

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias e Ingenierías**

**Microencapsulación de Antocianinas de Mortiño  
(*Vaccinium floribundum*) utilizando una combinación de  
Alginato y Pectina  
Sistematización de experiencias prácticas de investigación y/o intervención**

**Luis Estuardo Cajiao Orellana  
María José Luna Guillén**

**Ingeniería en Alimentos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Alimentos

Quito, 8 de mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍAS

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Microencapsulación de Antocianinas de Mortiño (*Vaccinium floribundum*)  
utilizando una combinación de Alginato y Pectina**

**Luis Estuardo Cajiao Orellana**

**María José Luna Guillén**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

José Francisco Álvarez Barreto, Ph.D.

Nombre del profesor, Título académico

Lucía de los Ángeles Ramírez  
Cárdenas, Ph.D.

Firma del profesor

---

Firma del profesor

---

Quito, 8 de mayo de 2019

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Luis Estuardo Cajiao Orellana

Código: 00118355

Cédula de Identidad: 1722370929

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: María José Luna Guillén

Código: 00109627

Cédula de Identidad: 1714500749

Lugar y fecha: Quito, 8 de mayo de 2019

## RESUMEN

El mortiño (*Vaccinium floribundum*) es un fruto de la sierra del Ecuador con un alto contenido de compuestos fenólicos sensibles a factores extrínsecos, como la temperatura y el pH. La microencapsulación con pectina y alginato, podría atrapar antocianinas en hidrogeles y mantener su actividad. El objetivo de este trabajo fue encapsular antocianinas utilizando una mezcla polimérica en diferentes concentraciones y composiciones (Pectina:Alginato) para mejorar la estabilidad, liberación en el tiempo, y estudiar su potencial aplicación en alimentos de acidez intermedia, como el yogurt. Para ello, se utilizaron dos diseños completamente aleatorizados (DCA) con arreglos factoriales 3x3x4 para evaluar la estabilidad de las micropartículas mediante un análisis de peso perdido, y un arreglo 5x2x3 para determinar el porcentaje de liberación de antocianinas encapsuladas por medio de espectrofotometría. También se realizó un análisis morfológico de las microcápsulas aplicando microscopía electrónica de barrido. Después de realizar un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de diferencia de medias de Tukey a un nivel de confianza del 95 % ( $p < 0.05$ ), se encontró que las cápsulas con menor estabilidad fueron las de composición 75:25 y las de mayor estabilidad fueron de 50:50. Por otro lado, para la liberación de antocianinas, no se encontró diferencia significativa entre las composiciones utilizadas, pero sí en la concentración de polímero, siendo las de 2 % (p/v) las que liberaron la menor cantidad de antocianinas en el tiempo. Estos resultados, demostraron la factibilidad de la encapsulación para el uso en fuentes alimenticias de acidez intermedia (yogurt), otorgándoles características funcionales.

**Palabras clave:** antocianinas, microencapsulación, hidrogeles, pectina, alginato

## ABSTRACT

Andean blueberry (*Vaccinium floribundum*) is a fruit of the highlands of Ecuador with a high content of phenolic compounds sensitive to extrinsic factors, such as temperature and pH. The microencapsulation with pectin and alginate, encapsulate anthocyanins in hydrogels and maintain their functional activity. The objective of this work was to encapsulate anthocyanins using a polymer mixture in different concentrations and compositions (Pectin:Alginate) to improve stability, release over time, and study their potential application in intermediate acidity foods, such as yogurt. For this, two completely randomized designs (DCA) with 3x3x4 factorial arrangements were used to evaluate the stability of the microparticles by a lost weight analysis, and a 5x2x3 arrangement to determine by spectrophotometry, the percentage of encapsulated anthocyanins released. A morphological analysis of the microcapsules was performed by scanning electron microscopy. After performing a variance analysis (ANOVA) and Tukey's mean difference test at a confidence level of 95 % ( $p < 0.05$ ), it was found that the 75:25 capsules were the least stables and 50:50 capsules were the most stables. On the other hand, for the release of anthocyanins, no significant difference was found between the compositions used. Nevertheless, the polymeric concentration was significant, being the 2 % capsules (w/v), the ones with the least amount of anthocyanins released over time. These results demonstrated the feasibility of encapsulation for use in food sources of intermediate acidity (yogurt), giving them functional characteristics.

**Key words:** anthocyanins, microencapsulation, hydrogels, pectin, alginate

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN .....	10
METODOLOGÍA.....	13
1. Materiales.....	13
2. Diseño experimental .....	13
3. Extracción de antocianinas de mortiño .....	14
4. Cuantificación de antocianinas .....	15
5. Cálculo de la concentración de antocianinas con base en el método de estándar externo.....	16
6. Análisis de datos .....	17
7. Formación de microcápsulas.....	17
8. Formación de microcápsulas con extracto de antocianinas .....	18
9. Microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
1. Cuantificación de antocianinas .....	20
2. Estabilidad de las micropartículas en un medio simulado .....	21
3. Curvas de calibración por el método de estándar externo .....	25
4. Eficiencia de encapsulación y liberación acumulativa de antocianinas.....	28
5. Evaluación morfológica de las microcápsulas .....	32
CONCLUSIONES .....	35
RECOMENDACIONES .....	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS .....	42

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Peso perdido por las microcápsulas en el tiempo, con diferentes concentraciones poliméricas y composición P:A .....	25
Tabla 2. Eficiencia de encapsulación de antocianinas a diferentes concentraciones poliméricas y composiciones .....	29
Tabla 3. Liberación acumulativa en el tiempo de antocianinas a partir de microcápsulas con diferentes concentraciones poliméricas y composición P:A.....	32

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala de madurez del mortiño ( <i>Vaccinium floribundum</i> ) .....	13
Figura 2. Diagrama de flujo de extracción de antocianinas de mortiño ( <i>Vaccinium floribundum</i> ) .....	15
Figura 3. Pérdida de peso de microcápsulas en el tiempo, elaboradas con diferentes composiciones P:A, con concentración de a) 1 %, b) 2 % y c) 3 % (p/v) .....	24
Figura 4. Barrido espectral para determinación de longitud de onda máxima para el extracto de antocianinas de mortiño ( <i>Vaccinium floribundum</i> ) .....	26
Figura 5. Curva de calibración Absorbancia vs. Concentración a longitudes de onda, $\lambda$ , de a) 513.5 nm, b) 492 nm y c) 540 nm .....	28
Figura 6: Liberación acumulativa en el tiempo de antocianinas a partir de microcápsulas elaboradas con diferentes composiciones P:A, con concentración de a) 1 % y b) 2 % (p/v) ..	31
Figura 7: Micrografía electrónica (2000x) de microcápsulas elaboradas a diferentes concentraciones y proporciones P:A (Barra de calibración:10 $\mu$ m) .....	34



## ANEXOS

Anexo 1. Análisis de Varianza (ANOVA) del peso perdido por las microcápsulas en el tiempo, con diferentes concentraciones poliméricas y composición P:A .....	42
Anexo 2. Análisis de Varianza (ANOVA) de liberación acumulativa en el tiempo de antocianinas a partir de microcápsulas con diferentes concentraciones poliméricas y composición P:A .....	42

## INTRODUCCIÓN

En Ecuador se han identificado tres especies de mortiño, *Vaccinium floribundum*, *Vaccinium distichum* y *Vaccinium crenatum*, que se encuentran en zonas de la sierra y oriente, siendo la primera especie la de mayor distribución (Pérez, 2007). Este fruto puede inhibir la oxidación de lípidos y proteínas debido a la presencia de compuestos fenólicos, como las antocianinas, cuyos extractos alcohólicos han demostrado un efecto antimicrobiano sobre cepas de *Streptococcus mutans*, causantes de las caries dentales (Jácome, 2016).

Las antocianinas son pigmentos que se presentan desde tonalidades rojas hasta violetas, de acuerdo al pH al que se encuentran (Avendaño & López, 2013). Schreckinger (2010), caracterizó las antocianinas de muestras de polvo comercial de mortiño (*Vaccinium floribundum*) y de bayas liofilizadas, identificándose cinco tipos principales: delfinidina 3-galactosida, cianidina-3-galactosida, delfinidina-3-arabinosa, cianidina-3-glucósida y cianidina-3-arabinosa. La mayor proporción fue para delfinina-3-arabinosa con 42.45 % y cianidina-3-arabinosa con 31.25 %.

