



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARACTERIZACIÓN Y MICROENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS DEL MORTIÑO (*Vaccinium floribundum*, Kunth)

AUTOR

Cristina Lucía Guerra Vaca

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARACTERIZACIÓN Y MICROENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS DEL MORTIÑO (*Vaccinium floribundum*, Kunth)

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos

Profesor Guía

Msc. Pablo Santiago Moncayo Moncayo

Autor

Cristina Lucía Guerra Vaca

Año

2017

DECLARACIÓN DE PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Pablo Santiago Moncayo Moncayo
Master en Dirección de Operaciones y Seguridad Industrial
C.I. 171236750-5

DECLARACIÓN DE PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Elsy Paola Carrillo Hinojosa
Master en Alimentos y nutrición
C.I. 170862540-3

DECLARACIÓN DE ASESOR CIENTÍFICO

“Declaro haber asesorado científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación, conduciéndole con coherencia en el conjunto de procedimientos realizados y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Iván Rodrigo Samaniego Maigua

Doctor en Química

C.I. 0602791345

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos del autor vigentes”

Cristina Lucía Guerra Vaca

C.I. 1720934379

AGRADECIMIENTO

A Dios, por su guía en este largo, pero gratificante camino. A mis padres por brindarme su amor y su apoyo en cada etapa de mi vida. A mis hermanos por su cariño. A mis tíos y abuelos por sus enseñanzas e incondicionales palabras de aliento.

Agradezco a cada persona en mi camino que supo apoyarme para llegar a este día.

Agradezco a Msc. Pablo Moncayo, por compartir su experiencia y conocimientos conmigo a lo largo de mi carrera universitaria, además de la guía constante durante el proyecto de titulación.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en especial al Departamento de Nutrición y Calidad. Al Dr. Iván Samaniego por enriquecer el proyecto de titulación con sus conocimientos y su ayuda en el desarrollo de la investigación.

DEDICATORIA

A mi ángel en el cielo, por acompañarme desde mis primeros pasos para conseguir mis sueños. A mis padres, gracias por tanto. Mis éxitos son sus éxitos, los amo. A mis hermanos por la alegría que entregan a mi vida, me hacen querer ser mejor cada día.

RESUMEN

La investigación presentada en el proyecto de titulación, tuvo como primera fase realizar una caracterización de los compuestos bioactivos presentes en el fruto de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). Se obtuvieron tres muestras procedentes del campo de producción de este fruto en la comunidad de Quinticusig, cantón Sigchos, provincia Cotopaxi. Se evaluó la diferencia en el contenido de polifenoles totales, antocianinas, flavonoides y capacidad antioxidante de tres alturas de la comunidad. Los compuestos bioactivos fueron recuperados gracias a un proceso de extracción con soluciones de metanol/agua/ácido fórmico y buffer pH 1,0 (Cloruro de Potasio 0,2N y Ácido Clorhídrico 0,2N) y pH 4,5 (Acetato de Sodio 1M y Ácido Clorhídrico 1,0N). La capacidad antioxidante fue evaluada en el extracto obtenido. La concentración de compuestos bioactivos fue determinada por espectrofotometría UV-VIS. Se realizó un diseño de bloques completamente al azar con tres repeticiones y una prueba de separación de medias de Tukey al 5%. La muestra obtenida a una altitud de 3020 msnm presentó una mayor concentración de polifenoles totales con 66,83 mg de ácido gálico/100 gramos de base seca y una capacidad antioxidante de 3670,43 mg Trolox/100 gramos de base seca, la muestra encontrada a 2850 msnm presentó 55,22 mg de AG/100 g BS y 3479,83 mg de Trolox/100 g BS y la muestra obtenida a 2680 msnm presentó 45,83 mg AG/100 g BS y 3414,97 mg Trolox/100 g BS. Se realizó un perfil de los polifenoles individuales encontrados en el fruto utilizando un HPLC a longitudes de onda de 280 y 330 nm, se observaron trece picos y se identificaron cinco compuestos principales: ácidos cafeico, myricetina, para-hidroxi benzoico, catequina y ácido vanílico. En una segunda fase de la investigación, se realizó la microencapsulación de la totalidad del fruto de mortiño liofilizado por el método de coacervación compleja. El pH de microencapsulación fue de 4,5 y la concentración de las soluciones gelatina/goma arábiga utilizadas fue del 3%. En una instancia final, se evaluaron cualitativamente las microcápsulas obtenidas, siendo estas redondas, sin aberturas ni poros en su estructura.

ABSTRACT

The investigation presented in this degree project was divided in two phases. The first phase had the purpose to characterize the bioactive compounds found in mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) berries. Three samples from Quinticusig, Sigchos, Cotopaxi with different growing altitudes were studied to analyze the difference in the content of total polyphenols, flavonoids, anthocyanins and antioxidant capacity. The bioactive compounds were extracted using solutions methanol/water/formic acid and buffer solutions pH 1,0 (potassium chloride 0,2N and chlorhydric acid 0,2N) and pH 4,5 (sodium acetate 1M and chlorhydric acid 1,0N). Both antioxidant capacity and concentration of bioactive compounds were determined by extracts and using spectrophotometry UV-VIS. A complete randomized block design with three repetitions and a mean separation test using Tukey 5% was made. Sample 1 with an altitude of 3020 masl presented the highest concentration of total polyphenols, the value was 66,83 mg gallic acid/100 g dried basis and an antioxidant capacity of 3670, 43 mg Trolox/100 g dried basis. Sample 3 found at 2850 masl followed with 55,22 mg GA/100 g DB and an antioxidant capacity of 3479,83 mg Trolox/100 g DB. Finally, sample 2 at an altitude of 2680 masl presented 45,83 mg GA/100 g DB and 3414,97 mg Trolox/100 g DB. A phenolic compound profile was performed using high performance liquid chromatography (HPLC) at two different wavelengths (280 and 330 nm), thirteen peaks were observed. Using standards, five peaks were correctly identified. They responded to caffeic acid, myricetin, p-hydroxybenzoic acid, catechin and vanillic acid. The tentative quantification assumed that vanillic acid and catechin were the phenolic compounds with higher concentration in the samples. The second phase of the investigation consisted on the microencapsulation of the mortiño freeze dried fruit in its totality by complex coacervation method. The microencapsulation pH was 4,5 and the concentration of the gelatin/arabic gum solution was 3%. In a final instance, the microcapsules were evaluated qualitatively. These were round and didn't present any openings or pores in their structure.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Generalidades del cultivo de mortiño	3
3.2 Composición nutricional y funcional del mortiño	4
3.3. Compuestos bioactivos presentes en el fruto de mortiño	6
3.3.1. Sustancias fenólicas	9
3.4 Capacidad antioxidante.....	11
3.5 Microencapsulación.....	14
3.5.1 Materiales encapsulantes	15
3.5.2 Técnicas de microencapsulación	16
3.5.3 Microencapsulación en la actualidad	20
3.5.4 Microencapsulación en la industria alimenticia	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Origen de las muestras	23
4.2 Descripción de la ubicación del experimento	23
4.3. Preparación de la muestra	24
4.4. Caracterización de compuestos bioactivos del mortiño	26
4.5. Determinación de ciclos de extracción	27
4.5.1. Elaboración de la curva de calibración.....	28
4.5.2 Extracción de compuestos bioactivos	29
4.5.3. Determinación del porcentaje de extracción	29
4.6. Caracterización de compuestos bioactivos	31
4.6.1 Curvas de calibración	31
4.6.2 Determinación de antocianinas	31

4.6.3 Determinación de flavonoides totales	32
4.6.4 Determinación de polifenoles totales e individuales	33
4.6.5 Determinación de capacidad antioxidante	34
4.7 Microencapsulación de compuestos bioactivos	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1 Preparación de muestra para evaluación de compuestos bioactivos y determinación de humedad.....	37
5.2 determinación de polifenoles totales	38
5.3 Determinación de antocianinas totales.....	40
5.4 Determinación de flavonoides totales.....	41
5.5 Determinación de polifenoles individuales por HPLC	44
5.6 Capacidad antioxidante de los frutos de mortiño	48
5.7 Microencapsulación de compuestos bioactivos del mortiño .	49
5.8 Análisis económico de la microencapsulación de compuestos bioactivos	52
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
6.1 Conclusiones	54
6.2 Recomendaciones.....	55
REFERENCIAS	56
ANEXOS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional del mortiño	5
Tabla 2. Contenido de polifenoles totales encontrado en bayas	6
Tabla 3. Antocianinas encontradas en bayas	11
Tabla 4. Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante.....	13
Tabla 5. Materiales utilizados para la microencapsulación	16
Tabla 6. Identificación de muestras del proyecto de titulación	23
Tabla 7. Protocolos y equipos utilizados para la caracterización de compuestos bioactivos del fruto de mortiño	27
Tabla 8. Soluciones de extracción utilizadas para los biocompuestos	29
Tabla 9. Ecuaciones y R ² obtenidos tras la elaboración de la curva de calibración	31
Tabla 10. Condiciones del equipo HPLC	34
Tabla 11. Contenido de humedad del fruto de mortiño	37
Tabla 12. Resultados de la separación de medias para concentración de polifenoles totales.....	39
Tabla 13. Resultados de la separación de medias para concentración de antocianinas totales	40
Tabla 14. Resultados de la separación de medias para concentración de flavonoides totales.....	42
Tabla 15. Descripción de estándares utilizados para la identificación de polifenoles individuales en el fruto de mortiño.	45
Tabla 16. Cuantificación de compuestos identificados a través de la curva de ácido cafeico.....	46
Tabla 17. Capacidad antioxidante de los frutos liofilizados de mortiño	48
Tabla 18. Costos asociados al proceso para la obtención de 500 microcápsulas aproximadamente.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general del proceso de microencapsulación.....	17
Figura 2. Fruto de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth)	24
Figura 3. Lavado de fruto de mortiño	24
Figura 4. Pesaje de la pulpa licuada de mortiño	25
Figura 5. Equipo utilizado para la liofilización (izq.) y mortiño liofilizado (der.).....	25
Figura 6. Molienda de fruto de mortiño.....	26
Figura 7. Tamizado de mortiño	26
Figura 8 . Cambios de coloración obtenidos tras la adición del reactivo Folin	28
Figura 9. Porcentaje de extracción de polifenoles totales en el fruto de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) vs ciclos de extracción.....	30
Figura 10. Reacción obtenida tras adición de cloruro de aluminio al 10% e hidróxido de sodio	32
Figura 11. Coloraciones obtenidas en la determinación de polifenoles totales	33
Figura 12. Coloración tras la adición de ABTS+ en celdas para lectura en el espectrofotómetro.....	35
Figura 13. Proceso de microencapsulación realizado	36
Figura 14. Curva de calibración para ácido cafeico.....	46
Figura 15. Microcápsulas de compuestos bioactivos obtenidas a diferentes concentraciones	50

1. INTRODUCCIÓN

En la última década se han estudiado diferentes sustancias químicas para contrarrestar en lo posible procesos oxidativos causantes de varias enfermedades, siendo los antioxidantes los más estudiados (Pérez, 2012). Estas sustancias tienen una participación muy importante en la salud humana. Estudios realizados prueban su efectividad en prevenir o tratar ciertas enfermedades crónicas que involucran los radicales libres, como el cáncer, diabetes, hipertensión, obesidad, enfermedades cardiovasculares y además poseen una función protectora frente a enfermedades neurodegenerativas (Shahidi y Zhong, 2010).

El creciente interés hacia la promoción de una buena salud ha generado una demanda en el estudio de metabolitos secundarios, como lo son los polifenoles con sus propiedades bioactivas. Lo anterior ha generado un nexo con la industria alimenticia para la aplicación de estos compuestos como ingredientes funcionales en diferentes productos (Cuevas, Vergara y Pérez, 2017).

En el mundo vegetal existe una gran gama de plantas que contienen antioxidantes naturales, los cuales protegen a las estructuras del estrés oxidativo, como frutas, vegetales, hierbas, cereales, granos, té, café, cacao que cuentan con sustancias fenólicas (Shahidi y Zhong, 2010).

Entre estas fuentes de antioxidantes se pueden mencionar a las bayas como uno de los principales grupos ricos en estos compuestos (Milivojevic, Maksimovic, Nikolic, Bogdanovic, Maletic y Milatovic, 2010).

Las bayas son constituidas en especial por antocianinas y glucósidos de flavonoides, los cuales otorgan sus coloraciones rojizas, violetas, azules y púrpuras a frutos como moras, frambuesas, arándanos, mortiño (Zafra, Yasmin, Bagchi, Chatterjee, Vinson y Bachi, 2007).

El mortiño es una planta endémica del Ecuador que es considerado como coadyuvante nutrimental gracias a su alto contenido de antioxidantes (Coba, Coronel, Verdugo, Paredes, Yugsi y Huachi, 2012). Cada vez más estudios involucran a este fruto de la sierra ecuatoriana que comúnmente es utilizado para la preparación de bebidas tradicionales como la colada morada, vinos, dulces y mermeladas (Coba et al., 2012).

Las sustancias fenólicas presentes en el fruto de mortiño, como en otras bayas y frutas; son susceptibles a efectos degradativos del ambiente, lo cual limita su aplicación en la industria alimentaria sin perder sus propiedades (Betz y Kulozik, 2011).

La presente investigación se centra en la caracterización de los compuestos bioactivos del fruto del mortiño, el cual ha ganado interés para su investigación por su alto contenido de antioxidantes, ligado a su alta capacidad antioxidante. El propósito del estudio es brindar información del contenido de antioxidantes presentes en este fruto frente a otros similares, además de identificar individualmente los polifenoles principales a través del HPLC, siendo el primer estudio de caracterización individual de polifenoles del fruto de mortiño en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIAP Santa Catalina. Además, se pretende exponer un método de microencapsulación que proteja los compuestos bioactivos susceptibles a factores como pH, temperatura, luz y oxígeno. Lo anterior se realiza con el fin de posicionar al mortiño como un fruto de interés en el Ecuador para su investigación y aportar al conocimiento de su contenido fenólico; para finalmente a través de la microencapsulación, brindarle protagonismo para su uso como ingrediente funcional en la elaboración de alimentos funcionales.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar los compuestos bioactivos presentes en el fruto de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) para la elaboración de microcápsulas.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar los polifenoles totales e individuales, antocianinas y flavonoides presentes en el fruto de mortiño.
- Evaluar la microencapsulación de compuestos bioactivos del fruto de mortiño y sus condiciones de almacenamiento.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades del cultivo de mortiño

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es un arbusto silvestre perteneciente a la familia Ericaceae, siendo endémico de la zona andina de Ecuador y Colombia (Coba et al., 2012). Las condiciones ideales de crecimiento se dan en páramos de altitudes entre 1600 y 4000 metros sobre el nivel del mar, en un rango de temperatura de 8 a 17°C (Cobo, Gutiérrez, Torres y Torres, 2015). En el Ecuador, el mortiño es un fruto que se logra encontrar desde el páramo del Ángel en Carchi hasta Tambo en Cañar. Así mismo se han realizado colectas en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja (Coba et al., 2012).

La densidad de siembra es de 4400 plantas por hectárea aproximadamente. Los frutos de la planta son producidos dependiendo de la localización y variedad del cultivo. A pesar de que el periodo de maduración sea de tres años, el fruto puede ser cosechado a partir del primer año. La cosecha es realizada de forma manual y se estima un rendimiento por hectárea de 2 a 3 toneladas y 0,68 kg de fruto

por planta, teniendo en cuenta que no es una producción tecnificada (Díaz, 2012).

El mortiño puede observarse como un arbusto ramificado de una altura aproximada de 2,5 metros. Posee hojas pequeñas con margen aserrado, nerviación de clase pinnada, flores blancas de menos de 1 cm. El fruto de mortiño es negro, redondo, de aproximadamente 5 a 8 milímetros de diámetro, piel lisa y en su interior se encuentran semillas pequeñas, casi indetectables, el fruto es a veces glauco y su peso es de 0,4 gramos en promedio (Coba et al.; Vasco, Riihinen, Ruales y Kamal, 2009).

