun presentes (Salinas *et al.* 2012). Existe la preocupación por evitar desechar este residuo después de la infusión por lo cual se busca la manera de dar un uso óptimo para este subproducto de la industria y diversificar dando un valor agregado.

Con el avance de la tecnología las antocianinas pueden ser aprovechadas en la industria alimentaria, ya que contiene cierto poder antioxidante natural (Gárzaro *et al.* 1998). Debido al auge de las antocianinas y otros componentes de frutas y vegetales, la disponibilidad de extractos es variada. En el mercado existe una oferta de antioxidantes naturales que no abastece la demanda, ya que hay un mercado emergente fuerte para estos compuestos.

Se considera la opción de extraer antocianinas de la flor de Jamaica, puede ser incluso utilizando el sub producto de la flor después de infusión en la elaboración de bebidas, seguido de una encapsulación de las antocianinas para preservarlas.Las antocianinas pueden ser extraídas por maceración, ultrasonido, fluidos supercríticos y extracción asistida por microondas.

La técnica más utilizada por su rendimiento y eficiencia económica es la técnica de maceración donde existe una relación sólido-líquido (Zhang *et al.* 1994; Gonzáles 2013). La polaridad de la molécula de antocianina permite su solubilidad en diferentes solventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Las condiciones de extracción, toman en cuenta diferentes parámetros como: relación sólido-líquido, temperatura, tiempo, tipo y concentración de disolvente que influyen en la estabilidad y concentración de las antocianinas extraídas (Bridgers *et al.* 2010) .

Estos compuestos bioactivos pueden ser preservados utilizando diferentes técnicas de encapsulación, ayudando a cubrir defectos, proteger los compuestos del medio que los rodea hasta su liberación controlada (Deladino *et al.* 2008). Algunas ventajas de encapsular son: la conservación de sabores, compuestos acidulantes, vitaminas, aromas, colorantes, microorganismos, aceites y antioxidantes, permite la adición como un ingrediente alimentario que al estar encapsulado preserva su contenido nutricional además de facilitar su manipulación asegurando una dosis exacta (López *et al.* 2012). Una de las técnicas más conocidas y sencilla es la técnica por extrusión simulada (gelificación iónica), donde se utiliza biopolímeros como alginato y almidón para formar la matriz encapsulante. Los alginatos son utilizados como agentes encapsulantes debido a su alta biocompatibilidad y baja toxicidad (Lupo *et al.* 2012).

Los factores a tomar en cuenta al momento de elegir la técnica de encapsulación son: el agente biológico, las aplicaciones del compuesto encapsulado, el tamaño de partícula requerido, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Parra 2010). La microencapsulación entonces consiste en una formación de gotas de la solución formada con el biopolímero que contiene la biomolécula a encapsular, al hacer pasar dicha solución por un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de goteo controlado (Pasin *et al.* 2012). Es por ello que los objetivos de esta investigación fueron:

- Identificar el punto óptimo para obtener una mayor extracción de antocianinas de la flor de Jamaica.

- Evaluar la metodología de encapsulación de las antocianinas presentes en la flor de Jamaica.

- Evaluar la capacidad antioxidante de las antocianinas extraídas y encapsuladas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio. El estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos del Departamento de Agroindustria Alimentaria en la Escuela Agrícola Panamericana.

Fase I. Optimización de la extracción de antocianinas de la flor de Jamaica.

Diseño experimental. Este fue un experimento factorial completo 2^3 estadísticamente delineado en la metodología de superficie de respuesta con un diseño de composición central rotacional de 2do orden (DCCR). Los parámetros del proceso se codificaron (- 1, 0, +1), esto de acuerdo a la ecuación 1:

$$xi = Xi - \frac{\mathrm{z}}{\Delta \mathrm{xi}} \qquad [1]$$

Dónde:
xi = Valor codificado de la variable Xi
Xi = Valor real de la variable
Z = Valor real de la variable en el punto central
Δxi = Valor del intervalo de variación de xi

Para obtener un entorno experimental más acotado se delinearon las variables axiales -α y +α, este valor depende del número factorial ($F = 2^k$), donde K es el número de variables independientes (K=3), los valores son definidos por la ecuación 2.

$$\alpha = (F)^{\frac{1}{4}} = (2^k)^{\frac{1}{4}} = 1.682 \qquad [2]$$

El número de unidades experimentales para esta metodología fue un diseño factorial completo definido por la ecuación 3.

$$n = 2^k + 2k + m \qquad [3]$$

Dónde:

2^k = número de puntos factoriales
2k = número de puntos axiales
m = número de réplicas del punto central

Se utilizaron tres variables independientes y tres niveles codificados usando un total de 20 unidades experimentales, siendo ocho factoriales, combinación de los niveles -1 y +1, seis axiales - α y + α y seis puntos centrales sirviendo como estimado del error experimental y determinando la precisión del modelo matemático (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción del diseño experimental.

Expresión	**Tratamientos**	**Cantidad puntos**
$2^k = 2^3$	8	Factoriales
2k = 2×3	6	Axiales
m	6	Puntos centrales

Fuente: Box y Draper 1959; adaptado por los autores

El análisis de los resultados experimentales se describe como el comportamiento de un sistema en el que se combinan dos variables independientes y una variable dependiente, donde la respuesta fue una función de los niveles en los que se combinan (Box y Draper 1959), como se determina en la ecuación 4.

$$Y = F\ (X_1, X_2, \ldots \ldots, Xk) \qquad [4]$$

Se realizó también un análisis de regresión para ajustar un polinomio de segundo orden con las variables independientes para cada variable respuesta. La expresión general utilizada para predecir el comportamiento de una respuesta es descrita en la ecuación 5

$$Yi = (\beta_o + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon) \qquad [5]$$

Dónde:
Yi = Función respuesta
X_1, X_2 y X_3 = Valores de las variables independientes
β_0 = Coeficiente relativo con la interpretación del eje
β_1, β_2 y β_3 = Coeficientes lineales estimados por el método de mínimos cuadrados
β_{11}, β_{22} y β_{33} = Coeficientes de variables cuadráticas
β_{12} = Coeficiente de interacción entre variables independientes
ε = Error experimental

El arreglo del modelo propuesto se evaluó por el método “regresión por pasos” y el análisis de residuos se clasificó como “Falta de Ajuste”, la comparación de la proporción de la varianza explicada por el modelo, es decir por el R^2. Así los coeficientes de la ecuación 5 del mejor modelo polinomio, serán ajustados a las respuestas del diseño experimental (Moro 2013). Los niveles de las variables independientes son descritas como la combinación de todos los niveles, axiales (α = 1.682) y puntos centrales (Cuadro 2), estos son referentes a las proporciones utilizadas.

Cuadro 2. Niveles de las variables independientes para la extracción de antocianinas.

Variables	Niveles				
	-1.6817928	**-1**	**0**	**1**	**1.681793**
% Agua:Metanol	0.00	20.27	50.00	79.73	100.00
Horas	0.00	4.87	12.0	19.14	24.00
pH	1.50	2.31	3.5	4.69	5.50

El delineamiento del experimento comprende la expresión completa de todas las variables independientes codificadas y decodificadas las cuales fueron usadas para la obtención de los análisis de varianza y coeficientes de regresión, así como para la diagramación de la superficie de respuesta respectivamente (Cuadro 3). Para efectos de visualizar mejor las variables independientes se elaboraron las formulaciones con sus respectivas proporciones y medidas (Cuadro 4).

Cuadro 3. Delineamiento del diseño experimental completo.

Tratamientos	Valores codificados			Valores reales		
	X_1	X_2	X_3	x_1	x_2	x_3
1	-1.00	-1.00	-1.00	20.27	4.87	2.31
2	1.00	-1.00	-1.00	79.73	4.87	2.31
3	-1.00	1.00	-1.00	20.27	19.14	2.31
4	1.00	1.00	-1.00	79.73	19.14	2.31
5	-1.00	-1.00	1.00	20.27	4.87	4.69
6	1.00	-1.00	1.00	79.73	4.87	4.69
7	-1.00	1.00	1.00	20.27	19.14	4.69
8	1.00	1.00	1.00	79.73	19.14	4.69
9	-1.68	0.00	0.00	0.00	12.00	3.50
10	1.68	0.00	0.00	100.0	12.00	3.50
11	0.00	-1.68	0.00	50.00	0.00	3.50
12	0.00	1.68	0.00	50.00	24.00	3.50
13	0.00	0.00	-1.68	50.00	12.00	1.50
14	0.00	0.00	1.68	50.00	12.00	5.50
15 C	0.00	0.00	0.00	50.00	12.00	3.50
16 C	0.00	0.00	0.00	50.00	12.00	3.50
17 C	0.00	0.00	0.00	50.00	12.00	3.50
18 C	0.00	0.00	0.00	50.00	12.00	3.50
19 C	0.00	0.00	0.00	50.00	12.00	3.50
20 C	0.00	0.00	0.00	50.00	12.00	3.50

X_1 y x_1= % Agua: metanol **X_2 y x_2**= Tiempo (h) **X_3 y x_3** = pH

Cuadro 4. Formulación de los tratamientos para la extracción de antocianinas.

Tratamientos	Relación Agua:Metanol		Tiempo (h)	pH
	Agua (mL)	Metanol (mL)		
1	2.03	7.97	4.87	2.31
2	7.97	2.03	4.87	2.31
3	2.03	7.97	19.14	2.31
4	7.97	2.03	19.14	2.31
5	2.03	7.97	4.87	4.69
6	7.97	2.03	4.87	4.69
7	2.03	7.97	19.14	4.69
8	7.97	2.03	19.14	4.69
9	0.00	10.00	12.00	3.50
10	10.00	0.00	12.00	3.50
11	5.00	5.00	0.00	3.50
12	5.00	5.00	24.00	3.50
13	5.00	5.00	12.00	1.50
14	5.00	5.00	12.00	5.50
15	5.00	5.00	12.00	3.50
16	5.00	5.00	12.00	3.50
17	5.00	5.00	12.00	3.50
18	5.00	5.00	12.00	3.50
19	5.00	5.00	12.00	3.50
20	5.00	5.00	12.00	3.50

Preparación de la muestra. Para obtener la harina de flor de Jamaica se pesaron 30 g de muestra de cálices secos, utilizando un molido de marca Thomas con una malla de 2 mm, luego se pasó nuevamente por otro molino modelo CT 193 Cyclotec con malla de 0.5 mm para obtener partículas de menor diámetro y finalmente la harina se colocó en una bolsa de plástico.

