



S.E.P.

S.E.S.

Tec.N.M.

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

**“ENCAPSULAMIENTO DE PIGMENTOS NATURALES
CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES FLORALES”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**P R E S E N T A :
JOSÉ ÁNGEL SANJURJO GARCÍA
No. DE CONTROL: 0728M1050**

**DIRECTORA:
DRA. CLAUDIA ROSARIO MURO URISTA**

**CO-DIRECTORA:
DRA. MARIA DEL CARMEN DÍAZ NAVA**

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 2017

“Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos”

Metepec, Méx., 23/Junio/2017

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-1113/2017


DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE.

Por este medio comunicamos a usted que la Comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada **“ENCAPSULAMIENTO DE PIGMENTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES FLORALES”**, que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental presenta el C. JOSÉ ÁNGEL SANJURJO GARCÍA, con número de control 0728M1050 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad necesario para proceder a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE


DRA. CLAUDIA ROSARIO MURO URISTA
DIRECTORA DE TESIS


DRA. MARÍA DEL CARMEN DÍAZ NAVA
CO-DIRECTORA DE TESIS


DR. FRANCISCO JAVIER ILLESCAS MARTÍNEZ
REVISOR


M. en C. YOLANDA ALVARADO PÉREZ
REVISORA


M. en C. ROSA ELENA ORTEGA AGUILAR
REVISORA


SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



“Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos”

Metepec, Méx., 30/junio/2017

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-1115/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

C. JOSÉ ÁNGEL SANJURJO GARCÍA
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE.

De acuerdo con el Reglamento de Titulación del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica de la Subsecretaría de Educación Superior de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado **“ENCAPSULAMIENTO DE PIGMENTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES FLORALES”** la División de Estudios de Posgrado e Investigación concede autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

Educación, Integridad y Ciencia

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

JLGR/magj



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios que me ha permitido culminar esta etapa de mi vida ya que siempre acercó a las personas adecuadas en el momento indicado.

A mis padres y hermana ya que su apoyo fue siempre incondicional y que sin ellos no hubiese podido llegar hasta aquí.

A la Dra. Claudia Muro por su apoyo y motivación que en todo momento me brindo, a mi comité tutorial por su dirección y ayuda brindada durante el desarrollo de mi trabajo.

Al Instituto Tecnológico de Toluca por brindar el material y equipo necesario para los análisis realizados en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico a fin de realizar mis estudios de posgrado grado maestría.

RESUMEN

Dada la contaminación por pigmentos sintéticos de uso alimenticio y fármaco, en el presente trabajo se estudiaron dos especies florales para extraer su pigmento y realizar su análisis y posible aplicación en estos sectores; de esta forma, se exponen alternativas de obtención de materia prima sustentable que pudiera dar respuesta a la sustitución de los pigmentos sintéticos actualmente utilizados.

Las especies florales utilizadas son de origen silvestre, sus pétalos presentan una tonalidad amarilla y azul para cada especie. Ambas son comestibles, sobre todo en el Estado de México y florecen prácticamente en todo el país, principalmente en época de lluvias.

Para llevar cabo el estudio de los pigmentos, se extrajeron cada uno, conservando la tonalidad descrita y se determinaron algunas características fisicoquímicas. También se hicieron estudios de degradación de los mismos teniendo como parámetros la temperatura, el pH, la luz solar y el oxígeno ambiental. Además se probaron materiales encapsulantes, como la maltodextrina y la goma arábica, con la finalidad de extender el tiempo de vida de los pigmentos.

Entre los resultados obtenidos más importantes están la identificación de la estructura química de los pigmentos, encontrando que el amarillo es un pigmento perteneciente a las auronas y el pigmento azul se identificó como una metaloantocianina. Ambos presentan fluorescencia, pero mostrando mayor intensidad el amarillo.

Otros resultados son relativos a la estabilización de los pigmentos, encontrando que el amarillo es térmicamente estable a temperaturas desde $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ y para el azul de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mientras que el color se ha mantenido estable en los sistemas de encapsulamiento utilizados. Además, se encontró que ambos mostraron actividad antioxidante dentro del rango de las especies vegetales, por lo que son pigmentos de potencial uso en alimentos y fármacos.

ABSTRACT

Given the contamination by synthetic pigments of alimentary use and drug, in the present work two floral species were studied to extract its pigment and to make its analysis and possible application in these sectors; In this way, alternatives for obtaining sustainable raw material that could respond to the substitution of synthetic pigments currently used are presented.

The floral species used are of wild origin, their petals present a yellow and blue hue for each species. Both are edible, especially in the State of Mexico and flourish practically throughout the country, especially in the rainy season.

To carry out the study of the pigments, each one was extracted, preserving the described tonality and some physicochemical characteristics were determined. Degradation studies were also carried out with parameters such as temperature, pH, sunlight and ambient oxygen. In addition, encapsulating materials, such as maltodextrin and gum arabic, were tested in order to extend the life of the pigments.

Among the most important results are the identification of the chemical structure of the pigments, finding that yellow is a pigment belonging to the aurones and the blue pigment was identified as a metalanthocyanin. Both have fluorescence, but yellow is showing more intensity.

Other results are relative to the stabilization of the pigments, finding that yellow is thermally stable at temperatures from -3°C to 170°C and for blue from -3°C to 80°C . While the color has remained stable in the encapsulation systems used. In addition, both found to have antioxidant activity within the range of plant species, so they are pigments of potential use in food and drugs.

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | ii |
| ABSTRACT | iii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1 FUNDAMENTOS | 3 |
| 1.1 Pigmentos | 4 |
| 1.2 Pigmentos sintéticos | 7 |
| 1.2.1 Pigmentos orgánicos sintéticos en la industria de los alimentos | 11 |
| 1.2.2 Legislación en el uso de pigmentos sintéticos | 11 |
| 1.3 Pigmentos naturales | 12 |
| 1.3.1 Pigmentos de origen microbiano | 13 |
| 1.3.2 Pigmentos obtenidos de insectos | 15 |
| 1.3.3 Pigmentos de origen vegetal | 17 |
| 1.4 Estructura química de los pigmentos naturales | 21 |
| 1.4.1 Clorofilas | 21 |
| 1.4.2 Carotenoides | 22 |
| 1.4.3 Flavonoides | 23 |
| 1.4.3.1 Auronas y Chalconas | 28 |
| 1.4.3.2 Quinonas | 30 |
| 1.4.4 Antocianinas | 32 |
| 1.4.4.1 Mecanismos de estabilización de antocianinas | 37 |
| 1.5 Sustancias activas de origen vegetal | 39 |
| 1.5.1 Actividad antioxidante | 40 |
| 1.6 Encapsulación de pigmentos | 43 |
| 1.6.1 Materiales de encapsulamiento | 43 |
| 1.6.2 Técnicas de encapsulamiento | 46 |
| 1.7 Caracterización de pigmentos por técnicas espectrofotométricas, espectroscópicas y espectrométricas | 50 |
| 1.7.1 Espectrofotometría UV-Vis | 50 |
| 1.7.2 Espectroscopía Infrarroja | 54 |
| 1.7.3 Espectrofluorimetría | 55 |
| 1.7.4 Resonancia magnética nuclear | 57 |
| 1.7.5 Espectrometría de masas | 58 |
| 2 MÉTODO | 60 |
| 2.1 Extracción y purificación de los pigmentos | 61 |
| 2.2 Caracterización de los pigmentos | 62 |
| 2.2.1 Identificación del grupo de procedencia en la estructura química | 62 |
| 2.2.2 Determinación de características fisicoquímicas | 63 |
| 2.2.3 Determinación de características espectrofotométricas UV-Vis y espectrométricas IR | 64 |
| 2.2.4 Determinación de características de fluorescencia | 65 |
| 2.2.5 Determinación de características de resonancia magnética | 65 |
| 2.2.6 Determinación de características de espectrometría de masas | 66 |
| 2.3 Análisis de degradabilidad de los pigmentos | 67 |
| 2.4 Determinación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos totales | 68 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.4.1 | Método por Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico (ABTS). | 68 |
| 2.4.2 | Método por 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) | 69 |
| 2.4.3 | Determinación de compuestos fenólicos totales por Folin Ciocalteu | 70 |
| 2.5 | Encapsulamiento de los pigmentos | 70 |
| 2.5.1 | Encapsulamiento del pigmento amarillo | 70 |
| 2.5.2 | Encapsulamiento del pigmento azul | 72 |
| 2.6 | Caracterización de los pigmentos encapsulados | 72 |
| 2.6.1 | Pruebas de degradabilidad | 72 |
| 2.6.2 | Cinética de liberación | 73 |
| 3 | RESULTADOS | 74 |
| 3.1 | Extracción y purificación de los pigmentos | 74 |
| 3.2 | Caracterización de los pigmentos | 76 |
| 3.2.1 | Identificación del grupo de procedencia | 76 |
| 3.2.2 | Determinación de características fisicoquímicas | 77 |
| 3.2.3 | Caracterizaciones espectrofotométrica UV-Vis y espectroscópica IR | 77 |
| 3.2.4 | Caracterización de espectrofluorometría | 83 |
| 3.2.5 | Caracterización espectrométrica de masas | 84 |
| 3.2.6 | Caracterización por resonancia magnética nuclear | 86 |
| 3.3 | Análisis de degradabilidad de los pigmentos | 89 |
| 3.4 | Actividad antioxidante | 95 |
| 3.4.1 | Actividad antioxidante por ABTS | 95 |
| 3.4.2 | Actividad Antioxidante por DPPH | 97 |
| 3.4.3 | Compuestos fenólicos totales | 98 |
| 3.5 | Encapsulación de los pigmentos | 99 |
| 3.5.1 | Encapsulación por extrusión | 99 |
| 3.5.2 | Encapsulación por secado | 100 |
| 3.6 | Caracterización de los pigmentos encapsulados | 101 |
| 3.6.1 | Pruebas de degradabilidad | 101 |
| 3.6.2 | Cinética de liberación de los pigmentos | 102 |
| | CONCLUSIONES | 104 |
| | REFERENCIAS | 109 |
| | RELACIÓN DE TABLAS | |
| 1.1 | Relación de colores en región UV-Vis | 5 |
| 1.2 | Diferentes pigmentos obtenidos de frutas y verduras | 17 |
| 1.3 | Descripción técnica de la Especie floral A | 19 |
| 1.4 | Descripción técnica de la Especie floral B | 20 |
| 1.5 | Enzimas involucradas en la biosíntesis de Flavonoides I | 23 |
| 1.6 | Enzimas involucradas en la biosíntesis de Flavonoides II | 23 |
| 1.7 | Algunas estructuras bioactivas halladas en flores | 41 |
| 1.8 | Clases de material de recubrimiento | 44 |
| 1.9 | Clasificación y características de algunos métodos de encapsulación | 46 |
| 1.10 | Grupos cromóforos y la longitud de onda (λ) en que se pueden identificar, considerando el solvente revelador del cromóforo | 54 |
| 1.11 | Trazadores comerciales y sus usos | 57 |
| 1.12 | Trazadores naturales comerciales y sus usos | 57 |
| 2.1 | Formulaciones de mezclas de material encapsulante | 71 |
| 3.1 | Pruebas de precipitación para el pigmento amarillo | 76 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3.2 | Características fisicoquímicas de los pigmentos | 77 |
| 3.3 | Identificación de grupos funcionales del pigmento amarillo proveniente de Especie floral A | 80 |
| 3.4 | Identificación de grupos funcionales del pigmento azul proveniente de Especie floral B | 83 |
| 3.5 | Relaciones de TG y DT | 91 |
| 3.6 | Actividad antioxidante por ABTS | 96 |
| 3.7 | Actividad antioxidante por DPPH | 97 |
| 3.8 | Compuestos fenólicos totales | 98 |
| 3.9 | Pruebas de degradación por pH | 101 |
| 3.10 | Pruebas de degradación por Temperatura | 102 |
| 3.11 | Cinética de liberación prolongada | 102 |
| 3.12 | Cinética de liberación acelerada | 102 |

RELACIÓN DE FIGURAS

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Pigmentos sintéticos inorgánicos utilizados generalmente en la construcción y recubrimientos | 8 |
| 1.2 | Grupos cromóforos comunes que conforman a los colorantes sintéticos. | 9 |
| 1.3 | Principales grupos auxócromos | 9 |
| 1.4 | Estructura química de algunos colorantes sintéticos orgánicos. | 10 |
| 1.5 | Usos de pigmentos en la industria alimenticia | 11 |
| 1.6 | Bacterias y algas que producen pigmentos | 14 |
| 1.7 | Pigmento rojo carmín proveniente del insecto <i>Dactylopius coccus</i> y su uso | 15 |
| 1.8 | Insecto <i>Laccifer lacca</i> y el pigmento que produce | 16 |
| 1.9 | Fuentes florales de pigmentos | 18 |
| 1.10 | Estructuras químicas de carotenoides obtenidas de muestras vegetales; a) α -Crytoxantina (3R, 6'R) – β,ϵ -caroten-3-ol y b) Phytoeno epóxido decahydro- ψ,ψ -caroteno | 22 |
| 1.11 | Biosíntesis de Flavonoides I | 24 |
| 1.12 | Biosíntesis de Flavonoides II | 25 |
| 1.13 | Estructuras de pigmentos flavonoides | 26 |
| 1.14 | Frutas y verduras que dan origen a pigmentos naturales | 37 |
| 1.15 | a) <i>Narcissus cultivar</i> con coloración amarilla de flavonoides, b) <i>Argemone sp</i> con coloración amarilla de carotenoides | 28 |
| 1.16 | Quinonas con propiedades anticarcinógenas y de fluorescencia UV | 30 |
| 1.17 | Imágenes digitales de fluorescencia microscópica en el control de células neuronales usando quinonas. | 31 |
| 1.18 | Diferencia entre antocianina y antocianidina | 32 |
| 1.19 | Glucósidos que acompañan normalmente a antocianinas | 33 |
| 1.20 | Estructura de las antocianinas y sus radicales principales | 33 |
| 1.21 | Mecanismo de transformaciones estructurales de las antocianinas conforme a el cambio de pH | 35 |
| 1.22 | Especie <i>Oenothera sp.</i> a) Sin alterar, b) Bajo luz UV | 37 |
| 1.23 | Mecanismos enzimáticos comunes de estabilización de antocianinas | 38 |
| 1.24 | Estructura básica de una metaloantocianina | 39 |
| 1.25 | Estándares para determinar compuestos Fenólicos Totales | 42 |
| 1.26 | Estructura química de la maltodextrina | 44 |
| 1.27 | Estructura química de la goma arábica | 45 |
| 1.28 | Partes de un secador por aspersión | 47 |

| | | |
|------|---|-----|
| 1.29 | Niveles de energía en los que se mueve un electrón al ser excitado por la radiación UV-Vis | 53 |
| 1.30 | Estructuras de algunas sustancias fluorescentes bajo luz UV | 56 |
| 2.1 | Diagrama de encapsulamiento de pigmentos naturales con actividad antioxidante de especies florales | 60 |
| 2.2 | Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35 | 64 |
| 2.3 | Espectroscopio Agilent Varian 640-IR FT-IR | 65 |
| 2.4 | Fluorímetro Horiba Fluorolog FL3C | 65 |
| 2.5 | Espectrómetro NMR Bruker 400 MHz | 66 |
| 2.6 | Espectrómetro de Masas Bruker Daltonics-Esquire6000 | 66 |
| 2.7 | TGA PT-1600 Linseis | 67 |
| 2.8 | Secador por aspersión Mini Sprühtrockner B-290 | 72 |
| 3.1 | Imagen de una muestra de la extracción del pigmento y del pigmento extraído de la especie floral A. | 74 |
| 3.2 | Pigmento extraído, especie floral B | 75 |
| 3.3 | Pruebas de formación de precipitado del pigmento | 76 |
| 3.4 | Espectro UV-Vis de extracto de pigmento amarillo | 78 |
| 3.5 | Espectros UV-Vis de pigmento amarillo purificado en columna | 79 |
| 3.6 | Espectro IR del pigmento amarillo | 80 |
| 3.7 | Estructura del Cernuoside. | 81 |
| 3.8 | Espectro UV-Vis del pigmento azul | 81 |
| 3.9 | Espectro IR del pigmento azul | 82 |
| 3.10 | Espectro de fluorescencia del pigmento amarillo | 83 |
| 3.11 | Espectro de fluorescencia del pigmento azul | 84 |
| 3.12 | Espectro de masas del pigmento amarillo | 85 |
| 3.13 | Espectro de masas del pigmento azul | 86 |
| 3.14 | Espectro de RMN- ¹ H del pigmento amarillo y esqueleto patrón de auronas | 87 |
| 3.15 | Espectro de RMN- ¹ H del pigmento azul y esqueleto patrón de antocianinas | 88 |
| 3.16 | Cambios de tonalidad con respecto al pH del pigmento amarillo | 89 |
| 3.17 | Cambios estructurales de auronas y formación de complejos | 90 |
| 3.18 | Termograma del pigmento amarillo hasta 800 °C | 81 |
| 3.19 | Comparación de Espectros UV-Vis de pigmento amarillo para pruebas de degradación de oxígeno y luz | 93 |
| 3.20 | Cambios de tonalidad con respecto al pH del pigmento azul | 93 |
| 3.21 | Prueba de degradabilidad por temperatura | 94 |
| 3.22 | Análisis de degradabilidad por O ₂ y luz | 95 |
| 3.23 | Curva de calibración de ATBS con ácido ascórbico | 96 |
| 3.24 | Curva de calibración de DPPH con ácido ascórbico | 97 |
| 3.25 | Curva de calibración de Folin Ciocalteu con ácido gálico | 98 |
| 3.26 | Encapsulados de los pigmentos | 99 |
| 3.27 | Pigmento amarillo seco y en solución acuosa | 100 |
| 3.28 | Espectro UV-Vis de pigmento amarillo encapsulado en maltodextrina y secado por aspersión | 100 |