La planta no cuenta con una forma de cultivo comercial en el Ecuador, sino que crece de forma silvestre en los páramos de las diferentes provincias andinas del país. La cosecha del fruto de mortiño es realizada por pobladores de cada zona y varía en cada provincia, siendo más común la recolecta una o dos veces al año (Trujillo, 2008). La explotación del mortiño en el Ecuador también representa una alternativa económica para pobladores de los páramos de las zonas andinas donde se produce este fruto (Ruiz, 2011).

En el Ecuador, es consumido mayoritariamente en los meses de octubre, noviembre y diciembre. Su uso viene dado principalmente para la elaboración de la tradicional colada morada en el día de los difuntos. En la actualidad se pueden encontrar nuevas formas de empleo del fruto para la preparación de jugos, mermeladas, vinos y dulces. El mortiño ha perdido importancia en la alimentación ecuatoriana y su adquisición cada vez es más complicada. Lo anterior viene ligado a la limitada información acerca de sus propiedades nutricionales y la dificultad de encontrar un método de propagación que permita la generación de un cultivo sostenible (Coba et al., 2012).

3.2 Composición nutricional y funcional del mortiño

El mortiño presenta propiedades y cualidades nutricionales destacadas que lo han posicionado como un fruto rico en compuestos antioxidantes, polifenoles y

antocianinas (López, Pilatowsky, Cortés, Rojano y Navarro, 2016). En la Tabla 1 se puede apreciar la composición nutricional del fruto de mortiño.

Tabla 1.

Composición nutricional del mortiño

Parámetro	Cantidad
Humedad (g)	80,09 ± 0,16
Proteína (g)	0,76
Minerales (mg)	
Ca	15,54 ± 1,14
K	142,04 ± 1,88
Mg	21,22 ± 1,90
Cu	0,11 ± 0,00
Zn	0,21 ± 0,00
Fe	0,77 ± 0,00
Fibra Dietética Total (g)	5,87
Azúcares (g)	
Fructosa	4,55 ± 0,06
Glucosa	2,96 ± 0,04
Sacarosa	ND
Ácido ascórbico (g)	14
β-carotenos (ug)	36
Tiamina (mg)	0,05
Rivoflavina (mg)	0,05
Niacina (mg)	0,18
Ácido patoténico (mg)	0,09

Tomado de (Tupuna, Vera y Ruales 2016) y (Coba et al., 2012)

Nota: Valores expresados por 100 gramos de peso de fruta fresca.

El fruto de mortiño presenta un alto contenido de polifenoles, antocianinas y una alta capacidad antioxidante al igual que otros *Vaccinium*. El contenido de estos compuestos bioactivos en el fruto está ligado con la etapa de desarrollo y maduración en la que se encuentre el fruto (Gaviria, Hernández, Lobo, Medina y Rojano, 2012).

3.3. Compuestos bioactivos presentes en el fruto de mortiño

Los compuestos bioactivos, también llamados fitonutrientes; son metabolitos secundarios encontrados en el mundo vegetal. El término bioactivo es utilizado para ciertas sustancias que tienen la capacidad de aportar beneficios adicionales a los de una nutrición básica (Herrera, Betancur y Segura, 2014). Estos compuestos se presentan en pequeñas cantidades en un gran número de alimentos de origen vegetal y presentan propiedades importantes que pueden tener efectos benéficos en la salud humana, existiendo investigaciones que ratifican su importancia en la prevención de enfermedades a largo plazo. Como consecuencia de lo anterior, la investigación de estos componentes crece a través de los años y seguirá ampliándose en el tiempo (Martínez, Camacho, y Martínez, 2008).

El mortiño, junto con los frutos de la familia Rosaceae se los conoce como bayas. (Skrovankova, Sumczynski, Mlcek, Jurikova y Sochor, 2015). Estos frutos constituyen una fuente importante de vitamina C, fibra, minerales y son considerados como la mejor fuente dietaria de compuestos bioactivos (Battino, Beekwilder, Denoyes-Rothan, Laimer, McDougall y Mezzetti, 2009). En la Tabla 2 se indica el contenido de polifenoles totales presentes en las principales bayas.

Tabla 2.

Contenido de polifenoles totales encontrado en bayas

Especie	Polifenoles totales
Arándano (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	525,0
Mora (<i>Rubus fruticosus</i>)	417-555
Grosella negra (<i>Ribes nigrum</i>)	498-1342
Arándano azul (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	261-585

Arándano rojo grande (<i>Vaccinium macrocarpon</i>)	113,74-177,6
Frambuesa (<i>Rubus idaeus</i>)	113,73-517
Frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i>)	102
Mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth)	882 ± 38

Tomado de (Agnieszka y Borowska, 2008) y (Vasco et al., 2009)

Nota: Valores expresados en mg de ácido gálico por 100 gramos de peso de fruta fresca.

El grupo de las bayas está caracterizado por ser pequeños frutos de corteza blanda (Vazquez, Jimenez, Torres, Guzman, Guevara y Miranda, 2012). Además de poseer sabores y aromas especiales, en los últimos años han cobrado importancia económica por sus propiedades antioxidantes, las cuales son de interés tecnológico en la investigación y desarrollo de alimentos. Así como para nutricionistas en la elaboración de alimentos funcionales que tengan como ingredientes funcionales ciertos compuestos bioactivos (Skrovankova et al., 2015).

Entre los principales polifenoles que se pueden encontrar en las bayas se pueden nombrar a los flavonoides (antocianinas, flavonoles, flavonones, flavonas e isoflavonas), estilbenos, y ácidos fenólicos. La concentración de estas sustancias y la capacidad antioxidante en las frutas de este grupo son influenciadas por factores bióticos y abióticos como el cultivar, el manejo en campo, factores climáticos, época de cosecha, condiciones de almacenamiento del fruto y manejo post-cosecha así como el clima, bayas que crecen en un clima frío y sin tratamiento de fertilizantes y pesticidas tienen una mayor concentración de polifenoles que aquellos que lo hacen en un clima cálido (Jimenez, Guevara, Miranda, Feregrino, Torres y Vazques, 2012).

La caracterización de los compuestos bioactivos puede ser realizada a partir de varios métodos, los cuales pueden influenciar en gran parte el resultado de la composición fenólica de una muestra. Como requisito para todo método, se debería trabajar con un aislado de los mismos, el cual se obtiene a través de una de extracción. La separación de la fase sólida de la extracción evita que el aislado contenga compuestos no fenólicos, compuestos orgánicos volátiles y algunos fenólicos no deseados. A partir de este punto, las técnicas más utilizadas para la caracterización de compuestos bioactivos son la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), combinada con técnicas de espectrofotometría UV-VIS y espectrometría de masas (MS) (Jimenez et al., 2012).

El HPLC logra identificar individualmente los compuestos de una muestra, gracias a un cromatograma donde cada pico representa una curva Gaussiana, que a su vez es un compuesto cuyas moléculas se han extraído a lo largo del tiempo. El área de esta curva contiene información del número de moléculas de cada pico y, por tanto, la concentración de la misma (Díaz, Sacristán, Alarcón, Córdoba y Legaz, 2011).

Los compuestos bioactivos de las bayas son susceptibles al ambiente. Por ejemplo, flavonoides y lignanos son susceptibles a pH muy altos y a temperaturas muy altas o muy bajas (Rahimi y Hasanloo, 2016). En la industria, son extremadamente sensibles a procesos físicos, mecánicos y químicos. En estudios que han evaluado factores de retención (concentración de polifenoles en alimentos procesados/concentración de polifenoles en alimentos crudos*factor peso), el factor de referencia fue de 1, indicando un ideal donde no existan pérdidas de polifenoles en los procesos. Sin embargo, el resultado del factor de retención en la investigación fue de 0,5 o menos en promedio, lo cual indica que en todas las subclases de polifenoles, existe degradación de los mismos tras ser sometidos a procesos físicos, mecánicos y químicos (Rothwell, Medina, Pérez, Neveu, Knaze, Slimani y Scalbert, 2014). Lo anterior convierte un verdadero reto tecnológico su protección para evitar alteraciones, Por lo cual, tecnologías como la liofilización, entre otros tratamientos térmicos se han

desarrollado con el fin de preservar las propiedades antioxidantes de los compuestos bioactivos presentes en los frutos (Michalska y Lysiak, 2015).

3.3.1. Sustancias fenólicas

Los polifenoles son metabolitos secundarios muy numerosos encontrados en el mundo vegetal, donde se han identificado alrededor de 8000 compuestos. Estas sustancias influyen en características de los alimentos que los contienen, tanto en olor, color, sabor, astringencia como su estabilidad oxidativa (Kanti y Syed, 2009).

Se han realizado estudios epidemiológicos y meta análisis que sugieren que un consumo de alimentos con altos contenidos de polifenoles ofrecen protección ante enfermedades neurodegenerativas, ya que polifenoles el resveratrol, catequina, previenen el estrés oxidativo que causa varias enfermedades neuronales como el Alzheimer. En cuanto a enfermedades cardiovasculares, la quercetina, catequina, resveratrol son inhibidores de la oxidación del colesterol malo LDL, aumentando el bueno HDL, además de su acción de inhibir la agregación de plaquetas, disminuyendo el riesgo de trombosis y enfermedades coronarias. En diabetes, se inhibe la absorción de glucosa, así como el transporte de los glucósidos y glucosa del intestino gracias a polifenoles como catequina, epicatequina, epigallocatequina, isoflavonas, ácido clorogénico. También en prevención de ciertos tipos de cáncer ya que los polifenoles como flavinas, quercetina han sido relacionados con la inducción de enzimas, regulación del sistema inmune, facilitando la excreción de toxinas (Kanti y Syed, 2009).

Los polifenoles se agrupan de acuerdo al número de anillos fenólicos y los elementos estructurales que estos presentan. Siendo los principales los flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012).

Los ácidos fenólicos se dividen en aquellos que se derivan del ácido benzoico y más comúnmente del ácido cumárico (Kanti y Syed, 2009). Estos ácidos pueden ser encontrados en fresas, frambuesas, granadas (Martínez et al.,2008). Los ácidos fenólicos pueden ser liberados o hidrolizados previo a una hidrólisis ácida o alcalina, o por enzimas (Tsao, 2010).

El compuesto más estudiado dentro de los estilbenos, es el resveratrol (Kanti y Syed, 2009). Esta sustancia se encuentra principalmente en uvas, grosellas negras y arándanos (Martínez et al.,2008).

Los lignanos son compuestos difenólicos que se consideran como fitoestrógenos. Varios lignanos son considerados fitoestrógenos, siendo la linaza la principal fuente vegetal donde se los encuentra (Kanti y Syed, 2009).

En el mundo vegetal, se han identificado más de 4000 tipos de flavonoides, con lo cual se han logrado constituir como la subclase de polifenoles más abundante (Kanti y Syed, 2009). Estos compuestos pueden ser encontrados en la mayoría de plantas que presentan coloraciones amarillas, anaranjadas, rojas y azules (Escamilla, Yáñez y Guevara, 2009).

Los flavonoides tienen una estructura de dos anillos aromáticos unidos entre sí por tres carbonos, formando un heterociclo oxigenado (Kanti y Syed, 2009). La clasificación viene dada por el estado de oxidación y posición de los anillos que los conforman (Quiñones et al.,2012).

Uno de los flavonoides más importantes son las antocianinas. Químicamente, las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas y estas constituyen pigmentos hidrosolubles, responsables de los colores rojo-azulados de frutos, aunque también pueden ser encontradas en ciertos vegetales y cereales (Aguilera, Reza, Chew y Meza, 2011; Escamilla et al, 2009; Quiñones et al.,2012). Dentro de los frutos que contienen estos compuestos se pueden citar

a la cereza, uva, arándano, fresa, mortiño, grosella (Martínez et al., 2008). En la Tabla 3 se puede observar la antocianina predominante de las principales bayas.

Tabla 3.

Antocianinas encontradas en bayas

Espece	Antocianina dominante
Arándano (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	Malvidina-3-glucósido Cianidina-3-glucósido Mirtilina Cianidina-3-galactósido
Mora (<i>Rubus fruticosus</i>)	Cianidina-3-glucósido
Grosella negra (<i>Ribes nigrum</i>)	Delfinidina-3-runitósido
Arándano azul (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	Malvidina-3-arabinósido Malvidina-3-glucósido Malvidina-3-galactósido
Frambuesa (<i>Rubus idaeus</i>)	Cianidina-3-soforósido
Frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Pelargonidina-3-glucósido
Mortiño ^a (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth)	Delfinidina hexóximo Cianidina hexóximo

Tomado de (Agnieszka y Borowska, 2008.) y (Vasco et al., 2009)

3.4 Capacidad antioxidante

El término antioxidante se designa comúnmente a los compuestos que tienen la capacidad de bloquear o retardar la reacción de un sustrato frente a especies reactivas de oxígeno (Litescu, Eremia y Radu, 2010). En el mundo vegetal, se tienen vitaminas antioxidantes y compuestos bioactivos como los mencionados anteriormente con la capacidad de eliminar radicales libres (León, Rodríguez, Rodríguez y Díaz, 2009). Como ejemplos de radicales libres se tienen al ión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH), alcoxilo (RO^-), peroxilo (ROO^-) y óxido de nitrógeno (NO^-) (Valls, 2003). Esta capacidad de las moléculas fenólicas se basa en su habilidad de convertirse en radicales más estables que la mayoría de los radicales libres. Lo anterior se logra por la deslocalización del anillo aromático

de los compuestos fenólicos, estabilizando el electrón libre (Hidalgo y Almajano, 2017).

Los polifenoles tienen una estructura química de dos anillos aromáticos unidos por un heterocíclico. Esta naturaleza química les otorga capacidad para desempeñarse como captadores de radicales libres. Su grado de metoxilación y el número de grupos hidroxilo determinan su capacidad antioxidante (Valls, 2003). Existen dos mecanismos principales a través de los cuales los antioxidantes responden a los radicales libres: por transferencia del átomo de hidrógeno (HAT) o por la transferencia de un electrón (SET), también puede darse una combinación de ambos mecanismos. En el caso del mecanismo HAT, los radicales libres toman un átomo de hidrógeno del compuesto antioxidante, convirtiéndose en un radical, mientras que en el mecanismo SET, el antioxidante dona un electrón al radical libre, convirtiéndose en un catión radical (Liang y Kitts, 2014).

Dentro del mecanismo HAT se tienen métodos para determinar la capacidad antioxidante como el ORAC. El mecanismo SET es utilizado por métodos como el FRAP, ABTS y DPPH (Prior, Wu y Schaich, 2005). En la Tabla 4 se muestran con mayor detalle los métodos mencionados anteriormente.

Tabla 4.

Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante

Método	Mecanismo	Descripción
ORAC	HAT	Es utilizado más comúnmente para evaluar la capacidad antioxidante de fitoquímicos solubles en agua. En este ensayo, se genera un radical libre que reacciona con un fluoróforo, causando un descenso en la intensidad fluorescente. Los resultados se expresan tras calcular el área bajo la curva de fluorescencia. Utilizado en la evaluación de la capacidad antioxidante de polifenoles.
FRAP	SET	El método trabaja a un pH bajo y estudia la capacidad del compuesto antioxidante para reducir el ión férrico a ferroso, esta reacción provoca una coloración verde azulada que se determina en el espectrofotómetro. El método FRAP constituye uno de los más simples y menos costosos para la determinación de la capacidad antioxidante, sin embargo, no puede determinarla en compuestos que contengan grupos sulfurados o que reaccionen con iones ferrosos. Utilizado para evaluar capacidad antioxidante en polifenoles.
ABTS	SET	Este método estudia los cambios en la absorbancia del ABTS. Tras obtener la solución de ABTS activada, se añade el compuesto antioxidante. La reacción consiste en un cambio de coloración que es efecto de la reducción del radical en proporción a la concentración del compuesto. Esta variación se determina en un

		espectrofotómetro. Importante para la evaluación de la capacidad antioxidante de antocianinas, polifenoles
DPPH	SET	Este estudio evalúa la capacidad de los antioxidantes para eliminar el radical libre DPPH- El radical se presenta de una coloración rojo violeta, pero al ser reducido, cambia su apariencia a un color amarillo pálido. Este puede ser utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de flavonoides, polifenoles.