Medición de pH. El pH se midió de acuerdo al método de la AOAC 943.02 con el potenciómetro. Se tomó la muestra, con el potenciómetro calibrado, se procedió a medir el pH de las muestras en el solvente por triplicado para cada muestra en específico. Se introdujo el electrodo dentro de la muestra. El electrodo se lavó con agua destilada antes y después de cada medición.

Extracción de antocianinas. Se pesaron 3 g de harina de rosa de Jamaica en un tubo, se añadió 10 ml de solvente (agua: metanol), las cuales fueron previamente preparadas en diferentes proporciones. Se estandarizó el pH según lo indicado por el diseño experimental utilizando HCL 1N y NaOH 1N y leyendo con un potenciómetro. Inicialmente, se agitaron las muestras utilizando el vórtex por un minuto cada tratamiento y se dejó en reposo a las diferentes horas establecidas por el diseño con agitación cada dos horas. Después fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 30 minutos y se recolectó el sobrenadante.

Cuantificación de antocianinas. Para la obtención de la concentración de las antocianinas se utilizó el método de pH diferencial. Se diluyó en 50X, colocando en un tubo de ensayo 0.5 ml de cada muestra con 24.5 ml de agua destilada. Luego, se extrajo 0.5 ml de la dilución y se añadió 4.5 ml de buffer pH 1 (0.025 M Cloruro de potasio) y buffer pH 4.5 (0.4 M Acetato de sodio), respectivamente. Se dejó reposar por 45 minutos en oscuridad y finalmente se midió la absorbancia de los extractos utilizando un espectrofotómetro de UV-Visible, previamente se calibró el equipo, usando como blanco agua destilada y se hizo la lectura en el espectrofotómetro en el rango de 400 nm- 700 nm con absorbancia menor a 0.8 UA (esto para cumplir con la ley de Beer).

Para la obtención de la concentración de antocianinas (cianidina) se utilizó la fórmula de pH diferencial:

$$A = abc, A = absorbancia, a = coeficiente\ de\ extracción\ molar, b = luz\ (1\ cm)$$

$$a = 29{,}600\ para\ cianidina - 3 - glu\ (MW\ 457.16)$$

$$A = A[(OD520 - OD700)\ pH\ 1.0 - \ (OD520 - OD700) pH\ 4.5] \qquad [6]$$

$$Concentración\ en\ \frac{mg}{L} = \left(\frac{A}{a}\right) \times MW \times 100 \times 10\left(SW + \left(\frac{FV - SV}{SV}\right)\right) \qquad [7]$$

Dónde: MW= peso molecular, 1000= molar en ppm, 10= factor de dilución del buffer, SW= Peso de la muestra en g, FV= volumen final de la extracción.

Función de utilidad. Una vez obtenidos los criterios de optimización se trazó una función de utilidad con ayuda del programa Statistica 7.0 con el propósito de realizar la optimización múltiple de las variables independientes a partir del supuesto de que existe una combinación predicha en la cual todas las variables respuesta alcanzan su punto óptimo, manipulando únicamente las variables independientes del estudio.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis con un apego a la prueba F a 10% de significancia. El modelo de regresión fue significativo cuando el valor de la prueba F calculado fue mayor o igual al F tabular, con lo cual se trazó la superficie (Rodrigues y Lemma 2012). El procesamiento de los datos se realizó con el programa Statistica versión 7.0 para Windows, utilizando las variables independientes codificadas para la obtención de los coeficientes de regresión y las variables decodificadas para la generación de las superficies de respuesta.

Fase II. Evaluación de la metodología de encapsulación.

Diseño experimental. Se estableció un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo factorial 2×2×2. Se usaron tres repeticiones obteniendo un total de 24 unidades experimentales.

Cuadro 5. Diseño experimental de evaluación de microcápsulas.

Material encapsulante		**Concentración de antocianinas**	
Biopolimero	**Materia seca**	**1000 mg/L**	**2000 mg/L**
Alginato	**2% (p/v)**	T1	T5
	4% (p/v)	T2	T6
Alginato/Almidón	**2% (p/v)**	T3	T7
	4% (p/v)	T4	T8

T= tratamiento

Microencapsulación por extrusión simulada con Alginato. Se diluyeron 3 g del extracto de flor de Jamaica en 100 ml de una solución de alginato al 2% (p/v). Se usó una jeringa de aguja con diámetro de 0.7 mm (22G), con la cual se llenó una segunda jeringa con aguja de diámetro de 0.25 mm (31G). Se gotearon 3 ml de la solución de alginato en 200 ml de cloruro de calcio (0.1M) con agitación continua para evitar que se unan las microcápsulas. Las microcápsulas fueron filtradas con el uso de un colador estéril inmediatamente y se dejaron reposar en papel durante cinco minutos a temperatura ambiente (De la cruz y Terán 2013). Este mismo procedimiento se llevó a cabo para la encapsulación en diferentes concentraciones de materia seca de alginato y almidón siendo estas: alginato al 4% (p/v), alginato/almidón (1:1) 2% (p/v) y 4% (p/v).

Evaluación de encapsulación por extrusión simulada. La forma y tamaño de las cápsulas se evaluaron mediante la ayuda de un pie de rey digital y del programa ImageJ. También se evaluó la eficiencia de encapsulado según el atrapamiento de antocianinas y se calculó la relación entre lo encapsulado y la concentración inicial de antocianinas (Zava *et al.* 2014).

$$Eficiencia\ de\ encapsulado = \frac{\mathrm{N}}{\mathrm{N0}} \times 100 \qquad [8]$$

N= concentración de antocianinas liberadas de las cápsulas.
N0=concentración de antocianinas añadidas a la mezcla de polímeros.

Para liberar las antocianinas encapsuladas se tomó un gramo de cápsula y se adicionó una solución de 10 ml de citrato de sodio al 3% (p/v). La suspensión se homogenizó por un minuto y luego se dejó reposar por 20 minutos.

Se evaluó el rendimiento de encapsulado según las microcápsulas obtenidas como la relación de peso de microcápsulas obtenidas entre el peso del material encapsulante utilizado.

$$\%\ Rend = \frac{Cantidad\ de\ microcapsulas\ obtenidas}{Cantidad\ de\ microcapsulas\ esperadas} \times 100 \qquad [9]$$

Análisis estadístico. Se estableció una separación de medias LS MEANS y un análisis de varianza con un nivel de significancia de 5%, mediante el uso del programa SAS® 9.4 (Statistical Analysis Software) para la evaluación de las microcápsulas.

Fase III. Evaluación de la capacidad antioxidante.

Diseño experimental. Para la estabilidad oxidativa (matriz lipofílica) se estableció un diseño completamente al azar (DCA) con tres antioxidantes, los cuales fueron las antocianinas encapsuladas, las antocianinas no encapsuladas, BHT. También se evaluó un testigo (sin antioxidantes). Se usaron tres repeticiones obteniendo un total de 12 unidades experimentales.

Estabilidad oxidativa. Análisis de estabilidad oxidativa (Aceite Vegetal 120°C AOCS Cd 12b-92). Esta prueba induce a la oxidación de las muestras de aceite mediante la adición constante de oxígeno y con una temperatura alta constante. Con agua destilada y sensores se midió la conductividad eléctrica formada por ácidos volátiles de los tubos de reacción. Se realizó pruebas por triplicado y se midió en horas de inducción.

Análisis estadístico. Se estableció una separación de medias DUNCAN y un análisis de varianza con un nivel de significancia de 5%, mediante el uso del programa SAS® 9.4 (Statistical Analysis Software) para la evaluación de capacidad antioxidante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Optimización de la extracción de antocianinas de la flor de Jamaica. Para encontrar la extracción óptima de antocianinas se consideraron las variables de pH, tiempo y solvente (Agua:Metanol). Se usó un rango de tiempo de 0-24 h, con 10 mL de solvente de 0-100% de agua y la diferencia fue de metanol. El pH se estandarizó de 1.5-5.5. El extracto de antocianinas de flor de Jamaica se expresó en mg/L (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultado del efecto de variables independientes en la extracción de antocianinas.

Tratamientos	%Agua:%Metanol	Tiempo (h)	pH	Antocianinas (mg/L)
1	20.27	4.87	2.31	2,108
2	79.73	4.87	2.31	1,791
3	20.27	19.14	2.31	1,938
4	79.73	19.14	2.31	1,459
5	20.27	4.87	4.69	1,745
6	79.73	4.87	4.69	988
7	20.27	19.14	4.69	1,891
8	79.73	19.14	4.69	1,598
9	0.00	12.00	3.50	1,722
10	100.0	12.00	3.50	1,668
11	50.00	0.00	3.50	1,722
12	50.00	24.00	3.50	1,714
13	50.00	12.00	1.50	1,830
14	50.00	12.00	5.50	2,054
15	50.00	12.00	3.50	1,891
16	50.00	12.00	3.50	1,984
17	50.00	12.00	3.50	1,969
18	50.00	12.00	3.50	1,930
19	50.00	12.00	3.50	1,884
20	50.00	12.00	3.50	1,799

El modelo fue clasificado como significativo y predictivo ya que presentó un coeficiente de determinación superior a 60% (R^2=0.74). El R^2 encontrado en la investigación para la extracción de antocianinas demostró que 74% de los datos fueron predichos por el modelo. También, el modelo fue clasificado como predictivo ya que el F calculado fue mayor que el F tabular (Teba 2014). Se realizó la prueba F con 10% de significancia, obteniendo 15.54 de valor F calculado por lo que al compararse con la F tabular de 4.051 se identificó la validez para graficar la respuesta. La falta de ajuste fue otro parámetro que demostró un modelo predictivo, ya que éste no fue significativo (cuadro 7), en los modelos de regresión la falta de ajuste se presenta cuando el modelo no logra describir de manera adecuada la relación entre las variables independientes y la variable dependiente. Una falta de ajuste puede ocurrir si no se toman en cuenta factores importantes, tales como interacciones o términos cuadráticos. Todos los factores indicaron que el modelo propuesto tuvo significancia estadística y que los datos pudieron ser ajustados siendo éste capaz de identificar las respuestas dentro de la región experimental delimitada dentro del estudio (Thompson 1982).