INTRODUCCIÓN

Actualmente los pigmentos sintéticos son utilizados sin limitaciones en distintos rubros, industrias alimenticias, industrias textiles e industrias farmacéuticas, entre otras. Sin embargo, éstos representan un riesgo tanto para la salud como al medio ambiente, ya que debido a su ingesta, pueden ser causantes de cáncer y padecimientos mentales en niños. Vertidos en el ambiente causan mal aspecto, en cuerpos de agua e inhiben el paso de la luz dañando la flora y fauna. La mayoría de ellos son de constitución química compleja, contienen anillos aromáticos y enlaces tipo azo, lo cual los hace de difícil degradación, y en un tratamiento convencional de aguas residuales no logran ser removidos.

Una alternativa para dar solución a los problemas que causan los pigmentos sintéticos, es el uso de pigmentos naturales, ya que además de ser compuestos amigables con el ambiente, también presentan propiedades o actividades biológicas que pueden beneficiar la salud. Los pigmentos naturales provienen de diversas fuentes como frutas, raíces, verduras, insectos, microorganismos y flores, proporcionando una diversidad de coloraciones y tonalidades. Sin embargo, a la fecha pocas fuentes han sido explotadas para su obtención, ya que algunos pigmentos son de difícil extracción y muchos de ellos presentan una corta vida debido a su inestabilidad y fácil degradabilidad, lo que ha permitido que su aplicación y comercialización se haya visto limitada.

De forma particular, los pigmentos provenientes de flores son los que se encuentran en menor proporción en investigación y aplicación, ya que debido a su sensibilidad a parámetros ambientales presentan una mayor degradabilidad frente a los sintéticos, e incluso en comparación con otros naturales provenientes de una fuente diferente. Pese a lo mencionado, esas desventajas pueden ser mitigadas a través de estrategias que ayuden a su preservación, entre las que se encuentran el encapsulamiento.

Este trabajo tiene como objetivo realizar el estudio de dos pigmentos de origen floral de diferentes especies. La hipótesis de la investigación está relacionada con el

encapsulamiento, ya que se espera que esta estrategia prolongue la vida de los pigmentos y conserve sus propiedades antioxidantes y de coloración.

El trabajo se presenta en tres apartados, fundamentos, métodos y resultados. En fundamentos se presenta información sobre colorantes naturales, su origen, estructura y técnicas de caracterización. En el apartado de método, se describe la metodología utilizada en la extracción de los pigmentos, identificación de su estructura y caracterización fisicoquímica y espectrofotométrica. En resultados se presentan los datos obtenidos del estudio, de acuerdo a la metodología.

1. FUNDAMENTOS

En la actualidad los pigmentos sintéticos son imprescindibles para dar mejor apariencia a los productos de consumo en general y son utilizados sin limitaciones en distintos rubros, desde industrias alimenticias, de pinturas exteriores, industrias textiles, hasta en industrias farmacéuticas, entre otras, sin embargo, debido a que una gran cantidad de ellos contienen en su estructura anillos aromáticos que son de difícil degradación con enlaces tipo azo o bien metales pesados, representan diversos riesgos para la salud y en general para el ambiente.

En cuanto a la salud, varias investigaciones indican que su consumo promueve desordenes nerviosos y de atención, además, una exposición prolongada puede derivar en problemas carcinógenos. Particularmente se ha mostrado que los colorantes rojo No. 2 y No. 40, están relacionados con la hiperactividad de niños de edad escolar, incluso, se les relaciona con problemas neuronales agudos. Debido a estas investigaciones, los colorantes mencionados, ya han sido prohibidos en Austria, Japón, Noruega y Suecia, desde hace bastante tiempo. Mientras que, en Estados Unidos, el rojo No. 40 aún se encuentra en escrutinio, y en México, ambos continúan en uso.

En relación al daño que ocasionan al ambiente, es bien sabido que su vertido en cuerpos de agua, aun en bajas concentraciones es visible; dañando la actividad biológica de las especies que habitan en esos ecosistemas porque restringe la penetración de la luz, provocando muerte y mutaciones de especies que sobreviven a esas condiciones. Su absorción en suelo, disminuye la fertilidad del mismo, y su presencia en agua residual para tratarse en plantas convencionales, representa un problema grave de contaminación por su resistencia a la biodegradación, particularmente, aquellos que son azoicos. Tales antecedentes son indicios suficientes para concientizar sobre la disminución del uso de pigmentos sintéticos y favorecer el consumo de colorantes naturales.

Lo anterior es la razón por la cual se han buscado alternativas para su sustitución. Los pigmentos naturales pueden ser la mejor alternativa debido a su origen, ya que además de ser compuestos amigables con el ambiente, también presentan propiedades o actividades biológicas. Esto es, debido a que poseen compuestos antioxidantes por su procedencia de especies vegetales, frutas, flores y microorganismos; mismas propiedades que pudieran ser aprovechadas para la preparación de alimentos. Sin embargo, las desventajas de degradabilidad frente a los sintéticos han permitido que su aplicación no sea directamente viable para este fin. Esa podría ser la explicación del porqué, a la fecha se han aprovechado pocas fuentes de pigmentos naturales, entre las que se encuentran las especies *Dactilopius coccus*, insecto del cual se obtiene un pigmento rojo, *Sepiidae officinalis* animal del cual se obtiene pigmento púrpura, *Roccella canariensis* vegetal del cual se extrae pigmento púrpura, *opuntia ficcus-indica* fruto del cual se extrae pigmento rojo, *Tagetes erecta* flor de la cual se extrae pigmento naranja, entre otros.

Sin embargo, entre las desventajas de los pigmentos naturales, se pueden mencionar la sensibilidad a la luz solar, el pH, la temperatura, contenido de compuestos altamente oxidantes, así como su inestabilidad y en ocasiones un poder bajo de fijación.

De forma particular, los pigmentos provenientes de flores son los que se encuentran en menor proporción en investigación, ya que debido a su especial sensibilidad a parámetros ambientales presentan una mayor degradabilidad frente a los sintéticos, e incluso en comparación con otros naturales provenientes de una fuente diferente.

1. 1 Pigmentos

Cuando se refiere a sustancias que son capaces de proporcionar color a un material se utiliza indistintamente el término pigmento o colorante. Sin embargo, en este trabajo se entiende que, al referirse a un pigmento, es dar un significado más amplio que el de colorante, ya que los pigmentos pueden dar origen a los colorantes mediante

modificación de sus moléculas, tratamientos, o uso de sustancias que ayudan a proporcionar el color. En este sentido, se considera el término pigmento como un material que se encuentra en finas partículas y que una vez disperso en un vehículo líquido adecuado, proporciona color. El color que transmite un material o sustancia se determina de acuerdo a la fracción de luz que ésta absorbe en el espectro UV-Vis. En la Tabla 1.1, se muestra el color transmitido de acuerdo a la luz absorbida (Mayo *et al.*, 2003).

Tabla 1.1 Relación de colores en región UV-Vis

| Luz absorbida | | Color transmitido |
|---------------------------------|----------------|-------------------|
| Longitud de onda λ (nm) | Color | |
| 400 | Violeta | Verde-Amarillo |
| 425 | Azul índigo | Amarillo |
| 450 | Azul | Naranja |
| 490 | Azul-verdoso | Rojo |
| 510 | Verde | Púrpura |
| 530 | Verde-Amarillo | Violeta |
| 550 | Amarillo | Azul índigo |
| 590 | Naranja | Azul |
| 640 | Rojo | Verde-Azul |
| 730 | Púrpura | Verde |

La definición de colorantes indica que éstos son sustancias orgánicas intensamente coloreadas o fluorescentes, que son directamente solubles en disolventes o en los propios substratos usados en la industria, como por ejemplo las resinas plásticas. Los colorantes también son conocidos como anilinas, ya que son capaces de comunicar su propio color a otros materiales. Estos colorantes son retenidos en el sustrato por absorción, retención mecánica, o por un enlace iónico o covalente. En el trabajo realizado por San Andrés *et al.* (2010), se encuentra definido un colorante como una sustancia diluida capaz de proporcionar color a un material. Esto sucede siempre que el material tenga cierta afinidad química para retenerlo, es decir, que la sustancia se disuelva durante su aplicación, obteniendo características fisicoquímicas distintas al pigmento. Lo que significa que éste debe tener una cierta propiedad o preparación para fijarse al material a colorear.

Cuando el pigmento no tiene esta propiedad, se hace uso de un fijador, conocido como una sustancia que permite al pigmento adherirse a la superficie de interés, para lo cual el fijador debe cumplir ciertos requisitos, como no alterar la composición química del pigmento, ser incoloro y no ser fácilmente removible. Otras formas de evitar la insolubilidad de los pigmentos, es hacerles reaccionar con sales de calcio favoreciendo la formación de placas sobre el material. Otra estrategia es tratarlos con tartrato de potasio y antimonio para hacerlos solubles (Downham, 2000). Por tanto, los pigmentos naturales pueden ser distinguidos de los pigmentos sintéticos principalmente por el método como se aplican más que por la constitución química o su composición.

En general, la solubilidad parcial de un pigmento es una función de la aplicación de las condiciones del medio y condiciones de proceso, especialmente en ciertas condiciones físicas como la temperatura y humedad. Por otro lado, las propiedades de aplicación de los pigmentos como fuerza de tinción, migración, recristalización y estabilidad térmica son determinadas por sus características (Downham, 2000).

Por su naturaleza y composición química, los pigmentos pueden ser divididos en sintéticos o naturales, inorgánicos u orgánicos; estos últimos son prácticamente insolubles en el medio en el que se incorporan. Sin embargo, la insolubilidad de estos pigmentos puede ser evadida tras la remoción de los compuestos intrínsecos que tienden a formar estructuras orgánicas insolubles.

Algunas diferencias significativas entre un pigmento natural y uno sintético son la forma cristalina y la pureza. Los naturales presentan una forma cristalina, mientras que, en el caso de los sintéticos, ésta puede ser manipulable, Con respecto a la pureza, los sintéticos, generalmente presentan un mayor grado, ya que generalmente son obtenidos en condiciones controladas de precipitación, lo que constituye una gran ventaja sobre los naturales.

1.2 Pigmentos sintéticos

Un pigmento sintético es aquel que es obtenido por medio de síntesis química. Estos pueden ser orgánicos o inorgánicos. Actualmente se cuenta con una amplia gama de pigmentos de ambos tipos o combinados. Los inorgánicos son desarrollados, formulados, manufacturados y controlados principalmente para la industria textil, pinturas y cosmética, mientras que para la industria alimenticia predominan los orgánicos.

Los principales aspectos a favor de los pigmentos orgánicos, son la posibilidad de obtener más brillo o claridad de color, mientras que los inorgánicos presentan mayor resistencia a la luz, estabilidad térmica, acción anticorrosiva, absorción UV y efectos antireflejantes.

La historia de aplicación del uso de pigmentos data de la prehistoria en pinturas rupestres que dan evidencia del uso de los mismos desde hace 30,000 años, pero fue hasta el año 1704, en que fue sintetizado el primer pigmento inorgánico conocido como azul prusiano. Posteriormente, en el siglo pasado fue producido el azul cobalto, luego con experiencia y tecnologías mejoradas se produjo el amarillo cromo, el amarillo cadmio y muchos colores óxidos metálicos en matices como amarillo, rojo y negro. La adición de rojo molibdato en 1936, seguido por el amarillo titanio, en 1960 aumentó la producción de los pigmentos sintéticos inorgánicos, cuyo factor común era la presencia de un metal.

La forma más común de los pigmentos inorgánicos es la de óxidos: TiO_2 (pigmento blanco), Fe_2O_3 (*óxidos de hierro*) y Cr_2O_3 (*óxido de cromo verde*).

Sin embargo, hoy en día, el uso de los pigmentos inorgánicos se ha restringido, particularmente los amarillos de cromo y los pigmentos naranjas de molibdeno por tener plomo y cromo en su composición. El uso de otros que contienen arsénico, también es limitativo por su toxicidad, ya que los límites de concentración en solución efluentes residuales son fijados por entes regulatorias.

La aplicación de los sintéticos inorgánicos, la constituye principalmente la industria de la construcción. Diversas manufacturas basadas en cemento constituyen en su conjunto más del 70% del consumo global de óxidos de hierro. Un 25% de estos colorantes se destinan a la fabricación de pinturas de todo tipo, y el 5% restante se reparte en aplicaciones *masterbatches* (coloreado de materiales plásticos), abrasivos, papel decorativo y asfaltos (Espinoza, 2008). En la Figura 1.1, se presentan imágenes de algunos pigmentos sintéticos inorgánicos y su aplicación.



Figura 1.1. Pigmentos sintéticos inorgánicos utilizados generalmente en la construcción y recubrimientos.

Otras áreas, también utilizan este tipo de pigmentos, sin embargo, se distinguen por su bajo contenido de metales. Son utilizados para empaques de alimentos y juguetes.

Particularmente, los fabricantes de cosméticos, utilizan colorantes con bajos niveles de metales pesados por motivos de salud, ya que en concentraciones altas pueden

provocar desniveles en el cuerpo y suscitar problemas tales como dolor de cabeza, problemas neurológicos y cáncer (Geotech, 2012).

En lo que se refiere a los sintéticos orgánicos, su aplicación es bastante grande, se utilizan en la industria textil, alimenticia y farmacéutica entre otras. Estos son identificados por el grupo funcional que los caracteriza y les confiere el color; a este grupo funcional se le llama cromóforo. En la Figura 1.2 se muestran los cromóforos más comunes (Fernández, 2008).

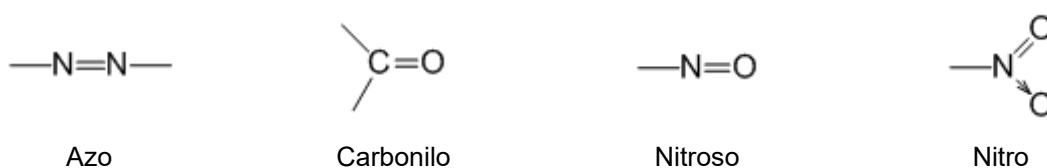


Figura 1.2. Grupos cromóforos comunes que conforman a los pigmentos sintéticos.