Se ha confirmado su poder antioxidante, siendo pH 1 el ideal para inhibir radicales libres y evitar la oxidación de LDL (Low density lipids), promoviendo la salud cardiovascular. Sin embargo, su incorporación en alimentos procesados es limitada debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento. Algunos factores como la estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz afectan las propiedades de estos flavonoides (Garzón, 2008). Estas limitaciones se pueden superar parcialmente aplicando tecnologías como la microencapsulación, que las protege de las condiciones desfavorables y aumentan su disponibilidad y acción en períodos prolongados de almacenamiento. De este modo, se podría aplicar en alimentos procesados como el yogurt, que, debido a su pH, ayudaría a

mantener la estabilidad de las antocianinas y sería potencializado con la microencapsulación de estos antioxidantes.

La microencapsulación es un proceso en el que un compuesto de interés es atrapado en un agente encapsulante. Las microcápsulas ayudan a crear una barrera funcional y protectora del núcleo de factores como calor y humedad, permitiendo mantener su estabilidad, viabilidad, valor nutritivo y apariencia del producto (Yáñez, 2013). Existe gran interés en pigmentos naturales y antioxidantes por la demanda de productos alimenticios saludables, y es por esto que la industria requiere de tecnologías que conserven estos pigmentos debido a su alta inestabilidad (Cano, 2011).

La pectina es un tipo de fibra soluble que se encuentra presente en la pared celular de las plantas y en mayor concentración en las cáscaras de las frutas (Pereira et al., 2016). En la industria se aprovecha sus características gelificantes, emulsificantes y espesantes. Se clasifican en pectinas de alto metoxilo y bajo metoxilo, dependiendo del grado de esterificación, que es determinado por el contenido de grupos metoxilo presentes en la composición de la pectina. Las pectinas de alto metoxilo forman geles en presencia de azúcar y ácido, mientras que las de bajo metoxilo requieren la presencia de calcio para la formación del gel (Boatella, 2014). Debido a su bajo costo, la pectina puede sustituir a la goma arábiga, ya que, su capacidad de gelificación es ideal para formar hidrogeles biodegradables, películas y recubrimientos para propósitos de microencapsulación (Humblet, 2011).

Por otra parte, los alginatos son polisacáridos presentes en las algas marinas formados por dos ácidos,  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico ordenados en bloques con secciones alternadas de cada uno. La estructura química del alginato permite formar geles por entrecruzamiento catiónico. Esto se debe a la unión de dos cadenas de bloques de ácido gulurónico que forman bucles entre ellas, dejando lugar para que interactúe un catión

divalente. A la vez, los grupos carboxílicos y átomos de oxígeno electronegativos del alginato permiten el enlazamiento con el catión (como  $\text{Ca}^{2+}$ ), que solidifican la solución de alginato formando el gel (González, 2009). Por esto, son utilizados en postres, productos de panadería, helados, bebidas y geles de repostería (Avendaño & López, 2013).

Actualmente, una alternativa muy utilizada y económica para la microencapsulación de sustancias es el uso de polímeros como el alginato y la pectina (Ersus & Yurdagel, 2007). En un estudio realizado por Singh (2018), se microencapsuló  $\alpha$ -tocoferol con diferentes composiciones de alginato y pectina, con una eficiencia de encapsulación del 55.97 %, mejorando la estabilidad y viabilidad de esta vitamina. Jaya (2009) analizó los efectos de diferentes concentraciones de alginato y pectina en la microencapsulación y liberación de fármacos en medios ácidos, y observó que la combinación de estos polímeros creó matrices óptimas para la liberación controlada de ácido acetilsalicílico (aspirina).

Debido a las propiedades de estos polímeros y la amplia disponibilidad de fuentes de pectina en Ecuador, el presente proyecto tuvo como objetivo estudiar la microencapsulación de antocianinas de mortiño en matrices de pectina y alginato con diferentes concentraciones y composiciones (P:A) y su liberación controlada en un medio que simule las condiciones de temperatura y acidez, para la aplicación en yogurt.

# METODOLOGÍA

## 1. Materiales

El mortiño (*Vaccinium floribundum*) se obtuvo de un mercado local (mercado Ñaquito) de la ciudad de Quito. Se eligieron los frutos en buen estado, sin daños en la superficie, y con un grado de madurez entre 4 y 5, de acuerdo a la escala presentada en la Figura 1. Se escogió este grado de madurez porque la cantidad de compuestos fenólicos incrementa en frutos maduros (Coba et al., 2012). Para la elaboración de microcápsulas se utilizó pectina cítrica distribuida por LAQUIN CIA. LTDA y alginato de sodio de grado alimentario con 91 % de pureza, marca Loba Chemie.

Los reactivos químicos utilizados fueron HCl en solución acuosa 37 % (MW 36.458 g/mol), NaOH en pellets (MW 39.997 g/mol) y CaCl<sub>2</sub> dihidratado (MW 147.01 g/mol) marca Fisher Scientific International, Inc.

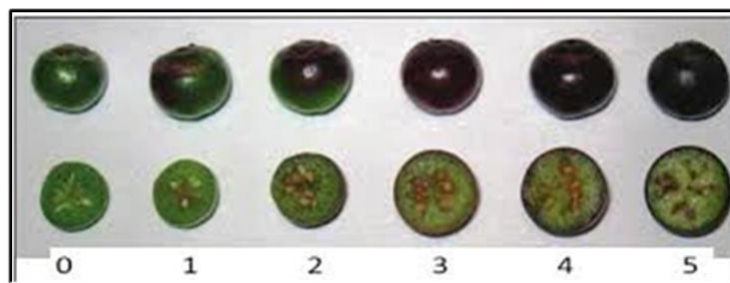


Figura 1. Escala de madurez del mortiño (*Vaccinium floribundum*)

Fuente: (Buitrago, 2014)

## 2. Diseño experimental

Para la formación de microcápsulas se aplicó un Diseño Completamente Aleatorizado con arreglo factorial 3x3x4 correspondiente a la combinación de los factores: tiempo (1, 2 y 5 días), concentración polimérica (1, 2, 3 % (p/v)) y

composición pectina:alginato (P:A) (75:25, 50:50, 25:75 y 0:100). Se realizaron cinco repeticiones, obteniéndose 180 unidades experimentales y se evaluó el porcentaje de pérdida de peso, como variable de respuesta.

Asimismo, se utilizó un Diseño Completamente al azar con arreglo factorial 5x2x3 con cuatro repeticiones (120 unidades experimentales) para evaluar el porcentaje de liberación de antocianinas encapsuladas. Los factores estudiados fueron: tiempo (30, 60, 120, 300 y 1440 minutos), concentración polimérica (1 y 2 % p/v) y composición P:A (75:25, 50:50 y 0:100).

### **3. Extracción de antocianinas de mortiño**

Se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Bonilla (2008). En la Figura 2, se muestra un diagrama de flujo de la extracción de antocianinas. Se pesó el mortiño en una balanza (Mettler Toledo PB3002-S  $\pm$  0,1) y se trituró en un procesador de alimentos (Continental Electric modelo CE22361) durante 5 minutos hasta obtener 100 g de una pasta homogénea. Esta pasta fue colocada en un erlenmeyer y se añadieron 400 ml de etanol al 20 %, previamente acidificado con HCl hasta un pH 1. La mezcla se agitó durante 20 segundos y se introdujo en la estufa (ECOCELL LSIS-B2V / EC 111) a 60 °C durante 4 horas. Finalmente, se filtró en papel filtro sin cenizas (Macherey Nagel MN 640 w, diámetro 125 mm) y se concentró el extracto utilizando un rotavapor (Büchi R-200) a 54°C y 15 inHg de presión por 4 horas.