Cuadro 7. Coeficientes de regresión para antocianinas en función de Agua:Metanol (X_1), Tiempo (h) (X_2) y pH (X_3).

Factor	**Antocianinas (mg/L)**
Intercepto	1912.80*
X_1	-141.80*
X_1Q	-94.42*
X_2	31.97
X_2Q	-65.76*
X_3	-120.44*
X_3Q	-27.53
X_1X_2	37.65
X_1X_3	-31.85
X_2X_3	157.34*
R^2	**0.74**
F. Calculado	**15.54**
F. Tabular	**4.05**
Falta de Ajuste	**0.11**

Los coeficientes con signo * son significantes P < 0.10 y entran en la ecuación.

La expresión matemática que representó la concentración de antocianinas (mg/L) es un modelo cuadrático de segundo orden con productos cruzados los cuales fueron expresados por los coeficientes significativos, entre la concentración de antocianinas y las variables independientes, se expresa de acuerdo a la Ecuación 10.

$$ANT\ \left(\frac{mg}{L}\right) = 1{,}912.8 - 141.8X_1^2 - 65.8X_2^2 - 120.4X_3 + 157.3X_2X_3 \qquad [10]$$

Las superficies de respuesta generadas por el modelo propuesto, demostraron las interacciones entre las variables y el valor óptimo en la extracción de antocianinas (Figuras 2-4). La polaridad de las antocianinas las hace solubles en varios solventes, como alcoholes, acetona y agua. Sin embargo, el agua puede reaccionar como nucleófilo con el catión flavilio en el C-2 formando la base carbinol incolora, esto provoca una degradación de las antocianinas (Garzón 2008). En este estudio se pudo observar que al reducir la cantidad de agua, utilizando un 30% del total del solvente y aumentar la cantidad de metanol hasta un 70% (X_1) existió una tendencia a incrementar la extracción de antocianinas (Figura 1). La afinidad fue el factor más importante que determinó la relación ideal de Agua:Metanol para la extracción de antocianinas, ya que las moléculas tienen partes polares y no polares. Ciertas partes de la estructura química de la cianidina y delfinidina que son las principales antocianinas presentes en la flor de Jamaica se unieron a la molécula de agua y el resto de la molécula se unió al metanol (Kechinski *et al.* 2010).

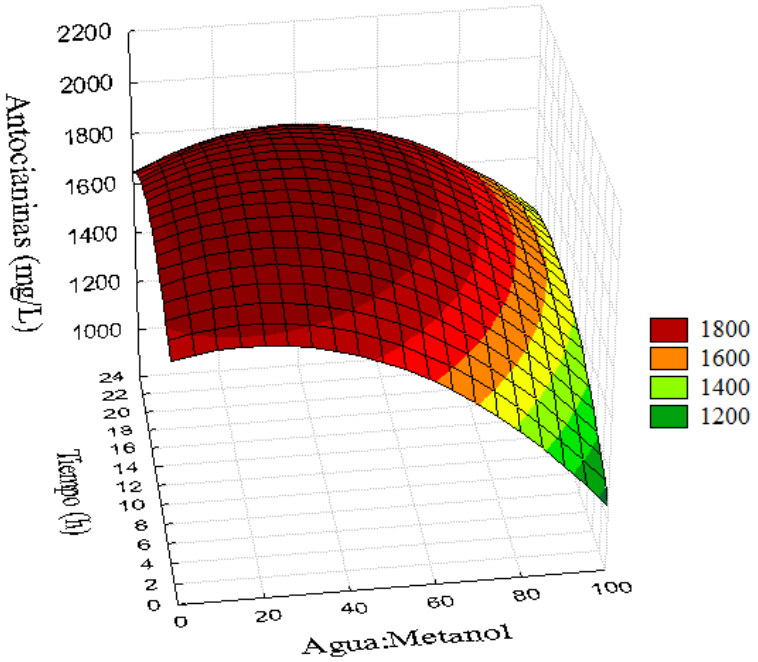

Figura 1**.** Efecto del solvente (agua: metanol) y tiempo (h) en la extracción de antocianinas.

El análisis de HPLC de polifenoles y la purificación de polifenoles por columnas de carbono activado parten de este principio de afinidad. Es por eso la importancia de diluir metanol con agua y por lo cual un solvente con 100% de metanol no fue más efectivo para la extracción de estas antocianinas en específico (Kunradi *et al.* 2009). El tiempo que la muestra de flor de Jamaica estuvo en contacto con el solvente, fue una variable que afectó en la extracción de antocianinas.

Se observó que mientras más tiempo se dejaron las muestras de flor de Jamaica en el solvente se obtuvo mayor extracción. Esta variable aumentó la extracción en un periodo de 6 h. Sin embargo, después de 6 h ya no fue significativa la extracción, ya que probablemente se produjo un equilibrio final entre el soluto de muestra sólida y el solvente de extracción (Silva *et al.* 2007). El tiempo máximo que se dejaron las muestras de flor de Jamaica en contacto con el solvente fue de 24 h. El óptimo para extraer antocianinas en relación a estas dos variables independientes fue 30% agua, 70% metanol y un tiempo de 6 h.

Los resultados de la relación entre las variables independientes pH y solvente (Agua:Metanol), indicaron que al disminuir la cantidad de agua en el solvente aumenta la extracción de antocianinas (Figura 2) como se mostró en la gráfica anterior (Figura 1). El propósito de utilizar agua en otros solventes es reducir costos, sin embargo, para optimizar la extracción el contenido de agua en el solvente debe ser bajo (Gorriti-Gutiérrez *et al.* 2009). En pH se observó que a medida que éste disminuye se obtuvo un mejor resultado en la extracción. El nivel de pH más bajo utilizado en el experimento fue de 1.5, sin embargo, para economizar la regulación del pH, se encontró un óptimo de extracción con ayuda del modelo el cual resultó en 2.37.

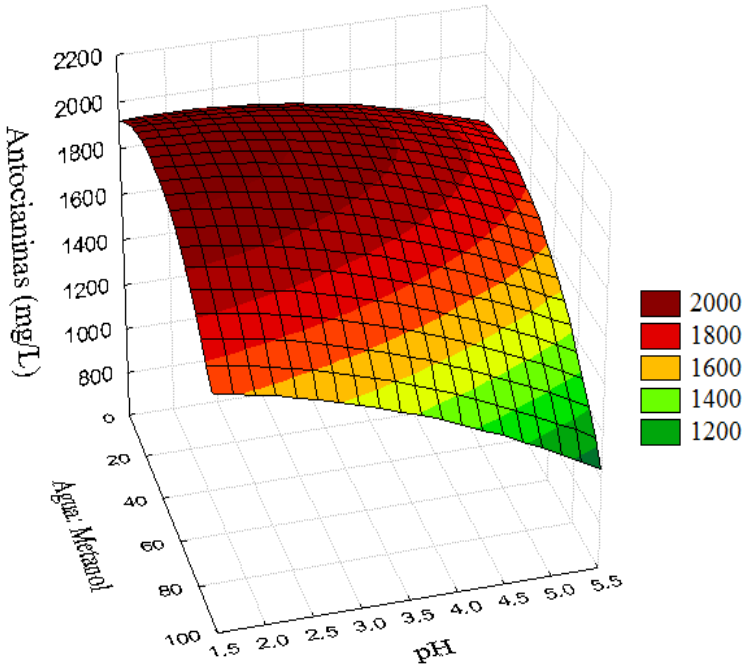

Figura 2**.** Efecto del solvente Agua: Metanol y pH en la extracción de antocianinas.

El punto óptimo encontrado por el modelo del estudio concuerda con recientes investigaciones que indican un pH óptimo de extracción entre 2-4 (Quinteros *et al.* 2014). El pH es un factor que influye en la estabilidad de las antocianinas. Se debe limitar la degradación del estado natural de las antocianinas (Bridgers *et al.* 2010). Un pH alto degrada las antocianinas por el catión flavilio, ya que éste tiene pocos electrones y por lo tanto es muy reactivo.

Al reaccionar el catión da origen a otras estructuras químicas que también son inestables. Las antocianinas muestran su máxima expresión de color a bajo pH y su forma incolora a pH alcalino, por esta característica las antocianinas son utilizadas a bajo pH en la industria de alimentos (Badui-Dergal 2006; Garzón 2008). Con respecto a los resultados de la interacción entre Tiempo y pH, se observó que las dos variables influyeron en la extracción de antocianinas (Figura 3). A medida que las muestras se dejaron más tiempo en contacto con el solvente (Agua:Metanol) la concentración de antocianinas extraídas aumentó. Para el caso de pH se observó que a valores de 1.5 a 3 se obtuvo mejores resultados de extracción que a valores ≥ 4. Un pH bajo fue mejor para la extracción, se suele acidificar los solventes para obtener más antocianinas, ya que éstas son dependientes del pH y al tener un pH de 2 se presentan con una coloración roja y a un pH de 8 presentan coloración azul por lo que puede influir en la cuantificación por un método colorimétrico (Aguilera 2009). Algunas investigaciones obtuvieron mejores resultados de extracción a menor tiempo, lo cual va a depender del solvente, pH, temperatura y del material del cual se extraen las antocianinas. Sin embargo, los tiempos comúnmente utilizados son de 4 ± 2 horas (Heras *et al.* 2013). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en éste estudio, siendo el tiempo óptimo de extracción de 6 h.