Por otra parte, el incremento o suplemento del color en un colorante orgánico, se alcanza por la presencia de grupos que forman sales llamados auxócromos. En la Figura 1.3 se muestran los principales grupos auxócromos (Fernández, 2008).

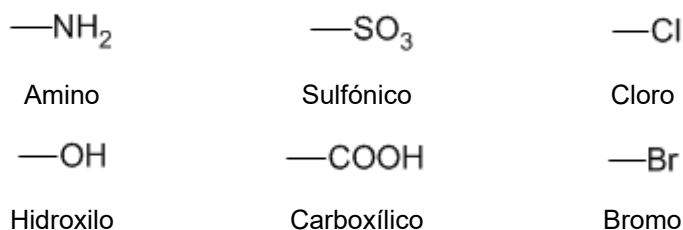
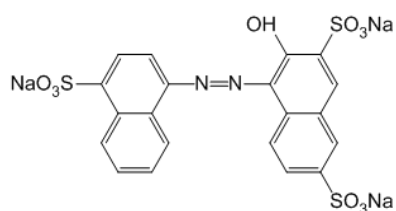


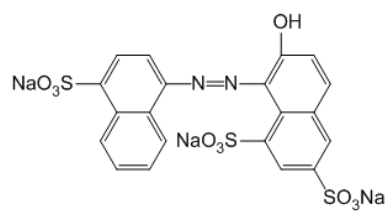
Figura 1.3. Principales grupos auxócromos

Atendiendo los grupos presentes en un colorante sintético orgánico, se conocen tres grandes divisiones: azoicos, ftalocianinas y policíclicos, de los cuales los azoicos tienen un 50% de disponibilidad, seguidos por las ftalocianinas con un 25%, y el resto es de pigmentos policíclicos.

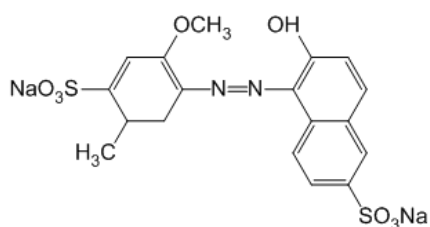
En la Figura 1.4 se muestra la estructura química de algunos pigmentos orgánicos sintéticos (Fernández, 2008).



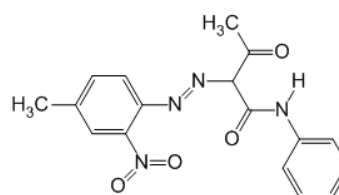
Rojo No. 2



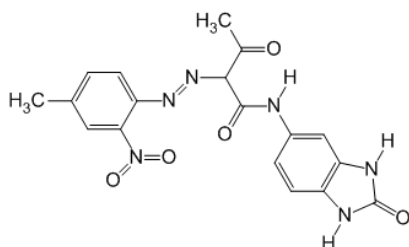
Rojo No. 6



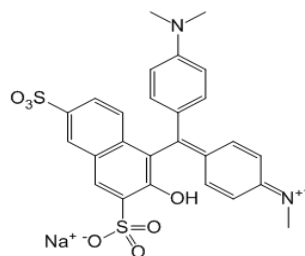
Rojo No. 40



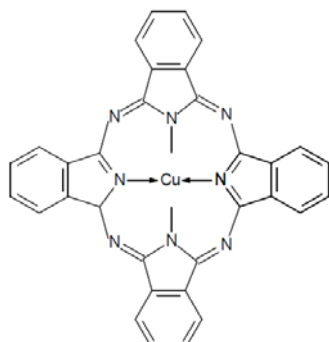
Amarillo No. 1



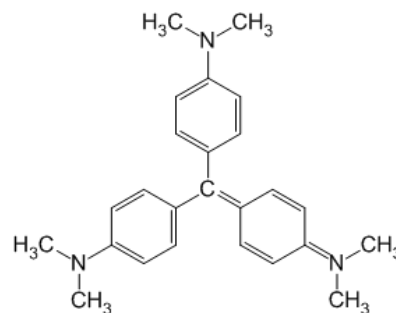
Naranja No. 36



Verde No. 50



Colorante azul ftalocianina



Colorante violeta No. 3

Figura 1.4. Estructura química de algunos pigmentos sintéticos orgánicos.

1.2.1 Pigmentos orgánicos sintéticos en la industria de los alimentos

Particularmente, la mayoría de los pigmentos sintéticos orgánicos, son utilizados para una gran variedad de productos alimenticios y son considerados como aditivos. Entre los más conocidos se encuentran el Azul No. 1 (Azul brillante), Azul No. 2 (Indigotina), Amarillo No. 5 (Tartrazina), Rojo No. 3 (Eritrosina), Verde No. 3 (Verde firme), Rojo 40 y Rojo 5; se encuentran proporcionando coloración a diversos alimentos como carnes, embutidos, quesos, repostería, bebidas, mermeladas, postres, salsas etc.

En la Figura 1.5, se presenta una imagen de algunos de los productos de consumo que contienen pigmentos sintéticos orgánicos.



Figura 1.5. Usos de pigmentos en la industria alimenticia

1.2.2 Legislación en el uso de pigmentos sintéticos

La Food and Drug Administration (FDA), que en español es la Administración de Alimentos y Medicamentos, es una entidad regulatoria que tuvo origen en 1906 en Estados Unidos, y que hasta la fecha es la responsable de proteger la salud pública mediante el aseguramiento de eficacia y seguridad de medicamentos humanos y veterinarios, productos biológicos, dispositivos médicos, cosméticos y productos que

emitan radiación. A la fecha cualquier producto alimenticio o farmoquímico ya sea en fabricación o exportación, debe ser aprobado por la FDA (2014).

En el caso del uso de pigmentos sintéticos en alimentos, en 1958 la FDA en su cláusula DELANEY estableció la prohibición de cualquier tipo de aditivo en alimentos, cosméticos y otros productos que indujera cáncer al ser ingerido por el hombre o algún animal. La cita textual es: “Ningún aditivo se puede considerar seguro si se encuentra que induce al cáncer cuando el hombre o los animales lo ingieren o si se encuentra, después de las pruebas apropiadas para la evaluación de la seguridad de aditivos alimenticios, que induce al cáncer en hombres o en animales”, siendo los colorantes considerados como aditivos esta cláusula los rige desde entonces.

Actualmente, se encuentra prohibido el uso de los siguientes colorantes: azul No. 6; rojos No. 10, 11, 12 y 13; amarillos No. 1 (aplicación externa), 3 y 4 para medicamentos y cosméticos; debido a su estructura azoica, los colorantes mencionados son altamente alergénicos. En el área de alimentos, medicamentos y cosméticos se prohibió el rojo No. 2, violeta No. 1, grafito y anaranjado B (Méndez y *et al.*, 2005).

1.3 Pigmentos naturales

Los pigmentos naturales carecen de sustancias dañinas, como los biosidas o plastificantes, y su impacto medioambiental es muy inferior al de los productos sintéticos; también pueden ser de tipo orgánico e inorgánico. Estos últimos están formados por minerales de composición definida, y se obtienen de tierras y fósiles, bajo diferentes formas químicas, como silicatos, carbonatos y sales de diferentes metales, entre los cuales se encuentra el hierro. Mientras que los orgánicos son obtenidos de diversas fuentes como frutas, plantas, insectos, bacterias, algas y hongos.

1.3.1 Pigmentos de origen microbiano

En relación a los pigmentos de origen microbiano, éstos son sintetizados por ciertas especies de algas, levaduras, hongos y bacterias, por lo que es considerada una característica genética que distingue al microorganismo. Los pigmentos son secretados como metabolitos secundarios y algunos tienen propiedades antibióticas, su formación es dependiente de la presencia de la luz, composición del sustrato y la temperatura de incubación.

Generalmente, la presencia de pigmentos en los microorganismos sometidos a la luz, se debe al efecto protector frente a la luz visible y el ultravioleta cercano. Los pigmentos protegen a la célula de la foto oxidación y se localizan en la membrana plasmática. Los colores van desde el tono amarillo al rojo y generalmente son carotenoides.

El mecanismo por el cual la luz visible afecta a los microorganismos se basa en el fenómeno de foto oxidación, en presencia de oxígeno atmosférico algunos pigmentos celulares (flavinas, citocromos) actúan como foto-sensibilizadores. La molécula de colorante absorbe energía lumínica y la cede al O₂ pasándola de su estado normal a un estado excitado, el cual inicia reacciones de oxidación en cadena, llevando a la muerte al microorganismo. En el caso de las bacterias fotosintetizadoras, los pigmentos absorben luz con fines fotosintéticos, los carotenoides se localizan junto a las bacterioclorofilas en las membranas fotosintéticamente activas de los cromatóforos.

Bacterias como *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia*, y levaduras como, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*, son algunos ejemplos de estos microorganismos.

Algunos de los pigmentos de origen microbiano son la Pulquerrimina: pigmento rojo que contiene hierro en su molécula, es sintetizado por la *Cándida pulcherrima*, levadura aislable de zumos de frutas, flores con néctar y el tracto gastrointestinal de las abejas. La prodigiosina: pigmento de naturaleza pirrólica, de color rojo oscuro, el

cual es producido por la bacteria *Serratia marcescens*. La Indigoína: pigmento azul derivado de las azoquinonas, es excretado al medio por la bacteria *Pseudomonas indigofera*.

Entre los colorantes fenacínicos el más conocido es la piocianina producido por *Pseudomonas aeruginosa*. Sus cultivos muestran una fluorescencia amarillo verdosa, su origen está en las pioverdinas cromopéptidos que aparecen cuando hay limitación de hierro. Actúan como sideróforos que sirven para captar y transportar hierro al interior de la célula.

En la Figura 1.6, se muestran imágenes de algunas bacterias y algas que producen pigmentos, la imagen superior izquierda es la bacteria *Acitenobacter baumannii*, la imagen superior derecha es el alga *Porphyridium purpureum*, la imagen inferior izquierda es el alga *Rothophyta* y la imagen inferior derecha es la bacteria *Rhodospirillum*. Otros pigmentos con riboflavina amarilla de Ashbya; azo-antroquinona naranja de Phoma y azul violáceo, provienen de la *Chromobacterium violaceum* y también han sido estudiados por distintos autores.

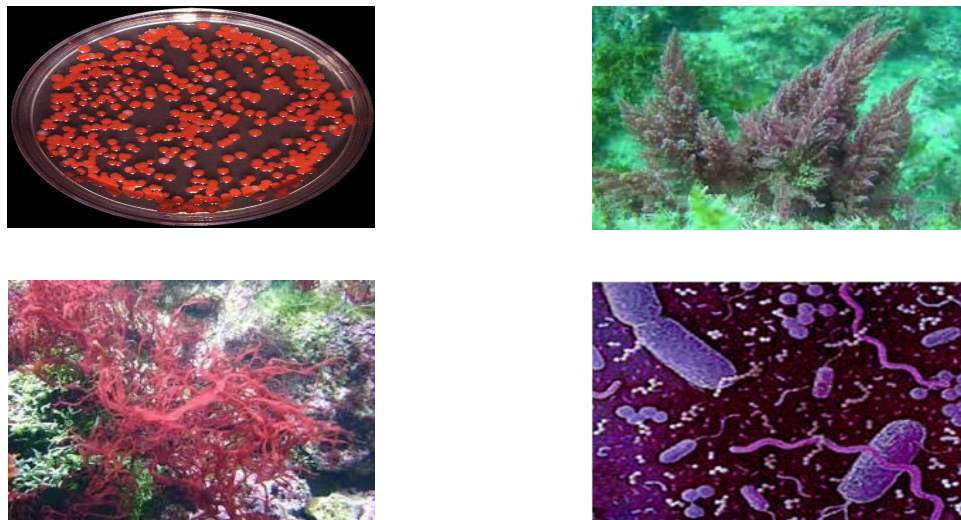


Figura 1.6. Bacterias y algas que producen pigmentos

1.3.2 Pigmentos obtenidos de insectos

En el caso de la producción de pigmentos obtenidos por insectos, destaca el rojo carmín profundo (ácido carmínico); el cual es un pigmento que se encuentra en los huevecillos que proviene de las hembras de ciertas cochinillas (*Dactylopius coccus*). Los insectos se crían sobre los nopales o tunas (cactus del género *Opuntia*). Actualmente, este pigmento es utilizado en la industria de los cosméticos y alimenticia.

En la Figura 1.7, se muestran imágenes de las cochinillas, el pigmento que contienen y uno de sus usos en la industria alimenticia.

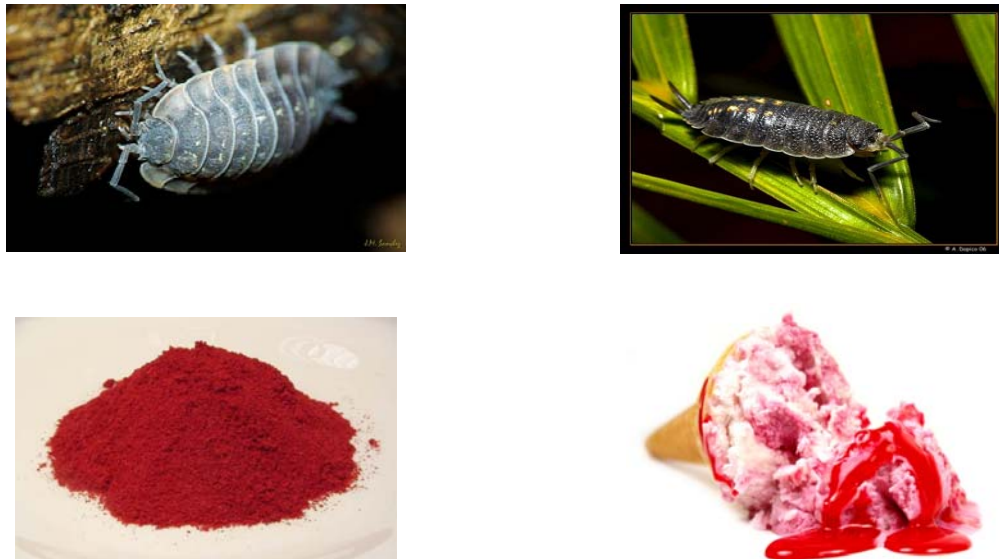


Figura 1.7. Pigmento rojo carmín proveniente del insecto *Dactylopius coccus* y su uso.

Este tipo de pigmento es conocido desde hace muchos años. Sin embargo, ha sido sustituido por pigmentos sintéticos como el Ponceau 4® de la misma tonalidad, rojo carmín, pero es sospechoso de ser dañino para la salud, por lo que su demanda bajó, y en el año 2011, las exportaciones de cochinilla en Perú, alcanzaron los US\$250 millones, al sumar 2,500 toneladas (Asociación de Exportadores. ADEX), esto debido

a que actualmente las empresas productoras de colorantes naturales transforman el 95% de la cochinilla para producir y exportar carmín de cochinilla y ácido carmínico, cubriendo la creciente demanda de colorantes naturales en el mundo.

Otro pigmento que proviene de insectos es el rojo o café rojizo profundo, obtenido del insecto *Laccifer lacca*. Se trata de un pequeño artrópodo de color rojo y extremidades oscuras, perteneciente a la familia de los *Coccoidea*, pariente próximo de la Cochinilla. El insecto se hospeda en los árboles *Qinchoncho cajanus* y el llamado Árbol de la Lluvia *Samanea samam*. En la Figura 1.8, se muestran imágenes del insecto y el pigmento que se obtiene.



Figura 1.8. Insecto *Laccifer lacca* y el pigmento que produce.

El colorante tintóreo es una sustancia segregada por las hembras de este insecto, de donde, precisamente, toma el nombre de laca. El insecto es muy abundante en la India, Tailandia, China y también se encuentra en México. En la actualidad, la producción obtenida de este insecto es una actividad económica importante en Tailandia y la India, donde ocupa una población agrícola estimada en más de 5 millones de habitantes de regiones pobres y su producción ha alcanzado más de 40 mil toneladas. El color rojo puede ser ampliamente utilizado en las bebidas de frutas jugo de vegetales, condimentos compuestos, mermelada, los productos de cacao, chocolates y productos de chocolate, caramelo y vino.