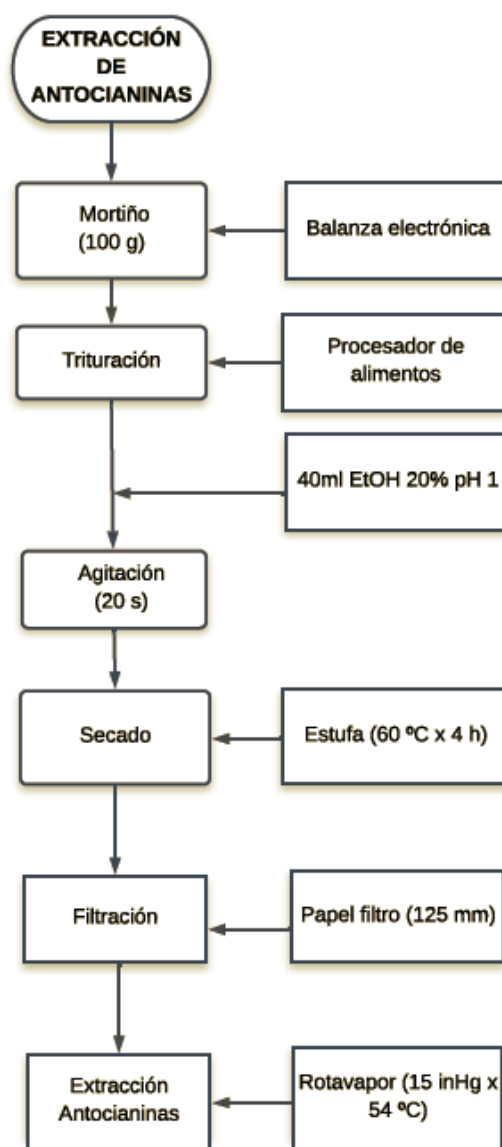


Figura 2. Diagrama de flujo de extracción de antocianinas de mortiño (*Vaccinium floribundum*)

#### 4. Cuantificación de antocianinas

Las antocianinas se cuantificaron de acuerdo al método de pH diferencial, que consistió en preparar un buffer pH 1.0 de cloruro de potasio (KCl 0.025M) y un buffer pH 4.5 de acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.4M). Se tomaron alícuotas de la muestra de antocianinas y se aforó con las soluciones buffer en balones de 50 ml. Al final, se obtuvieron dos diluciones de la muestra de antocianinas (una con cada buffer)

y se realizaron las mediciones de absorbancia a dos longitudes de onda específicas (AOAC, 2016).

Las lecturas de las absorbancias de las soluciones preparadas se realizaron a 520 y 700 nm, en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 30) y la absorbancia final fue medida contra un blanco y calculada con la fórmula (1).

$$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH \ 1,0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH \ 4,5} \quad (1)$$

La concentración de pigmentos monoméricos en el extracto se obtuvo con la fórmula (2) y se expresó en mg de cianidin-3-glucósido / 100 g de mortiño (PM: 449.2;  $\epsilon$ : 26900 (Kuskoski, 2005)), y se calculó en función del volumen de extracto y el peso de la muestra.

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/100 g)} = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times 1} \quad (2)$$

A: absorbancia calculada en (1); PM: peso molecular; FD: factor de dilución;

$\epsilon$ : coeficiente de absortividad molar.

## 5. Cálculo de la concentración de antocianinas con base en el método de estándar externo

Para el cálculo de liberación controlada en el tiempo y eficiencia de encapsulación de antocianinas fue necesario realizar curvas de calibración para emplear el método de estándar externo utilizando patrones de antocianinas con concentraciones conocidas.



Se hizo un barrido espectral en el extracto de antocianinas de mortiño utilizando un espectrofotómetro (CECIL CE 2041), para obtener la longitud de onda donde se observa la máxima absorbancia. Se realizaron diluciones en porcentajes (100, 75, 50, 25 y 10) del extracto de antocianinas en el medio simulado, se colocaron en celdas de cuarzo de 2 ml y se midieron las absorbancias para obtener la curva de calibración a la longitud de onda conseguida en el barrido.

El método se adaptó a un lector de microplacas (SEAC Sirio-S) de longitudes de onda estándar ( $\lambda = 492$  nm y  $\lambda = 540$  nm). Para esto, se colocaron 50  $\mu$ l de las diluciones en microplacas de 96 pocillos, y se midieron las absorbancias a ambas longitudes de onda. De estas se obtuvieron dos curvas de calibración. Luego, otras soluciones de concentraciones conocidas se analizaron a ambas longitudes de onda a fin de determinar cuál de las dos curvas era más apropiada para la estimación directa de concentración de antocianinas. Esta sería luego utilizada en los ensayos de liberación para estimar el porcentaje acumulativo de extracto liberado (Sección 3.4).

## **6. Análisis de datos**

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) y prueba de diferencias de medias de Tukey, utilizando el software Minitab (Minitab versión 18, Minitab Inc., USA). Se utilizó un nivel de confianza del 95 % ( $p < 0.05$ ).

## **7. Formación de microcápsulas**

Se prepararon soluciones de una mezcla polimérica a concentraciones 1, 2 y 3 % (p/v) con diferentes composiciones P:A (100:0; 75:25; 50:50; 25:75 y 0:100) a pH 7. Se tomó 50  $\mu$ l de las soluciones con una micropipeta y se colocó en placas con pocillos

de 10 ml con una solución de  $\text{CaCl}_2$  1M para formar las microcápsulas. Las placas se colocaron a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 h y el producto formado se pesó en una balanza analítica (RADWAG AS 60/220.R2), estableciendo el peso como punto de partida ( $t = 0$ ). Las microcápsulas se transfirieron a placas de 6 pocillos con 10 ml con medio simulado de yogurt (agua destilada a pH 4 y temperatura  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) para ser pesadas en los días 1, 2, y 5. El porcentaje de pérdida de peso fue calculado en función del tiempo con la fórmula (3).

$$\text{Peso perdido (\%)} = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \times 100 \quad (3)$$

donde,  $P_0$  es el peso inicial y  $P_f$  el peso medido a los días 1, 2, y 5.

## 8. Formación de microcápsulas con extracto de antocianinas

Con una micropipeta se colocaron  $700\text{ }\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  en tubos de ensayo de vidrio de 5 ml (previamente cubiertos con papel aluminio) y  $300\text{ }\mu\text{l}$  de extracto de mortiño y se mezclaron en un homogeneizador Vortex. Por último, se añadieron  $200\text{ }\mu\text{l}$  de las soluciones de mezclas poliméricas con las diferentes relaciones P:A (75:25, 50:50 y 0:100), con un pH 7, en concentraciones de 1 y 2 % (p/v). Se permitió el entrecruzamiento por 5 minutos, y las microcápsulas formadas se transfirieron a una placa de 96 pocillos con  $100\text{ }\mu\text{l}$  de medio simulado de yogurt, que fue analizado espectrofotométricamente, en el lector de microplacas, a los 30, 60, 120, 300 y 1440 minutos. La absorbancia de la solución de  $\text{CaCl}_2$  y extracto resultante después de la encapsulación se utilizó para determinar la eficiencia de encapsulación, por medio de la fórmula (4):

$$\text{Encapsulación (\%)} = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100 \quad (4)$$

donde,  $C_0$  es la concentración inicial de antocianinas y  $C_f$  es la concentración de antocianinas no encapsuladas, luego del proceso de encapsulación.

La cinética de liberación se presenta como el porcentaje acumulado de liberación (calculado a través de la curva de liberación de la sección 3.4) en el tiempo.

## **9. Microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés)**

Se formaron cápsulas por triplicado, añadiendo 80  $\mu$ l de las soluciones poliméricas (75:25, 50:50 y 0:100) al 1 y 2 % (p/v) y 800  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$ . Después de una hora, las microcápsulas formadas se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se congelaron. A las 12 horas, las muestras deshidratadas en un liofilizador (BIOBASE BK-FD10P) fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-IT300LA) utilizando 50.0 Pa de presión y un voltaje de 10.0 kV.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. Cuantificación de antocianinas

La primera parte del estudio tuvo como propósito la extracción y cuantificación de antocianinas del mortiño, para luego encapsular una concentración conocida y determinar la liberación acumulativa en el tiempo. El contenido de antocianinas calculado para la fruta en un estado de madurez entre 4 y 5 (Figura 1) del mortiño fue de 140.27 mg/100 g fruta. Este valor se encuentra en el rango previamente reportado por Montoya et al. (2012), quienes cuantificaron el contenido de este compuesto entre 0.42 mg/100 g y 271.9 mg/100g y determinaron que las antocianinas se encuentran en la cáscara y mesocarpio y la cantidad depende de la diversidad genética del fruto y el estado de madurez, siendo este el principal determinante y encontrándose en mayores cantidades en los frutos más maduros. Por otra parte, Schreckinger et al. (2011), presentaron valores del contenido total de antocianinas de 10.6 mg/g y 3.4 mg/g en muestras de bayas liofilizadas y polvo de mortiño, respectivamente. Esto indica que el procesamiento en alimentos reduce significativamente el contenido de antocianinas en el producto. Por lo tanto, la extracción a partir del fruto fresco es apropiada para este tipo de procesos.

Vasco (2009), expresó la cuantificación de antocianinas con base en el área de los picos de longitud de onda de absorción como glucósidos de cianidinas y delphininas. En el grupo de cianidinas se mencionan la cianidina galactosida, cianidina glucósida y cianidina arabinosa, mientras que en las delphininas están la galactosida y arabinosa.