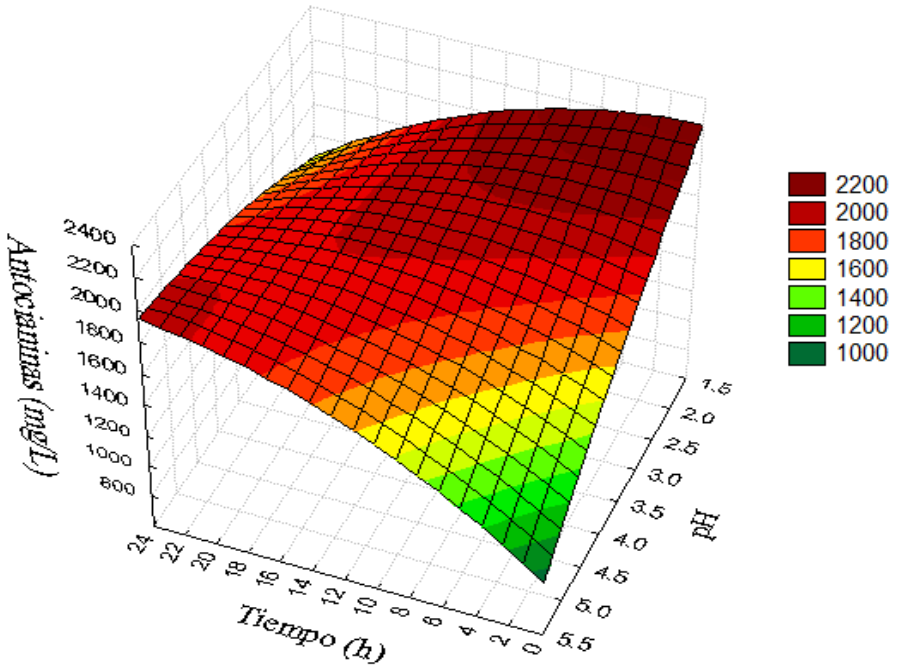

Figura 3**.** Efecto del Tiempo (h) y pH en la extracción de antocianinas.

La máxima extracción de antocianinas de flor de Jamaica con relación a las variables de % relación Agua: Metanol, Tiempo y pH, se generó por medio de una función de utilidad la cual indicó los niveles óptimos de extracción. El punto óptimo fue de 6 horas de contacto de la harina de flor de Jamaica con el solvente (30% agua y 70% metanol) a un pH de 2.37 (Figura 4). Al repetir este experimento se obtendría 2,000 mg/L de antocianinas siendo un indicador de la diversidad de polifenoles en la flor de Jamaica.

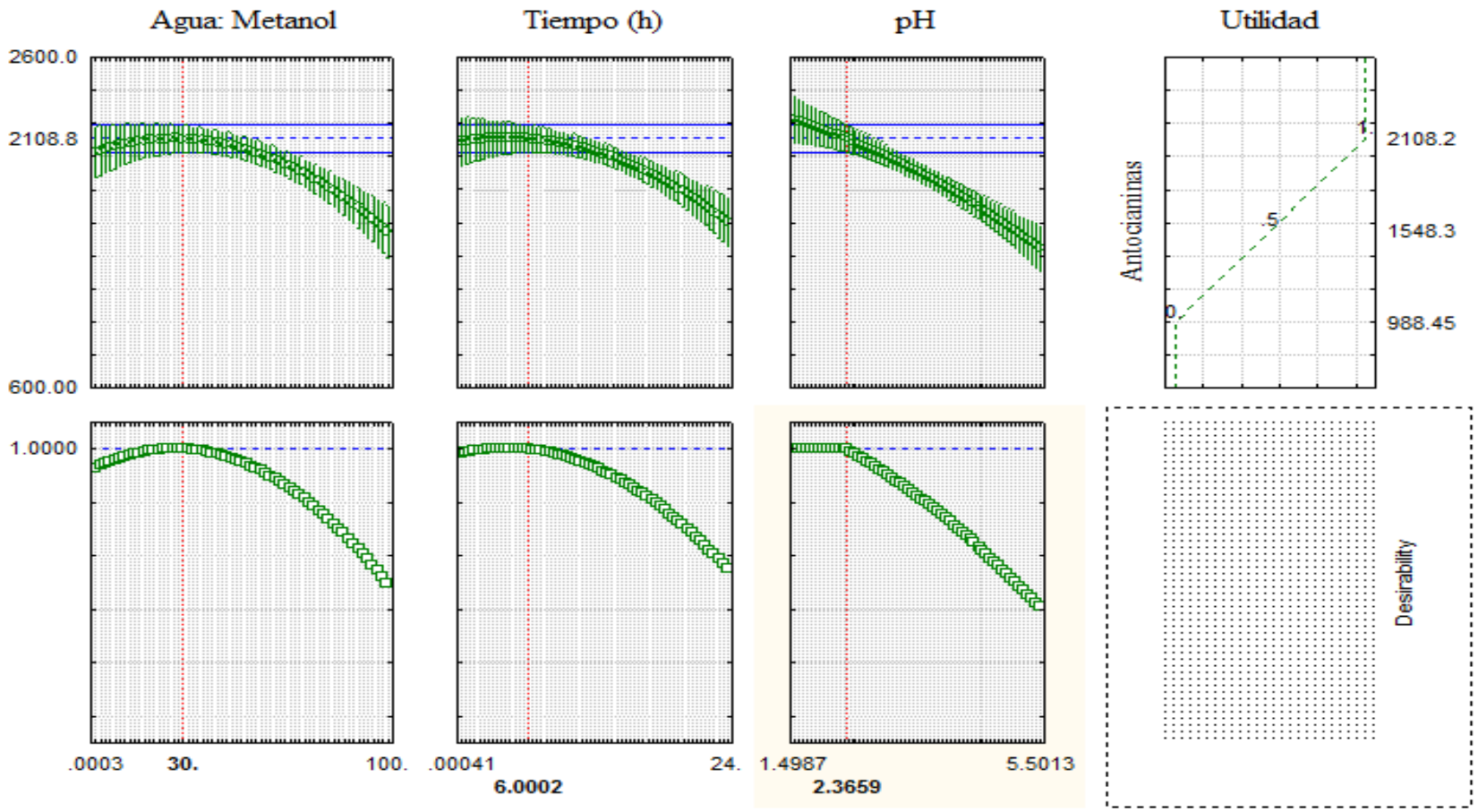

Figura 4. Condiciones de proceso que optimizan la extracción de antocianinas de flor de Jamaica.

Fase II. Evaluación de la metodología de encapsulación.

Morfología de microcápsulas. La evaluación de la morfología de las microcápsulas se hizo con la ayuda de un microscopio y el programa ImageJ (Figura 5). Se evaluó la forma de las microcápsulas según el material de encapsulación, el porcentaje de materia seca y diferente concentración de antocianinas dentro de las cápsulas. En la gelificación iónica de las cápsulas es importante estandarizar el proceso para mantener las características morfológicas. La forma de las cápsulas van a depender de múltiples variables que se deben considerar, tales como: densidad, viscosidad, diámetro de la jeringa, distancia y velocidad de caída de la gota (Chan *et al.* 2009).

Se observó que las microcápsulas presentaron una forma esférica recién preparadas (Calero *et al.* 2008). Sin embargo, la captura del microscopio mostró que las microcápsulas con almidón presentaron mayor grado de esfericidad y obtuvieron una distribución más homogénea, conservando la forma de las cápsulas, ya que el almidón colaboró como material de relleno y dio mejor consistencia a la solución beneficiando el acabado de las cápsulas (López *et al.* 2011; López 2012). Las microcápsulas elaboradas a partir de alginato y las de mayor porcentaje de materia seca presentaron esferas irregulares, más aplanadas, forma de huevo y con cola, ya que la solución tenía una viscosidad mayor y al salir de la jeringa en el proceso de extrusión fue más difícil de controlar el goteo (López *et al.* 2009).

Eficiencia de la microencapsulación de las antocianinas. Se obtuvieron microcápsulas con una carga máxima de 64% ± 2.58 correspondiente a las cápsulas formadas por una matriz de relación 2:2 (4% p/v) de alginato/almidón basados en una concentración de 2,000 mg/kg de antocianinas (Figura 6). Varios estudios han demostrado que las microcápsulas a base de alginato de sodio tienen la desventaja de ser muy porosas e inestables a condiciones osmóticas, esto disminuye la eficiencia de retención de la carga encapsulada (Araya 2012). La eficiencia por lo tanto está ligada a la permeabilidad de las cápsulas, en este caso al adicionar el almidón en 2% (p/v) ayudó a la formación de una matriz menos permeable y porosa ya que actuó como relleno al combinar con el alginato, además de mantener las características morfológicas (López 2012). Sin embargo, los resultados con bajas concentraciones pueden ser afectados por la exposición prolongada a temperaturas elevadas y en condiciones de bajo pH durante la formación del gel de alginato, ya que este puede degradarse y no lograr una buena cohesividad entre las moléculas del biopolímero, que influye en su permeabilidad. Por ende, al formar un gel adecuado ayuda a la adhesión entre el biopolímero y el material a cubrir (Pedroza 2002).