1.3.3 Pigmentos de origen vegetal

Dos diferentes clases de pigmentos determinan el color en flores, hojas y frutas y se dividen en los liposolubles e hidrosolubles, los liposolubles son las clorofilas y los carotenoides, mientras que los hidrosolubles son los flavonoides y antocianinas (Mulder y Vertoorte, 1994).

De los pigmentos orgánicos de origen vegetal más conocidos y utilizados, se encuentran los provenientes de frutas verduras y plantas.

En cuanto a los pigmentos rojos, a la fecha se han reportado algunas fuentes de obtención como el amaranto, especialmente el género *Celosia*, flores de bugambilia (*Bougainvillea glabra*) (Heuer *et al.*, 1994), y algunas especies de pitayas pertenecientes a los géneros *Hylocereus* y *Stenocereus* (Wybraniec *et al.*, 2001), garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) (Reynoso *et al.*, 1997), flores del cactus de navidad (*Schlumberger buckleyi*) (Kobayashi *et al.*, 2000), la jiotilla (*Escontriachiotilla*) (Ramos, 1983; Pimentel, 1984) y la fruta de la palma de rattam (*Calanus draco*), utilizada en el este de Asia para obtener el pigmento rojo sangre. La Tabla 1.2, muestra algunas frutas y verduras de las que se ha extraído pigmento.

Tabla 1.2. Diferentes pigmentos obtenidos de frutas y verduras

| Autor | Pigmento | Fuente |
|---------------------------------|-------------|--------------------------------|
| Lozano (2009) | Púrpura | <i>Opuntia stricta</i> |
| Ramos <i>et al.</i> , (2008) | Púrpura | <i>Calophyllum brasiliense</i> |
| Aguilera <i>et al.</i> , (2012) | Café – Rojo | <i>Ficus carica</i> |
| Dueñas <i>et al.</i> , (2008) | Rojo | <i>Opuntia ficus-indica</i> |

Otro rubro de pigmentos de origen vegetal es referido a las flores, algunas de ellas se muestran en la Figura 1.9.



Ageratum houstonianum



Bellis perennis



Viola tricolor



Salvia splendens



Salvia patens



Hydrangea sp.

Figura 1.9. Fuentes florales de pigmentos

No obstante, a pesar de que es conocido su poder de coloración, pocas especies florales son conocidas y utilizadas para este fin. Tal es el caso de la *Dalia*, *Torenia* y *Salvia patens*, entre otras (Lara *et al.*, 2014, Oyama y Kondo, 2004 y Miyazaki *et al.*, 2006).

Dentro de la gama de especies florales que pudieran ser fuente de obtención de pigmentos, se encuentran las especies identificadas como *Especie floral A* de tonalidad amarilla fluorescente y *Especie floral B* de tonalidad azul, motivo de estudio. De acuerdo a su origen, y coloración, resulta interesante su estudio como fuentes de pigmento y propiedades de alto poder antioxidante, lo que podría resultar de gran interés para la industria alimenticia, fármacos y cosméticos, sin embargo, las publicaciones sobre estas especies son escasas y ninguna se encuentra relacionada en su uso como pigmentos. A continuación, se presenta alguna de la información encontrada sobre estas especies.

1. Especie floral A

La especie floral A es originaria y antes endémica de Namibia y Sudáfrica, sin embargo, a través de los años se ha aclimatado en muchas regiones del mundo de entre las cuales se incluye el Mediterráneo, zonas de Europa, oeste de Estados Unidos

y México. Dreyer et al. (2009), relacionaron la fenología y aclimatación de la especie con el cambio climático.

Esta especie es considerada normalmente una maleza, altamente invasora y agresiva en muchas partes del mundo debido a la alta velocidad de generación de bulbos (Verdaguer *et al.*, 2010). Florece con una flor color verde-amarillo; de acuerdo a Sequin (2012), se conoce que posee flavonoides, así como glucósidos del orden de las chalconas y auronas. Información de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) (2015), muestra algunos datos técnicos de la especie. En la Tabla 1.3 se presenta un resumen de su descripción.

Tabla 1.3. Descripción técnica de la *Especie floral A*

| Parámetro | Descripción |
|------------------------|--|
| Hábito y forma de vida | Hierba sin tallo, generalmente con pelos sencillos. |
| Hojas | Basales, sobre largos pecíolos, compuestas por 3 hojillas generalmente acorazonadas, llamadas foliolos, que nacen de un mismo punto (como las hojas en una palmera). |
| Flores | El cáliz de 5 sépalos, de hasta 8 mm de largo; la corola de 5 pétalos unidos en la base, de hasta 25 mm de largo, de color amarillo brillante; estambres 10 distribuidos en 2 series; estilos 5. |
| Frutos y semillas | El fruto es una cápsula cilíndrica, de hasta 6 mm de largo. Semillas numerosas, con varias crestas transversales. |

A la fecha se conocen pocos estudios sobre su aplicación. Sahin (2004) aisló un nuevo tipo de bacteria fijadora de nitrógeno y oxalato oxidativa *Azospirillum* sp., de las raíces de ésta especie vegetal, Ibrahim *et al.*, (2013) encontraron un nuevo flavonoide en la flor de esta especie, sin embargo, se desconocen estudios referentes a su aplicación como pigmento.

2. *Especie floral B*

Si bien existen algunos estudios sobre la especie *floral B*, éstos se enfocan al estudio de su aplicación en remedios herbolarios. Es conocida desde el siglo XVI, se reporta

con propiedades curativas y de uso herbolario debido a que se le asocian propiedades antihelmínticas y para sanar heridas; también se le conoce como febrífuga, antipirética, anticarcinógena, antidiarréica y coagulantes (UNAM, 2015).

Según información encontrada en la CONABIO (2015), en la Tabla 1.4, se resume la descripción técnica de la especie.

Tabla 1.4. Descripción técnica de la *Especie floral B*

| Parámetro | Descripción |
|------------------------|---|
| Hábito y forma de vida | Planta erecta, robusta o delicada, con o sin pelos |
| Tamaño | De 40 a 80 cm 1.5 m de alto. |
| Tallo | Derecho, por lo general ramificado y áspero en la parte superior. |
| Hojas | Con vainas laxas, membranosas y secas, a veces teñidas con morado, de 1.5 a 2.5 (5) cm de largo y 0.5 a 0.7 (2) cm de ancho, sin pelos, con frecuencia ciliadas en la parte superior, láminas ovado-lanceoladas o oblongo-lanceoladas, de (4) 8 a 20 cm de largo por 2.5 a 4 (5) cm de ancho, ápice agudo o acuminado, con frecuencia la base acorazonada o redondeada, envainante, haz algo áspero, envés veloso o con pocos pelos |
| Flores | Con pétalos iguales o subiguales, de color azul intenso (excepcionalmente blancos), de \pm 1.5 cm de largo por \pm 2 cm de ancho; estambres 3, estaminodios (vestigios estériles de estambres) 3, sus anteras amarillas, en forma de cruz o de H; sépalos de 5 a 7 mm de largo. |
| Frutos y semillas | El fruto es una cápsula con dos valvas, elipsoide, cortamente apiculada, de unos 7 mm de largo; semillas 4, con marcas en forma de pequeños hoyos, piramidales, de 2 a 3 (3.5) mm de largo. |

La Especie floral B, es la flor de una hierba erecta de tallos nudosos, las hojas son puntiagudas, envolventes y alargadas. Las flores son azul intenso y suelen desarrollarse en grupos de tres flores.

Esta especie vegetal ha sido estudiada por el impacto que tiene sobre distintos lugares y especies endémicas, así como las modificaciones que puede realizar al suelo donde se desarrolla (Güçlütürk.et al, 2012). Por tanto, los estudios van enfocados en su fenología e impacto ambiental que producen debido a que son invasivas. Información

aislada sobre esta especie de flor, indica que es originaria de México, está presente en clima templado entre los 1800 y 2500 metros sobre el nivel del mar y es asociada a vegetación de bosques de encino y pino.

1.4 Estructura química de los pigmentos naturales

La mayoría de los pigmentos naturales están agrupados en no más de seis conjuntos de estructuras: tetrapirrolas (clorofilas), isoprenoides (carotenoides), quinonas (flavonoides), benzopironas (chalconas), compuestos N-heterocíclicos y metaloproteínas. Algunos autores consideran que las antocianinas se deben agrupar dentro de los flavonoides, otros, sin embargo, consideran que al poseer una estructura química más compleja estos pertenecen a otro rubro diferente de pigmentos. Sin embargo, en este trabajo se agruparán en cuatro clases: Clorofilas, Carotenoides, Flavonoides y Antocianinas según Delgado y Paredes (2002), se han reportado cerca de 34 tetrapirrolas, 600 carotenoides, más de 4100 flavonoides y cerca de 250 antocianinas presentes en pigmentos de origen natural.

1.4.1 Clorofilas

La palabra clorofila proviene del griego χλωρος, chloros, que significa verde, y φύλλον, fýlon, que significa hoja. Las clorofilas son derivados tetrapirrolas macrocíclicas conteniendo en su forma natural un ion quelato de magnesio. Son responsables del color verde de vegetales y algunas frutas, también se encuentran en algas y bacterias. Además, en las plantas, las clorofilas son fotoreceptoras y en la fotosíntesis forman un circuito cerrado de dobles enlaces conjugados que les permiten absorber luz. Por su importancia en la fotosíntesis se han desarrollado un gran número de técnicas analíticas para su determinación y separación, entre las cuales se destaca la determinación espectrofotométrica con dos bandas, la primera en el rango de longitud de onda 400-500 nm y la segunda de 600-700 nm (Delgado y Paredes 2002).

1.4.2 Carotenoides

Los carotenoides son de los pigmentos más abundantes en la naturaleza; plantas, bacterias fotosintéticas y protozoarios (plancton) son las principales fuentes de los carotenoides, los cuales son requeridos para el desempeño de los organismos vivientes de vertebrados e invertebrados. Los carotenoides se acumulan en algunos órganos como los ojos, piel de peces y plumaje de aves, y en las especies vegetales en los frutos y flores de pigmentación que va de la amarilla a roja. La estructura básica de los carotenoides es una cadena conjugada de polipropenoides. Los carotenoides causan un impacto positivo en el humano. Ellos han mostrado una singular capacidad de enfriamiento molecular y protegen contra oxidación fotosensible de lípidos, debido a su naturaleza orgánica conjugada son compuestos liposolubles que por técnicas espectrofotométricas UV-Vis, presentan bandas en la región de 330-510 nm (Yeverino, 1997). En la Figura 1.10 se muestra la estructura química del carotenoide α -Crytoxantina (3R, 6'R) – β,ϵ -caroten-3-ol, que es obtenido del grano de maíz amarillo (Groos, 1991) y la estructura del carotenoide Phytoeno epóxido decahidro- ψ,ψ -caroteno (Groos, 1991) es extraída del tomate rojo.

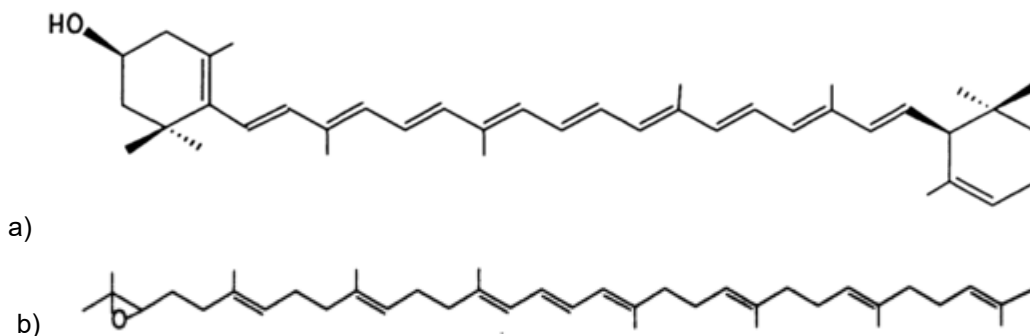


Figura 1.10. Estructuras químicas de carotenoides obtenidas de muestras vegetales; a) α -Crytoxantina (3R, 6'R) – β,ϵ -caroten-3-ol y b) Phytoeno epóxido decahidro- ψ,ψ -caroteno

1.4.3 Flavonoides

Flavonoide (del latín flavus, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "ruta biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa.

Las Figuras 1.11 y 1.12 muestran el proceso de la biosíntesis de flavonoides, los reactivos referidos con números son las enzimas involucradas en el mecanismo de reacción, las cuales se muestran en las Tablas 1.5 y 1.6, correspondientes a la biosíntesis de la estructura básica y compuesta de los flavonoides (Krieger y Verpoorte 1994). La estructura básica se refiere a la chalcona en la Figura 1.11 y la compuesta a la naringerina en la Figura 1.12, ambas estructuras se consideran patrones ya que a partir de ellas se da la diversidad de compuestos flavonoides.

Tabla 1.5 Enzimas involucradas en la biosíntesis de Flavonoides I

| Número | Enzima |
|--------|---------------------------|
| 1 | Acetil-CoA-Carboxilasa |
| 2 | Fenilalanina-Amonio-Liasa |
| 3 | Cinnamato-4-Hidroxilasa |
| 4 | 4-Coumarato:CoA-Ligasa |
| 5 | Chalcona sintasa |
| 6 | Chalcona isomerasa |

Tabla 1.6 Enzimas involucradas en la biosíntesis de Flavonoides II

| Número | Enzima |
|--------|---|
| 1 | 2-Hidroxiflavona sintasa |
| 2 | Flavona sintasa |
| 3 | (2S)-Flavanona-3-hidroxilasa |
| 4 | Flavonoide-3'-hidroxilasa |
| 5 | Flavonoide-3',5'-dihidroxilasa |
| 6 | Flavonol sintasa |
| 7 | Dihidroxiflavanol-4-reductasa |
| 8 | Antocinidin/flavonol-3-O-glucosil transferasa |
| 9 | Flavan-3,4-cis-diol-4-reductasa |