Tomado de (Litescu, Eremia y Radu, 2010) y (Barrón, García, Soto, Colinas y Kite, 2011)

3.5 Microencapsulación

La tecnología de la microencapsulación ha tenido una expansión considerable en la última década gracias a la aplicación que tiene en varias industrias que buscan la estabilidad de sus componentes clave, así como poder controlar la liberación de estos en condiciones determinadas. Entre las industrias que utilizan esta tecnología se puede nombrar a la alimenticia, cosmética y farmacéutica (Sagis, 2015, p.3).

La microencapsulación es un proceso que busca que compuestos funcionales como antioxidantes, enzimas, micronutrientes y polifenoles sean protegidos a través de una cápsula hecha de materiales protectores. Gracias a esta barrera, las sustancias pueden ser protegidas ante condiciones adversas del ambiente, así como mejorar su estabilidad en diferentes medios (Soo, 2014, p. 1).

Las bayas son ricas en sustancias fenólicas, cuya eficiencia y estabilidad en el tiempo son afectadas por la luz, enzimas, humedad, oxígeno. Siendo la microencapsulación una alternativa para mantener su estabilidad una vez que han sido extraídos del alimento. Sin embargo, tras el proceso de

microencapsulación existe una pérdida de los mismos frente a los niveles encontrados en el extracto fresco, la pérdida se debe en gran parte a la temperatura de microencapsulación, ya que algunos compuestos fenólicos son termo sensibles. Otro factor que define la pérdida de los compuestos es el agente encapsulante utilizado (Trindade y Zapata, 2015).

El tamaño de la cápsula va a determinar la tecnología de encapsulación. En microencapsulación, las cápsulas que tienen un diámetro entre 3 y 8 μm ; si las partículas varían entre 10 y 1000 nm, la tecnología es llamada nanoencapsulación (Soo, 2014, p. 1). En general, el microencapsulado está formado por dos partes principales: el núcleo y la cobertura. El núcleo es constituido por el compuesto que será encapsulado, mientras que la cobertura es el material que lo envuelve. El material encapsulante o cobertura representa entre el 1 y 80% del peso del encapsulado y este puede ser de varios materiales, es no reactivo con el núcleo y generalmente se requiere que exista una incompatibilidad entre el núcleo y el material encapsulante para que se forme la cobertura. Para núcleos hidrofóbicos, se debe elegir un material hidrofílico y viceversa (Gaonkar, Vasisht, Khare y Sobel, 2014, p.3-10).

Por ejemplo, dentro de los materiales utilizados para microencapsular núcleos hidrofóbicos se tienen a los polisacáridos, proteínas vegetales y animales y polímeros. Mientras que para la microencapsulación de núcleos hidrofílicos se tienen a lípidos y ceras (Gaonka et al., 2014, p.10).

3.5.1 Materiales encapsulantes

La variedad de materiales utilizados para la microencapsulación ha tenido un aumento considerable a partir del desarrollo de tecnologías para la aplicación de nuevos biomateriales. La elección del material encapsulante depende del propósito de la microcápsula y características que deben tomarse en cuenta, como la solubilidad, la homogeneidad de las matrices o membranas que produzca, la porosidad que presente, la estabilidad frente a condiciones ambientales y es importante que sea inerte frente a otros compuestos

(Hernández, Ventura, Belmares, Contreras, Michelena y Martínez, 2016). En la Tabla 5 se muestran los principales materiales utilizados para la microencapsulación.

Tabla 5.

Materiales utilizados para la microencapsulación

Grupo	Materiales
Polisacáridos no modificados	Azúcar, almidones, glucosa, maltodextrina
Polisacáridos modificados	Dextrina, ciclodextrina, octenil succinato aluminico de almidón, celulosa
Gomas	Goma arábica, alginatos, carragenina, pectina
Proteína vegetal	Proteína de soya, trigo, maíz
Proteína animal	Gelatina, caseína, proteína de suero aislada y concentrada, caseinatos
Polímeros	Polietilenglicol, acetato de polivinilo, quitosán
Lípidos	Grasa hidrogenada, glicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos
Ceras	Parafina, carnuba, cera microcristalina, cera de abeja

Tomado de (Gaonkar et al., 2014, p.9)

Dentro de los grupos citados anteriormente, los polisacáridos modificados y no modificados, así como los polímeros son los más utilizados para la elaboración de microcápsulas (Hernández et al., 2016). La estabilidad de la microcápsula viene dada por factores como su morfología y tamaño. Desde un punto de vista fisicoquímico, los factores que afectan su estabilidad y liberación son el peso molecular, concentración, solubilidad, humedad y temperatura del compuesto activo (Gaonkar et al., 2014, p.19).

3.5.2 Técnicas de microencapsulación

En la actualidad, existen varias técnicas de microencapsulación que pueden ser utilizadas para la elaboración de microcápsulas. Estas son divididas en dos

grandes grupos: microencapsulación por métodos físicos y químicos. Entre los métodos físicos se pueden nombrar al secado por aspersion, lecho fluidizado y extrusión. Los métodos químicos pueden ser por separación de fases, evaporación del solvente, coacervación, polimerización interfacial, liposomas, coextrusión (Gaonkar et al., 2014, p.9).

Al igual que la elección del material encapsulante, la técnica de microencapsulación debe ser elegida tomando en cuenta la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades físicoquímicas del núcleo, aplicación de la microcápsula y el costo asociado al proceso (Esquivel, Ochoa, y Rutiaga, 2015). Los diferentes procesos de microencapsulación presentan un esquema similar al presentado en la Figura 1.

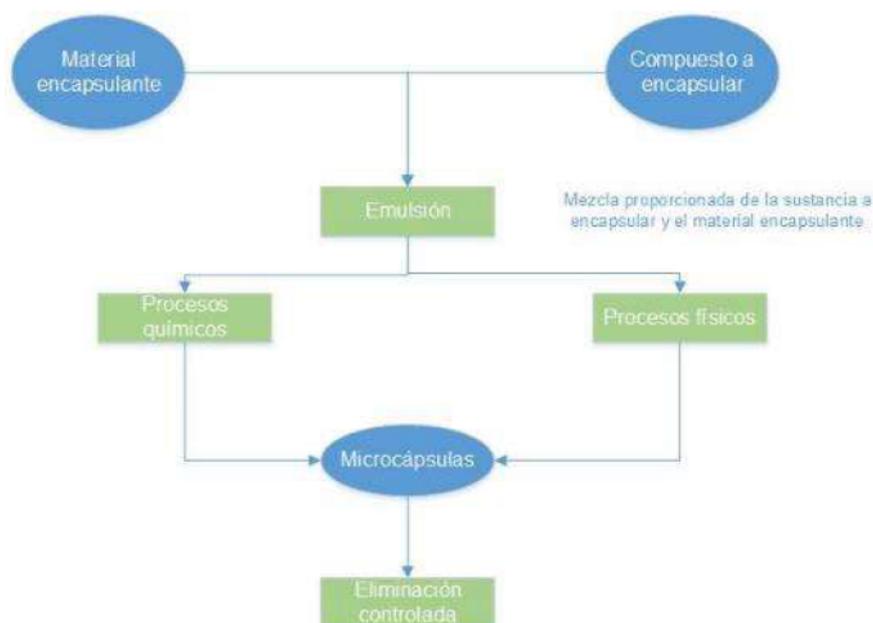


Figura 1. Esquema general del proceso de microencapsulación.

Adaptado de (Parra, 2010)

El esquema del proceso de microencapsulación tiene el mismo principio sin importar el método que se utilice. Sin embargo, es importante resaltar que cada técnica de microencapsulación tiene puntos críticos de control que tienen influencia en la estabilidad y liberación del compuesto encapsulado (Gaonkar et al., 2014, p.20).

Entre las técnicas más utilizadas para la microencapsulación en la industria alimenticia se puede nombrar al secado por aspersión y la coacervación, las cuales son explicadas de mejor manera a continuación (Parra,2010).

El secado por aspersión constituye una técnica que desde los años 50 ha sido utilizada en la industria alimenticia. Al comparar con otros métodos, el secado por aspersión se destaca por su efectividad y bajo costo, siendo utilizado mayormente para la microencapsulación de saborizantes, probióticos y compuestos bioactivos (Hernández et al., 2015). La eficiencia del secado por aspersión en microencapsulación se encuentra en un máximo de 96-100%, siendo los principales parámetros de control la temperatura de entrada y salida del aire caliente, la tasa de incorporación del producto que se secará y el tiempo de secado (Parra, 2010). El principio básico del secado por aspersión consiste en someter un producto líquido a un gas caliente (150-220°C) para producir una evaporación que resultará en un recubrimiento fino sobre la sustancia a encapsular. Dependiendo de las condiciones del secado, las microcápsulas tendrán tamaños entre 10 y 50 μm . El éxito de esta técnica se evidencia por la cantidad de compuesto a encapsular contenida en las partículas del polvo, su estabilidad y la vida útil del producto (Esquivel et al., 2015; Hernández et al., 2016; Parra, 2010)

El término coacervación proviene del latín coacervare, que significa juntar (Soo, 2014, p.23). Este método es considerado como el método original de encapsulación y consiste en la separación de un sistema coloidal en dos fases y dependiendo de la cantidad de polímeros que intervienen, se puede clasificar en coacervación simple o compleja (Gaonkar et al., 2014, p.125). El soluto polimérico se separa y se obtiene el coacervado, que se caracteriza por tener forma de pequeñas gotas líquidas. Este coacervado se distribuye sobre las partículas a encapsular y se forman las microcápsulas (Parra,2010). La solubilidad de las microcápsulas en agua es baja, este comportamiento es el esperado bajo el método de coacervación. Lo anterior tiene un efecto positivo ya

que ratifican su estabilidad y control sobre su liberación (Mendanha, Molina, Favaro, Mauri, Monterrey y Thomazini, 2009).

El proceso de coacervación para la formación de microcápsulas utilizado por Bungenberg de Jong a través de gelatina, propone un modelo general de la encapsulación de compuestos. Este método propone empezar con una emulsificación, donde el material a encapsular se añade a una solución de gelatina (8-11% p/p) que se encuentra a 50°C y agitación constante. En una segunda parte se añaden los polisacáridos con agua, a fin de disminuir el contenido total de polímeros sólidos. El pH debe ser ajustado para que se formen aglomerados gracias a las interacciones electrostáticas. Finalmente, se realiza un enfriamiento a una temperatura menor del punto gelificante de la gelatina para que se forme la corteza de las microcápsulas (Gaonkar et al, 2014, p.128).

Los parámetros críticos de control a tomar en cuenta en el proceso de coacervación son el tiempo de mezclado, el pH, control del potencial z, temperatura de enfriamiento, tasa de enfriamiento y punto de gelificación (Gaonkar et al., 2014). El resultado de la coacervación con un control eficiente de los parámetros críticos, debería resultar en microcápsulas de tamaños entre 1 y 100 μm (Soo, 2014, p.24). La coacervación puede ser simple o compleja dependiendo del tipo de polímero que se utilice en el proceso y tiene una amplia aplicación en la industria alimenticia (Parra, 2010).

Una vez que el proceso de microencapsulación ha terminado, se esperaría la recuperación del 100% de los compuestos bioactivos dentro de las cápsulas. Este porcentaje se cumple bajo un método de microencapsulación que haya trabajado bajo temperaturas ideales y con materiales encapsulantes adecuados para la naturaleza del compuesto que se busca encapsular (Saéñz, Tapia, Chávez y Robert, 2009).

3.5.3 Microencapsulación en la actualidad

En las últimas décadas, la microencapsulación se ha convertido en un negocio a gran escala, moviendo varios millones de dólares por su impacto en varias industrias (Soo, 2014, p.6).

De acuerdo al reporte de Grand View Research de 2017, el mercado global de la microencapsulación fue de \$5,54 billones de dólares en 2015, con previsión de crecimiento en la industria alimenticia y farmacéutica (GrandViewResearch, 2017). Internacionalmente, Estados Unidos domina el mercado de microencapsulación con un 30% de participación al contar con empresas que se encuentran a la vanguardia de la investigación y desarrollo de estas tecnologías. En segundo lugar, se puede encontrar a Europa y su participación en el mercado de microencapsulación gracias a países como Francia, Alemania y el Reino Unido que se encuentran produciendo esta tecnología. Asia tiene un tercer lugar de participación en el mercado, entre los principales países en los que se ha desarrollado microencapsulados se encuentran China, Japón y la India. Latinoamérica está representada principalmente por Brasil, donde se ha elaborado microcápsulas para el desarrollo de alimentos funcionales (Market Research Store, 2016).

El mercado global de microencapsulación está segmentado en cinco aplicaciones principales: farmacéuticas, productos de hogar, aditivos alimenticios, agroquímicos y materiales de fases cambiantes; además de otros no tan representativos (GrandViewResearch, 2017).

La mayor parte del mercado está dado por la industria farmacéutica con un 70% de participación, el 30% restante viene dado por productos de hogar, agroquímicos, aditivos alimenticios y finalmente materiales de fase cambiante (GrandViewResearch, 2017).

El crecimiento del negocio de la microencapsulación está prevista a presentar un crecimiento anual del 7,9%, llegando a un tamaño de 9,1 billones de dólares en el 2022, siendo probable que se presenten otras aplicaciones de esta tecnología y la entrada de nuevos competidores en el panorama mundial (KRVG, 2017).

3.5.4 Microencapsulación en la industria alimenticia

La microencapsulación es una tecnología que ha estado presente en la industria alimenticia desde hace setenta años (Esquivel et al., 2015). Las razones de su uso son varias, ya que han resultado en soluciones tecnológicas a problemas como las aplicaciones de ciertos compuestos en ingredientes y aditivos alimentarios, se ha logrado integrar compuestos bioactivos a productos alimenticios aumentando su estabilidad en medios con condiciones de humedad, pH, temperatura y oxidativas no favorables, reduciendo así las propiedades de higroscopicidad, volatilidad y reactividad de los compuestos (Parra, 2010).

En la industria alimenticia, no existe una sola técnica para realizar la microencapsulación, cada tipo de compuesto requiere una solución única establecida por el propósito de la misma. Además, los materiales encapsulantes aprobados para el uso en alimentos es limitado. Sin embargo, es una tecnología en crecimiento por el interés creciente de los consumidores por encontrar productos saludables, lo cual involucra a las industrias a incorporar compuestos promotores de salud en sus productos (Gaonkar et al., 2014). Entre las principales razones por las cuales la microencapsulación es una práctica cada vez más utilizada en el sector alimenticio se puede nombrar a las siguientes:

- Lograr que el compuesto a encapsular tenga una menor reactividad con el ambiente.
- Buscar que la tasa de transferencia del núcleo con el medio sea menor.
- Manejar de forma más fácil al producto.
- Evitar la detección de aromas o sabores no deseados del compuesto a encapsular.
- Realizar la dilución del núcleo en pequeñas cantidades.

- Liberar el compuesto encapsulado en el tiempo y condiciones deseadas.
- Resistencia a diferentes condiciones de procesamiento y empaque.
- Mejoramiento de características organolépticas de productos.

Lo anterior evidencia su importancia en el mundo actual para su investigación y aplicación en diferentes campos (Esquivel et al., 2015; Parra, 2010)

Como aplicaciones de las microcápsulas, se pueden destacar varios ejemplos. En probióticos, se busca proteger a microorganismos de factores ambientales como temperatura, humedad, oxígeno para su uso en la industria láctea, como es el caso del queso en polvo. Las enzimas como quimosina, proteinasas, lipasas, carraginosos y grasa láctea son encapsuladas para su uso en lácteos, mejorando su rendimiento y calidad en quesos al degradar la cápsula durante la maduración de quesos. Otra aplicación constituye la microencapsulación de pigmentos naturales encontrados en fuentes vegetales, estas sustancias son sensibles a la luz, aire, humedad y temperaturas. La microencapsulación de estas sustancias permite mejorar su estabilidad para que puedan ser incorporadas en distintas fases del procesamiento de productos. Así mismo, existe un interés creciente en la microencapsulación de minerales, vitaminas y antioxidantes para el desarrollo de alimentos funcionales (Parra, 2010).