## 2. Estabilidad de las micropartículas en un medio simulado

La estabilidad de micropartículas en el medio simulado de yogurt se realizó con la finalidad de escoger las mejores formulaciones para la encapsulación y liberación de antocianinas (Sección 3.4). Las que presentaban menor pérdida de peso en el tiempo, eran las que menos se degradaban y por ello podían ofrecer mejor estabilidad en el producto.

En la Figura 3, se observan las curvas de estabilidad de las partículas. Se puede apreciar que las cápsulas con una concentración polimérica 1 % presentaron la mayor pérdida en los días 1, 2 y 5 para las diferentes composiciones P:A, en comparación con las cápsulas 2 y 3 % ( $p < 0.05$ ). La pérdida de peso máxima se obtuvo en las cápsulas de composición 75:25, mientras la menor pérdida se registró en la composición 50:50, para los tres casos de concentración polimérica estudiados. Visualmente, en el desarrollo de hidrogeles se observó que las cápsulas que tenían mayor contenido de pectina en su composición eran más grandes, mientras que las que tenían mayor contenido de alginato fueron más pequeñas.

El tamaño de las microcápsulas tiene influencia directa sobre su permeabilidad, aumentando la pérdida de peso. Según Munarin (2010), las microcápsulas con base en alginato difieren significativamente de aquellas con pectina en tamaño y forma. Varios estudios muestran que el alginato y la pectina interactúan sinérgicamente entre sí para formar hidrogeles mixtos que tienen microestructuras diferentes a los formados por los biopolímeros individuales (Chen et al., 2018). Los diámetros de cápsulas de pectina tienen un rango desde 500-900  $\mu\text{m}$ , que dificulta la formación de esferas estables y al cabo de algunas horas estas llegan a perder su morfología hasta degradarse a un gel deforme. Otro factor que influye en el tamaño de partículas, según Chen (2018), es el tipo de instrumento que se utiliza para formar los microgeles. En su investigación se

obtuvo una correlación de 0.991 entre el diámetro del microgel y el de la boquilla del instrumento para encapsular. También se ha reportado un aumento del tamaño de microgeles de alginato de calcio cuando se aumenta el tamaño de la boquilla utilizando un método de goteo (Davarci et al., 2017). En el presente trabajo, al utilizar una punta de micropipeta, fue difícil controlar este parámetro, lo que pudo haber resultado en una gran variabilidad evidenciada en los datos de estabilidad.

Como se puede observar en la Tabla 1 y Anexo 1, el tiempo, la concentración polimérica y la composición P:A de las cápsulas influyeron significativamente en la pérdida de peso ( $p < 0.05$ ). A medida que se incrementaba la concentración polimérica, la pérdida de peso disminuía y aumentaba significativamente en el tiempo, lo que indica que las cápsulas se van degradando lentamente, hasta llegar, en muchos casos, a un equilibrio.

La pectina, al ser metoxilada tiene menor cantidad de grupos carboxílicos (COOH). A pH neutro, estos ácidos se transforman en carboxilatos cargados negativamente (COO<sup>-</sup>), lo cual permite la interacción con una de las cargas positivas del calcio (Ca<sup>2+</sup>) y la formación de geles. Sin embargo, al tratarse de una pectina de alto grado de metoxilación, la interacción entre cargas es menor, obteniendo una baja estabilidad en gel formado (Wang et al., 2019). Por otro lado, el alginato tiene mayor cantidad de carboxilatos disponibles para la interacción, por lo que se tendrían geles más estables en el tiempo (Liling et al., 2016). Esto fue evidente en las microcápsulas al 1 % (p/v) con composición 75:25, ya que, al haber menos moléculas por volumen, este efecto fue menos significativo, que en aquellas de 2 y 3 % respectivamente.

A pesar que las cápsulas de alginato tienden a formar geles más estables, en Ecuador la producción de algas marinas pardas (fuente de extracción de alginatos) es prohibida por considerarse especies invasivas (Ocaña, 2016). Por otro lado, las fuentes

de pectina son muy abundantes en los desechos de frutas alrededor del país, por lo que la incorporación de pectina en la mezcla fue importante en este estudio. Para observar las diferencias en la liberación acumulativa de antocianinas, se utilizaron las microcápsulas con una concentración del 1 y 2 % (p/v) para evaluar las diferencias de cápsulas con mayor, igual y menor composición de pectina (75:25, 50:50 y 0:100).

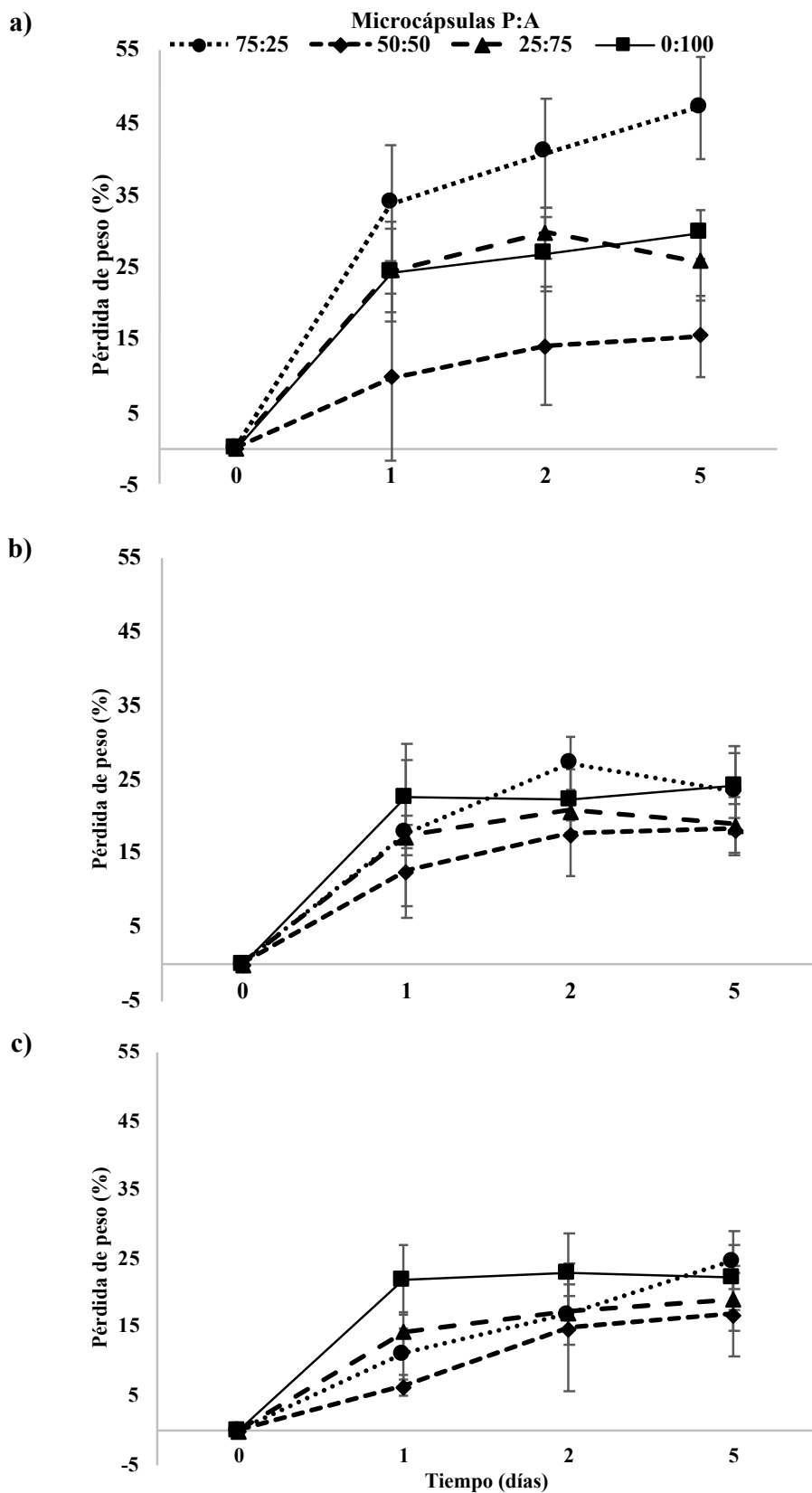


Figura 3. Pérdida de peso de microcápsulas en el tiempo, elaboradas con diferentes composiciones P:A, con concentración de a) 1 %, b) 2 % y c) 3 % (p/v)



Tabla 1. Peso perdido por las microcápsulas en el tiempo, con diferentes concentraciones poliméricas y composición P:A