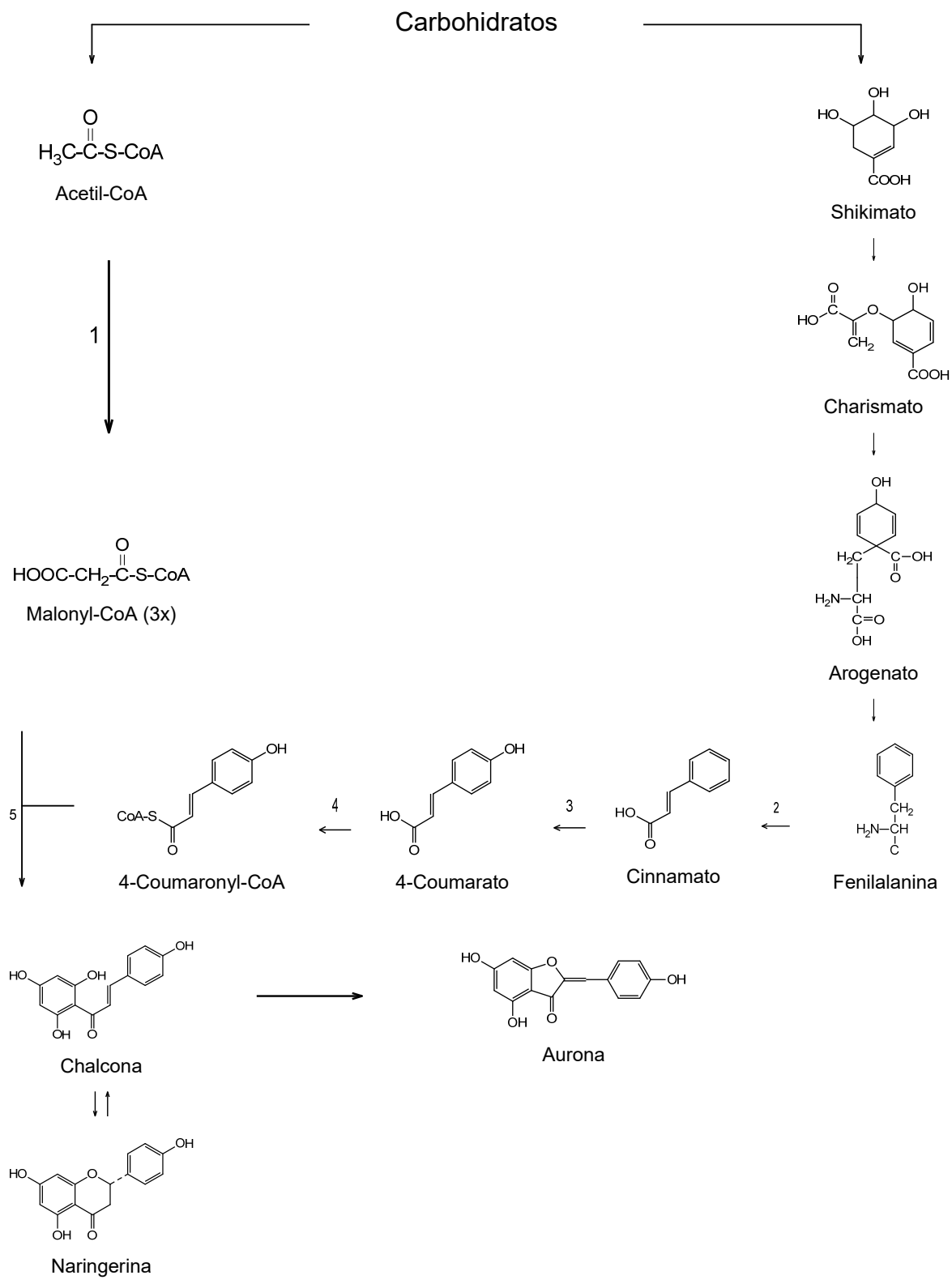


Figura 1.11 Biosíntesis de Flavonoides I

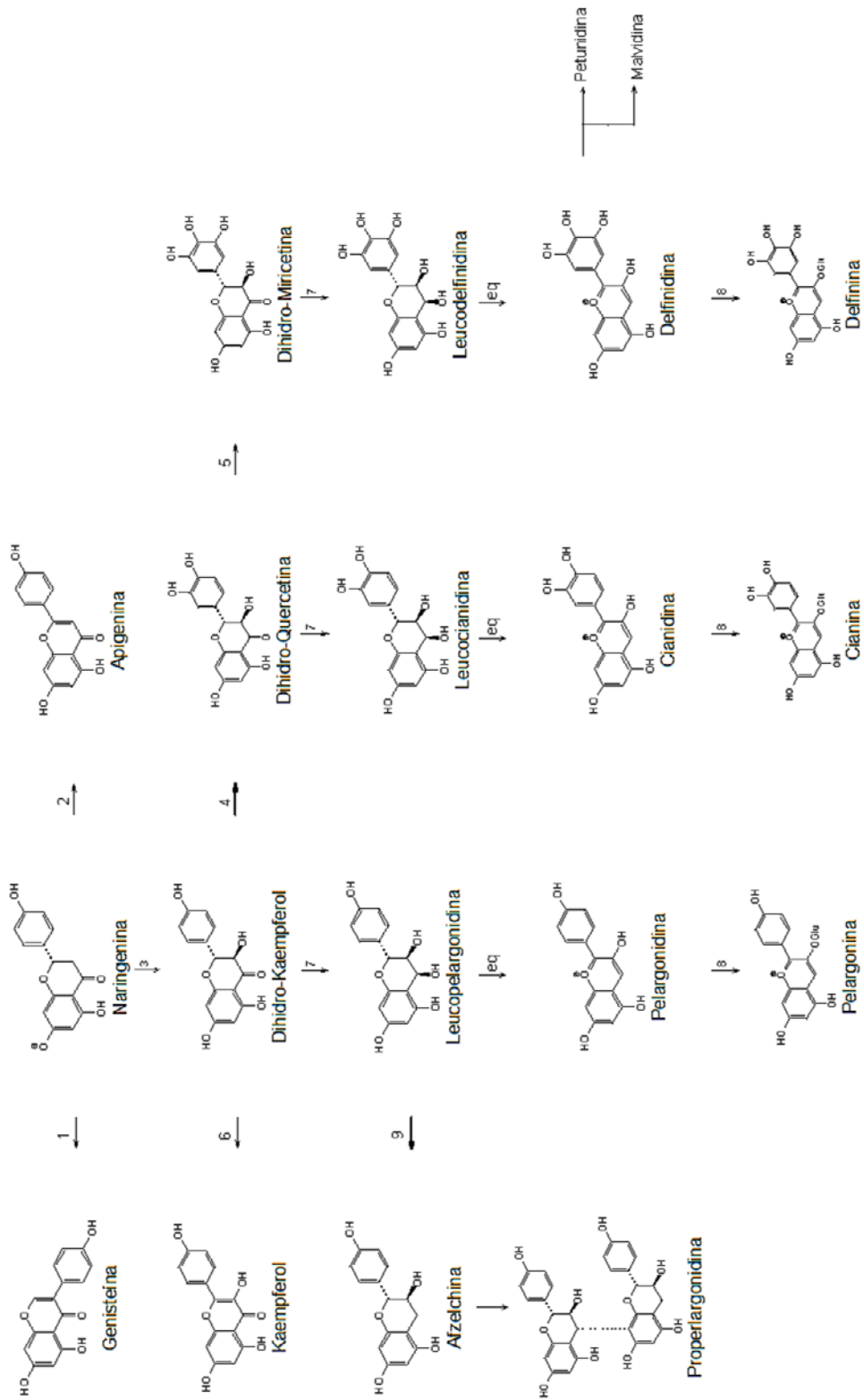


Figura 1.12 Biosíntesis de flavonoides II

Los flavonoides son pigmentos naturales que imparten cierta coloración a las plantas para diversas funciones, en diferentes gamas que van desde la blanca hasta el morado. Debido a esto, los flavonoides representan un potencial para el reemplazo competitivo de pigmentos sintéticos en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos y para la obtención de productos con valor agregado dirigidos al consumo humano.

La Figura 1.13 muestra las estructuras químicas básicas de los diferentes tipos de flavonoides.

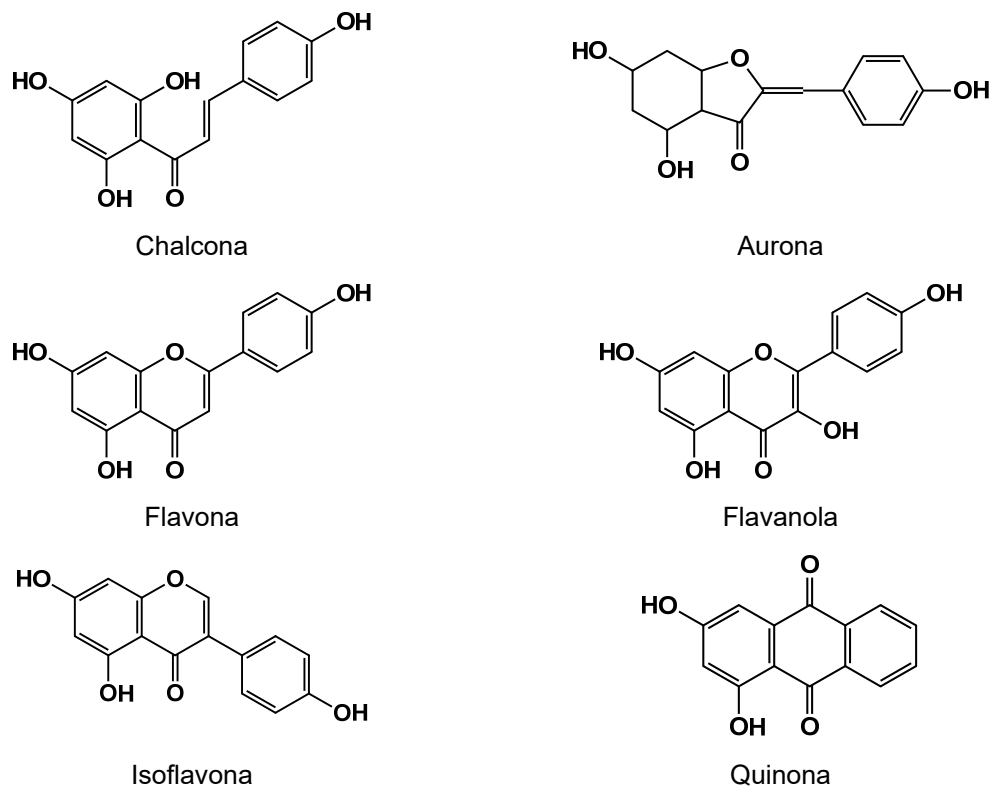


Figura 1.13 Estructuras de pigmentos flavonoides

Los flavonoides se pueden encontrar en diversos vegetales, frutas, verduras y especies florales, proporcionando diferentes tonalidades al producto, como lo muestra la Figura 1.14.

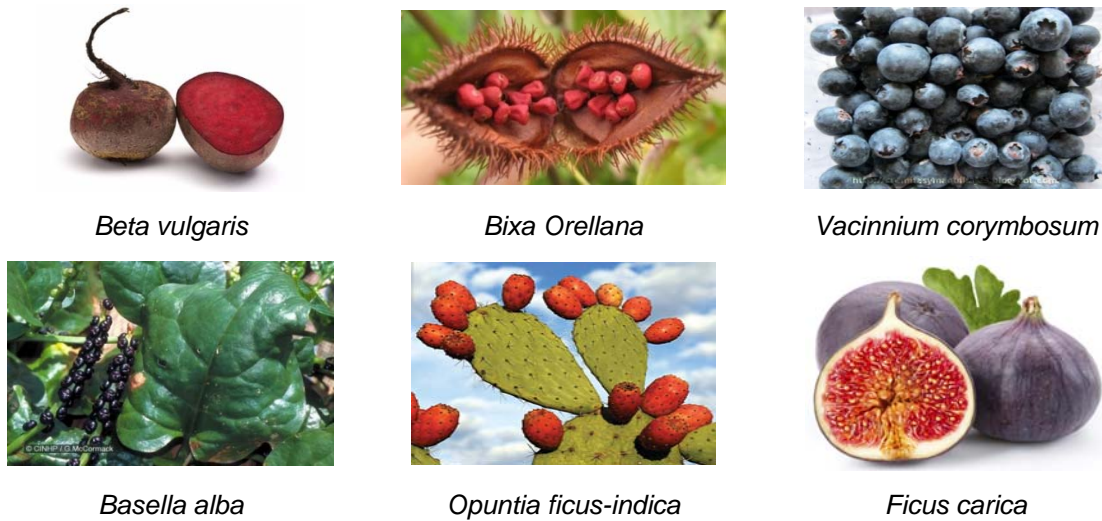


Figura 1.14. Frutas y verduras que dan origen a pigmentos naturales

Los flavonoides son metabolitos secundarios que generalmente se producen en plantas, comúnmente vienen acompañados de glucósidos. La estructura de flavonoides muestra alta variedad. La estructura básica es 2-fenilbenzo-gamma-pirona. Los flavonoides generalmente contienen 2 anillos fenólicos ligados a una cadena lineal de tres carbonos o con 3 átomos de carbono formando una estructura de 5 miembros (auronas). De forma similar a los carotenoides, los flavonoides también contienen considerables actividades biológicas. Sus efectos benéficos en cáncer y deficiencias del corazón se han probado en varias investigaciones.

Se ha establecido que los flavonoides mejoran el remodelamiento cardiovascular y funciones vasculares resultando en no tener la deficiencia de hipertensión. Además, reducen el riesgo de males crónicos y benéficos efectos en inflamaciones y úlceras.

La diferencia entre la coloración amarilla de algunos flavonoides a los carotenoides, radica en la intensidad; la coloración de los carotenoides es más intensa, mientras que la de los flavonoides está en un rango más verdoso.

En la Figura 1.15 se muestran coloraciones de algunas flores debidas a los flavonoides y a los carotenoides (Sequin, 2012).

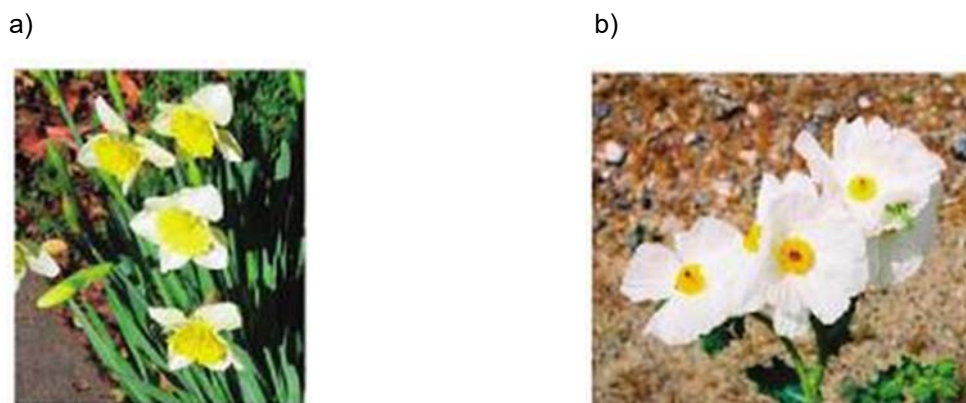


Figura 1.15. a) *Narcissus cultivar* con coloración amarilla de flavonoides.

b) *Argemone sp.* con coloración amarilla de carotenoides

Una propiedad especial de los flavonoides es que absorben una gran cantidad de luz UV, propiedad que les ayuda a las flores en la reproducción ya que algunas especies de insectos, como las abejas, se sienten atraídas a su coloración radiada puesto que tienen la visión desarrollada en el espectro UV.

La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua.

1.4.3.1 Auronas y Chalconas

Como ya se indicó anteriormente, una clase de flavonoides, la constituyen las auronas y chalconas, tenidas en cuenta por algunos autores por estar presentes en una cantidad considerable de plantas. Cuando el esqueleto sufre modificaciones, se puede convertir en el esqueleto de los isoflavonoides o el de los neoflavonoides, que por lo tanto también son derivados de los flavonoides dando origen a flavonoides más complejos (Winkel-Shirley, 2001).

Las auronas y chalconas son pigmentos con tonalidad amarillo brillante, llamados también pigmentos antocloros debido a que en pH básico tornan su color a rojo, también son las precursoras del resto de los flavonoides, su existencia no está limitada a los pétalos en las flores, sino que también en las hojas, frutas y raíces.

Es importante mencionar que también ayudan en la copigmentación de los carotenoides amarillos, una de las características importantes de las auronas y chalconas es que forman un complejo insoluble con coloración rojo intenso cuando está en presencia de magnesio en pH básico, esta se considera una prueba cualitativa de presencia para estos flavonoides (Xu R. *et al.*, 2010).

Los isoflavonoides en contraste a los demás flavonoides no ocurren en todos los vegetales, tienen una inmensa variación estructural, así como actividades biológicas, estos no contribuyen a la coloración en las flores sino que proporcionan las actividades importantes como propiedades osteogénicas, insecticidas, antimicrobianas y antimicóticas. Meneses *et al.*, (2008), optimizaron el proceso de extracción de flavonoides de la flor de manzanilla (*Matricaria recruta*), para cuantificar flavonoides usaron un método colorimétrico de cloruro de aluminio, además disolvieron la muestra en una mezcla de metanol-agua 50:50 y 80:20 a una temperatura de 80 °C en condiciones de reflujo, también con acetona y acetato de etilo (50:50) sin embargo no tuvieron buenos resultados, pero sí con etanol al 45%, con resultados mayores al 80%. En este trabajo, también se menciona que el extracto hidroalcohólico sirve como antiinflamatorio, ansiolítico, vulnerario, desodorante, antibacteriano y estimulante cutáneo, esto se atribuye a la apigenina que es el flavonoide mayoritario en esta solución.

1.4.3.2 Quinonas

Con respecto a las quinonas, éstas han sido usadas en la tinción de productos textiles (antraquinonas de las raíces de *Rubia tinctorum*) y en la preparación de cosméticos (naftaquinonas de *Lawsonia alba*).