Entre los beneficios de la microencapsulación de compuestos bioactivos, se puede citar a la liberación controlada en el alimento, esperando en un futuro controlarla en el tracto gastrointestinal. Una de las limitaciones en alimentos viene a ser la alteración que producen en las propiedades organolépticas y apariencia. Sin embargo, las empresas deben informar a los consumidores las propiedades de la tecnología de la microencapsulación y los beneficios que traen a los alimentos en los que es aplicada consumidores (Champagne y Fustier, 2007).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Origen de las muestras

Las muestras para la realización del proyecto fueron obtenidas gracias a la Asociación de Productores y Comercializadores Agropecuarios de Quinticusig-Sigchos. Ubicada a 2820 msnm una latitud de 0°45", longitud de 78°52", en la comunidad de Quinticusig, cantón Sigchos, provincia de Cotopaxi.

Las muestras están identificadas por la altura a la que se realizó su recolección, información que se expone en la Tabla 6 a continuación. Adicionalmente, se encuentra la nomenclatura asignada a cada muestra.

Tabla 6.

Identificación de muestras del proyecto de titulación

Número de muestra	Altitud de recolección (msnm)	Nomenclatura en el proyecto
Muestra 1	3020	Mortiño Alto
Muestra 2	2680	Mortiño Bajo
Muestra 3	2850	Mortiño Medio

4.2 Descripción de la ubicación del experimento

La presente investigación fue realizada en dos ubicaciones destinadas a cada fase. En primer lugar, se localizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en la Estación Santa Catalina, Departamento de Nutrición y Calidad, con el apoyo del Dr. Iván Samaniego como Docente Científico de la investigación para la caracterización de compuestos bioactivos. La estación está ubicada en la autopista Panamericana Sur Km.1, Sector Cutuglagua, Cantón Mejía, Pichincha. Posteriormente se ubicó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Universidad de las Américas, sede Queri, en la ciudad de Quito, donde se realizó el proceso de microencapsulación.

4.3. Preparación de la muestra

En el presente apartado se detallan las operaciones a las cuales fue sometido el fruto del mortiño para poder ser utilizado en los análisis de caracterización de compuestos bioactivos y sus respectivas fotografías.

a) Recepción del fruto de mortiño: El fruto de mortiño fue seleccionado tomando en cuenta su grado de madurez. Se escogieron para los análisis aquellos frutos con grado de madurez comestible, caracterizados por su firmeza, tamaño y color negro (Figura 2).



Figura 2. Fruto de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

b) Lavado: El lavado fue realizado para eliminar pedúnculos, hojas, suciedad y microorganismos que se encuentren en el fruto (Figura 3).



Figura 3. Lavado de fruto de mortiño

c) Despulpado: El fruto pasa por un proceso de licuado para la obtención de su pulpa, incluyendo cáscara y semillas, previo al proceso de liofilización (Figura 4).



Figura 4. Pesaje de la pulpa licuada de mortiño

d) Liofilización: El proceso consistió en colocar la pulpa obtenida previamente en bandejas de aluminio como se observa en la Figura 10 y programar al equipo para que se produzca la liofilización. La cual constó de dos fases; una congelación a -30°C durante 24 horas y en una segunda instancia una sublimación directa del hielo a una presión ideal de 0,11 bares durante 48 horas. La liofilización fue realizada en un liofilizador Marca Lab-Kits. Modelo Serie FD-100F. El fruto de mortiño liofilizado resultante se observa en la parte inferior derecha de la Figura 5.



Figura 5. Equipo utilizado para la liofilización (izq.) y mortiño liofilizado (der.)

e) Molienda: La molienda del fruto liofilizado se realizó con el fin de disminuir el tamaño de las partículas y que estas puedan ser tamizadas más fácilmente. El

proceso consistió en la utilización de un molino eléctrico para una reducción inicial de las partículas que permita pasar a un mortero y obtener el producto de partículas reducidas (Figura 6).



Figura 6. Molienda de fruto de mortiño

f) Tamizado: El tamizado fue necesario para la obtención de partículas de tamaño uniforme de las muestras. Una vez realizado este procedimiento se pudo proseguir con los ensayos de caracterización de compuestos bioactivos.

El tamizado fue realizado con la ayuda de un agitador para tamices de la marca Burrows Equipment CO, modelo S2 y se utilizó un tamiz de acero inoxidable con una luz de malla de 355 micrómetros, el mismo que se observa en la Figura 7.



Figura 7. Tamizado de mortiño

4.4. Caracterización de compuestos bioactivos del mortiño

La caracterización de compuestos bioactivos fue realizada a través de protocolos proporcionados por el Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP quienes

adaptaron los mismos para la determinación de polifenoles totales, polifenoles individuales, antocianinas y flavonoides. Además, se evaluó la capacidad antioxidante. Los protocolos utilizados se pueden identificar en la Tabla 7.

Tabla 7.

Protocolos y equipos utilizados para la caracterización de compuestos bioactivos del fruto de mortiño

Biocompuesto caracterizado	Protocolo de análisis	Equipo
Antocianinas	Rapisarda, Fanella y Maccarone (2000)	Espectrofotómetro UV-VIS. Marca Shimadzu. Modelo UV-2600
Capacidad antioxidante	ABTS+ de (Re, 1998)	Idem
Flavonoides Totales	Zhishen, Mengcheng y Jianming, 1998	Idem
Polifenoles Totales	Espectrofotometría UV-VIS de Cross, Villeneuve y Vincent (1982)	Idem
Polifenoles individuales	Análisis cromatográfico por HPLC de bomba binaria con lámpara DAD-UV	Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Aligent Technologies 1100/1200 Series.

4.5. Determinación de ciclos de extracción

Se realizaron ensayos para establecer el porcentaje de recuperación de los compuestos antioxidantes y determinar el número de ciclos necesarios para extraer el máximo de estos compuestos. Para esto fue necesario realizar una curva de calibración y a fin de probar el método de extracción y evaluar la repetibilidad del mismo se procedió a realizar el mismo procedimiento para extracción de polifenoles totales por 5 veces en una muestra de fruto de mortiño liofilizado. A continuación, se detalla el procedimiento seguido.

4.5.1. Elaboración de la curva de calibración

Como primer punto para realizar la caracterización de compuestos bioactivos del mortiño se determinó el número de ciclos de extracción necesarios para recuperar el 100% de polifenoles totales a partir del método de Cross, Villeneuve y Vincent (1982) para su extracción, el mismo que ha sido adaptado por el Departamento de Nutrición y Calidad de INIAP Santa Catalina.

El protocolo de análisis indica la elaboración de una curva de calibración en la cual se preparó una solución estándar primario de Ácido Gálico de 200 ppm, diluyendo el estándar en 8 concentraciones.

Después de este punto, en una segunda fase, se realizó la reacción con 1 mL de reactivo de Folin & Ciocalteu añadido a cada concentración de estándar para que con el carbonato de sodio al 20% y el tratamiento indicado en el protocolo, se cuantifique en el espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 760 nm. Se esperaba que la curva se encuentre correctamente realizada al obtener coloraciones como en la Figura 8. Donde (a) indica la coloración tras la adición del reactivo Folin & Ciocalteu y (b) tras el baño María para ser leídas en el espectrofotómetro. Las lecturas del espectrofotómetro fueron utilizadas para realizar la curva de calibración.

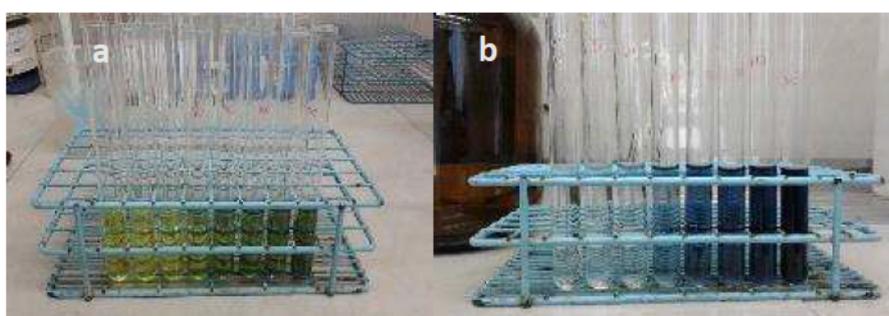


Figura 8 . Cambios de coloración obtenidos tras la adición del reactivo Folin

- a Coloración tras la adición del reactivo Folin & Ciocalteu
- b Coloración tras el baño María para lectura en el espectrofotómetro

4.5.2 Extracción de compuestos bioactivos

La extracción de compuestos bioactivos siguió el mismo principio para todos los casos, donde se colocan 5 mL de solución de extracción en los tubos que contienen 0,2 gramos de fruto de mortiño liofilizado. Se llevaron a agitación durante 10 minutos. Se pasó a un baño de ultrasonido durante 5 minutos para finalmente realizar un centrifugado a 5700 revoluciones por minuto, durante 5 minutos. El sobrenadante fue llevado a un balón ámbar de 25 mL. Tras el número de ciclos necesarios para la recuperación de biocompuestos se aforó con solución de extracción. Las soluciones utilizadas para la extracción de biocompuestos se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8.

Soluciones de extracción utilizadas para los biocompuestos

Compuesto bioactivo	Solución de extracción
Polifenoles totales e individuales	Metanol/agua/ácido fórmico 70:30:1
Flavonoides	Idem
Capacidad antioxidante	Idem
Antocianinas	Buffer pH 1,0 (Cloruro de Potasio 0,2N y Ácido Clorhídrico 0,2N) y pH 4,5 (Acetato de Sodio 1M y Ácido Clorhídrico 1,0N)

4.5.3. Determinación del porcentaje de extracción

Se realizó la cuantificación de polifenoles totales con 6 ciclos de extracción aplicando el protocolo de Cross, Villeneuve y Vincent (1982) adaptado por el INIAP, donde se dio lugar a la reacción con el Folin y carbonato de sodio 20%. Finalmente se pasó a un espectrofotómetro UV-VIS y se cuantificaron los polifenoles totales por la ecuación presentada en el protocolo. Como resultado de este proceso se determinó que se requerían 6 ciclos para recuperar el 100% de los polifenoles totales del fruto liofilizado del mortiño. Sin embargo, el porcentaje más representativo (99,10%) se obtiene en 4 extracciones. Siendo

este el número de extracciones realizado para la determinación de compuestos antioxidantes (Figura 9).

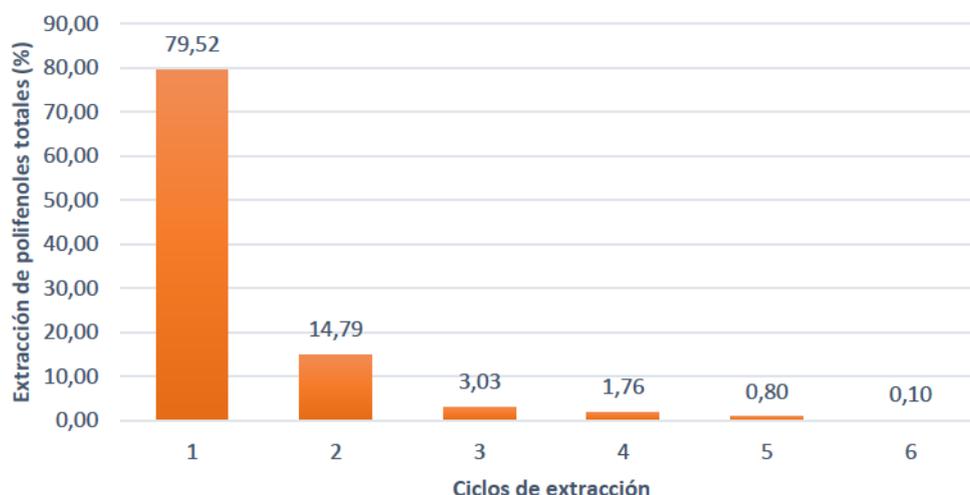


Figura 9. Porcentaje de extracción de polifenoles totales en el fruto de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) vs ciclos de extracción

Establecido el número de ciclos necesarios para la extracción se procedió a realizar un estudio de repetibilidad, realizando el mismo método en 5 réplicas. Este estudio establece la confiabilidad del método de laboratorio aplicado a través del coeficiente de variación de Horwitz, quien indica que en laboratorios tiene un valor de 2 a 4%. Para realizar el estudio de repetibilidad se determinó el promedio de extracción, el cual fue de 5594,36 mg Ácido Gálico/100 g de muestra, con una desviación estándar de 244,24, obteniéndose un coeficiente de variación de 4,37%, un tanto mayor al margen superior establecido por Horwitz (Rivera y Rodríguez, 2010). Sin embargo, lo anterior pudo ser consecuencia de la complejidad del proceso de extracción para polifenoles. Al no ser mayormente representativo se aceptó el método de extracción.

4.6. Caracterización de compuestos bioactivos

4.6.1 Curvas de calibración

Para la evaluación de compuestos bioactivos se elaboraron curvas de calibración indicados en los protocolos para flavonoides, polifenoles totales y capacidad antioxidante. Las curvas fueron realizadas a partir de estándares a fin de comparar los resultados obtenidos de las muestras y que puedan ser reportadas en la investigación, con el propósito de que el error experimental disminuya. Se buscó obtener un R^2 lo más cercano a 1 y una relación lineal que indique una alta correlación entre las absorbancias medidas por el espectrofotómetro y la concentración de cada sustancia implicada. En la Tabla 9 se pueden observar los datos con los que se trabajó.

Tabla 9.

Ecuaciones y R^2 obtenidos tras la elaboración de la curva de calibración

Compuesto bioactivo	Ecuación lineal	R^2	Absorbancia (nm)	Concentración
Polifenoles totales	$y=0,0102x+0,1057$	0,9963	760	PPM Ácido Gálico
Flavonoides	$y=0,0027x+0,0636$	0,9963	490	PPM Catequina
Capacidad antioxidante	$y=0,0012x+0,0086$	0,9953	734	uMTrolox/Litro

4.6.2 Determinación de antocianinas

La determinación de concentración de antocianinas fue realizada siguiendo el protocolo de Rapisarda, Fanella y Maccarone (2000), adaptado por el Departamento de Nutrición y Calidad de INIAP Santa Catalina con algunas modificaciones.

La extracción siguió el mismo proceso descrito anteriormente con las soluciones de extracción de pH 1,0 y 4,5 correspondientes a la determinación de antocianinas. Estas extracciones se diluyeron con agua destilada en una relación 1:10 para poder ser medidas en el espectrofotómetro UV-VIS a 515 y 710 para cada pH. Finalmente se utilizó la ecuación propuesta en el protocolo para la cuantificación de antocianinas totales de cada muestra.

4.6.3 Determinación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales fue realizada siguiendo el protocolo de Zhishen, Mengcheng y Jianming (1998) adaptado por el Departamento de Nutrición y Calidad de INIAP Santa Catalina.

Se siguió el proceso de extracción indicado previamente, así como la elaboración de la curva de calibración. Para la lectura de flavonoides totales se realizó igualmente una dilución con agua destilada 1:10 para el extracto obtenido, a esta dilución se añadió cloruro de aluminio al 10% e hidróxido de sodio (NaOH) a fin de que ocurra una reacción que se denotó por un cambio de coloración de amarillo a rosado (Figura 10).

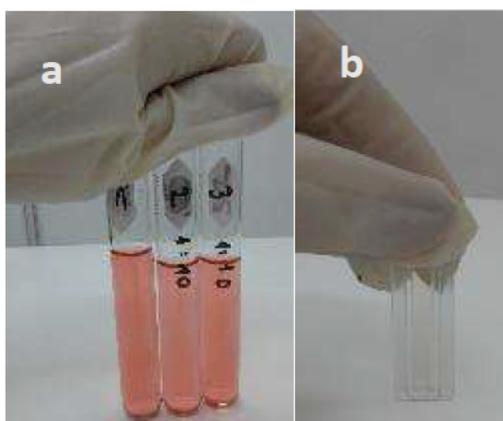


Figura 10. Reacción obtenida tras adición de cloruro de aluminio al 10% e hidróxido de sodio

- a Coloración tras adición de cloruro de aluminio e hidróxido de sodio
- b Colocación de la solución para lectura en una celda

4.6.4 Determinación de polifenoles totales e individuales

La determinación de polifenoles totales siguió el método de Cross, Villeneuve y Vincent (1982), donde primero se realizó una curva de calibración y la extracción siguiendo el procedimiento mencionado previamente. Se añadió el reactivo de Folin & Ciocalteu y carbonato de sodio 20% para poder generar la reacción y cambio de coloración que fue medido por espectrofotometría a una longitud de onda de 760 nm.