Tiempo (días)	Composición (P:A)	Concentración polimérica (%)		
		1	2	3
1	75:25	(28.07±1.56) <sup>aAz</sup>	(10.98±2.09) <sup>bAz</sup>	(11.78±3.87) <sup>cAz</sup>
	50:50	(17.94±2.27) <sup>aCz</sup>	(8.60±3.63) <sup>bCz</sup>	(5.70±0.76) <sup>cCz</sup>
	25:75	(20.47±1.39) <sup>aBz</sup>	(15.76±1.06) <sup>bBz</sup>	(15.23±1.05) <sup>cBz</sup>
	0:100	(26.20±1.56) <sup>aAz</sup>	(24.22±0.73) <sup>bAz</sup>	(18.77±2.58) <sup>cAz</sup>
2	75:25	(35.47±0.90) <sup>aAy</sup>	(25.00±2.51) <sup>bAy</sup>	(19.27±2.54) <sup>cAy</sup>
	50:50	(15.64±1.84) <sup>aCy</sup>	(15.62±7.12) <sup>bCy</sup>	(10.94±5.87) <sup>cCy</sup>
	25:75	(27.21±1.35) <sup>aBy</sup>	(21.76±0.44) <sup>bBy</sup>	(17.40±1.56) <sup>cBy</sup>
	0:100	(26.90±1.10) <sup>aAy</sup>	(21.11±1.33) <sup>bAy</sup>	(19.64±3.27) <sup>cAy</sup>
5	75:25	(42.04±0.77) <sup>aAx</sup>	(23.57±1.61) <sup>bAx</sup>	(27.49±1.40) <sup>cAx</sup>
	50:50	(19.33±3.16) <sup>aCx</sup>	(17.05±4.51) <sup>bCx</sup>	(14.26±3.47) <sup>cCx</sup>
	25:75	(25.53±3.84) <sup>aBx</sup>	(16.84±2.55) <sup>bBx</sup>	(20.59±5.87) <sup>cBx</sup>
	0:100	(31.86±1.85) <sup>aAx</sup>	(24.70±0.87) <sup>bAx</sup>	(19.40±3.52) <sup>cAx</sup>

\*Medias de cinco repeticiones ± error estándar.

Medias para la misma composición y tiempo a diferente concentración con distinta letra (a-c) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) según la prueba de Tukey.

Medias para la misma concentración y tiempo con diferente composición con distinta letra (A-C) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Medias para la misma composición y concentración obtenidos a diferente tiempo con distinta letra (x-z) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) según la prueba de Tukey.

### 3. Curvas de calibración por el método de estándar externo

Para realizar el cálculo de las concentraciones de liberación, se aplicó el método de estándar externo, donde se utilizan las curvas de calibración para calcular la concentración de las sustancias desconocidas de manera directa. Este método se usó como reemplazo a la cuantificación por medio del pH diferencial, ya que este requiere de la dilución de las muestras en los buffers (Sección 2.4) y para ello se necesita cantidades grandes de muestra. Al estar realizando un estudio de liberación, las cantidades utilizadas son pequeñas (aprox. 50  $\mu$ L) para lograr hacer una cuantificación de este tipo. Una dilución excesiva podría resultar en concentraciones que no estén dentro del rango de detección del método.

Para poder desarrollar un método directo de cuantificación, fue necesario determinar un pico característico del extracto. Del barrido espectral se obtuvo este pico, con una máxima absorbancia a un  $\lambda_{\max}$  de 513.5 nm (Figura 4). En otro estudio, al realizar extracciones y cuantificaciones similares de antocianinas de distintos frutos, se encontró en mayor cantidad la cianidina-3-glucósido con un  $\lambda_{\max}$  a 523 nm en las muestras de mortiño (Santacruz, 2011). Además, se indica una pérdida del color rojo de este pigmento a medida que el pH aumentaba, por lo que es importante que se mantenga en valores inferiores a 4.5, siendo ideal para aplicación en alimentos de acidez intermedia como el yogurt.

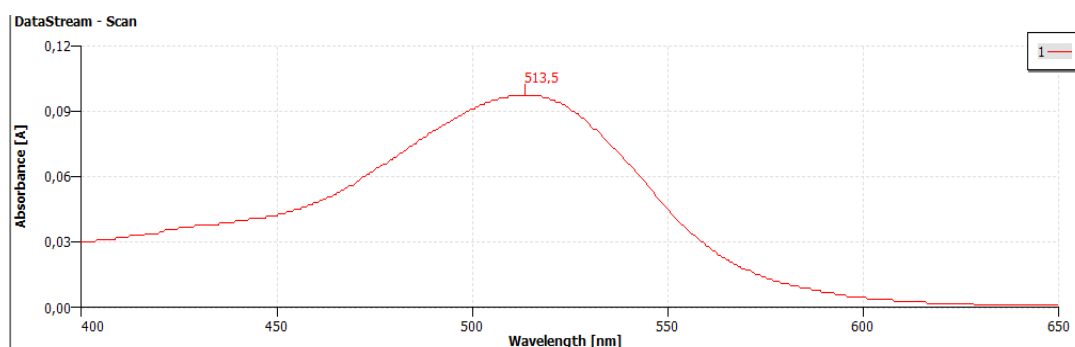


Figura 4. Barrido espectral para determinación de longitud de onda máxima para el extracto de antocianinas de mortiño (*Vaccinium floribundum*)

Para la cuantificación de antocianinas por el método de estándar externo, se obtuvieron tres curvas de calibración, la primera con un  $\lambda$  de 513.5 nm con un coeficiente de determinación  $r^2 = 0.991$ . Como se realizaron las curvas de calibración del ensayo utilizando un lector de microplacas (SEAC Sirio-S) se utilizaron longitudes de onda predeterminadas ( $\lambda$  492 nm y  $\lambda$  540 nm) por el equipo. Se obtuvieron coeficientes de determinación  $r^2 = 0.9992$  y  $r^2 = 0.9974$  respectivamente (Figura 5).

La curva de calibración que presentó un coeficiente de determinación más cercano a 1 fue escogida para las pruebas de encapsulación (Tabla 2) y liberación (Figura 6).

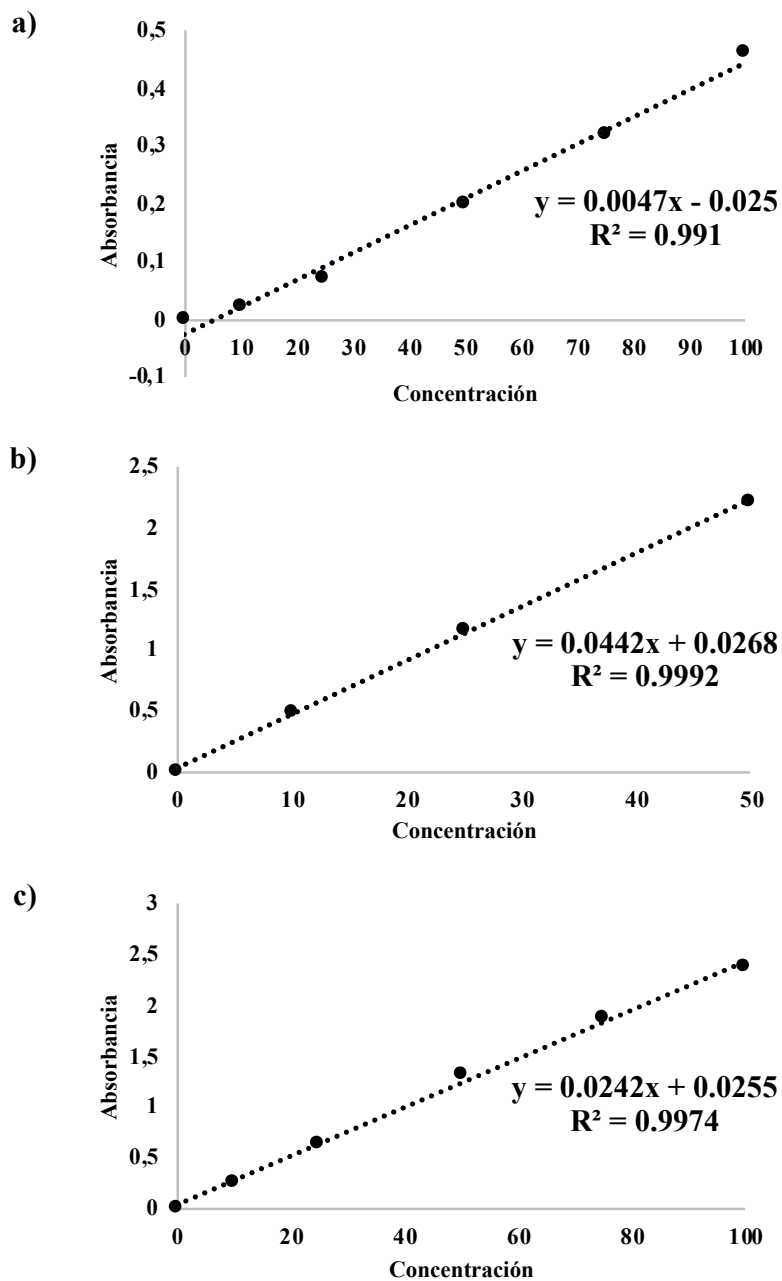


Figura 5. Curva de calibración Absorbancia vs. Concentración a longitudes de onda,  $\lambda$ , de a) 513.5 nm, b) 492 nm y c) 540 nm