En cuanto a sus métodos de identificación se encuentra la espectrofotométrica; las quinonas presentan dos bandas de absorción en la región UV-Vis, la primera en el rango de 220 y 290 nm y la segunda en el rango de 400 y 520 nm. También se conoce su identificación por espectroscopía IR, en la cual las quinonas presentan picos en el intervalo de 1695-1650 y 1640-1595 cm^{-1} .

La fluorescencia inducida por rayos UV, es aprovechada para el estudio de control metabólico de células sanguíneas, para el estudio de protección a membranas de células neuronales, así como por su actividad anticarcinógena.

En la Figura 1.16 se muestran las quinonas más representativas y en la Figura 1.17 se muestran imágenes digitales de fluorescencia microscópica en el control de células neuronales, en donde se observa que la sustancia reveladora denota las quinonas (Abelson *et al.*, 2009).

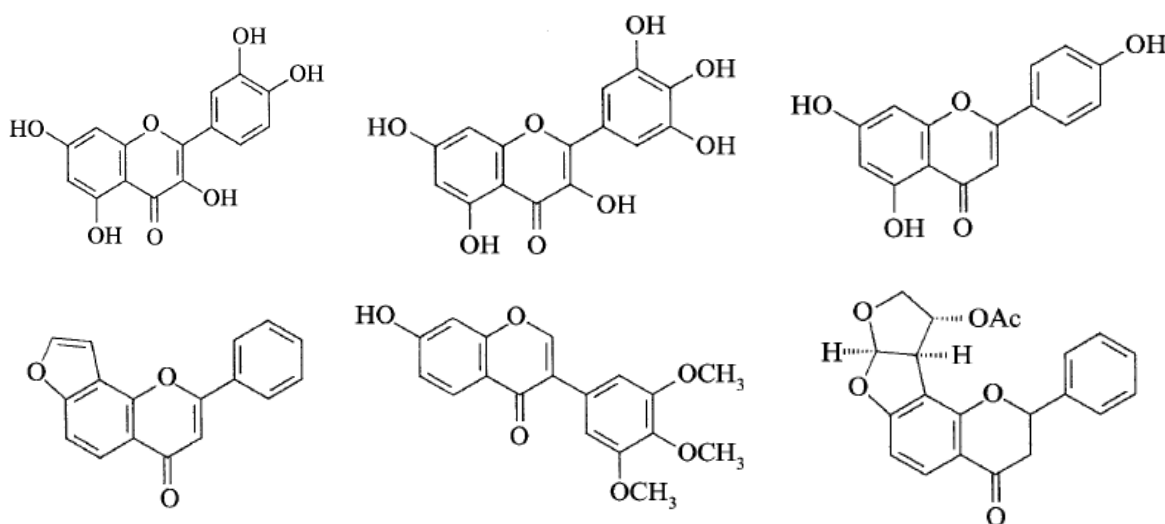


Figura 1.16. Quinonas con propiedades anticarcinógenas y de fluorescencia UV.

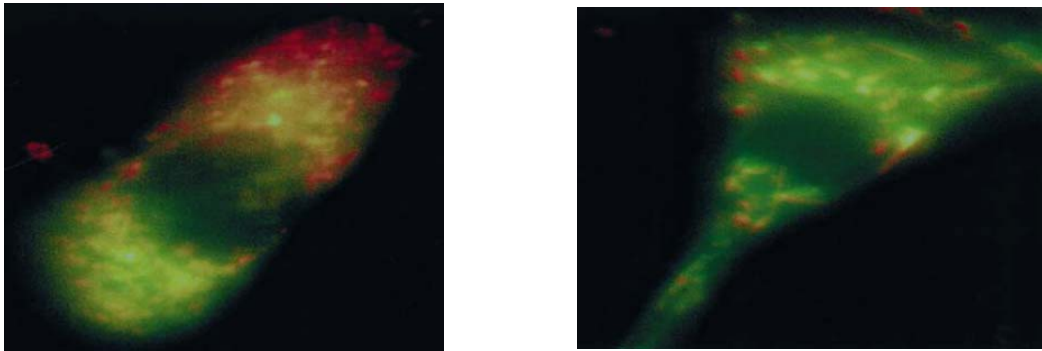


Figura 1.17. Imágenes digitales de fluorescencia microscópica en el control de células neuronales usando quinonas.

En general, todos los flavonoides, debido a su estructura aromática conjugada, actúan como protector solar contra los rayos destructivos UV, también se ha estudiado que los flavonoides intervienen en distintos procesos celulares vegetales desde la germinación de las semillas, el crecimiento de éstas, y especialmente en la generación de lignina, actúan como protector antimicrobiano.

En relación a investigaciones realizadas de flavonoides hallados en flores la investigación no es extensa, en 2013 Ibrahim *et al.*, determinaron la presencia de corniculatina A, un flavonoide de la especie *Oxalis corniculata*, dicha especie posee propiedades significativas medicinales, los disolventes usados fueron acetato de etilo para retener la fracción soluble de la planta en dicho disolvente y el glucósido luteolina para el resto de los flavonoides.

Barron *et al.* en 2011 determinaron que la especie *Calia secundiflora* posee actividad antioxidante y propiedades medicinales de interés agronómico. La actividad antioxidante se determinó con un perfil de flavonoides cuantificando flavonoides y compuestos fenólicos utilizando el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

1.4.4 Antocianinas

Desde 1916 se ha hecho una distinción de pigmentos de origen vegetal, los que poseen antocianinas y los que tienen flavonoides. Las antocianinas (del griego άνθος (anthos): 'flor' + κυανός (kyáneos): 'azul') son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos (Wagner, 1982). Desde el punto de vista químico, las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides y son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. Sus funciones en las plantas son múltiples, desde la de protección de la radiación ultravioleta hasta la de atracción de insectos polinizadores (Wong, 1995).

Por tanto, la diferencia entre una antocianina y una antocianidina es que el grupo funcional situado en el anillo central tiene un glucósido, para todas ellas la terminación es "ina" y cuando no lo tienen es la terminación "idina". La Figura 1.18 muestra dicha diferencia.

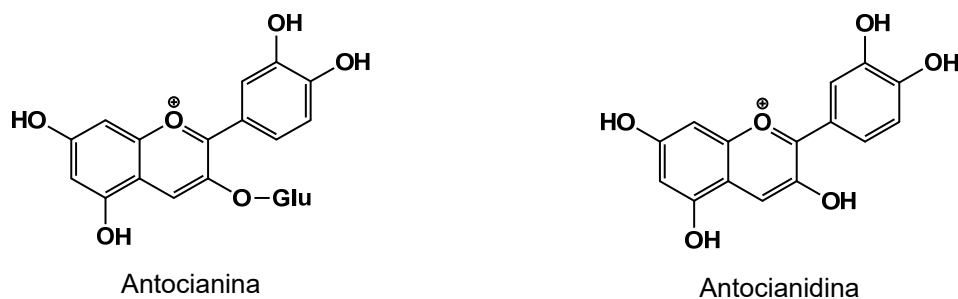


Figura 1.18 Diferencia entre antocianina y antocianidina

Los grupos glucosídicos que normalmente se encuentran copigmentando a las antocianinas se muestran en la Figura 1.19.

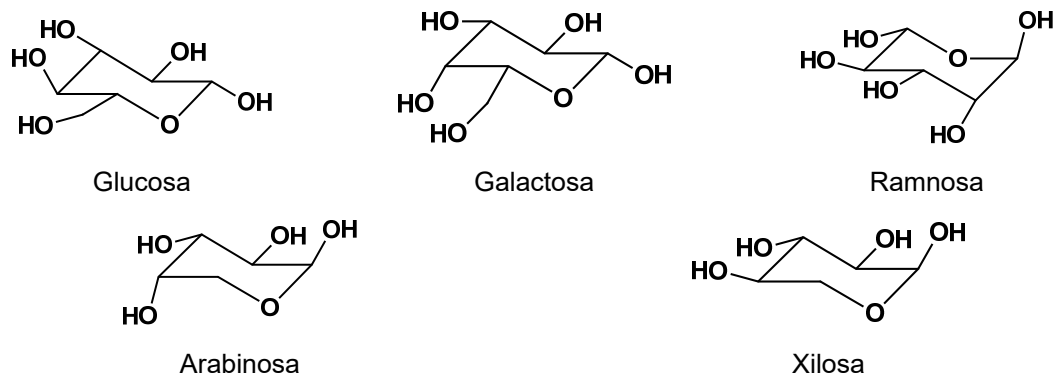
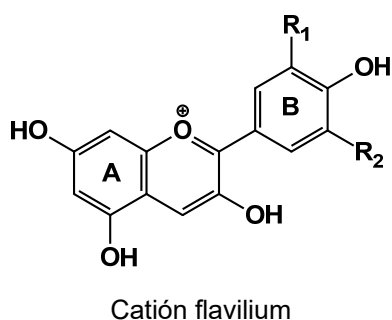


Figura 1.19. Glucósidos que acompañan normalmente a antocianinas (Socaciu,2008)

Solo seis antocianidinas son comunes en plantas superiores, la pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina, todas parten del catión flavilium, que se muestra en la Figura 1.20, de acuerdo al grupo funcional que tenga este catión, recibe el nombre de la antocianina correspondiente, además que las partes de este catión están dadas por A y B que son la estructura benzopirilio y un anillo fenólico, respectivamente.



| Antocianidina | R1 | R2 | λ máx (nm) |
|---------------|------|------|--------------------|
| Pelargonidina | H | H | 520 |
| Peonidina | OCH3 | H | 532 |
| Cianidina | OH | H | 535 |
| Malvidina | OCH3 | OCH3 | 542 |
| Petunidina | OCH3 | OH | 543 |
| Delphinidina | OH | OH | 546 |

Figura 1.20 Estructura de las antocianinas y sus radicales principales.

A las antocianinas se les atribuye la tonalidad roja, púrpura y azul, sin embargo, algunas estructuras inusuales en ellas poseen patrones de hidroxilación como el de algunas apigenidinas que exhiben colores amarillos.

Las antocianinas con tonalidades amarillas ocurren en los vegetales casi siempre acompañadas de carotenoides, mientras que los flavonoides con “ausencia de color” y sus glucósidos son usualmente encontrados en flores blancas (Mulder y Vertoorte, 1994).

Debido a la ruta biosintética de antocianinas en las flores, algunas de ellas pueden estar acompañadas de flavonoides menores como auronas, chalconas e isoflavonas, debido a que su relación en su copigmentación es estrecha.

Las antocianinas cambian de color con variaciones de pH, en medio ácido muestran color naranja a rojo, mientras que los tonos violetas aparecen de pH ligeramente ácido a neutro. El color azul puede ser obtenido en medios alcalinos.

Willsätter quién determinó la estructura básica de las antocianinas en 1913, atribuyó los diferentes colores de las flores a las variaciones de pH en las células vegetales, sin embargo, Shibata (1919) halló que las células de las flores son ligeramente ácidas y no básicas, entonces el color azul de las flores no puede ser explicada solamente por la teoría de Willsätter. Fue así que Shibata propuso la teoría de complejación metálica, estableciendo que ese color azul es producido por la formación de complejos de antocianinas con iones metálicos como magnesio.

A continuación, en la Figura 1.21 se muestra el mecanismo de las transformaciones estructurales de las antocianinas conforme el cambio de pH, donde las estructuras “X” corresponden a las estructuras desprotonadas más probables en vegetales.

Esas estructuras “X” pueden convertirse en “Y” mediante una primera protonación, a su vez, “Y” se puede convertir a “Z” conocida como la estructura flavilium, misma que a través de una primer hidrólisis básica, puede transformarse en “V”, correspondiente a la estructura carbinol. Finalmente, mediante una segunda hidrólisis básica, se hace rompimiento del anillo C y entonces puede convertirse en W, dando origen a las chalconas.

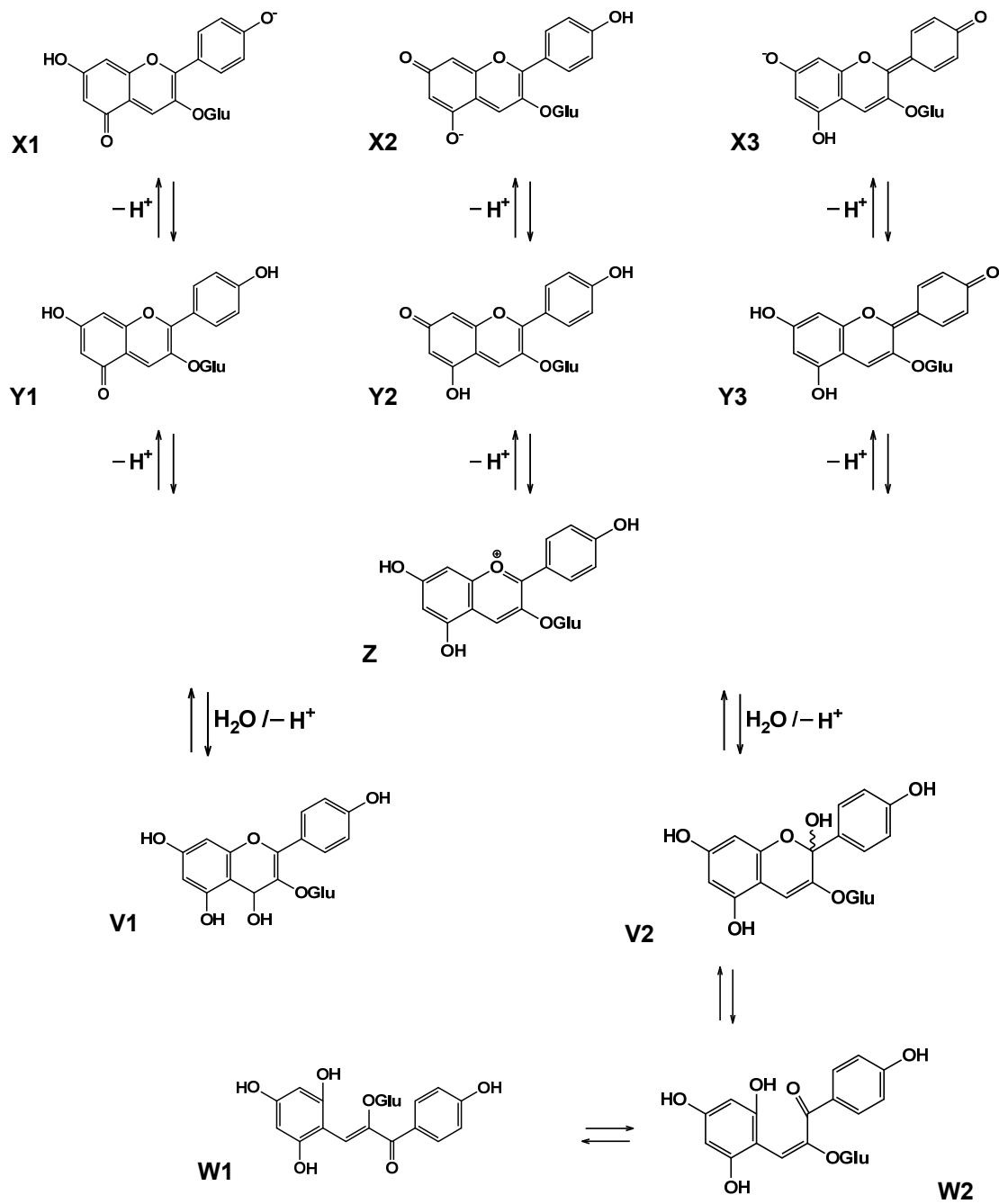


Figura 1.21 Mecanismo de transformaciones estructurales de las antocianinas conforme al cambio de pH (Socaciu, 2008)

Las antocianinas pueden encontrarse incluso en las hojas del vegetal, haciendo que las mismas muestren un color rojizo. Esta coloración puede deberse a un mecanismo de defensa, para proteger a las plantas, sus flores y sus frutas contra la luz ultravioleta (UV) y, por su propiedad antioxidante, evitar la producción de radicales libres.