En la Figura 11 se pueden observar las coloraciones durante la extracción y tras la reacción con el reactivo de Folin & Ciocalteu que fue leída en el espectrofotómetro.

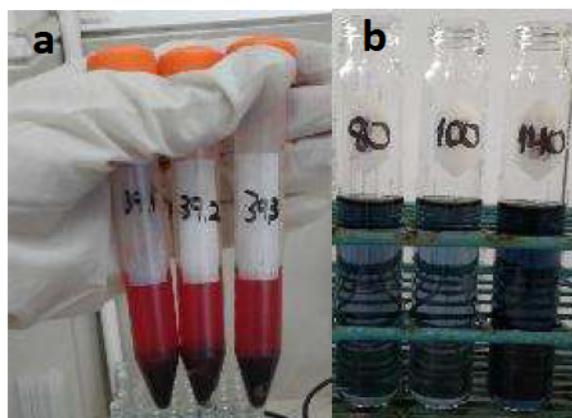


Figura 11. Coloraciones obtenidas en la determinación de polifenoles totales

- a Coloración durante extracción
- b Coloración tras adición de reactivo de Folin

El extracto obtenido en el proceso anterior fue también utilizado para ser inyectado en el Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC), el cual dará como resultado el perfil de polifenoles de las muestras del fruto de mortiño.

El mortiño posee componentes como antocianinas, flavonoides y otros derivados de ácidos que son detectables a diferentes longitudes de onda. En el proceso realizado en el laboratorio, las longitudes de onda utilizadas para detectar individualmente los polifenoles fueron de 280, 330 y 520 nanómetros. Los análisis realizados a nivel cromatográfico se los hizo a través de un HPLC de

bomba binaria con lámpara DAD-UV, el cual fue utilizado siguiendo el protocolo de uso del equipo.

En la Tabla 10 a continuación, se describen las condiciones a las que fueron inyectadas las muestras en el equipo HPLC.

Tabla 10.

Condiciones del equipo HPLC

Lámpara:	DAD-UV DAD
Longitud de onda:	280, 330 nm
Volumen de inyección:	20 µL
Columna:	ZORBAX Eclipse XDB-C18 4,6 x 250 mm, 5 µm, Agilent Technologies
Temperatura de la columna:	35°C
Flujo utilizado:	0,8 mL/min
Tiempo de cromatografía:	75 min
Fase móvil	Agua:Acetonitrilo:Ácido fórmico (99:08:02) %

4.6.5 Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante fue determinada a través del método ABTS+ de Re en 1998 adaptado por el Departamento de Nutrición y Calidad de INIAP Santa Catalina. Se realizó una curva de extracción y un proceso de extracción.

Los extractos fueron diluidos 1:10 para poder añadir la solución de trabajo de ABTS+. Tras homogeneizar y reposar se procedió a medir la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 734 nm y cuantificar con la ecuación propuesta por el protocolo.

En la Figura 12 se muestra el color tras la reacción con la solución ABTS + que fue colocada en las celdas para su lectura en el espectrofotómetro.



Figura 12. Coloración tras la adición de ABTS+ en celdas para lectura en el espectrofotómetro.

4.7 Microencapsulación de compuestos bioactivos

El método de coacervación es uno de los métodos más utilizados al ser relativamente simple y no necesitar equipo muy específico (Gómez, Comunian, Montero, Ferro y Favaro, 2016). Por lo descrito anterior, se seleccionó el método de coacervación compleja aplicando el método de Bhattacharyya y Argillier (2005) para la formación de microcápsulas de los compuestos bioactivos del fruto del mortiño, el método fue adaptado a los recursos disponibles en el laboratorio de análisis de alimentos de la Universidad de las Américas. La coacervación compleja consiste en la separación de dos compuestos poliméricos con cargas opuestas en dos fases. Este fenómeno ocurre a partir de la neutralización de la carga positiva de uno de los polímeros gracias a la carga negativa del otro (Omidi, Khorram y Samimi, 2010). Los polímeros escogidos para la microencapsulación fueron la gelatina y goma arábica ya que actualmente existen varias combinaciones de polímeros para la aplicación de la coacervación compleja; sin embargo, la gelatina y la goma arábica son ampliamente aplicados gracias a la disponibilidad y efectividad en la formación de coacervados (Gómez *et al.*, 2016).

Para esto se prepararon tres soluciones de 100 mL de gelatina y goma arábica al 1%, 3% y 5% a una temperatura de 55°C y en agitación constante. Para cada concentración, las soluciones fueron ajustadas a un pH de 6.5 con hidróxido de

sodio (NaOH) 0.1N a una temperatura de 55°C, la cual se encuentra sobre el punto de gelificación de la gelatina. Se realizó una solución con el liofilizado de fruto de mortiño al 3% m/v, de la cual se tomaron 15 mL y se añadió a la solución de goma arábica y se mantuvo a una agitación constante de 1200 rpm durante 30 minutos. Posteriormente se añadió la solución de gelatina en forma de gotas y se ajustó el pH a 4,5 con ácido clorhídrico (NaOH) 0,01N para formar los coacervados y mantenerlos en agitación constante durante 1 hora. En una segunda instancia se colocó la solución en un baño de hielo a 8°C durante 1 hora y se añadieron 10 mL de formaldehído para inducir la reticulación del coacervado. Finalmente se ajustó el pH a 9 con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N, se filtró y se colocó en la estufa a temperaturas de 30°C, 45°C y temperatura ambiente durante 24 horas, para evaluar la mejor manera de almacenar las microcápsulas. En la Figura 13 se observa el ajuste de pH realizado, el proceso de enfriamiento y el resultado de la microencapsulación.



Figura 13. Proceso de microencapsulación realizado

- a Ajuste de pH para formación de microencapsulados
- b Proceso de enfriamiento
- c Microcápsulas resultantes

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Humedad de las muestras previo a la evaluación de compuestos bioactivos

El fruto de mortiño pasó por un proceso de preparación para su uso en las diferentes pruebas de determinación de antioxidantes. En esta fase de la investigación se evaluó su contenido de humedad tras el proceso de liofilización (Tabla 11).

Tabla 11.

Contenido de humedad del fruto de mortiño

Muestra	Porcentaje de humedad (%)
Mortiño alto	82,5
Mortiño bajo	84,18
Mortiño medio	83,99

Vasco et al. (2009), reportan un contenido de humedad de $81 \pm 2,0\%$. Este valor representa el promedio de tres muestras tomadas de tres diferentes mercados de la sierra ecuatoriana. Las muestras siguieron el mismo proceso que las de la investigación, donde se midió el porcentaje de humedad después de la liofilización. Otros autores, como Coba et al.; en su trabajo indican un contenido de humedad alrededor del 80% gracias a una revisión bibliográfica. El contenido de humedad presente en los frutos de mortiño de Quinticusig es bastante alto. Este porcentaje varía para cada localidad, ya que depende en gran medida de la disponibilidad de agua presente en el suelo durante la cosecha (Magro, Stroschoen, Martins Da Silva, Jablonski, Hickmann, de Oliveira y Vogt, 2014). Al evaluar cómo cambia esta disponibilidad de acuerdo al gradiente altitudinal, se puede observar una tendencia de decrecimiento lineal con la altitud, la cual expresa que a medida que la altitud aumenta, el contenido de agua en el suelo disminuye (He, Hou, Liu y Wen, 2016). Lo anterior se ve reflejado en los resultados, donde el mortiño alto es el que tiene menor contenido de humedad

(82,5%) y mortiño bajo tiene un mayor porcentaje (84,18%), mortiño medio presentó un valor entre estos (83,99%).

Es importante que para la determinación de compuestos bioactivos, la fruta sea procesada en el menor tiempo posible. A mayor tiempo de almacenamiento, se presenta una pérdida de peso del fruto causada por un debilitamiento de la membrana celular, teniendo como efecto la pérdida de agua por transpiración. En el proceso de transpiración se utilizan ácidos; de los cuales algunos pueden fenólicos y azúcares presentes en el fruto (Rincón, Buitrago, Ligarreto, Torres y Balaguera, 2012). Por lo anterior, el tiempo de almacenamiento fue de dos días y se procedió inmediatamente a una liofilización.

5.2 Determinación de polifenoles totales

En la Tabla 12 se presentan los resultados de la determinación de polifenoles totales presentes en el fruto de mortiño. Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones y están expresados en mg de ácido gálico por 100 gramos de muestra en base seca. Igualmente se presenta la desviación estándar y el coeficiente de variación presentado para cada muestra.

Se realizó un arreglo en bloques completos al azar de las muestras a fin de realizar el análisis de varianza con tres repeticiones para cada variable. El nivel de confianza utilizado para la investigación fue del 95% y a través del p-valor se evaluó la significancia estadística de las variables. Se siguió con un análisis de Tukey al 5% como método de separación de medias. En el caso de polifenoles totales, el ANOVA arrojó un valor P de 0,009 y un r^2 de 0,7958, indicando que para esta probabilidad se tienen diferencias significativas. Tras la separación de medias, arrojó los resultados presentados en la Tabla 12

Tabla 12.

Resultados de la separación de medias para concentración de polifenoles totales

Muestra	Media	σ	Categoría
Mortiño alto	6682,60	658,47	A
Mortiño bajo	4582,92	593,36	B
Mortiño medio	5522,47	257,15	AB

El contenido de polifenoles totales se encuentra en valores por debajo de los reportados por autores como Llerena (2014), Tupuna, Vera y Ruales (2016) y Vasco (2009). Quienes indican valores promedio desde 7254,62 a 9799,02 mg de ácido gálico/100 gramos de muestra seca. Esto puede darse por una recolección de frutos con un estado de madurez menor al de los estudiados anteriormente por los autores, ya que en la medida que los frutos de mortiño maduran, este tipo de compuestos aumentan (Rodríguez, López y García, 2010). En investigaciones realizadas en Colombia para mortiño endémico (*Vaccinium meridionale*), a 2120 msnm ha arrojado valores de 2800 mg de ácido gálico por 100 gramos de muestra seca (Gaviria, Ochoa, Sánchez, Medina, Lobo, Galeano, Mosquera, Tamayo, Lopera y Rojano, 2009). Al contrastar la altitud del cultivo del fruto de mortiño de las investigaciones anteriores con la presente, se puede observar que la altura de recolección de fruto de las tres muestras es superior, lo cual sugiere que la altitud es un factor que influye en el contenido de polifenoles. Así mismo, en otros estudios aplicados al mismo fruto encontrado en mercados locales de Medellín, se encontraron valores para polifenoles totales de 1237,2 mg de ácido gálico por 100 gramos de fruto liofilizado (Zapata, Piedrahita y Rojano, 2014). Al comparar el contenido de polifenoles totales presentes en el fruto de mortiño frente a diferentes *Vaccinium*, se observó que su concentración es mayor, ya que para *Vaccinium corymbosum* se tuvieron valores de 822,72 a 2150 mg de ácido gálico por 100 gramos de fruto seco. En cuanto a *Vaccinium virgatum*, 1045 a 2077 mg de ácido gálico por 100 gramos de fruto seco y para *Vaccinium angustifolium* valores entre 1318,18 a 2250 mg de ácido gálico por 100 gramos de fruto seco (Gaviria et al., 2009). Igualmente, el mortiño de

Quinticusig estudiado presenta valores superiores para el contenido fenólico a los reportados en investigaciones anteriores.

5.3 Determinación de antocianinas totales

Los resultados de la concentración de antocianinas totales se evidencian en la Tabla 13 igualmente en promedio de tres repeticiones para cada muestra, los cuales están expresados en mg de cloruro de cianidina-3-glucósido por 100 gramos de muestra en base seca con su desviación estándar y coeficiente de variación resultante de cada muestra.

De igual forma se realizó un arreglo en bloques completos al azar para el análisis de varianza. Tras este análisis se obtuvo un valor p de 0,006 y un r^2 de 0,9622, indicando diferencias significativas, donde la prueba de Tukey al 5% para la separación de medias arrojó los resultados presentados en la Tabla 15.

Tabla 13.

Resultados de la separación de medias para concentración de antocianinas totales

Muestra	Media	σ	Categoría
Mortiño alto	3683,39	123,13	A
Mortiño bajo	3046,54	84,00	B
Mortiño medio	2869,53	38,38	B

El contenido de antocianinas obtenidas en la investigación reporta valores similares a los presentados por Llerena (2012) para *Vaccinium floribundum* Kunth, quien establece un contenido de 2682,30 mg de cloruro de cianidina-3-glucósido/100g de base seca. Así mismo, Vasco et al. (2009) establecen un contenido de 3832,95 30 mg de cloruro de cianidina-3-glucósido/100g de base seca. Stalin Roldán (2012) por su parte indica que el contenido de antocianinas totales en mortiño maduro secado por liofilización debería presentar valores alrededor de 2837,44 mg de cloruro de cianidina-3-glucósido/100g de base seca.

Para otras especies como *Vaccinium corybbosum*, *Vaccinium angustifolium*, *Vaccinium stamineum* se han encontrado valores de 92-235, 290-300 y 371-630 mg equivalentes de cianidin-3-glucósido por 100 gramos de fruta fresca (Gaviria et al., 2009). Los resultados del contenido de antocianina pueden variar entre especies ya que la mayor parte de antocianinas se encuentra en la epidermis del fruto de mortiño y estas son detectables de acuerdo al grado de maduración en el que se encuentra. Sin embargo, existen especies como el arándano, en el cual están distribuidas en todo el cuerpo del fruto, explicando estas diferencias (Gaviria et al., 2009).

En el análisis de los compuestos fenólicos de arándano a diferentes altitudes en el país de Montenegro, se evaluaron 11 altitudes entre los 665 y 1700 msnm donde se encuentra el cultivo y la relación que mantienen con el contenido de polifenoles totales presentes en el fruto, dando como resultado que existen diferencias significativas en la concentración de los mismos y la altitud a la que se encuentran, así como el contenido de antocianinas totales. En la investigación se demostró que los polifenoles y antocianinas totales son mayores a altitudes sobre los 1500 msnm que a menores de este valor (Jovancevic, Balijagic, Menkovic, Savikin, Zdunic, Jankovic y Dekic, 2011).

De forma particular para antocianinas, el mayor contenido de las mismas fue presentado por mortiño alto, seguido por mortiño bajo y finalmente por mortiño medio. Lo cual induce a que en una parte pudo haberse dado por la distribución de estos compuestos en el fruto, como una baja concentración de estas en la epidermis de los frutos de la muestra. Sin embargo, de manera general se ven influenciados por la altitud a la cual se encuentran los mismos, ratificando lo presentado en investigaciones anteriores.

5.4 Determinación de flavonoides totales

En cuanto a flavonoides totales, los resultados de su concentración en el fruto de mortiño se expresan en mg de catequina por 100 gramos de muestra en base

seca, estos son expuestos en la Tabla 14 con su correspondiente desviación estándar y coeficiente de variación.

Tras el ANOVA realizado para las tres muestras, se obtuvo un valor p de 0,016 y un r^2 de 0,7474, indicando diferencias significativas, al realizar la prueba de separación de medias de Tukey al 5%, se obtuvieron las categorías presentadas en la Tabla 14.

Tabla 14.

Resultados de la separación de medias para concentración de flavonoides totales

Muestra	Media	σ	Categoría
Mortiño alto	3820,29	521,80	A
Mortiño bajo	2558,05	180,50	B
Mortiño medio	2995,88	333,99	AB

Los flavonoides son el grupo mayoritario de sustancias fenólicas, con un alto poder antioxidante (Zapata, Piedrahita, Alzate, Cortés y Rojano, 2015). Los flavonoides totales presentes en el fruto del mortiño arrojaron datos superiores a los obtenidos en otras investigaciones. Mayorga (2012) para *Vaccinium floribundum* Kunth del Ecuador, establece un valor de 358,48 (mg de Catequina/100g de tejido) en base fresca, lo que corresponde a 2179,21 (mg de Catequina/100g de tejido) en base seca.