#### 4. Eficiencia de encapsulación y liberación acumulativa de antocianinas

La evaluación de la eficiencia de encapsulación se muestra en la Tabla 2, con los porcentajes alcanzados en las mezclas poliméricas con diferentes concentraciones. Todos mantuvieron una eficiencia de encapsulación por debajo del 70 %, logrando la

mayor eficiencia (68.42 %) en la mezcla polimérica 75:25 (P:A) al 1 % y la menor eficiencia (62.82 %) en la mezcla polimérica 50:50 al 1 %. La importancia de una adecuada microencapsulación está en que además de ser una barrera física para el compuesto encapsulado, también permite la asociación molecular entre las antocianinas y la pectina para aumentar la estabilidad del hidrogel (Hubbermann et al., 2006). En el trabajo de Maier (2009), la encapsulación máxima inicial fue 84.8 % para extracto de uva cuando se utilizó pectina de alta metoxilación como agente encapsulante. Li et al. (2019) analizó el efecto de la encapsulación de *Bifidobacterium* en partículas realizadas con pectina de bajo grado de metoxilación, para adicionar en yogurt, obteniendo una eficiencia de encapsulación superior al 99 %.

Estos resultados sugerirían, que la encapsulación utilizando pectinas de baja metoxilación podría incrementar significativamente la eficiencia de encapsulación de compuestos.

Tabla 2. Eficiencia de encapsulación de antocianinas a diferentes concentraciones poliméricas y composiciones

		Concentración polimérica (%) (p/v)	
		1	2
		Eficiencia (%)*	
Composición (P:A)	0:100	66.09 ± 4.00	64.40 ± 0.57
	50:50	62.82 ± 2.96	65.58 ± 0.42
	75:25	68.42 ± 4.61	66.60 ± 0.27

\*Medias de 4 determinaciones ± error estándar

Por otro lado, los ensayos de liberación son una prueba fisicoquímica que determina la cantidad de compuesto que se disuelve y la cantidad acumulativa de un principio activo en una solución, en función del tiempo, bajo condiciones estandarizadas (Brown et al., 2004).

Estos ensayos son importantes para la industria alimentaria, donde se realizan procesos a diferentes condiciones de temperatura, humedad, acidez, etc., que afectan negativamente la liberación, estabilidad y degradación de antocianinas en el producto final, además de generar coloraciones que pueden alterar las características organolépticas (Zapata et al., 2014). En la Figura 6, se observa que las cápsulas presentaron la misma tendencia al equilibrio conforme iba aumentando el tiempo. Después de las 24h de exposición en el medio simulado, la liberación máxima (12.8 %) fue alcanzada por las cápsulas con composición polimérica 50:50 a concentración de 1 % y una retención del 87.2 %. En cambio, cuando la concentración aumentó al 2%, la liberación máxima (5.68 %), presentaron las cápsulas de composición 0:100, con una retención del 94.32 %. En estudios previos en geles de pectina, se demostró que la retención de antocianinas de uva fue del 71 % para un tiempo de dos semanas (Maier, 2009).

La liberación acumulativa de antocianinas en el tiempo se muestra en la Tabla 3. Se observa que la concentración polimérica influyó significativamente sobre la liberación de antocianinas de las microcápsulas formadas, ya que se obtuvo una menor liberación cuando la concentración aumentó de 1 a 2 % (p/v). Por otro lado, los factores tiempo y composición no afectaron significativamente, la liberación de antocianinas.

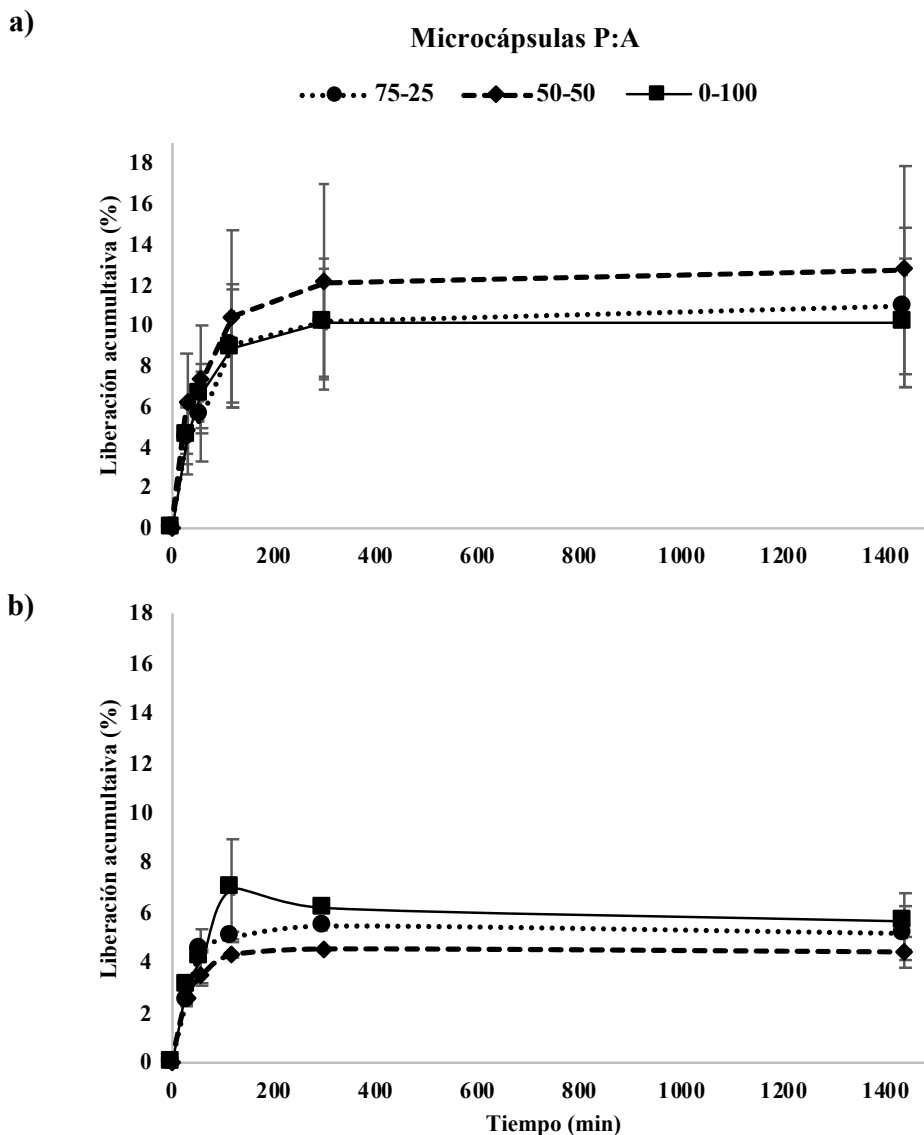


Figura 6: Liberación acumulativa en el tiempo de antocianinas a partir de microcápsulas elaboradas con diferentes composiciones P:A, con concentración de a) 1 % y b) 2 % (p/v)

La estabilidad de las microcápsulas y la velocidad de liberación están relacionadas directamente con la concentración del polímero, por lo que su efecto debe tenerse en cuenta para el porcentaje de liberación de compuestos encapsulados. Como se presenta en la Tabla 1, las cápsulas de composición 75:25 mostraron ser las más inestables. Sin embargo, en la liberación de estos compuestos fenólicos no sucedió lo mismo. Esto pudo deberse a que al juntar el extracto de antocianinas (pH 1.0) con la mezcla polimérica, la acidez de la mezcla disminuyó, mejorando las propiedades de

gelificación de la pectina. Moreira (2014) explica que la pectina presenta una degradación e incapacidad para gelificar en soluciones con pH 5.35 o superior. Por lo tanto, las soluciones de pectina con valores de pH que varían de 3.2 a 3.8 se eligieron para producir los geles.