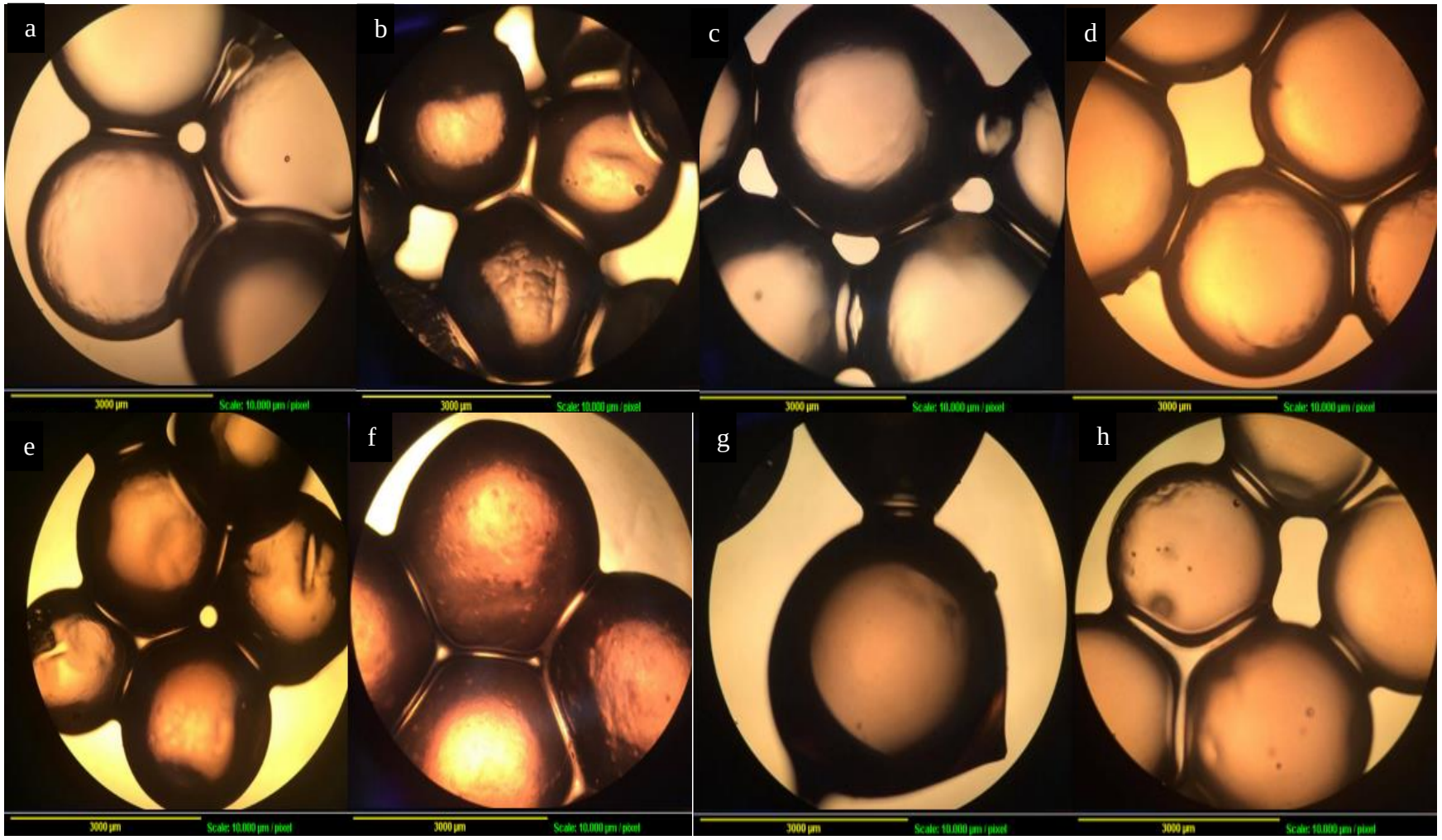

Figura 5. Microscopía para cápsulas de alginato (a, c), alginato-almidón (b, d) a 1000 mg/kg y alginato (e, g), alginato-almidón (f, h) a 2000 mg/L.

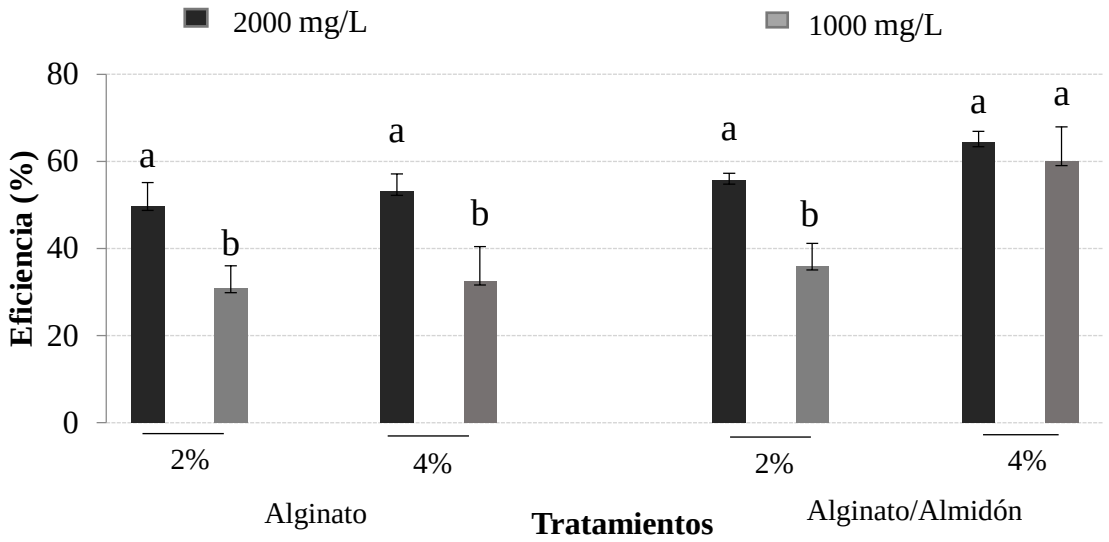

Figura 6. Eficiencia de carga de antocianinas capturadas en las microcápsulas.
[a-b] Diferentes letras indican diferencias significativas P<0.05.

Rendimiento de las microcápsulas. Los resultados obtenidos demostraron que mayor cantidad de materia seca de alginato presentó mayor rendimiento en este caso los tratamientos 3 y 4, los cuales están constituidos con 4% (p/v) de alginato, presentan los mayores rendimientos siendo 89% ± 4 y 94% ± 5, respectivamente (Figura 7). La diferencia de peso está relacionada a la cantidad de aire que se encuentra en el émbolo de la jeringa (Mortazavian *et al.* 2007).

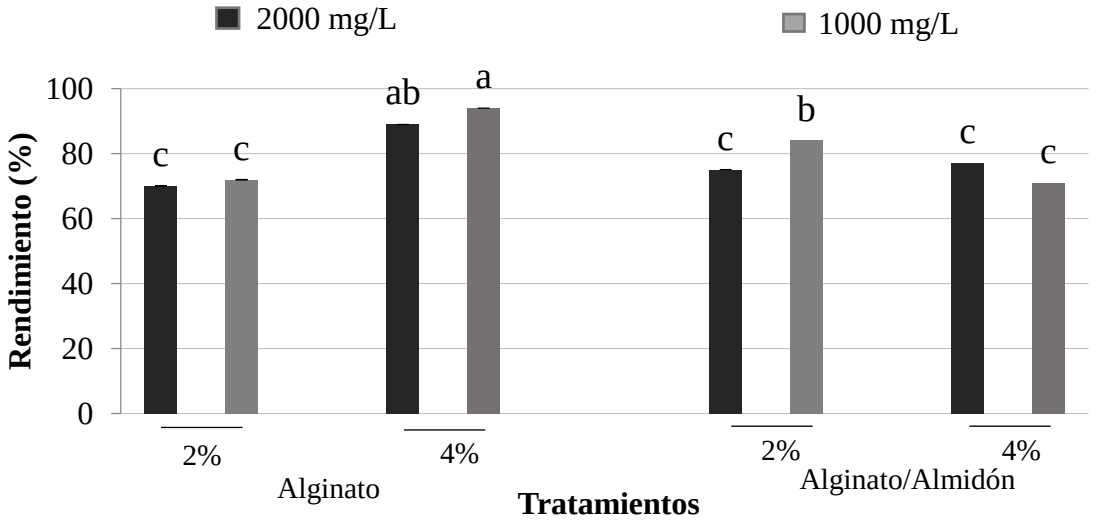

Figura 7. Rendimiento de microcápsulas en base a peso.
[a-b-c] Diferentes letras indican diferencias significativas P<0.05.

Diámetro de las microcápsulas. Se encontró que las variables que tuvieron interacción e influyeron significativamente sobre la distribución de tamaño fueron: el porcentaje y el tipo de biopolímero utilizado. La solución cargada con 4% (p/v) de alginato, al presentar una mayor viscosidad debido a la proporción polvo/líquido, influyó en el diámetro de la microcápsulas resultando en un tamaño de 2.93 ± 0.18 mm. Las cápsulas de menor tamaño no tuvieron diferencias significativas entre estas (P<0.05), los tratamientos fueron 1, 5 y 6 las cuales fueron formadas con 2% (p/v) de materia seca (alginato/almidón) para la formación de la matriz, los tamaños obtenidos fueron 2.08 ± 0.08 mm, 2.21 ± 0.13 mm y 2.10 ± 0.07 mm, respectivamente (Figura 8). El diámetro pudo ser influenciado también por factores como: viscosidad de la solución de alginato, la distancia desde el dispositivo extrusor al baño de calcio y del diámetro del orificio de la jeringa (Pasin *et al.* 2012; Chan *et al.* 2009). Según la literatura al realizar la técnica de encapsulación por extrusión los diámetros comunes van de 1-5 mm, por lo cual los resultados obtenidos se encuentran dentro de este rango (Calero *et al.* 2008).