Las hojas de muchas especies muestran un color rojo bien diferenciado durante el otoño, tales como: *Amherstia*, *Andira*, *Bombax*, *Brownea*, *Calophyllum*, *Cecropia*, *Ceiba*, *Cinnamomum*, *Coccoloba*, *Diospyrus*, *Eugenia*, *Gustavia*, *Lophira*, *Mangifera*, *Mesua*, *Pachira*, *Persea*, *Saraca*, *Triplaris*. También se hallan altas concentraciones de antocianinas en *Acalypha* y en muchas especies de las familias *Araceae*, *Bromeliaceae*, *Marantaceae*, *Liliaceae* y *Euphorbiaceae*, que atraen a los polinizadores a sus flores mediante los brillantes colores provistos por estos compuestos.

En algunos árboles, como el arce rojo Americano (*Acer rubrum*) o el roble escarlata (*Quercus coccinea*), los flavonoles (un tipo de flavonoide) incoloros se convierten en antocianinas rojas cuando la clorofila de sus hojas se degrada (Clifford, 2000). En otoño, cuando la clorofila se descompone, los flavonoides incoloros se ven privados del átomo de oxígeno unido a su anillo central, lo que los convierte en antocianinas, dando colores brillantes. Esta transformación química que consiste sólo en la pérdida de un átomo de oxígeno es la responsable de la percepción de los colores del otoño.

Las antocianinas que aparecen en el otoño probablemente son las que protegen a las hojas del efecto de los rayos UV del Sol. Se especula que esta protección aumenta su efectividad para transportar nutrientes durante su senescencia (Feild, 2001; Maza *et al.*, 1996).

En la Figura 1.22 se muestra una planta de la especie *Oenothera radiata* bajo luz UV, donde se observa el cambio de tonalidad con respecto a la luz visible, propiedad debida a la presencia de antocianinas (Sequin, 2012).

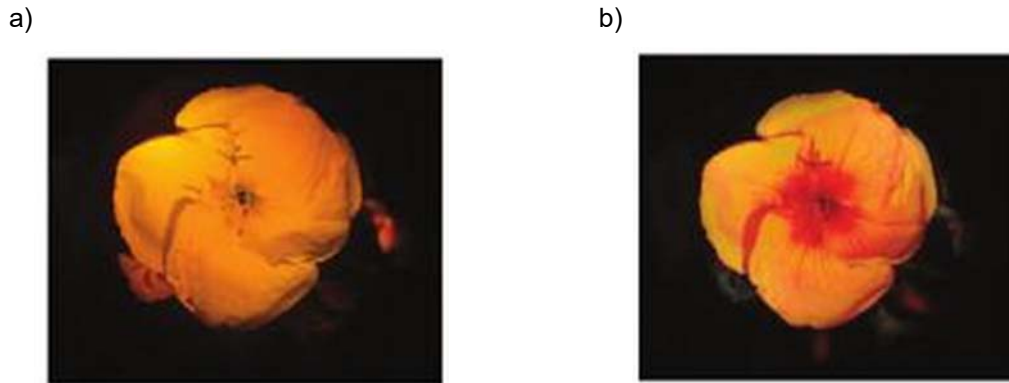


Figura 1.22. Especie *Oenothera sp.* a) sin alterar y b) bajo luz UV

Algunos pigmentos de estructura antocianínica que han sido aprobados en Estados Unidos para el uso en alimentos, se derivan de la cáscara de la uva, del extracto de la uva, del jugo de algunos vegetales y frutas. Las fuentes más comunes de jugo de vegetales son el repollo morado, los rábanos y diferentes variedades de bayas (Wrolstad, 2004).

1.4.4.1 Mecanismos de estabilización de antocianinas

Como se mencionó previamente los pigmentos naturales, sobre todo las antocianinas suelen presentar una alta sensibilidad a factores ambientales una vez que son extraídos, con lo cual se han estudiado las condiciones en las que se encuentran dichos pigmentos antes de ser extraídos, estas condiciones involucran mecanismos de estabilización mencionados a continuación.

Los mecanismos más comunes de estabilización de antocianinas ejecutadas dentro de las células vegetales son la auto asociación, la co-pigmentación y la asociación

intramolecular tipo sándwich que se muestran en la Figura 1.23; éstos mecanismos son realizados por enzimas específicas de cada especie vegetal ubicados en las células, específicamente en el citoplasma y en las vacuolas. La auto asociación es un arreglo selectivo entre antocianinas y un glucósido, mientras que la copigmentación es la asociación de antocianinas con sustratos presentes en las vacuolas, estos sustratos que funcionan como copigmentos pueden contener una variedad de compuestos como flavonoides, polifenoles, taninos, alcaloides. La asociación intramolecular tipo sándwich es una secuencia entre antocianina y compuesto fenólico encadenada entre el mismo azúcar. En la Figura 1.23, se representan los tres mecanismos de estabilización de las antocianinas (Krieger y Verpoorte., 1994),

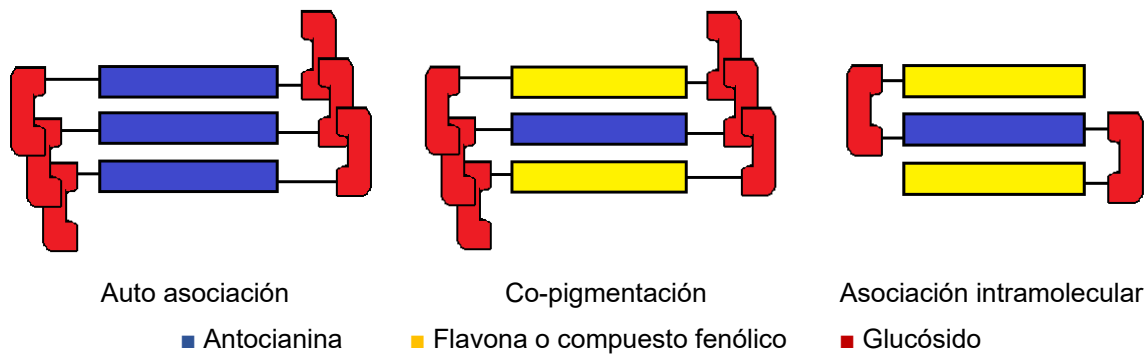
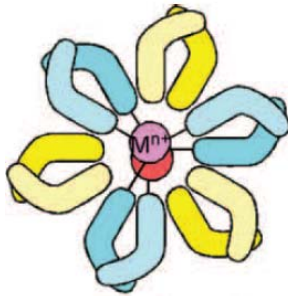


Figura 1.23 Mecanismos enzimáticos comunes de estabilización de antocianinas

De acuerdo a Yoshida *et al.*, (2009), otro mecanismo de estabilización de las antocianinas, es su complejación con metales; estas antocianinas son llamadas metaloantocianinas. La estructura es una auto asociación entre antocianinas, flavonas e iones metálicos en una proporción estequiométrica donde por cada ión metálico hay por lo menos 2 antocianinas y 2 flavonas como lo muestra la Figura 1.24 (Yoshida *et al.*, 2009).



- M^{n+} Ión metálico
- Antocianinas (ambos tonos azules)
- Flavonas (ambos tonos amarillos)

Figura 1.24 Estructura básica de una metaloantocianina

Esta interacción se logra gracias a la acción enzimática que hay entre los metales minerales polivalentes que las especies vegetales toman de la tierra como magnesio, hierro, aluminio manganeso, entre otros. Una vez formada la estructura central entonces los grupos salientes pueden ser sustituidos por copigmentos o bien sufrir acilaciones, donde éstas se definen como no sólo la adición de grupos acilo a las moléculas de los pigmentos sino que al permitir que otras moléculas puedan ser asociadas a la molécula principal se pueden considerar como posibles sitios extras de asociación de antocianinas. Este mecanismo de complejación de antocianinas por metales es exclusivo de colores azules en los vegetales.

1.5 Sustancias activas de origen vegetal

Los pigmentos naturales debido a su origen pueden presentar actividades biológicas, siendo una sustancia activa aquella que, al ser ingerida o aplicada en una superficie celular, puede curar, mitigar o tratar una enfermedad, ya que puede tener un efecto ya sea antioxidante como la quercetina hallada en la cebolla morada, anticarcinógeno como el hidroxitirosol en el aceite de oliva, antibacterial como en el caso de la alicina en ajo, por mencionar algunos ejemplos. Estas sustancias activas se pueden generar de forma natural en un organismo como producto del metabolismo celular de algunas especies como frutas, vegetales y hongos entre otros.

El poder de las sustancias activas lo proporcionan generalmente, el contenido de flavonoides, carotenoides, antocianinas y grupos glucosídicos de orden superior como las hormonas. Este poder recibe el nombre de capacidad biológica.

1.5.1 Actividad antioxidante

Entre la capacidad biológica que poseen algunas especies vegetales se encuentra la actividad antioxidante, un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de las células. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermediarios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores tales como compuestos fenólicos y polifenólicos. El olivo, ajo, arroz integral, café, coliflor, brócoli, berenjena, jengibre, perejil, cebolla, cítricos, semolina, tomates, aceite de semilla de la vid, té, romero y especies florales son algunos ejemplos de productos vegetales que contienen sustancias antioxidantes.

Sin embargo, la capacidad antioxidante varía de una especie a otra y también del período de desarrollo, por ejemplo, la capacidad antioxidante en el caso de las berenjenas, es mayor durante sus estadios iniciales (Zaro, 2014).

De acuerdo a Kaisoon *et al.* (2011), muchas especies de flores poseen compuestos antioxidantes de gran interés, así como una composición tal que las hace aptas para el consumo humano, esta actividad antioxidante se debe a la presencia de compuestos polifenólicos, flavonoides y antocianinas de los cuales destacan la quercetina y la rutina.

En la Tabla 1.7, se muestran algunas de las especies florales que han sido reportadas para el estudio de sustancias activas antioxidantes.

Tabla 1.7. Algunas estructuras bioactivas halladas en flores

| Autor | Pigmento | Especies |
|-----------------------------|--|-------------------------------------|
| Shawada (2005) | Antocianina Glucorinosittransferasa | Bellis perennis |
| Zechmeister y Polgar (1941) | β-caroteno | Greviella Robusta |
| Sando y Llyd (1923) | Rutina | Sambucus Canadensis |
| Sando y Bertlett (1922) | Isoquercetina | Zea mays |
| Harborne (2001) | Quercetagenina | Coronilla Lotus Rhodondendron |

La actividad antioxidante se mide mediante radicales libres que se utilizan para complejar las sustancias activas, entre estos radicales se encuentra el Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) el cual es uno de los radicales más usados en métodos espectrofotométricos para la determinación de esta actividad. En este caso el radical presenta una coloración verde la cual se decolora por la presencia de la sustancia antioxidante (Re et al., 1999).

Otro radical es el 2,2 difenil-1-picril hidrazilo (DPPH). El radical tiene color azul-violeta, en contacto con el antioxidante, su color disminuye y tiende hacia un amarillo pálido. De acuerdo a Ramos *et al.*, 2008, el porcentaje de captación de radicales libres (DPPH) se determina mediante la Ecuación 1.2:

$$CA = \frac{1 - (A_m - A_b)}{A_p} \times 100 \quad \dots\dots\dots\text{Ecuación 1.3}$$

Donde:

CA: Capacidad antioxidante en porcentaje de captación de radicales libres

A_m: Absorbancia de la muestra

A_b: Absorbancia del blanco de la muestra

A_p: Absorbancia de la muestra patrón

El contenido de compuestos fenólicos, también da constancia de la actividad antioxidante. Este método mide la concentración total de grupos fenólicos hidroxilo en extractos de plantas, ya que los polifenólicos en extractos de plantas con reactivos específicos redox como Folin Ciocalteu formando un complejo azul que puede ser cuantificado por espectrofotometría de luz visible, este método también es conocido como método de equivalencia de ácido gálico (GAE).

La reacción forma un cromóforo azul constituido por un complejo de fosfotungstato-fosfomolibdato, donde la absorbancia máxima del cromóforo depende de la solución alcalina y la concentración de compuestos fenólicos presentes en la muestra, los que pueden ser fenoles simples, ácidos fenólicos (ácidos cinámico y benzoico y sus derivados), cumarinas (benzopironas), flavonoides, estilbenos, taninos hidrolizables y condensados, lignanos y ligninas. Estos compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más ampliamente producidos en las plantas. En la Figura 1.25 se muestran algunos reactivos químicos más comunes usados como estándares para la determinación de compuestos fenólicos totales: a) ácido gálico, b) ácido tánico, c) catequina y d) pirogalol, los cuales presentan una banda de absorción en la región visible a los 780 nm (Blainski *et al.*, 2013).

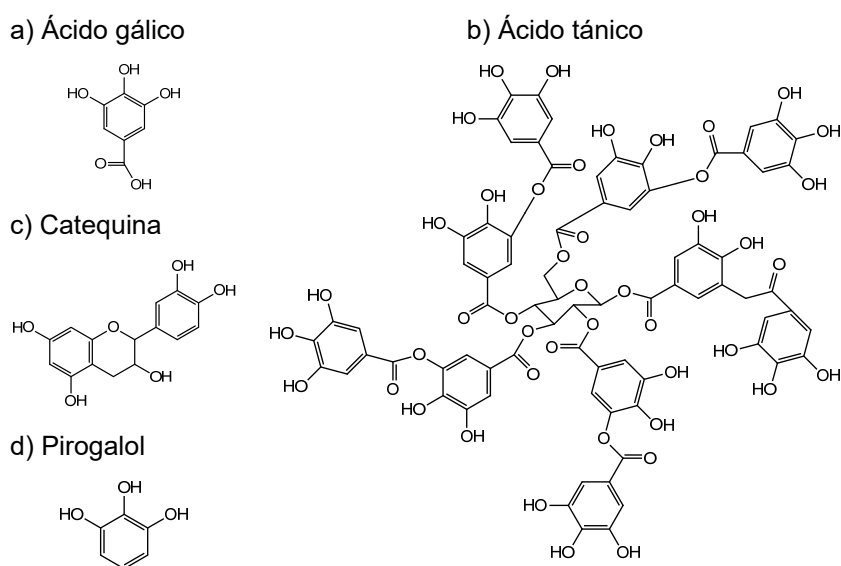


Figura 1.25 Estándares para determinar compuestos Fenólicos Totales (Blainski *et al.*, 2013)

1.6 Encapsulación de pigmentos

La encapsulación de una sustancia en el área de alimentos, se define como una técnica en la cual la sustancia es confinada en una matriz, para diferentes objetivos; su estabilización, protección de la degradación y reacción con otros compuestos, para frenar reacciones de oxidación a causa de la luz o del oxígeno y controlar su interacción con el exterior. En general, la encapsulación constituye un medio de envasar, separar y almacenar sustancias de interés para su posterior liberación bajo condiciones controladas. En algunos de los casos, incluso aporta, productos con mejores características sensoriales y nutricionales.

En este mismo sentido, se lleva a cabo la encapsulación de pigmentos. Sin embargo, pocos estudios han sido reportados al respecto, entre la información disponible se encuentran los datos reportados de Ghandia *et al.*, 2010 al encapsular antocianinas de la especie *Opuntia* con maltodextrina, los datos de Mahdavee *et al.*, 2014 al encapsular antocianinas de pétalos de azafrán con maltodextrina y goma arábiga, y los datos de Fernández *et al.*, 2013 al microencapsular flavonoides del vegetal romero.

1.6.1 Materiales de encapsulamiento

Los materiales de encapsulamiento que conforman las matrices de confinamiento; son llamados materiales o matrices pared, pueden ser únicos o producto de diferentes mezclas con el fin de contar con excelentes propiedades de formación de película para proveer una capa que proteja a la sustancia a encapsular así como al ingrediente activo de la oxidación, para evitar éste proceso.

En el área de alimentos, los materiales o matrices deben ser comestibles, de fácil digestión y liberación. Entre los más utilizados para este propósito, se encuentran los carbohidratos, lípidos y proteínas tales como el alginato, quitosano, sacarosa, inulina, maltodextrina y goma arábiga; así como amplia gama de aceites y colágeno, por mencionar algunos (Lupo *et al.*, 2012; Munin y Edwards, 2011; Özkan y Ersus, 2014).