Tabla 3. Liberación acumulativa en el tiempo de antocianinas a partir de microcápsulas con diferentes concentraciones poliméricas y composición P:A

Tiempo (minutos)	Composición (P:A)	Concentración polimérica (%) (p/v)	
		1	2
Antocianinas liberadas (%)*			
30	75:25	(4.44±1.74) <sup>a</sup>	(2.50±0.09) <sup>b</sup>
	50:50	(6.22±2.48) <sup>a</sup>	(2.63±0.30) <sup>b</sup>
	0:100	(4.57±1.42) <sup>a</sup>	(3.09±0.40) <sup>b</sup>
60	75:25	(5.56±2.26) <sup>a</sup>	(4.56±0.01) <sup>b</sup>
	50:50	(7.38±2.67) <sup>a</sup>	(3.51±0.27) <sup>b</sup>
	0:100	(6.58±1.64) <sup>a</sup>	(4.26±1.11) <sup>b</sup>
120	75:25	(9.05±3.04) <sup>a</sup>	(5.05±0.18) <sup>b</sup>
	50:50	(10.47±4.26) <sup>a</sup>	(4.34±0.06) <sup>b</sup>
	0:100	(8.91±2.93) <sup>a</sup>	(6.99±2.02) <sup>b</sup>
300	75:25	(10.19±2.66) <sup>a</sup>	(5.52±0.02) <sup>b</sup>
	50:50	(12.21±4.83) <sup>a</sup>	(4.56±0.03) <sup>b</sup>
	0:100	(10.13±3.21) <sup>a</sup>	(6.22±0.05) <sup>b</sup>
1440	75:25	(10.96±3.88) <sup>a</sup>	(5.22±1.08) <sup>b</sup>
	50:50	(12.81±5.14) <sup>a</sup>	(4.44±0.60) <sup>b</sup>
	0:100	(10.17±3.18) <sup>a</sup>	(5.68±1.15) <sup>b</sup>

\*Medias de cuatro repeticiones ± error estándar.

Medias para la misma composición y tiempo a diferente concentración con distinta letra (a-b) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) según la prueba de Tukey.

## 5. Evaluación morfológica de las microcápsulas

En la Figura 7 se observan imágenes de las microcápsulas utilizadas para la encapsulación y determinación de la liberación acumulativa de antocianinas en el tiempo. Para las partículas a una concentración de 1% (p/v) existió mayor porosidad en todas las composiciones P:A, mientras que al 2% (p/v) la cantidad de poros



disminuyó en gran cantidad, viéndose una superficie más lisa en todas las composiciones P:A. El análisis de microscopía electrónica ha demostrado que la uniformidad de la red de biopolímeros y el tamaño de los poros cambia cuando se varía la proporción del alginato y pectina (Walkenström et al., 2003).

Las cápsulas formadas con soluciones más concentradas de los polímeros, mostraron una estructura con una mayor densidad y menor porosidad, lo cual coincide con el estudio realizado por Munarin (2010), donde las microcápsulas con mayor concentración perdieron peso con más rapidez que las de menor concentración. Esto se debe a que el incremento de concentración del polímero puede conducir a la formación de una red de polímeros enredada, que reduce la captación y liberación de agua de las microcápsulas. Según Jaya et al. (2008), el aumento de pectina en la pared de la microcápsula puede aumentar el tamaño de partícula, por lo que su distribución será más expandida y de esta manera se tendrá una pared más permeable. Esto causa que la pared del gel formado sea más frágil y aumente el porcentaje de liberación de fármacos encapsulados. Además, en este estudio, todas las cápsulas que contenían combinaciones de pectina y alginato mostraron mayor porcentaje de liberación en pH ácido ( $< 4.0$ ), lo que permitiría la incorporación de estas microcápsulas en alimentos de acidez intermedia como el yogurt que tiene pH entre 4 y 4.5 (Badui, 2006).

Estos resultados podrían explicar parcialmente lo observado en los ensayos de liberación (Figura 6), donde al 1 % se obtuvo mayor liberación que a mayores concentraciones poliméricas (2 %), debido a la mayor porosidad (Figura 7), por lo que las antocianinas tendrían mayor espacio físico disponible para difundirse fuera de la matriz de encapsulación.

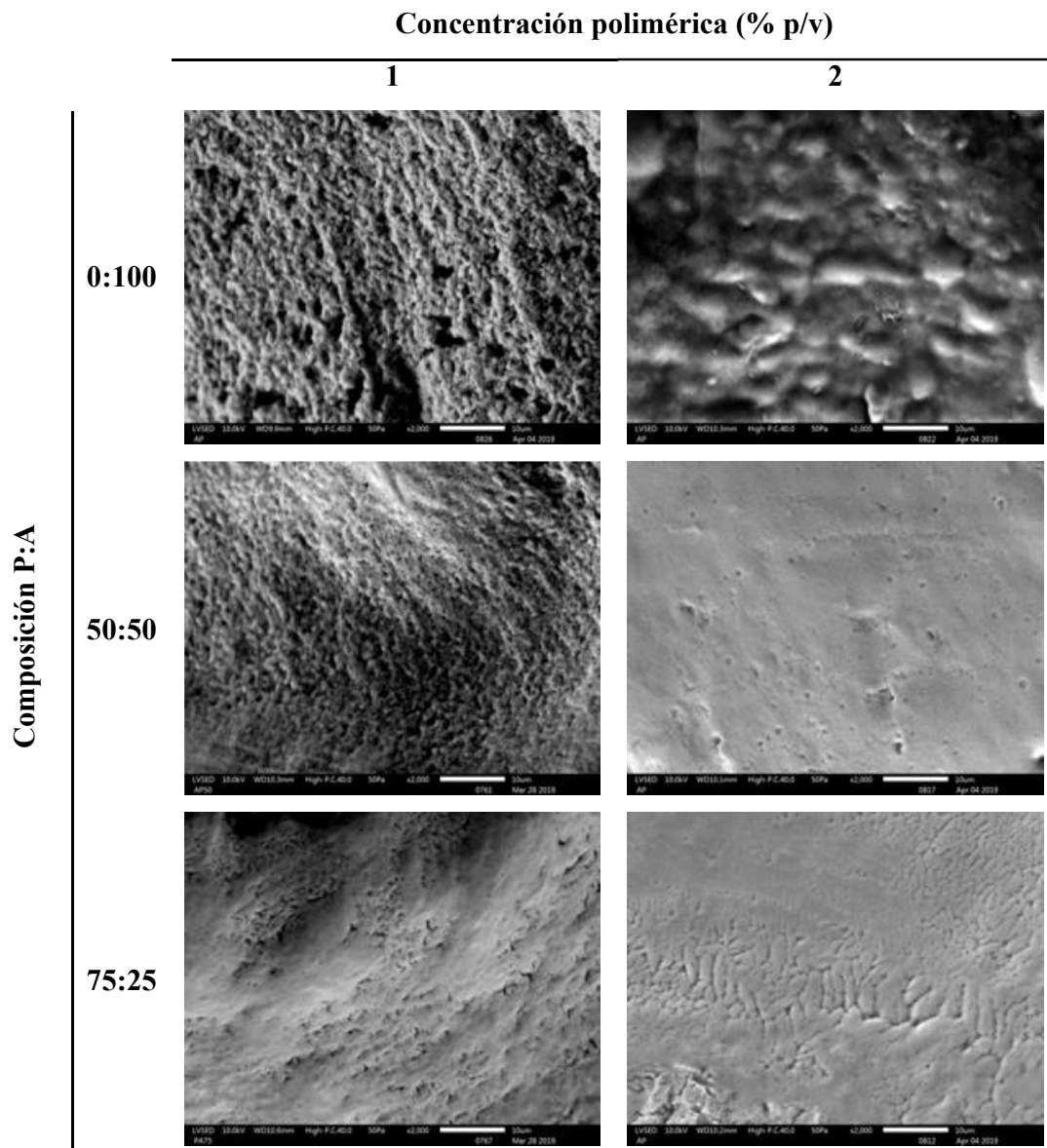


Figura 7: Micrografía electrónica (2000x) de microcápsulas elaboradas a diferentes concentraciones y proporciones P:A (Barra de calibración:10  $\mu$ m)

## CONCLUSIONES

La encapsulación de antocianinas de mortiño en matrices compuestas por pectina y alginato son potencialmente factibles para mantener estos compuestos en productos de acidez media como el yogurt, lo que podría otorgar una propiedad funcional. El hecho de haber tenido una retención alta que se traduce en bajos niveles de liberación sería beneficioso para mantener la actividad de las antocianinas.

La concentración de la matriz polimérica (P:A) se relacionó directamente con la estabilidad de las microcápsulas y la liberación de antocianinas fue independiente de la composición polimérica utilizada.