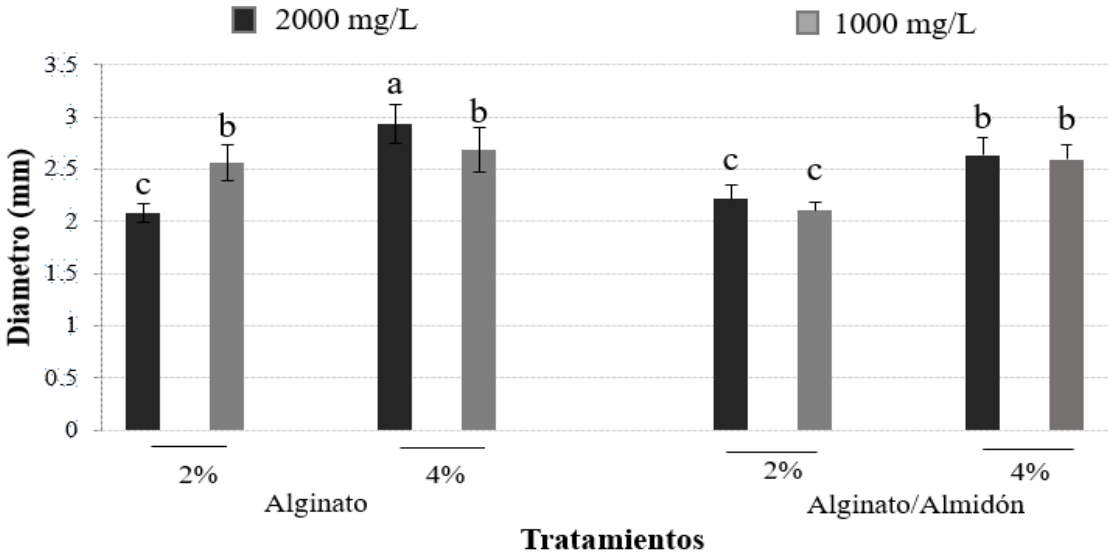

Figura 8. Diámetro de las microcápsulas.
[a-b-c] Diferentes letras indican diferencias significativas P<0.05.

Fase III. Evaluación de la capacidad antioxidante.

Tiempo de inducción. El efecto de la capacidad antioxidante de BHT y antocianinas encapsuladas no se observó (Cuadro 8), por las concentraciones que se utilizó, no presentaron funcionalidad para evitar oxidación. La cantidad de antioxidante añadida al aceite de soya en este estudio cumplió con las restricciones de cantidad máxima de antioxidantes agregados en aceites, que es de 75 mg/kg según la norma del Codex para aceites vegetales (CODEX 1999). Otro factor que no permitió observar el efecto de las antocianinas encapsuladas fue la temperatura usada para la medición del tiempo de inducción (Rodríguez *et al.* 2015).

La temperatura empleada fue de 120 °C, la cual degradó las microcápsulas a tal punto que no permitió la liberación controlada, difiriendo con investigaciones realizadas en estabilidad oxidativa de aceites con antioxidantes naturales encapsulados pero con menores temperaturas (Palma 2014). Sin embargo, los resultados son una herramienta potencial para determinar la capacidad antioxidante en aceites ya que existen pocas investigaciones evaluando el efecto de antocianinas encapsuladas en la estabilidad oxidativa de aceites. Se observó que el extracto de antocianinas libre mostró tiempos de inducción significativamente mayores ($P<0.05$) con respecto a los demás antioxidantes (BHT y antocianinas encapsuladas). El extracto de antocianinas libres cuadriplicó la vida útil del aceite evaluado (Figura 9), lo cual afirma el alto poder antioxidantes de las antocianinas aun usando una concentración tan baja (10 ppm) y sometiéndolas a temperaturas altas. Estudios anteriores han encontrado que las antocianinas tienen alta capacidad antioxidante en medios lipídicos (Michotte *et al.* 2011).

Cuadro 8. Tiempo de inducción de aceite de soya en Rancimat.

Sistemas	**Tiempo de inducción (h)**
Extracto	7.64 ± 0.36^{a}
Microcápsulas	1.66 ± 0.11^{b}
BHT	1.68 ± 0.09^{b}
Control	1.65 ± 0.06^{b}

[a-b] Diferentes letras indican diferencias significativas $P<0.05$.

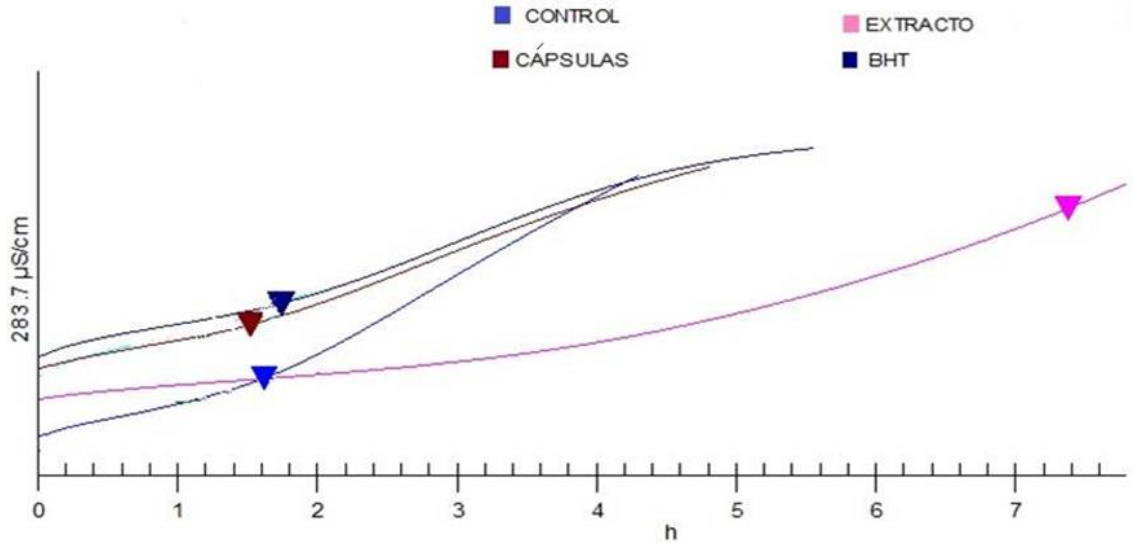

Figura 9. Relación de la conductividad y tiempo de inducción del aceite de soya.

4. CONCLUSIONES

- El punto óptimo para obtener una mayor extracción de antocianinas de la flor de Jamaica fue de un pH de 2.37, un tiempo de 6 h en el solvente, y una relación de 30% Agua y 70% metanol.

- La metodología de encapsulación de las antocianinas presentes en la flor de Jamaica fue efectiva, ya que sí se lograron encapsular las antocianinas.

- La mezcla de alginato y almidón lograron una mayor eficiencia de encapsulado, menor tamaño de capsula y mejor morfología.

- Las cápsulas con mayor porcentaje de materia seca obtuvieron mayor rendimiento y mejor atrapamiento de cápsulas. La encapsulación obtuvo mejores resultados con el extracto puro que con el extracto diluido.

- El extracto de antocianinas libres cuadriplicó la vida útil del aceite evaluado y obtuvo mayor capacidad antioxidante que el BHT, sin embargo, no se determinó la efectividad antioxidante del extracto encapsulado.

5. RECOMENDACIONES

- Para mejorar la extracción se recomienda tomar en cuenta más variables independientes tales como diferentes solventes, temperatura, relación solvente y materia seca.

- Purificar el extracto por medio de una columna carbono activado y cuantificarlo por el método de cromatografía liquida, ya que los métodos colorimétricos son más difíciles de manejar y menos exactos.

- Evaluar la viscosidad, densidad, higrospicidad, solubilidad, actividad acuosa, tensión superficial de las soluciones para la elaboración de cápsulas, hacer pruebas reológicas a las microcápsulas elaboradas y evaluar su vida útil.

- Hacer un estudio evaluando quitosano u otros agentes como material de recubrimiento en los biopolímeros utilizados en este estudio para la elaboración de cápsulas multicapas.

- Explorar aplicaciones para antocianinas encapsuladas y otros métodos de evaluación de la capacidad antioxidante.

6. LITERATURA CITADA

Aguilera Ortíz M. 2009. Caracterización y estabilidad de las antocianinas de higo *Ficus carica* variedad Misión, cultivado en ciudad Lerdo Durango, México [Tesis]. Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Araya EA. 2012. Encapsulación de una molécula modelo de bajo peso molecular en microcápsulas de Alginato de calcio. PhD diss [Tesis]. Facultad de Ciencias Escuela de Biología Marina. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile.

Badui Dergal S, Valdés Martínez SE, Cejudo Gómez H. 2006. Química de los alimentos. No. TX545. B3.

Box G.E.P, Draper N.R. 1959. A basis for the selection of a response surface design. Journal of the American Statistical Association. vol. 54 No. 287, pp. 622-654.

Bridgers EN, Chinn MS, Truong VD. 2010. Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweet potatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. Industrial Crops and Products. 32(3):613–620. doi:10.1016/j.indcrop.2010.07.020.

Calero J, Sánchez YF, Torrez R, Hernann E, López K. 2008. Elaboración y caracterización de microcápsulas gastrorresistentes de Diclofenac obtenidas por Gelificación Iónica. Universitas (León). Revista Científica de la UNAN-León., 2(1), 27-30.

Castañeda R, Cáceres A. 2014. Compuestos bioactivos y propiedades terapéuticas de los cálices de rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa Linn).* Revista científica Instituto de investigaciones químicas y biológicas universidad de san Carlos Guatemala. Vol. 24. 7–9

Chan ES, Lee BB, Ravindra P, Poncelet D. 2009. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. J Colloid Interface Sci. 338(1):63–72. eng. doi:10.1016/j.jcis.2009.05.02

Cid-Ortega S, Guerrero-Beltrán JA. 2015. Roselle calyces (Hibiscus sabdariffa), an alternative to the food and beverages industries: A review. J Food Sci Technol. 52(11):6859–6869. doi:10.1007/s13197-015-1800-9.