En investigaciones realizadas para *Vaccinium meridionale* Sw., los flavonoides totales cuantificados, tuvieron valores de $1298,54 \pm 6,36$ mg de catequina por 100 gramos de fruto liofilizado (Zapata et al., 2015). En las plantas, flavonoles y antocianinas son compuestos fenólicos que absorben la luz y la almacenan en las células epidérmicas como protección ante la radiación ultravioleta. Como resultado de esto, se logra encontrar una mayor acumulación de flavonoides en varias especies a medida que la altitud aumenta (Jaakola y Hohtola, 2010). anterior es evidenciado para la concentración de flavonoides totales, donde el

mortiño alto es el que presenta la mayor cantidad, seguido por mortiño medio y finalmente por mortiño bajo.

Haciendo referencia a la localización del cultivo, se debe considerar la altitud a la cual se encuentra y a la radiación que recibe en esas condiciones para evaluar de mejor manera la concentración de los compuestos fenólicos que presenta el cultivo.

Al presentarse diferencias estadísticas significativas en la evaluación de las variables (contenido de polifenoles totales, flavonoides totales y antocianinas totales) en el fruto liofilizado de mortiño y tras realizar una separación de medias bajo el método de Tukey al 5%, se determinó que existe un tratamiento con una calificación mayor en todos los casos, el cual corresponde a la muestra mortiño alto. De los resultados anteriores, se puede inferir que la altitud a la que se encuentra el cultivo puede considerarse un factor importante en el contenido de compuestos bioactivos del fruto del mortiño. Al no existir investigaciones previas que relacionen la altitud del cultivo de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) con el contenido de compuestos bioactivos, se ha tomado información relevante de estudios realizados a diferentes especies del género *Vaccinium*, al cual pertenece el mortiño.

Para el arándano azul (*Vaccinium corymbosum*), se ha determinado que existen diversos factores como el cultivar, la temporada de crecimiento y la localización del cultivo que influyen en la concentración de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los frutos (Dragovic, Savic, Brala, Levaj, Bursac y Bisko, 2010).

La radiación puede producir daño celular en seres vivos, sin embargo; en niveles moderados podría provocar una respuesta natural que ayude a disminuir este riesgo. Uno de los mecanismos vegetales contra esta radiación podría asumirse que es la generación de polifenoles y otros antioxidantes (Taquichiri, Ayarde,

Gutierrez, Bustos, Paredes, Callisaya, Surco, Palenque, Ghezzi, Alvarado y Peñarrieta, 2014).

En estudios realizados por Rieger, Muller, Guttenberg y Burcar en 2008, se evaluó por primera vez el efecto de la variación de la altura en el contenido de compuestos fenólicos en poblaciones silvestres del fruto de arándano (*Vaccinium myrtillus*) a través del HPLC para la detección de polifenoles individuales. Esta investigación se realizó tomando muestras a 3 altitudes diferentes (800, 1200 y 1500 msnm) durante dos años en Austria. Los resultados de esta investigación indicaron que la mayoría de compuestos fenólicos disminuía a medida que la altitud aumentaba, donde se asume que la radiación solar es mayor (Rieger, Muller, Guttenberg y Burcar, 2008). De forma general, se puede observar lo anterior en los resultados presentados.

Al evaluar las investigaciones realizadas y contrarrestar con las muestras analizadas, se puede llegar a la conclusión que la altitud podría ser un factor que inflencie la concentración de compuestos bioactivos presentes en el fruto de mortiño de Quinticusig, ya que especies de la misma familia de *Vaccinium* han demostrado comportamientos similares en las investigaciones más recientes. Teniendo como resultado que la muestra mortiño alto es la que se encuentra a mayor altitud y presentó mayor contenido de compuestos bioactivos, seguida por la muestra mortiño medio y mortiño bajo, se puede ratificar lo discutido anteriormente.

5.5 Determinación de polifenoles individuales por HPLC

La evaluación de polifenoles individuales fue realizada por medio del Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC). El cromatograma fue obtenido a tres longitudes de onda 280,330 y 520 nm, que permiten determinar los siguientes grupos de compuestos: flavonoides, ácidos fenólicos y antocianinas respectivamente. Los cromatogramas obtenidos se encuentran en Anexos para una mejor visualización.

El análisis de las muestras de mortiño permitió determinar que el perfil de compuestos fenólicos presenta trece picos diferentes que corresponden a este tipo de compuestos, de los cuales mediante inyección de estándares, comparación con los tiempos de retención obtenidos en los cromatogramas de las muestras, y mediante comparación con datos bibliográficos obtenidos para el perfil de estos compuestos en otros laboratorios internacionales se logró identificar cinco compuestos que se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15.

Descripción de estándares utilizados para la identificación de polifenoles individuales en el fruto de mortiño.

Longitud de onda	Estándar	Tiempo de retención (s)
330 nm	Ac. Caféico	21,482
	Ac. Myricetina	35,71
	Ac. P-Hidroxibenzoico	18,323
280 nm	Catequina	19,108
	Ac. Vanílico	21,086

En la longitud de onda de 330 nm, en las muestras se logró identificar cualitativamente a 2 compuestos, que son el ácido caféico y la myricetina, mientras que a 280 nm se detectaron cualitativamente 3 compuestos que fueron ácido para-hidroxibenzoico, catequina y ácido vanílico. A partir del estudio del perfil de polifenoles desarrollado por Vasco et al. en 2009 se pudo ratificar la existencia de estos compuestos. Sin embargo, los 8 picos restantes no se pudieron identificar por falta de estándares en el laboratorio para este tipo de compuestos. Para la cuantificación se utilizó una curva de calibración con un compuesto polifenólico representativo identificado en el mortiño, el cual fue el ácido caféico. En la Figura 14 se puede observar la curva de calibración utilizada, la misma que presenta un coeficiente de correlación r^2 de 0,9936 se estableció que existe una alta correlación entre el área obtenida para este estándar y la concentración.

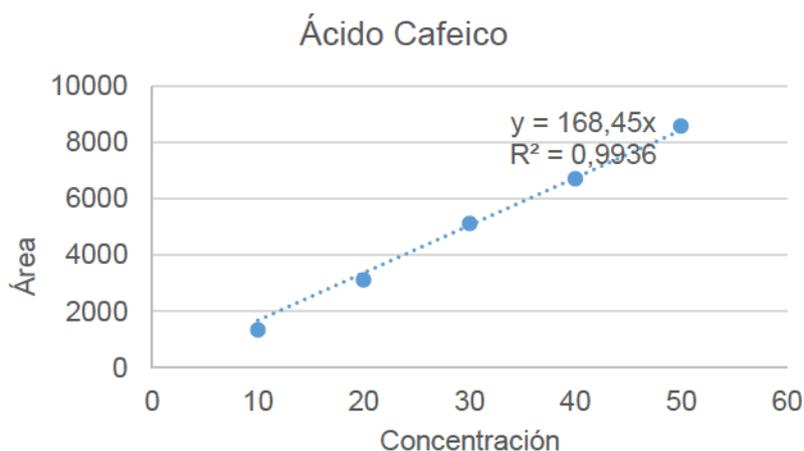


Figura 14. Curva de calibración para ácido cafeico.

La curva anterior fue utilizada para realizar la cuantificación de todos los trece compuestos obtenidos en el cromatograma de muestras de mortiño. Donde la concentración de cada pico cromatográfico fue expresada como miligramos equivalentes de ácido cafeico por 100 gramos de muestra seca.

Los resultados expresados en mg de ácido cafeico por 100 gramos de muestra liofilizada se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16.

Cuantificación de compuestos identificados a través de la curva de ácido cafeico

Longitud de onda	Número de pico	Identificación tentativa	Tiempo	Área promedio (mAU*s)	Concentración promedio (mg EAC/100g MS)
			de retención promedio (s)		
330 nm	1	N/I	13,8270	140,12	10,27
	2	N/I	14,9340	130,08	9,59
	3	Ácido Cafeico	23,9820	168,61	12,38
	4	N/I	24,1180	242,12	17,78
	5	N/I	28,9100	510,25	37,47
	6	N/I	29,4960	306,68	22,52
	7	N/I	31,1210	108,07	7,94

280 nm	8	N/I	32,4260	313,99	23,06
	9	Myricetina	36,0530	75,24	5,53
	10	N/I	36,6960	60,6	4,45
	11	Ac. P- Hidroxibenzoico	18,6340	83,53	6,13
	12	Catequina	19,2480	823,56	60,48
	13	Ac. Vanílico	21,0890	2350,78	172,63

Nota: Concentración expresada en equivalentes de ácido cafeico por 100 gramos de muestra seca.

Observando a la tabla anterior, tomando como polifenol representativo al ácido cafeico y al cuantificar el resto de compuestos a partir de este; se podría inferir que, en las muestras de fruto de mortiño, tentativamente se tiene una mayor concentración de los polifenoles ácido vanílico y catequina, ya que los equivalentes de ácido cafeico que presentan son mayores.

El ácido cafeico en la planta tiene la función principal de ser precursor en la formación de otros ácidos más complejos como la lignina, cumarinas, taninos, flavonoles e isoflavonoides. (Ávalos y Pérez, 2009) La formación de este ácido se da por la síntesis de compuestos fenólicos por la ruta del ácido siquímico, la cual es la ruta responsable de la biosíntesis de la mayoría de compuestos fenólicos. La enzima fenilalanina amonio liasa cataliza reacciones en la ruta que adicionan grupos hidroxilos y sustituyentes en la molécula de amonio de la fenilalanina para finalmente metabolizar los ácidos trans-cinámico y p-cumárico, los cuales forman el ácido ferúlico y el ácido cafeico (Ávalos y Pérez, 2009). En el laboratorio, este ácido fue utilizado como representativo ya que fue encontrado en las tres muestras en tiempos de retención similares.

De acuerdo a la publicación realizada por Vasco et al. en 2009 para el perfil fenólico de mortiño, se identificaron y cuantificaron algunos de los compuestos anteriores en base a la antocianina “aglicona”, por lo cual existen diferencias en la cuantificación de los compuestos con los de la presente investigación. La presente investigación llega a ser la primera caracterización fenólica en fruto de mortiño realizada en HPLC en el Instituto Nacional de Investigación

Agropecuaria INIAP. Siendo de gran importancia para abrir un campo de estudio a frutos de mortiño provenientes no solo de la zona de Quínticusig, sino de otros páramos del Ecuador para la evaluación de diferencias en su contenido de polifenoles individuales.

5.6 Capacidad antioxidante de los frutos de mortiño

El fruto de mortiño ha sido asociado con una alta capacidad antioxidante. De acuerdo con Vasco et al., el mortiño es considerado como uno de los frutos con mayor capacidad antioxidante del Ecuador, en comparación con otros como mora, guayaba (Vasco et al., 2009).

En la Tabla 17 se presentan los resultados obtenidos del análisis de la capacidad antioxidante de las muestras expresados en mg de Trolox por 100 gramos de muestra en base seca.

Tabla 17.

Capacidad antioxidante de los frutos liofilizados de mortiño

Compuesto	Capacidad antioxidante
Mortiño alto	3670,43
Mortiño bajo	3414,97
Mortiño medio	3479,83

El análisis de la capacidad antioxidante en los frutos de mortiño por el método de ABTS+, arrojó un valor promedio de 3521,74 mg de Trolox/100 gramos de muestra seca. Estos datos pueden ser comparados con los obtenidos por Roldán (2012), quien indica capacidad antioxidante del fruto de mortiño de 4633,25 mg de Equivalentes de Trolox/100g de muestra fresca, lo que equivale a 3475 mg Trolox/100 gramos de muestra seca aproximadamente. Lo anterior ratifica la veracidad del estudio de laboratorio para capacidad antioxidante. Cabe recalcar que tras el proceso de liofilizado se pierde aproximadamente el 25% de la capacidad antioxidante del fruto fresco (Roldán,2012).

En los alimentos de origen vegetal, la capacidad antioxidante viene dada por el grado de madurez del fruto y la concentración de compuestos fenólicos, pero principalmente por el contenido de flavonoides que presenta el fruto ya que estos actúan como secuestradores de radicales libres, además de presentar propiedades quelantes del hierro (Clappini, Stopanni, Martinet y Álvarez, 2013).

La investigación conducida por Martz, Jaakola, Julkumen y Stark en 2010 para evaluar la composición fenólica y capacidad antioxidante de las hojas de arándano en Europa del norte, indicó que la capacidad antioxidante aumenta a medida que aumenta la altura. Igualmente se indica que la producción de compuestos fenólicos es mayor al tener exposición directa solar y a mayor altura. Se debe tomar en cuenta que el contenido de compuestos fenólicos en hojas es mayor que en fruto. Sin embargo, se esperaría un comportamiento similar para este (Martz, Jaakola, Julkumen y Stark, 2010). En los resultados se puede evidenciar lo anterior, teniendo al mortiño alto con una mayor capacidad antioxidante, seguido por mortiño medio y mortiño bajo.

5.7 Microencapsulación de compuestos bioactivos del mortiño

Los resultados de la microencapsulación se evaluaron cualitativamente, donde para cada concentración de soluciones de gelatina y goma arábica se observó que la cápsula sea redonda, que no tenga aperturas y que se identifique al compuesto encapsulado dentro de la misma. A continuación, en la Figura 16, se pueden observar las microcápsulas obtenidas utilizando concentraciones de 1%, 3% y 5% de gelatina/goma arábica.



Figura 15. Microcápsulas de compuestos bioactivos obtenidas a diferentes concentraciones

- a Concentración 1%
- b Concentración 3%
- c Concentración 5%

Tras realizar un análisis cualitativo de las microcápsulas obtenidas, se puede identificar claramente que a una concentración de 3% de solución goma arábica/gelatina se obtuvieron los mejores resultados en la formación de coacervados. En la concentración de 1%, no se observó mayor formación de cápsulas, identificando formaciones esféricas, con aberturas sin retención del compuesto bioactivo. A una concentración de 3%, se logró observar la matriz de coacervados formada con el compuesto bioactivo encapsulado. Las microcápsulas obtenidas a esta concentración fueron esféricas, no presentaron aberturas, no presentaron poros en su estructura y se puede inferir, gracias a la bibliografía del método aplicado, que el tamaño de estas se encuentra bajo los 100 micrómetros (Bhattacharyya y Argillier, 2005). A una concentración de 5%, se identificaron esferas de mayor tamaño, pero no se logró identificar en su estructura al compuesto bioactivo.

Como instancia final del proceso, se evaluaron 3 temperaturas durante 24 horas, las cuales fueron 30°C, 45°C y temperatura ambiente en la conservación de las microcápsulas. Las temperaturas de 30°C y 45°C resultaron en un secado por completo. La temperatura ambiente mantuvo las microcápsulas estables en 24 horas, sin embargo; no se logró un secado completo de las mismas después de la filtración. Evidenciando un proceso adicional para una evaluación posterior de las microcápsulas.

El tamaño de la cápsula formada y sus características son influenciadas por varios factores durante el proceso de microencapsulación. Entre los que se pueden mencionar están la concentración de iones, el tipo de matriz formada y su radio, el tipo de compuesto bioactivo a microencapsular y principalmente por el pH, ya que influye directamente en la formación de los coacervados (de Vos, Faas, Spasojevic y Sikkema, 2010). La carga de la gelatina depende del pH, ratificando la dependencia del proceso de este parámetro y tomando en cuenta que pequeñas variaciones en el mismo pueden alterar drásticamente los resultados obtenidos (Bhattacharyya y Argillier, 2005). Los pH de solución goma arábica/gelatina/liofilizado de mortiño a los que fue trabajado el método para la formación de coacervados fueron de 3,6 y 4,5. A pH de 3,6 no se obtuvieron resultados positivos en la formación de coacervados, mientras que en pH 4,5 si se identificó la formación de microcápsulas. Esto puede ser ratificado por el método utilizado por Gómez et al. para coacervación compleja, quienes indican que a pH menores de 4 y mayores a 4,6 no se formaron las cápsulas. Identificando un pH óptimo de microencapsulación de 4,3 a 4,5. Los autores indican también que las fuerzas iónicas tienen efecto sobre el potencial z, que a un pH adecuado equilibra las cargas de los polímeros utilizados, favoreciendo la formación de la red de coacervados (Gómez et al., 2016). La formación de coacervados es influenciada en mayor parte por su pH inicial, sin embargo, el pH final también ejerce control en la matriz formada (Calero, Muñoz y Guerrero, 2013). Para inducir a la reticulación del complejo se añadió formaldehído, este compuesto tiene la acción de aumentar la rigidez de los coacervados al desnaturalizar la matriz goma arábica/gelatina. Además, las últimas instancias del proceso que incluyen el descenso de temperatura y aumento de pH final favorecen el efecto de la rigidez de las microcápsulas (Bhattacharyya y Argillier, 2005).