## RECOMENDACIONES

- Para realizar la microencapsulación de antocianinas de mortiño en matrices de pectina y alginato, no se debe mezclar el extracto directamente con las soluciones P:A, ya que se produce la gelificación de los componentes, haciéndose imposible la formación de las microcápsulas.
- Para obtener cápsulas más estables con mayor proporción de pectina en su composición, realizar la encapsulación en un rango de pH de 2.8 a 3.5, ideal para gelificar este polímero (Badui, 2006).
- Realizar pruebas de capacidad antioxidante de los extractos restantes en las microcápsulas para determinar si la capacidad de estos se mantiene viable en el tiempo.
- Para adicionar las microcápsulas en alimentos, hacer evaluaciones de liberación acumulada a tiempos más largos, teniendo en cuenta la vida útil del producto al que se desea adicionar.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avendaño, G., López, R. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 87-96.
- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemist  
EUA.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. México D.F: Pearson.
- Boatella, J. (2014). *Química y bioquímica de los alimentos II*. Barcelona.
- Bonilla, M. (2008). *Extracción, caracterización y estabilidad de antocianinas y otros compuestos antioxidantes obtenidos a partir de zarzamora*. Recuperado el abril de 2019, de Bibliotecas UDLAP:  
[catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lia/ceron\\_b\\_m/capitulo5.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/ceron_b_m/capitulo5.pdf)
- Buitrago, C. R. (2014). Tipificación de diferentes estados de madurez del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7521-7531.
- Brown, C., Chokshi, H., Nickerson, B., Reed, R., Rohrs, B., Shah, P. (2004). Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. *Pharmaceutical Technology*, 1, 56-65.
- Cano, A. (2011). Extracción y Uso de Tres Pigmentos Naturales a Partir de Tomate de Árbol (*Solanum betaceum Cav.*), Mortiño (*Vaccinium myrtillus L.*) y Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) Como Alternativa Colorante Natural Para Alimentos. Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), Departamento de Ciencias de la Vida, Sangolquí.
- Chen, F., Zhang, Z., Deng, Z., Zhang, R., Fan, G., Ma, D., McClements, D. J. (2018). Controlled-release of antacids from biopolymer microgels under simulated

- gastric conditions: Impact of bead dimensions, pore size, and alginate/pectin ratio. *Food Research International*, 106, 745–751.
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E., 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.
- Davarcı, F., Turan, D., Ozcelik, B., Poncelet, D. (2017). The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique. *Food Hydrocolloids*, 62, 119–127.
- Ersus, S., Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 805-812.
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como Colorantes Naturales y Compuestos Bioactivos. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27-36.
- González, G. (2009). *Estabilidad e intercambio de iones calcio en geles de alginato*. Instituto Tecnológico de Durango, Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica, Durango.
- Hubbermann, E., Heins, A., Stöckmann, H., Schwarz, K. (2006). Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates. *European Food Research and Technology*, 223(1), 83–90.
- Humblet, E. (2011). Encapsulation systems based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin. *Food Hydrocoll* (25), 569-576.
- Jácome, M. (2016). *Efecto Inhibitorio del Extracto Alcohólico de Mortiño (Vaccinium floribundum kunth) Sobre el Streptococcus mutans*. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología, Quito.

- Jaya, S., Durance, T., Wang, R. (2009). Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules. *Journal of Microencapsulation*, 26(2), 143–153.
- Kuskoski, E. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 25(4), 726-732.
- Li, M., Jin, Y., Wang, Y., Meng, L., Zhang, N., Sun, Y., Sun, Q. (2019). Preparation of *Bifidobacterium breve* encapsulated in low methoxyl pectin beads and its effects on yogurt quality. *Journal of Dairy Science*, 102, 1-12.
- Liling, G., Di, Z., Jiachao, X., Xin, G., Xiaoting, F., Qing, Z. (2016). Effects of ionic crosslinking on physical and mechanical properties of alginate mulching films. *Carbohydrate Polymers*, 136, 259–265.
- Maier, T., Fromm, M., Schieber, A., Kammerer, D. R., Carle, R. (2009). Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. *European Food Research and Technology*, 229(6), 949.
- Minitab 18 Statistical Software (2017). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. ([www.minitab.com](http://www.minitab.com))
- Montoya, C., Hernández, J., Lobo, J., Medina C. (2012). Cambios en la Actividad Antioxidante en Frutos de Mortiño (*Vaccinium meridionale Sw.*) durante su Desarrollo y Maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 65(1), 6487-6495.
- Moreira, H. R., Munarin, F., Gentilini, R., Visai, L., Granja, P. L., Tanzi, M. C., Petrini, P. (2014). Injectable pectin hydrogels produced by internal gelation: pH dependence of gelling and rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 103, 339–347.

- Munarin, F., Petrini, P., Farè, S., Tanzi, M. (2010). Structural properties of polysaccharide-based microcapsules for soft tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(1), 365–375.
- Ocaña, O. (2016). El alga invasora que amenaza el Estrecho de Gibraltar. Recuperado el 2 de mayo de 2019 de <http://www.elmundo.es/ciencia/2016/09/30/57e15d5dca47414b4b8b45c6.html>
- Pereira, P., Oliveira, T., Rosa, M., Cavalcante, F., Moates, G., Wellner, N., Azeredo, H. (2016). Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 373–379.
- Pérez, S. (2007). Colección y caracterización morfológica In situ del mortiño. Tesis, ESPE, Quito.
- Santacruz, L. (2011). *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Singh, J., Kaur, K., Kumar, P. (2018). Optimizing microencapsulation of atocopherol with pectin and sodium alginate. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3625–3631.
- Schreckinger, M., Wang, J., Yousef, G., Lila, M., Gonzáles, E. (2010) Antioxidant Capacity and in Vitro Inhibition of Adipogenesis and Inflammation by Phenolic Extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 8966-8976.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical Composition and Phenolic Compound Profile of Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8274–8281.



Walkenström, P., Kidman, S., Hermansson, A.-M., Rasmussen, P. B., Hoegh, L. (2003).

Microstructure and rheological behaviour of the alginate/pectin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 593–603

Wang, H., Wan, Li., Chen, D., Xingfeng, G., Fengxia, L., Siyi, P. (2019). Unexpected

gelation behavior of citrus pectin induced by monovalent cations under alkaline conditions. *Carbohydrate Polymers*, 212, 51-58.

Yáñez, J. J. (2013). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista*

*Avance y Perspectiva* (21), 313-319.

Zapata, L., Cárcel, G., Clemente, J. (2014). *Obtención de Extracto de Antocianinas a Partir*

*de Arándanos Para Ser Utilizado Como Antioxidante y Colorante en la Industria Alimentaria*. Retrieved from

<https://www.blueberrieschile.cl/subidas/2016/05/obtenciondeextracto.pdf>

## ANEXOS

Anexo 1. Análisis de Varianza (ANOVA) del peso perdido por las microcápsulas en el tiempo, con diferentes concentraciones poliméricas y composición P:A

<b>Fuentes de variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Valor p</b>
Tiempo	2	784,62	392,312	0,000*
Composición (P:A)	3	1976,62	658,872	0,000*
Concentración	2	1850,00	925,000	0,0008
Tiempo*Composición (P:A)	6	477,06	79,510	0,000*
Tiempo*Concentración	4	63,16	15,789	0,127 <sup>n.s.</sup>
Composición (P:A)*Concentración	6	432,86	72,143	0,000*
Tiempo*Composición (P:A)*Concentración	12	209,75	17,479	0,031*
Error	144	611,30	8,490	
Total	179	6405,37		

\* Significativo al 5 % de probabilidad

n.s. No significativo al 5% de probabilidad

Anexo 2. Análisis de Varianza (ANOVA) de liberación acumulativa en el tiempo de antocianinas a partir de microcápsulas con diferentes concentraciones poliméricas y composición P:A

<b>Fuentes de variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Valor p</b>
Concentración	1	155,28	155,285	0,000*
Tiempo	4	38,39	9,598	0,330 <sup>n.s.</sup>
Composición (P:A)	2	1,77	0,883	0,898 <sup>n.s.</sup>
Concentración*Tiempo	4	369,91	92,477	0,000*
Concentración*Composición (P:A)	2	43,66	21,832	0,076 <sup>n.s.</sup>
Tiempo*Composición (P:A)	8	17,56	2,195	0,974 <sup>n.s.</sup>
Concentración*Tiempo*Composición (P:A)	8	0,621	0,0776	0,991 <sup>n.s.</sup>
Error	90	642,189	0,3984	
Total	119	1269,38		

\* Significativo al 5 % de probabilidad

n.s. No significativo al 5% de probabilidad