CODEX Alimentarius. 1999. Norma del Codex para aceites vegetales especificados CODEX STAN 210-1999. Washington: FAO.

De la Cruz AV, Terán AR. 2013. Evaluación de la viabilidad de Lactobacillus casei libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 39 p.

Deladino L, Anbinder PS, Navarro AS, Martino MN. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from Ilex paraguariensis. Carbohydrate Polymers. 71(1):126–134. doi:10.1016/j.carbpol.2007.05.030.

Galicia-Flores LA, Salinas-Moreno Y, Espinoza-García BM, Sánchez-Feria C. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) nacional e importada. Revista Chapingo. Serie horticultura, 14(2), 121-129. Recuperado el 16 de Septiembre del 2016, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000200004&lng=es&tlng=es.

Gárzaro D, Cedezo FG, Kalvatchev Z. 1998. Theobroma cacao L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. Agroalimentaria, 23. Recuperado el 16 de Septiembre del 2016, de http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/17703/1/articulo6_2.pdf

Garzón G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta biol. Colomb. 13(3):27-36.

Gonzáles P. 2013. Extracción y caracterización de los antioxidantes secundarios del romero (Rosmarinus officinalis l.) para promover la obtención y la aplicación de antioxidantes naturales sobre grasas y aceites [Tesis]. Universidad técnica de Ambato-Ambato ecuador. 32 p.

Gorriti A, Quispe F, Arroyo JL, Córdova A, Jurado B, Santiago I, Taype E. 2009. Extracción de antocianinas de las corontas de Zea mays L. Maíz morado. Ciencia e Investigación, 12(2), 64-74.

Heras I, Alvis A, Arrazola G. 2013. Optimización del proceso de extracción de antocianinas y evaluación de la capacidad antioxidante de Berenjena (Solana melonera L.). Inf. tecnol. 24(5):93–102. doi: 10.4067/S0718-07642013000500011.

Kechinski CP, Guimaraes PVR, Norena CPZ, Tessaro IC, Marczak LDF. 2010. Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. J Food Sci. 75(2):C173-6. eng. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01479.x.

Kunradi-Vieira F, da Silva Campelo-Borges G, Copetti C.Valdemiro Gonzaga L, da Costa Nunes E. Fett R. 2009. “Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars”. En Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 59 (1), 101-106.

López A. 2012. Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de Yerba mate [Tesis]. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) La Plata, Buenos Aires. Recuperado el 23 de septiembre del 2016 Obtenido de http://sedici. unlp. edu. ar/bitstream/handle/10915/24904/Documento_completo __. pdf.

López AF, Deladino L, Alba SN, Miriam NM. 2011. Encapsulación de compuestos bioactivos con alginatos para la industria de alimentos. @ limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria, 10(1).

López Corado LC, Hernández V, Alexy M. 2009. Propuesta de un método para la elaboración de microesferas matriciales de ácido acetilsalicilico utilizando alginato de sodio por la técnica de gelificación iónica [Tesis] Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador.

Lupo Pasin B. 2012. Encapsulación de extractos polifenólicos en microesferas de alginato para alimentos funcionales [internet]. Recuperado el 26 de septiembre del 2016 de https://www.uclm.es/area/cta/cesia2012/cd/PDFs/4-BIO/BIO-O06T.pdf

Michotte D, Rogez H, Chirinos R, Mignolet E, Campos D, Larondelle Y. 2011. Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. Food Chem. 129(3):1228–1231. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.108.

Moro T. 2013. Caracterización físico-química de bioplásticos elaborados por extrusión y Termo compresión a partir de harina de maracuyá (passiflora edulis sp.). Dissertação (Maestria de Tecnología de Alimentos). Instituto de Tecnología, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

Mortazavian A. Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian journal of biotechnology, 5(1), 1-18.

Palma Astudillo MJ. 2014. Cinética y mecanismo de liberación de flavonoides desde micropartículas y su efecto sobre la estabilidad oxidativa en linoleato de metilo [Tesis]. Universidad de Chile, Santiago.

Parra Huertas RA. 2010. Revisión: Microencapsulación de alimentos. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 63(2), 5669-5684. Recuperado el 16 de septiembre del 2016. Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472010000200020&lng=en&tlng=es.

Pasin BL, Azón CG, Garriga AM. 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 3(1), 130-151.

Pedroza-Islas R. 2002. Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 3.

Quinteros CF, Heredia AM, Zapata LM, Clemente G, Malleret AD, Cárcel JA. 2014 Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos Ciencia, Docencia y Tecnología [en línea]. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2016. Disponible en:<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14532635008> ISSN 0327-5566

Rocha G. 2009. Obtenção e Caracterização de Filmes Biodegradáveis a partir de Misturas de Amido de Mandioca e Extrato Protéico de Soja [Disertación]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-Rio de Janeiro. 75 p.

Rodrigues MI, Lemma AF. 2012. Diseño experimental y optimización de procesos. Editora Carita. Campinas, Brasil.

Rodríguez G, Villanueva E, Glorio P, Baquerizo M. 2015. Estabilidad oxidativa y estimación de la vida útil del aceite de sacha inchi (Plukenetia volubilis L.). Scientia Agropecuaria. 6(3):155-63.

Salinas-Moreno Y, Zúñiga-Hernández ARE, Jiménez-De la Torre, Luis Bartolomé, Serrano-Altamirano V, Sánchez-Feria C. 2012. COLOR EN CÁLICES DE JAMAICA (Hibiscus sabdariffa L.) Y SU RELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE SUS EXTRACTOS ACUOSOS. rchsh. XVIII(3):395–407. doi:10.5154/r.rchsh.2011.08.038.

Silva E, Rogez H, Larondelle Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from Inga edulis leaves using response surface methodology. Separation and Purification Technology. 55(3):381–387. doi:10.1016/j.seppur.2007.01.008.

Soares M. 2014. Caracterização química de extratos de Hibiscus tiliaceus: estudo comparativo de métodos de extração [Tesis]. Universidade ferederal do rio grande do sul instituto de química-Porto alegre. 26 p.

Teba C. 2014. Desenvolvimento e caracterização de farinhas mistas extrudadas de arroz e concentrado proteico de soro de leite bovino para a elaboração de biscoitos e mingaus [Tesis]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-Rio de Janeiro. 192 p.

Thompson DR. 1982. Response surface experimentation. Journal of Food Process and Preservation 6: 155 p.

Venereo Gutiérrez JR. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de Medicina Militar, 31(2), 126-133. Recuperado en 16 de septiembre del 2016 http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009&lng=es&tlng=es.

Zava WJ, Estrada KA, Vargas OS, Vilchis RJ, González BS, Guillén AD, Flores H. 2014. Encapsulación de ácido A-aminolevulínico en microesferas de alginato. Revista Iberoamericana de Polímeros. 15(2):117-25.

Zhang Z, Yang MJ, Pawliszyn J. 1994. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. Anal. Chem. 66(17):844A–853A. doi:10.1021/ac00089a001.

7. ANEXOS

Anexo 1. Valor F calculado P < 0.10 para la variable antocianinas.

fuente de variación Antocianinas	**SS**	**GL**	**SM**	**F calculado**	**F tabular**
regresión	861561.46	5	172312.2913	15.54398694	4.051
residual	44341.85	4	11085.46295		
	905903.31	9			

Anexo 2. Microcápsulas con antocianinas.

Anexo 3. Sintaxis de SAS 9.4 para análisis

EFICIENCIA

```
DATA FACTORIAL;
INPUT  Mseca $ Pconcentracion pMseca $ Antocianinas;
DATALINES;
Alg   100   2     51.48
Alg   100   2     54.06
Alg   100   2     43.76
Alg   100   4     56.63
Alg   100   4     48.91
Alg   100   4     54.06
Alg_Alm     100   2     56.63
Alg_Alm     100   2     54.06
Alg_Alm     100   2     56.63
Alg_Alm     100   4     66.93
Alg_Alm     100   4     61.78
Alg_Alm     100   4     64.35
Alg   50    2     25.74
Alg   50    2     30.89
Alg   50    2     36.04
Alg   50    4     41.19
Alg   50    4     30.89
Alg   50    4     25.74
Alg_Alm     50    2     30.89
Alg_Alm     50    2     36.04
Alg_Alm     50    2     41.19
Alg_Alm     50    4     61.78
Alg_Alm     50    4     66.93
Alg_Alm     50    4     51.48

;
PROC GLM;
CLASS Mseca Pconcentracion pMseca;
MODEL Antocianinas = Mseca Pconcentracion pMseca Mseca*Pconcentracion
Mseca*pMseca Pconcentracion*pMseca Mseca*Pconcentracion*pMseca/SS3;
MEANS Mseca Pconcentracion pMseca/DUNCAN;
LSMEANS   Mseca*Pconcentracion      Mseca*pMseca   Pconcentracion*pMseca
Mseca*Pconcentracion*pMseca/STDERR PDIFF;
RUN;
```