De acuerdo a datos bibliográficos, la eficiencia que se esperaría obtener de la encapsulación por el método de coacervación compleja varía entre un 78-91%, dependiendo de la concentración del material encapsulado y los materiales encapsulantes (Mendanha et al., 2009).

El proceso para la obtención de las cápsulas con características esperadas para realizar un estudio más profundo consiste en un polvo de bajo peso molecular, cuyos componentes están adsorbidos unos en otros, de acuerdo a los métodos estudiados, este se obtiene gracias a una centrifugación y posterior secado por aspersion del complejo obtenido (Bhattacharyya y Argillier, 2005; Gómez et al., 2016). Al no contar con esta tecnología, no fue factible un estudio posterior. Sin embargo, de acuerdo a investigaciones previas, la humedad de las microcápsulas bajo este método se encuentra entre 2-4,5% (Bhattacharyya y Argillier, 2005), con una solubilidad y actividad de agua esperadas de 28,7% y 0,590 (gramos de agua/100 gramos de polvo) (Gómez et al., 2016).

5.8 Análisis económico de la microencapsulación de compuestos bioactivos

De acuerdo a la bibliografía planteada por el método de coacervación compleja de Bhattacharyya y Argillier, se obtienen a partir del proceso 500 microcápsulas. En base a esta cantidad se realizará el análisis económico de la microencapsulación de los compuestos bioactivos del mortíño bajo el título fase microencapsulación (Tabla 18).

Tabla 18.

Costos asociados al proceso para la obtención de 500 microcápsulas aproximadamente.

Recurso	Costo
Insumos	\$7,42
Mano de obra	\$14,35
TOTAL	\$555,37

Cabe recalcar que la microencapsulación en el país en su mayor parte es investigativa. Sin embargo, ya existen empresas que ofrecen este servicio a la industria alimentaria tras conocer la importancia que los compuestos bioactivos presentan en la elaboración de alimentos funcionales y viene dada gracias a una

creciente demanda de las empresas por incorporar estas microcápsulas con propiedades beneficiosas en sus productos. Como ejemplo se tiene a la empresa DLIP INDUSTRIAL, que ya ofrece servicios de microencapsulación con tecnología de punta en sus procesos. Un ejemplo del producto de microencapsulado es el quitosano que ofrecen, con un costo de \$150 dólares por kilo de quitosano microencapsulado. Sus precios varían de la tecnología que requieran para microencapsular el compuesto deseado (DLIPSA, 2016)

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

La caracterización de compuestos bioactivos del fruto liofilizado de mortiño estableció que existieron diferencias significativas en las muestras tomadas a diferentes alturas, donde la muestra mortiño alto (3020 msnm) presentó una mayor concentración de polifenoles totales, flavonoides totales y antocianinas totales frente a mortiño bajo (2680 msnm) y mortiño medio (2850 msnm). A partir de investigaciones previas realizadas en especies del género *Vaccinium*, donde el contenido de compuestos fenólicos es influenciado en gran parte por la altitud a la que se encuentra el cultivo, aumentando con la misma; se esperaría un comportamiento similar para el mortiño del Ecuador (*Vaccinium floribundum* Kunth), para ratificar que el contenido de compuestos bioactivos de las muestras aumenta al aumentar la altitud.

El análisis individual de polifenoles logró identificar trece picos en las tres muestras de fruto de mortiño liofilizado. Sin embargo, a partir de la inyección de estándares y comparación con datos bibliográficos, se logró identificar a una longitud de onda de 330 nm los ácidos caféico y el myricetina, mientras que a 280 nm se identificaron el ácido para-hidroxi benzoico, catequina y ácido vanílico. Los trece picos fueron cuantificados a partir de un compuesto fenólico representativo en el mortiño para ser expresados como miligramos equivalentes de ácido caféico por 100 gramos de muestra seca. Obteniendo tentativamente una mayor concentración de ácido vanílico y catequina en el fruto de mortiño liofilizado.

El método de coacervación compleja tiene un pH óptimo de 4,5 para la formación de microcápsulas y la concentración adecuada de microencapsulación consistió en 3% para la gelatina y goma arábica, gracias a la cual se obtuvieron microcápsulas redondas, sin aberturas, donde se logró identificar al liofilizado dentro de su estructura.

6.2 Recomendaciones

El mortiño es un fruto andino de la sierra ecuatoriana con un interés creciente por su contenido de compuestos bioactivos, el cual es mayor que otras frutas rojas como la mora, fresas que tienen mayor consumo en la población ecuatoriana. Es recomendable realizar una investigación más profunda a nivel de Ecuador para *Vaccinium floribundum* Kunth que determine específicamente cómo influye la altitud del cultivo en la concentración de compuestos bioactivos. Tomando en cuenta este factor y los beneficios que estas sustancias fenólicas presentan en la salud humana, se recomienda que los frutos de mortiño sean recolectados a mayor altitud, a fin de que puedan desarrollarse alimentos funcionales, potenciando las propiedades del fruto de mortiño ecuatoriano.

Una exitosa caracterización de polifenoles individuales depende en gran medida de los estándares que se cuenten en el laboratorio para su identificación y cuantificación. Es recomendable añadirlos para aumentar el número de polifenoles caracterizados, además, a través de un mayor número de curvas de calibración se podrán cuantificar correctamente los polifenoles; mejorando el método de investigación.

La microencapsulación es una tecnología emergente en el país, e internacionalmente es utilizada por grandes laboratorios para la incorporación de microcápsulas en su portafolio de productos. Es recomendable que, para un proceso exitoso, la tecnología para el mismo se encuentre disponible. Para lograr el producto final aplicando el método de coacervación compleja se recomienda secar las microcápsulas a través de un secado por aspersion.

REFERENCIAS

- Agnieszka, S. y Borowska, E. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: a review. *Plant foods human nutrition*. (63)4 147-156. Doi: 10.1007/s11130-008-0097-5.
- Aguilera, M., Reza, M., Chew, R. y Meza, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista Biotecnia. Revista de Ciencias biológicas y de la salud*. 8(2), 16-22. Recuperado el 20 de febrero de 2017 de: <http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/16-BIO-11-DPA-06.pdf>
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*. (2)3. 119-145. ISSN: 1989-3620
- Barrón, R., García, M., Soto, M., Colinas, T. y Kite, G. (2011). Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Revista fitotecnia mexicana*. (34)3. 151-157. ISSN: 0187-7380
- Battino, M., Beekwilder, J., Denoyes, B., Laimer, M., McDougall, G. y Mezzetti, B. (2009). Bioactive compounds in berries relevant to human health. *Nutrition reviews*. 67(1). 145-150. Doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00178.x
- Betz, M. y Kulozik, U. (2011). Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels. *Procedia Food Science*. (1)11 2046-2056. Doi: 10.1016/j.profoo.2011.10.006
- Bhattacharyya, A. y Argillier, J. (2005). Microencapsulation by complex coacervation: effect of cationic surfactants. *Journal of surface science and technology*. (21)3-4. 161-168. Recuperado el 20 de febrero de 2017 de: http://issstindian.org/pubpdf/voiume21/5/issst_journal_vol21_3_4_Art5.pdf
- Calero, N., Muñoz, J y Guerrero, A. (2013). Efecto del pH en emulsiones o/w formuladas con proteína de patata y quitosano. *Artículos de ingeniería química*. (1)64. 15-21. ISSN: 0017-3495.

- Champagne, C. y Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*. (18)2. 184-190. Doi: 10.1016/j.copbio.2007.03.001
- Clappini, M., Stoppani, F., Martinet, R. y Álvarez, M. (2013) Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucaliptos y alfalfa. *Revista de ciencia y tecnología SciELO Argentina*. (15)19. 45-51. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872013000100007
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E. y Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja: Revista de Ciencias de la vida*. (16)2. 5-13. ISSN: 1390-3799.
- Cobo, M., Gutiérrez, B., Torres, A. y Torres, M. (2015). Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Biochemical Systematics and Ecology*. (64). 14-21. Doi: 10.1016/j.bse.2015.11.008
- Cuevas, J., Vergara, J. y Pérez, J. (Eds.) *Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols*. (2017). Florida, Estados Unidos: Taylor & Francis Group, LLC.
- De Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M. y Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. (20)4. 292-302. Doi: 10.1016/j.idairyj.2009.11.008
- Díaz, E., Sacristán, M., Alarcón, B., Córdoba, V., Legaz, M. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. *Revista REDUCA*. (4)3. 33-47. ISSN: 1989-3620.
- Díaz, T. (2012). *Proyecto de factibilidad para producción y exportación de mortiño fresco al mercado de los Estados Unidos como sustituto del arándano (blueberry) en el período 2011- 2020*. Recuperado el 28 de febrero de: <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/6745>

- Dlipsa. (2016). *¿Quiénes somos?* Recuperado el 3 de febrero de 2017 de: <http://www.dlipsa.com/>
- Dragovic, V., Savic, Z., Brala, A., Levaj, B., Bursac, D. y Bisko, A. (2010). Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) Grown in the Northwest Croatia. *Food technology and biotechnology*. (48)2. 214-221. ISSN: 1330-9862.
- Escamilla, C., Cuevas, E. y Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus actividades antioxidantes. *Revista de la facultad de medicina de la UNAM*. (52)2. 73-75. Recuperado el 28 de febrero de 2017 de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un092g.pdf>
- Esquivel, B., Ochoa, L. y Rutiaga, O. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Revista iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. (16)2. 180-192. ISSN: 1665-0204.
- Gaonkar, A., Vasisht, N., Khare, A. y Sobel, R (2014). *Microencapsulation in the food industry: A practical implementation guide*. Massachusetts, Estados Unidos: Elsevier Inc.
- Gaviria, C., Hernández, J., Lobo, M., Medina, C. y Rojano, B. (2012) Cambios en la capacidad antioxidante en frutos de Mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.) durante su desarrollo y maduración. *Revista facultad nacional de agronomía*. (65)1. 6487-6495. ISSN: 0304-2847.
- Gaviria, C., Ochoa, C., Sánchez, N., Medina, C., Lobo, M., Galeano, P., Mosquera, A., Tamayo, A., Lopera, Y. y Rojano, B. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.). *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*. (8)6. 519-528. ISSN: 0717-7917.
- Gómez, J., Comunian, T., Montero, P. y Ferro, R. (2016). Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin-cashew gum complex. *Food hydrocolloids*. (61). 155-162. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.05.005.

- Grand View Research. (2017). *Microencapsulation market estimates & trend analysis by application (Pharmaceutical, household product, agrochemical, food additive, phase change material), by region (North America, Europe, Asia Pacific, RoW). And segment forecasts, 2014-2025*. Recuperado el 3 de marzo de 2017 de: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/microencapsulation-market>
- He, X., Hou, E., Liu, Y. y Wen, D. (2016). Altitudinal patterns and controls of plant and soil nutrient concentrations and stoichiometry in subtropical China. *Scientific reports*. (6)24261. 1-9. Doi: 10.1038/srep24261.
- Hernández, C., Ventura, I., Belmares, J., Contreras, J., Michelena, A. y Martínez, K. (2016). La microencapsulación de bioactivos para su aplicación en la industria. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*. (50)1. 12-19. ISSN: 0138-6204.
- Herrera, F., Betancur, D. y Segura, M. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutrición hospitalaria*. (29)1. ISSN: 1699-5198.
- Hidalgo, G. y Almajano, M. (2017). Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. *Pubmed Journals*. (6)1. 1-27. Doi: 10.3390/antiox6010007
- Jaakola, L. y Hohtola, A. (2010). Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, cell & environment*. (8)33. 1239-1247. Doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02154.x
- Jimenez, S., Guevara, R., Miranda, R., Feregrino, A., Torres, I. y Vazquez, M. (2012). Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: biochemistry, biotechnology and genomics. *Food research international*. (54)1. 1195-1207. Doi: 10.1016/j.foodres.2012.11.004
- Jovancevic, M., Balijagic, J., Menkovic, N., Savikin, K., Zdunic, G., Jankovic, T. y Dekic, M. (2011). Analysis of phenolic compounds in wild populations of

- bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) from Montenegro. *Journal of medicinal plants research*. (5)6. 910-914. ISSN: 1996-0875
- Kanti, B. y Syed, I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and celular longevity*. (2)5. 270-278. Doi: 10.4161/oxim.2.5.9498
- KRVG. (2017). *Global microencapsulation market estimated to reach USD 9,1 billion by 2022*. *Axion MRC*. Recuperado el 2 de marzo de 2017 de: <http://www.krgv.com/story/35175004/global-microencapsulation-market-estimated-to-reach-usd-91-billion-by-2022-axiom-mrc>
- León, H., Rodríguez, B., Rodríguez, E. y Díaz, C. (2009). Capacidad antioxidante de diferentes variedades de cebolla. *CyTA Journal of food*. (7)1. 53-58. Doi: 10.1080/11358120902850784
- Liang, N. y Kitts, D. (2014). Antioxidant property of coffe components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*. (19)11. 19180-19208. Doi: 10.3390/molecules191119180
- Litescu, S., Eremia, S. y Radu, G. (2010). Methods for the determination of antioxidant capacity in food and raw materials. *Advances in Experimental Medicine and biology*. (698). 241-249. Recuperado el 25 de julio de 2017 de: https://www.researchgate.net/publication/209388031_Methods_for_the_Determination_of_Antioxidant_Capacity_in_Food_and_Raw_Materials
- Llerena, W. (2014). *Estudio de la relación entre el color y el contenido de antioxidantes de seis frutas tropicales y andinas: Arazá (*Eugenia stipitata*), Mora (*Rubus glaucus*) variedad Iniap Andimora 2013, Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), Naranjilla (*Solanum quitoense*) variedad Iniap Quitoense 2009, Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) variedad Anaranjado Gigante y Uvilla (*Physalis peruviana* L.) variedad Golden Keniana*. Recuperado el 8 de febrero de 2017 de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3279>
- López, E., Pilatowsky, I., Cortés, F., Rojano, B. y Navarro, A. (2016). Effect of temperature on antioxidant capacity during drying process of mortiño

- (*Vaccinium meridionale* Swartz). *International Journal of Food Properties*. (20)2. 294-305. Doi: 10.1080/10942912.2016.1155601
- Magro, P., Stroschen, R., Martins, A., Jablonski, A., Hickmann, S., de Oliveira, A. y Vogt, E. (2014). Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and derived products. *Food Science and technology (Campinas)*. (4)4. 773-779. ISSN: 0101-2061.
- Market Research Store. (2016). *Microencapsulation Market for Pharmaceuticals, Household Products, Agrochemicals, Food Additives and Other Applications: Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis, Size, Share, Growth, Segment, Trends and Forecast, 2014 – 2020*. Recuperado el 28 de febrero de 2017 de: <http://www.marketresearchstore.com/report/microencapsulation-market-z47759>
- Martínez, N., Camacho, M. y Martínez, J. (2008). Los compuestos bioactivos en las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad dietética*. (12)2. 64-68. Doi: 10.1016/S1138-0322(08)75623-2
- Martz, F., Jaakola, L., Julkunen, R. y Stark, S. (2010). Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) leaves in Northern Europe following foliar development and along environmental gradients. *Journal of chemical ecology*. (36)9. 1017-1028. Doi: 10.1007/s10886-010-9836-9
- Mayorga, M. (2012). *Estudio del efecto de la deshidratación por aire sobre la capacidad antioxidante del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*. Recuperado el 22 de julio de 2017 de: http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/4988/1/51191_1.pdf
- Mendanha, D., Molina, S., Favaro, C., Mauri, A., Monterrey, E. y Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food research international*. (42)8. 1099-1104. Doi: 10.1016/j.foodres.2009.05.007
- Michalska, A. y Lysiak, G. (2015). Bioactive compounds of bilberries: Post-harvest factors influencing the nutritional value of products. *International*