DIAMETRO

```
DATA FACTORIAL;
INPUT  Mseca $ Pconcentracion pMseca $ Antocianinas;
DATALINES;

Alg   100   2     2.08
Alg   100   2     2.04
Alg   100   2     2.03
Alg   100   2     2.26
Alg   100   2     2.07
Alg   100   2     2
Alg   100   2     1.98
Alg   100   2     2.19
Alg   100   2     2.05
Alg   100   2     2.12
Alg   100   4     2.87
Alg   100   4     3.15
Alg   100   4     2.68
Alg   100   4     3.15
Alg   100   4     3
Alg   100   4     2.73
Alg   100   4     2.94
Alg   100   4     2.9
Alg   100   4     2.72
Alg   100   4     3.19
Alg_Alm     100   2     2.15
Alg_Alm     100   2     2.29
Alg_Alm     100   2     2.16
Alg_Alm     100   2     2.35
Alg_Alm     100   2     2.36
Alg_Alm     100   2     2.2
Alg_Alm     100   2     2.01
Alg_Alm     100   2     2.05
Alg_Alm     100   2     2.15
Alg_Alm     100   2     2.4
Alg_Alm     100   4     2.58
Alg_Alm     100   4     2.57
Alg_Alm     100   4     2.57
Alg_Alm     100   4     2.49
Alg_Alm     100   4     2.36
Alg_Alm     100   4     2.72
Alg_Alm     100   4     2.68
Alg_Alm     100   4     2.75
Alg_Alm     100   4     3
Alg_Alm     100   4     2.62
Alg   50    2     2.7
Alg   50    2     2.24
Alg   50    2     2.75
Alg   50    2     2.72
Alg   50    2     2.68
Alg   50    2     2.64
Alg   50    2     2.4
Alg   50    2     2.43
```

```
Alg   50    2     2.59
Alg   50    2     2.43
Alg   50    4     2.56
Alg   50    4     2.63
Alg   50    4     2.5
Alg   50    4     2.95
Alg   50    4     2.52
Alg   50    4     2.6
Alg   50    4     2.76
Alg   50    4     2.4
Alg   50    4     2.95
Alg   50    4     2.97
Alg_Alm     50    2     2.08
Alg_Alm     50    2     2.1
Alg_Alm     50    2     2.09
Alg_Alm     50    2     1.98
Alg_Alm     50    2     2.23
Alg_Alm     50    2     2.19
Alg_Alm     50    2     2.13
Alg_Alm     50    2     2.12
Alg_Alm     50    2     2.02
Alg_Alm     50    2     2.12
Alg_Alm     50    4     2.42
Alg_Alm     50    4     2.4
Alg_Alm     50    4     2.67
Alg_Alm     50    4     2.4
Alg_Alm     50    4     2.59
Alg_Alm     50    4     2.6
Alg_Alm     50    4     2.58
Alg_Alm     50    4     2.8
Alg_Alm     50    4     2.75
Alg_Alm     50    4     2.72

;
PROC GLM;
CLASS Mseca Pconcentracion pMseca;
MODEL Antocianinas = Mseca Pconcentracion pMseca Mseca*Pconcentracion
Mseca*pMseca Pconcentracion*pMseca Mseca*Pconcentracion*pMseca/SS3;
MEANS Mseca Pconcentracion pMseca/DUNCAN;
LSMEANS Mseca*Pconcentracion Mseca*pMseca Pconcentracion*pMseca
Mseca*Pconcentracion*pMseca/STDERR PDIFF;
RUN;
```

RENDIMIENTO

```
DATA FACTORIAL;
INPUT  Mseca $ Pconcentracion pMseca $ Antocianinas;
DATALINES;

Alg   100   2     65.33
Alg   100   2     68.67
Alg   100   2     76.33
Alg   100   4     86
Alg   100   4     88
Alg   100   4     93
Alg_Alm     100   2     76.67
Alg_Alm     100   2     75.67
Alg_Alm     100   2     78.67
Alg_Alm     100   4     75.67
Alg_Alm     100   4     71
Alg_Alm     100   4     78
Alg   50    2     71.67
Alg   50    2     68.67
Alg   50    2     74.33
Alg   50    4     86.33
Alg   50    4     82.33
Alg   50    4     84
Alg_Alm     50    2     76.67
Alg_Alm     50    2     67
Alg_Alm     50    2     68.33
Alg_Alm     50    4     93.33
Alg_Alm     50    4     89
Alg_Alm     50    4     98.67


;
PROC GLM;
CLASS Mseca Pconcentracion pMseca;
MODEL Antocianinas = Mseca Pconcentracion pMseca Mseca*Pconcentracion
Mseca*pMseca Pconcentracion*pMseca Mseca*Pconcentracion*pMseca/SS3;
MEANS Mseca Pconcentracion pMseca/DUNCAN;
LSMEANS Mseca*Pconcentracion Mseca*pMseca Pconcentracion*pMseca
Mseca*Pconcentracion*pMseca/STDERR PDIFF;
RUN;
```

TIEMPO DE INDUCCIÓN

```
DATA CAP_ANT;
INPUT REP TRT $ TIEMPO;
DATALINES;
1 CONTROL 1.71
2 CONTROL 1.62
3 CONTROL 1.67
1 EXTRACTO 7.89
2 EXTRACTO 7.38
3 EXTRACTO 7.46
1 CAPSULAS 1.68
2 CAPSULAS 1.62
3 CAPSULAS 1.65
1 BHT 1.74
2 BHT 1.61
3 BHT 1.64
 ;
PROC GLM;
CLASS TRT REP; MODEL TIEMPO= TRT;
MEANS TRT/DUNCAN;
RUN;
```

Anexo 4. Tabla de distribución F, alfa= 0.10.

Distribución F, alfa=0.10

v2 \ v1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	39.864	49.500	53.593	55.833	57.240	58.204	58.906	59.439	59.857	60.195	60.473	60.705	60.902	61.073	61.220	61.350	61.465	61.566	61.658	61.740	61.815	61.883	61.945	62.002	62.055
2	8.526	9.000	9.162	9.243	9.293	9.326	9.349	9.367	9.381	9.392	9.401	9.408	9.415	9.420	9.425	9.429	9.433	9.436	9.439	9.441	9.444	9.446	9.448	9.450	9.451
3	5.538	5.462	5.391	5.343	5.309	5.285	5.266	5.252	5.240	5.230	5.222	5.216	5.210	5.205	5.200	5.196	5.193	5.190	5.187	5.184	5.182	5.180	5.178	5.176	5.175
4	4.545	4.325	4.191	4.107	4.051	4.010	3.979	3.955	3.936	3.920	3.907	3.896	3.886	3.878	3.870	3.864	3.858	3.853	3.848	3.844	3.841	3.837	3.834	3.831	3.828
5	4.060	3.780	3.619	3.520	3.453	3.405	3.368	3.339	3.316	3.297	3.282	3.268	3.257	3.247	3.238	3.230	3.223	3.217	3.212	3.207	3.202	3.198	3.194	3.191	3.187
6	3.776	3.463	3.289	3.181	3.108	3.055	3.014	2.983	2.958	2.937	2.920	2.905	2.892	2.881	2.871	2.863	2.855	2.848	2.842	2.836	2.831	2.827	2.822	2.818	2.815
7	3.589	3.257	3.074	2.961	2.883	2.827	2.785	2.752	2.725	2.703	2.684	2.668	2.654	2.643	2.632	2.623	2.615	2.607	2.601	2.595	2.589	2.584	2.580	2.575	2.571
8	3.458	3.113	2.924	2.806	2.726	2.668	2.624	2.589	2.561	2.538	2.519	2.502	2.488	2.475	2.464	2.454	2.446	2.438	2.431	2.425	2.419	2.414	2.409	2.404	2.400
9	3.360	3.006	2.813	2.693	2.611	2.551	2.505	2.469	2.440	2.416	2.396	2.379	2.364	2.351	2.340	2.330	2.320	2.312	2.305	2.298	2.292	2.287	2.282	2.277	2.272
10	3.285	2.924	2.728	2.605	2.522	2.461	2.414	2.377	2.347	2.323	2.302	2.284	2.269	2.255	2.244	2.233	2.224	2.215	2.208	2.201	2.194	2.189	2.183	2.178	2.174
11	3.225	2.860	2.660	2.536	2.451	2.389	2.342	2.304	2.274	2.248	2.227	2.209	2.193	2.179	2.167	2.156	2.147	2.138	2.130	2.123	2.117	2.111	2.105	2.100	2.095
12	3.177	2.807	2.606	2.480	2.394	2.331	2.283	2.245	2.214	2.188	2.166	2.147	2.131	2.117	2.105	2.094	2.084	2.075	2.067	2.060	2.053	2.047	2.041	2.036	2.031
13	3.136	2.763	2.560	2.434	2.347	2.283	2.234	2.195	2.164	2.138	2.116	2.097	2.080	2.066	2.053	2.042	2.032	2.023	2.014	2.007	2.000	1.994	1.988	1.983	1.978
14	3.102	2.726	2.522	2.395	2.307	2.243	2.193	2.154	2.122	2.095	2.073	2.054	2.037	2.022	2.010	1.998	1.988	1.978	1.970	1.962	1.955	1.949	1.943	1.938	1.933
15	3.073	2.695	2.490	2.361	2.273	2.208	2.158	2.119	2.086	2.059	2.037	2.017	2.000	1.985	1.972	1.961	1.950	1.941	1.932	1.924	1.917	1.911	1.905	1.899	1.894
16	3.048	2.668	2.462	2.333	2.244	2.178	2.128	2.088	2.055	2.028	2.005	1.985	1.968	1.953	1.940	1.928	1.917	1.908	1.899	1.891	1.884	1.877	1.871	1.866	1.860
17	3.026	2.645	2.437	2.308	2.218	2.152	2.102	2.061	2.028	2.001	1.978	1.958	1.940	1.925	1.912	1.900	1.889	1.879	1.870	1.862	1.855	1.848	1.842	1.836	1.831
18	3.007	2.624	2.416	2.286	2.196	2.130	2.079	2.038	2.005	1.977	1.954	1.933	1.916	1.900	1.887	1.875	1.864	1.854	1.845	1.837	1.829	1.823	1.816	1.810	1.805
19	2.990	2.606	2.397	2.266	2.176	2.109	2.058	2.017	1.984	1.956	1.932	1.912	1.894	1.878	1.865	1.852	1.841	1.831	1.822	1.814	1.807	1.800	1.793	1.787	1.782
20	2.975	2.589	2.380	2.249	2.158	2.091	2.040	1.999	1.965	1.937	1.913	1.892	1.875	1.859	1.845	1.833	1.821	1.811	1.802	1.794	1.786	1.779	1.773	1.767	1.761