- Journal of molecular sciences.* (16)8. 18642-18663. Doi: 10.3390/ijms160818642
- Milivojevic, J., Maksimovic, V., Nikolic, M., Bogdanovic, J., Maletic, R. y Milatovic, D. (2010). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of food quality.* (34)1. 1-9. Doi: 10.1111/j.1745-4557.2010.00360.x
- Omidi, J., Khorram, M. y Samimi, A. (2010). Combined method of complex coacervation and electrospray for encapsule preparation. *Journal of applied polymer science.* (117)1. 322-328. Doi: 10.1002/app.30988
- Parra, H. (2010). Revisión: Microencapsulación de alimentos. *Revista facultad nacional de agronomía.* (63)2. 5669-5684. ISSN: 0304-2847
- Pérez, A. (2012). Consumo de antioxidantes naturales de un grupo de pacientes que concurren a un consultorio cardiológico de un hospital público de Rosario. Recuperado el 8 de febrero de: <http://imgbiblio.vaneduc.edu.ar/fulltext/files/TC112327.pdf>
- Prior, R., Wu, X. y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry.* (53)10. 4290-4302. Doi: 10.1021/jf0502698
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen vegetal con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria.* (27)1. 76-89. ISSN: 0212-1611
- Rahimi, S. y Hasanloo, T. (2016). The effect of temperatura and pH on biomass and bioactive compounds production in *Silybum marianum* hairy root cultures. *Research journal of pharmacognosy.* (3)2. 53-59. Recuperado el 24 de julio de 2017 de: http://www.rjpharmacognosy.ir/article_13779_044e9357fa598603cd7298728a18253a.pdf
- Rieger, G., Muller, M., Guttenberger, H. y Bucar, F. (2008). Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *Journal of*

- agricultural and food chemistry*. (56)19. 9080-9086. Doi: 10.1021/jf801104e
- Rincón, M., Buitrago, C., Ligarreto, G., Torres, W. y Balaguera, H. (2012). Comportamiento del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) cosechado en diferentes estados de madurez y almacenado en refrigeración. *Revista facultad nacional de agronomía*. (65)2. Recuperado el 24 de julio de 2017 de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0304-28472012000200006&lng=es&nrm=.pf&tlng=es
- Rivera, C. y Rodríguez, M. (2010) *Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos*) Recuperado el 10 de febrero de 2017 de: <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp03c.pdf>
- Rodríguez, L., López, L. y García, M. (2010) Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintas frutas de consumo habitual en Colombia, Mora (*Rubus glaucus* B.), maracuyá (*Passiflora edulis* S.) Guayaba (*Psidium guajava* L.) y Papayuela (*Carica cundinamarcensis* J.). *Revista alimentos hoy*. (19)21. Recuperado el 23 de febrero de 2017 de: <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/45>
- Roldán, S. (2012) *Caracterización molecular, funcional y estudio de comportamiento post cosecha del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) de la comunidad de Quinticusig del cantón Sigchos de la provincia de Cotopaxi*. Recuperado el 12 de febrero de 2017 de: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/5738>
- Rothwell, J., Medina, A., Pérez, J., Neveu, V., Knaze, V., Slimani, N. y Scalbert, A. (2014). Effects of food processing on polyphenol contents: A systematic analysis using Phenol-Explorer data. *Molecular Nutrition & Food Research Journal*. (59)1. 160-170. Doi: 10.1002/mnfr.201400494.
- Ruiz, H. (2011). *Desarrollo de un vino de mortiño (Arándanos) en la Corporación Grupo Salinas de Ecuador*. Recuperado el 22 de febrero de 2017 de: <http://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/3447/577414.pdf?sequence=1>

- Saéncz, C., Tapia, S., Chávez, J. y Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*. (114)2. 616-622. Doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.095
- Sagis, L. (2015). *Microencapsulation and microspheres for food applications*. (1era Ed.) San Diego, Estados Unidos: Elsevier Inc.
- Shahidi, F. y Zhong, Ying. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European journal of lipid science and technology*. (112)9. 930-940. Doi: 10.1002/ejlt.201000044
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T. y Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International journal of molecular sciences*. (16)10. 24673-706. Doi: 10.3390/ijms161024673
- Soo, H. (2014). *Nano – and microencapsulation for foods*. (1era Ed.) West Sussex, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd.
- Taquichiri, M., Ayarde, R., Gutierrez, P., Bustos, A., Paredes, C., Callisaya, J., Surco, J., Palenque, E., Ghezzi, F., Alvarado, J. y Peñarrieta, M. (2014). High levels of resveratrol in grapes cultivated at high altitude valleys in Bolivia. *International journal of fruit sciences*. (14)3. 311-326. Doi: 10.1080/15538362.2013.819748
- Trindade, R. y Zapata, C. (2015). Microencapsulation by spray-drying of bioactive compounds extracted from blackberry (*rubus fruticosus*). *Journal of food science and technology*. (53)3. 1515-1525. Recuperado el 3 de marzo de 2017 de: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13197-015-2111-x>
- Trujillo, D. (2008). *Cultivo in vitro del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*. Recuperado el 22 de febrero de 2017 de de: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/794>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, (2)12. 1231-1246. Doi: 10.3390/nu2121231
- Tupuna, D., Vera, E. y Ruales, J. (2016) *Obtención de Jugo Clarificado de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) mediante el uso de tecnología de membranas*. Recuperado el 8 de febrero de 2017 de:

http://www.revistapolitecnica.epn.edu.ec/ojs2/index.php/revista_politecnica2/article/view/641/pdf

- Valls, V. (2003). *El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal*. Recuperado el 25 de julio de 2017 de: http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista_agosto_03/Funcionales/vegetales,vitaminas,polifenoles.pdf
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J. y Eldin, A. (2009) Chemical Composition and Phenolic compound profile of Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (57)18. (8274-8281). Doi: 10.1021/jf9013586
- Vasquez, M., Jimenez, S., Torres, I., Guzman, S., Guevara, R. y Miranda, R. (2012). Effect of maturity stage and storage on flavor compounds and sensory description of *Berrycactus* (*Myrtillocactus geometrizans*). *Journal of food science*. (77)4. 1-8. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02621.x.
- Zafra, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, J. y Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanin as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular nutrition & food research*. (51)6. 675-683. Doi: 10.1002/mnfr.200700002
- Zapata, K., Piedrahita, A., Alzate, A., Cortés, F. y Rojano, B. (2015). Estabilización oxidativa del aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) con suspensiones de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Revista ciencia en desarrollo*. (6)2. 141-153. ISSN: 0121-7488
- Zapata, S., Piedrahita, A. y Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en nutrición humana*. (16)1. 25-36. ISSN: 0124-4108

ANEXOS

Anexo 1. Resultados certificados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP

MPC-LSAIA-2201-04



INIAP

INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y CALIDAD
LABORATORIO DE SERVICIO DE ANALISIS E INVESTIGACION EN ALIMENTOS
 Panamericana Sur Km. 1, Cullungayutte, 2690691-3007134- Fax: 3007134
 Casilla postal 17-01-340



LSAIA/INICIBESC

INFORME DE ENSAYO No: 17-025

NOMBRE PETICIONARIO: Sra. Cristina Guerra
DIRECCION: Quito
FECHA DE EMISION: 24 de abril de 2017
FECHA DE ANALISIS: Del 7 al 28 de febrero de 2017

INSTITUCION: Particular
ATENCION: Sra. Cristina Guerra
FECHA DE RECEPCION: 07/02/2017
HORA DE RECEPCION: 10H165
ANALISIS SOLICITADO: Polifenoles totales, flavonoides, antocianinas

ANALISIS	POLIFENOLES	FLAVONOIDES	ANTOCIANINAS	IDENTIFICACION
METODO	MD-LSAIA-31			
METODO REF.	CHOS E Y MARRODO G. (1982:1873)			
UNIDAD	mg/Lc Galico/g	mg catequina/g	mg cianidina-3- glucosido cloruro/100g	
17-0237	66,83	38,20	3663,39	Morriño M1
17-0238	45,83	25,58	3046,54	Morriño M2
17-0239	55,22	29,96	2969,53	Morriño M3

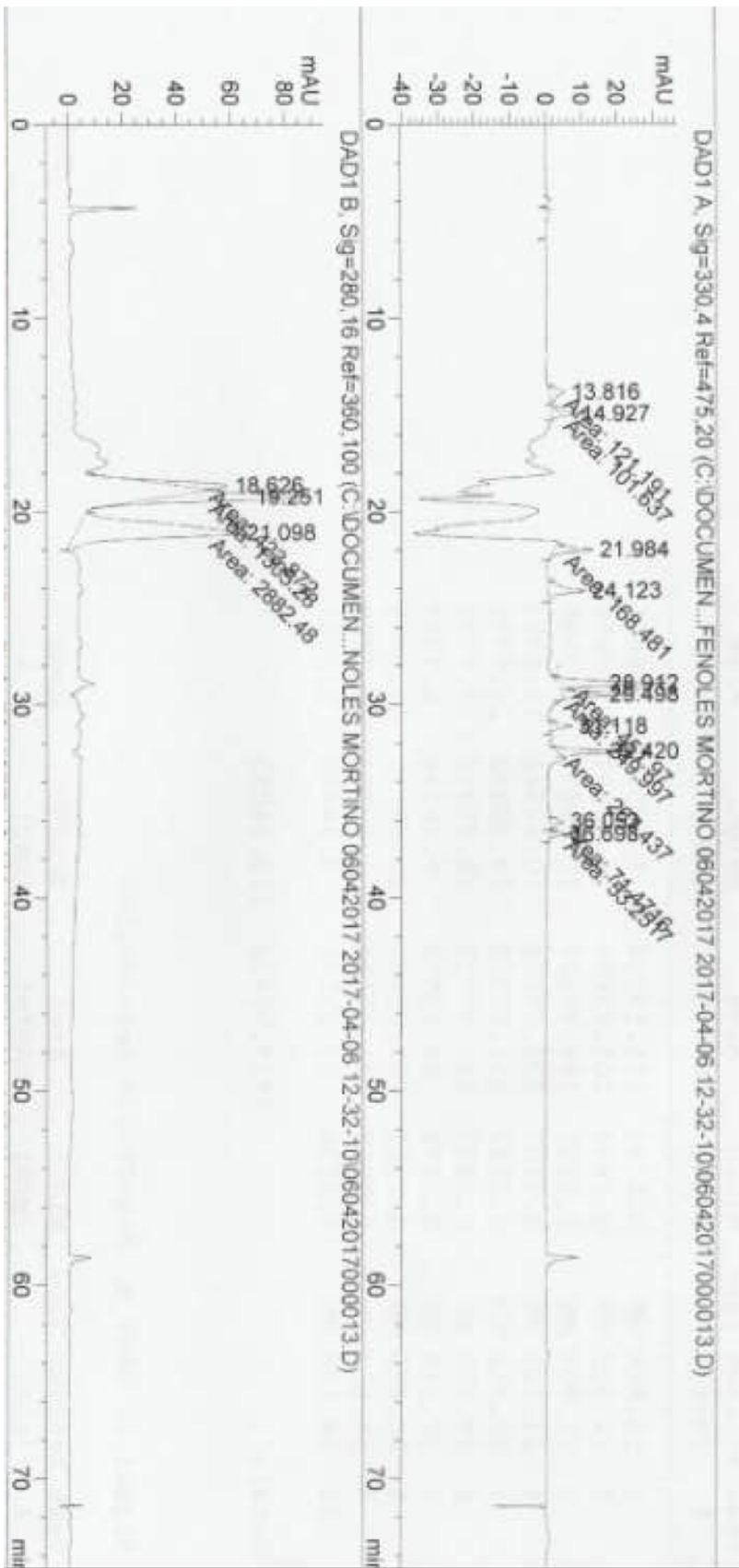
Los ensayos marcados con 12 se reportan en base seca.
 OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente

RESPONSABLES DEL INFORME

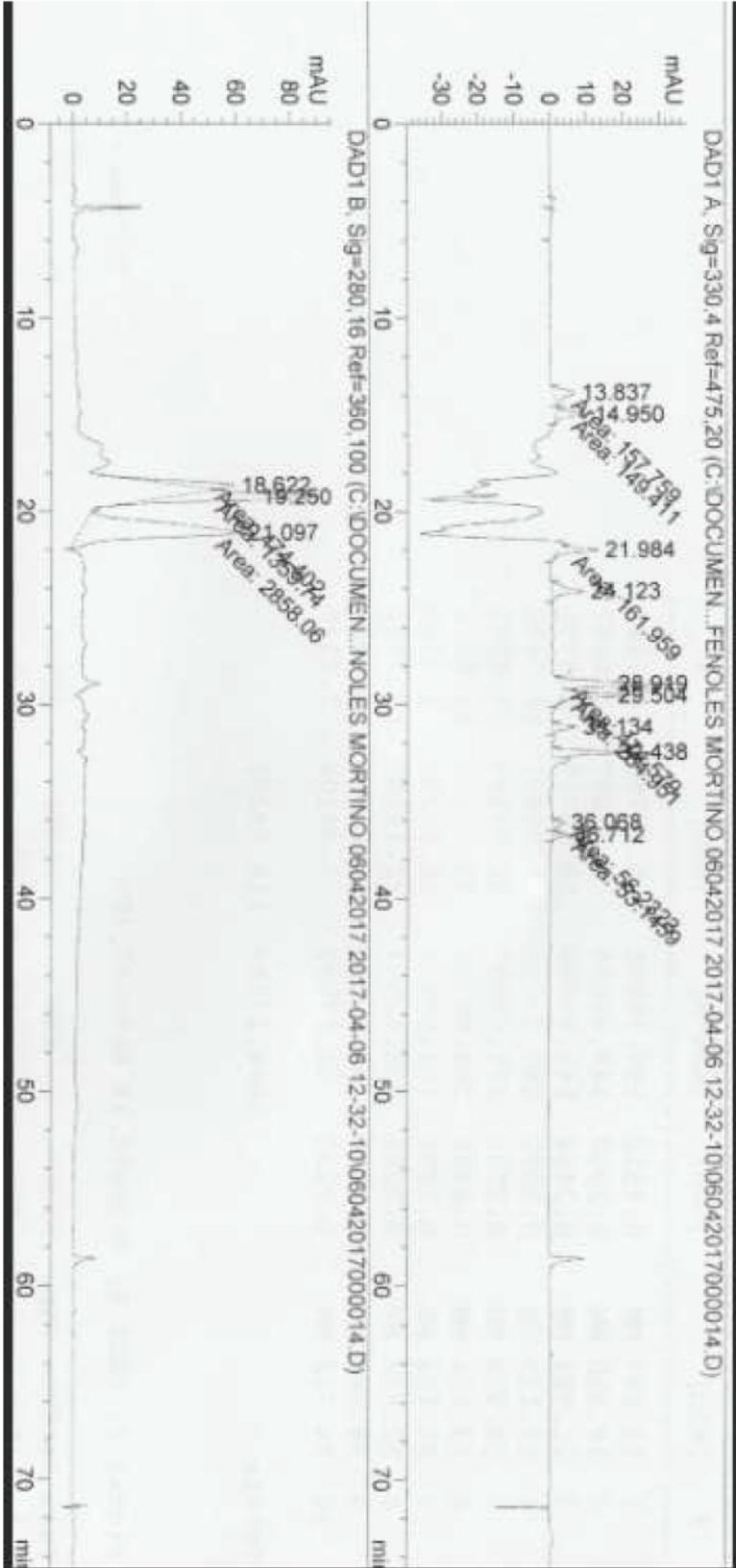
Dr. Ivan Salas, M.Sc.
 RESPONSABLE TECNICO



Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
 Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo.
 NOTA DE DESCARGA: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial, está dirigida únicamente al solicitante de la misma y solo podrá ser usada por esta. Si el lector de este correo electrónico o fax no es el destinatario del mismo, se le ruega que cualquier copia o distribución de este se encuentre totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.



(b)



(c)