En general, para el encapsulamiento de sustancias se han utilizado distintos materiales, los cuales son clasificados de acuerdo al tipo de material, como lo muestra la Tabla 1.8 (Parra, 2011).

Tabla 1.8 Clases de material de recubrimiento

| Clase de material | Tipo de recubrimiento |
|------------------------|---|
| Gomas | Goma arábica, agar, alginato de sodio, carragenina. |
| Carbohidratos | Almidón, maltodextrina, sacarosa, jarabe de maíz, ciclodextrinas. |
| Celulosas | Carboximetil celulosa, metil celulosa, etil celulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa. |
| Lípidos | Cera, parafina, triestarina, ácido esteráico, monoglicéridos, diglicéridos, cera de abeja, aceites, grasas. |
| Materiales inorgánicos | Sulfato de calcio, silicatos. |
| Proteínas | Gluteína, caseína, gelatina, albúmina |

Enseguida se describe algunas características de la maltodextrina, goma arábica y un lípido como los es el aceite de palma, considerados como materiales de encapsulación de mayor uso a nivel industrial.

La maltodextrina es el resultado de la hidrólisis del almidón o la fécula, normalmente se presenta comercialmente en forma de polvo blanco, compuesto por una mezcla de varios oligómeros de glucosa, compuestos por 5 a 10 unidades. Puede ser definida como un polímero de la glucosa. Estas moléculas poliméricas son metabolizadas de forma rápida en el organismo humano, contribuyendo, en la formación de individuos saludables, debido a un aumento exponencial de insulina (pico de insulina) en la corriente sanguínea (Kearsley, 1998). A continuación, se muestra la estructura química de la maltodextrina en la Figura 1.26.

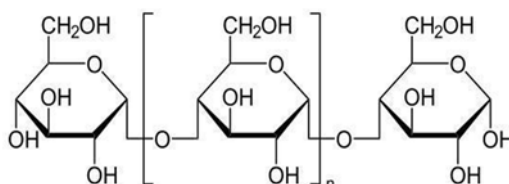


Figura 1.26 Estructura química de la maltodextrina

Entre los usos más conocidos de las maltodextrinas está en la industria alimenticia como sustituto de grasas generalmente usado en relación 1:3, son empleadas también en refrescos de dieta, condimentos de pasteles, sustituto de partes de la margarina (Kennedy *et al.*,1995)

La goma arábica (denominado E-414 en la industria alimentaria dentro de los Números E y acacia gum según la lista de aditivos de la Unión Europea) es un polisacárido de origen natural que se extrae de la resina de árboles subsaharianos (Acacia senegal y Acacia seyal), como parte del proceso de cicatrización de éstos, el cual es conocido como gummosis. En la Figura 1.27 se muestra la estructura química de la goma arábica.

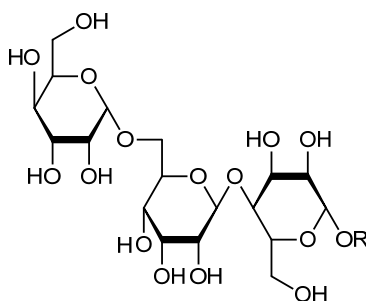


Figura 1.27. Estructura química de la goma arábica

El aceite de palma es un aceite de origen vegetal que se obtiene del mesocarpio de la fruta de la palma *Elaeis guineensis*. Es el segundo tipo de aceite con mayor volumen de producción, siendo el primero el aceite de soya. El fruto de la palma es ligeramente rojo, al igual que el aceite embotellado sin refinar. El aceite crudo de palma es una rica fuente de vitamina A y de vitamina E. En este caso el aceite es utilizado como encapsulante de pigmentos naturales, en forma de emulsión. El uso de este material es conocido principalmente en la industria alimenticia como material de consistencia en alimentos grasos, usado también para aligerar la margarina (Edem, 2002).

1.6.2 Técnicas de encapsulamiento

De acuerdo al tamaño del encapsulado o partícula que se encapsula, existen diferentes tipos de matrices de encapsulamiento, entre ellas, la microencapsulación y la nanoencapsulación (Borgogna *et al.*, 2010).

Para la producción de microcápsulas se han propuesto diversos métodos que se dividen en procesos físicos (secado por aspersión, extrusión y recubrimiento por aspersión) y procesos fisicoquímicos (coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas; polimerización interfacial y gelificación iónica). La selección del método depende del tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Parra *et al.*, 2011).

En la Tabla 1.9 se presentan los métodos anteriormente mencionados y el tamaño de partícula que se alcanza (Guevara y Jiménez, 2008).

Tabla 1.9 Clasificación y características de algunos métodos de encapsulación

| Tipo de técnica | Método de encapsulación | Tamaño de partícula (μm) |
|-----------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Químicas | Coacervación simple | 20 – 200 |
| | Coacervación compleja | 5 – 200 |
| | Inclusión molecular | 5 – 50 |
| Mecánicas | Secado por atomización | 1 – 50 |
| | Enfriamiento por atomización | 20 – 200 |
| | Extrusión | 200 – 2000 |
| | Fluidización del lecho | >100 |

El secado por aspersión es el más utilizado en la industria de los alimentos debido a que se trata de un método económico y efectivo en la protección de materiales. Los almidones modificados, las maltodextrinas y las gomas son empleados como materiales pared. En este caso, el material a encapsular es homogenizado con el

portador. Posteriormente, la mezcla se seca por aspersión y se atomiza por medio de una boquilla o disco. Tras este proceso, se recogen las cápsulas formadas listas para ser empleadas o se obtiene un sólido seco.

Para el secado se utiliza aire caliente entre los 200 °C y los 300 °C; el proceso se lleva a cabo en una cámara que tiene forma cilíndrica y cuenta con un cono en su parte inferior. La idea es que se pueda retirar el polvo obtenido en este proceso por efecto de la gravedad, a través del cono de la cámara de secado.

El aire caliente se enfría y es expulsado por un tubo de salida que se encuentra justo en medio de la cámara de secado. En algunos casos, el aire caliente recibe un tratamiento después de ser utilizado para que vuelva a estar en condiciones de ser expulsado al ambiente.

En otros casos se recircula por el sistema de secado hasta que pierde sus propiedades. Los polvos se depositan en la parte inferior del cono, en donde son recuperados.

La Figura 1.28 muestra las partes generales de un secador por aspersión.

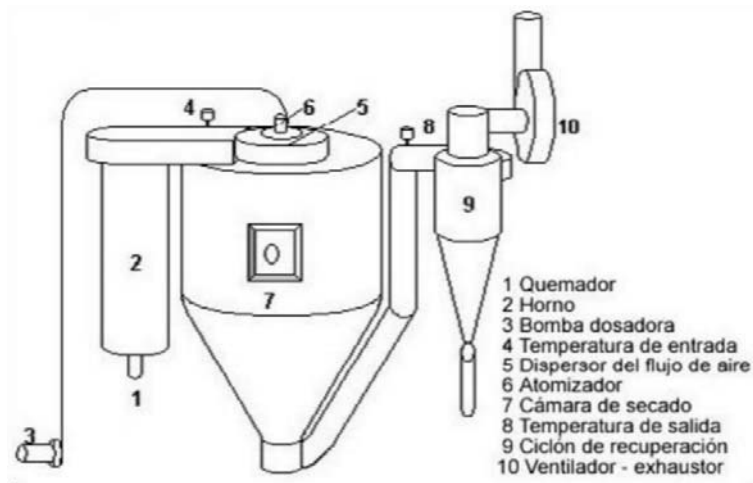


Figura 1.28 Partes de un secador por aspersión (Sprayprocess, 2016)

Actualmente se están estudiando nuevos materiales pared, incluyendo coloides y gomas naturales, para la obtención de mezclas que permitan incrementar la retención de compuestos volátiles y la vida comercial de las microcápsulas. De esta forma, se ha conseguido la retención de aceites esenciales de naranja y disminuido su oxidación al usar goma arábica, lo que indudablemente permite la inclusión de sustancias activas sin que se vean afectadas por los procesos de digestión iniciados en la boca y estómago.

Otro método es el de aspersión por enfriamiento o congelación, que consiste en mezclar el material a encapsular con el producto portador y atomizarlo por medio de aire frío. Las microcápsulas se producen por nebulización de la emulsión o suspensión que contiene el material pared y la sustancia activa sólida o líquida. Las coberturas más utilizadas son aceites vegetales en el caso de aspersión por enfriamiento o aceite vegetal hidrogenado para la aspersión por congelamiento; así pueden encapsularse líquidos sensibles al calor y materiales que no son solubles en disolventes convencionales.

La reducción de la temperatura produce una solidificación del lípido que actúa como pared y el atrapamiento de la sustancia activa en el centro de la cápsula. La aspersión por enfriamiento es usualmente empleada para encapsular sulfato ferroso, vitaminas, minerales o acidulantes. Las aplicaciones más comunes de la aspersión por congelación incluyen el secado de sopas y los alimentos con alto contenido de grasa. Las microcápsulas producidas por enfriamiento o congelación son insolubles en agua debido a su cobertura de lípidos, por lo que se encapsulan materiales solubles como enzimas, vitaminas solubles en agua y acidulantes.

La microencapsulación por extrusión, otro de los métodos desarrollados, involucra el paso de una emulsión del material activo y el material pared a través de un dado a alta presión. La extrusión constituye el segundo proceso más usado, después del secado por aspersión, para la encapsulación de sabores. Un proceso típico involucra la mezcla de sabores con jarabe de maíz o almidón modificado caliente, extrusionando la mezcla en forma de esferitas (pellets) dentro de un baño con un disolvente frío como el isopropanol. El disolvente frío solidifica el jarabe en un sólido amorfo, bañando los

sabores. Los sabores tienen así una mayor vida. La vitamina C y los colorantes pueden tener una vida de almacenamiento superior a dos años, ya que se protegen de la oxidación. Además, la forma sólida de los sabores es más conveniente para su uso. La aplicación de este método en el procesamiento de alimentos incluye bebidas, pasteles, gelatinas o postres.

La cobertura por lecho fluidificado consiste en suspender partículas sólidas en aire a alta velocidad dentro de una cámara con temperatura y humedad controlada, donde se atomiza el material pared. La cantidad de partículas cubiertas depende de la longitud de la cámara y del tiempo de residencia dentro de ésta. La técnica es aplicable a coberturas que funden fácilmente (como aceites vegetales hidrogenados, estearinas, ácidos grasos, emulsionantes o ceras) o coberturas solubles (como almidones, gomas y maltodextrinas). Para coberturas fundibles se usa aire frío para endurecer el acarreador, mientras que para las coberturas solubles se usa aire caliente para evaporar el disolvente. Los ingredientes más fáciles de fundir son liberados al incrementar la temperatura o por rotura física, mientras que las coberturas solubles liberan su contenido al adicionar agua. Algunos alimentos fortificados y mezclas nutricionales contienen ingredientes encapsulados por lecho fluidizado, como por ejemplo: ácidos cítrico, láctico y sórbico o bicarbonato de sodio utilizado en productos de panificación.

Un tipo de cápsula con más propiedades versátiles y menos fragilidad que las hechas de grasa es el de los liposomas, utilizados para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas en el organismo, después de su paso por los tramos iniciales del aparato digestivo. El método de encapsulación en liposomas está formado de una o más capas de lípidos no tóxicos y aceptables en alimentos, cuya permeabilidad, estabilidad, actividad superficial y afinidad pueden variar con el tamaño y la composición del lípido. Los liposomas son vesículas que se forman cuando se dispersan películas de fosfolípidos en un medio acuoso. Actúan del mismo modo que las membranas naturales, siendo selectivamente permeables a iones (Sprayprocess, 2016).

En el caso de la encapsulación de pigmentos, los reportes indican el uso de las técnicas de secado por aspersion para microencapsular pigmentos de algas marrones

utilizando como material encapsulante maltodextrina DE 20 (Ray *et al.*, 2015). También se ha reportado el encapsulamiento de pigmento de maracuyá con almidón natural (Jimenez *et al.*, 2014), el encapsulamiento de pigmento de berenjena mediante goma arábica (Arrazola *et al.* 2013), asimismo, se han encapsulado carotenoides, antocianinas y clorofilas mediante el uso de maltodextrina, goma arábica o bien una combinación de ambas (Özkan y Ersus 2014), todo lo reportado va enfocado a la estabilización y conservación de las propiedades de los pigmentos.

1.7 Caracterización de pigmentos por técnicas de espectrofotométricas, espectroscópicas y espectrométricas

Algunos de los métodos utilizados para determinar las características de un pigmento natural corresponden a las técnicas espectrofotométricas Ultravioleta-Visible (UV-Vis) e infrarroja (IR), de Espectrofluorimetría, Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas-Masas, las cuales son útiles para determinar propiedades de pigmentación, grupos funcionales y posible estructura de los pigmentos. Además, dado que provienen de fuentes naturales, también es posible determinar la capacidad biológica que presentan, particularmente la antioxidante. A continuación, se establecen los fundamentos y descripción de cada una de las técnicas mencionadas.

1.7.1 Espectrofotometría UV-Vis

El fundamento de la espectrometría se asocia a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber, depende de la estructura atómica y de las condiciones del medio, por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas.

Cuando una molécula absorbe un fotón, su energía incrementa, entonces la molécula ha sido promovida a un estado de excitación. Si una molécula emite un fotón la energía

de la molécula decrece, entonces alcanza un estado normal. La radiación visible y ultravioleta promueve electrones a los últimos orbitales energéticos.

En la región visible se aprecia el color de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite. El color que absorbe es el complementario del color que transmite, por lo tanto, para realizar mediciones de absorbancia es necesario determinar la longitud de onda en la que la solución coloreada absorbe luz y el que refleja.

La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto la espectrofotometría UV-Vis puede ser usada para determinar la concentración de una solución.

La transmitancia, está definida como la fracción de la intensidad del haz de luz incidente que atraviesa una muestra.

$$T = \frac{I}{I_0} \dots \dots \dots \text{Ecuación 1.1.}$$

Dónde:

T: Transmitancia

I: Intensidad del haz de luz incidente

I₀: Fracción de la intensidad del haz de luz incidente

La absorbancia, está definida como la fracción del haz de luz que fue retenida por la muestra, se relaciona con la transmitancia de forma complementaria, la Ecuación 1.2 muestra la relación entre la absorbancia y la transmitancia.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\log(T) \dots \dots \dots \text{Ecuación 1.2.}$$

Dónde:

A: Absorbancia

T: Transmitancia

I: Intensidad del haz de luz incidente

I_0 : Fracción del intensidad del haz de luz incidente

La mayoría de los compuestos orgánicos como colorantes que absorben luz en las regiones UV-Vis se utilizan comúnmente disolventes como agua o etanol, ya que los disolventes orgánicos pueden tener una absorción significativa en la región UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados. El etanol absorbe muy débilmente en la mayoría de las longitudes de onda. La polaridad y el pH pueden afectar la absorción de un compuesto orgánico.

Además del uso de la espectrofotometría para la identificación de las bandas y determinación de la concentración de sustancias que contienen color o desarrollan color, esta técnica también se puede utilizar para identificar grupos funcionales de dichas sustancias de acuerdo a la longitud de onda en la que absorben luz. La absorción de radiación ultravioleta o visible provoca la excitación de los electrones de enlace y, en consecuencia, los picos de absorción pueden relacionarse con los tipos de enlace que existen en las especies en estudio. Los niveles energéticos de estos orbitales moleculares no son idénticos y cuando se irradia la muestra con luz UV se producen tránsitos electrónicos desde niveles de menor energía hasta niveles de mayor energía.

Sin embargo, presenta una gran limitación, la energía usada (UV) para excitar los electrones también provoca cambios vibracionales y rotacionales. En la Figura 1.29, se presenta una imagen de los niveles de energía en los que se mueve un electrón al ser excitado por la radiación UV-Vis. (Harris, 2011).

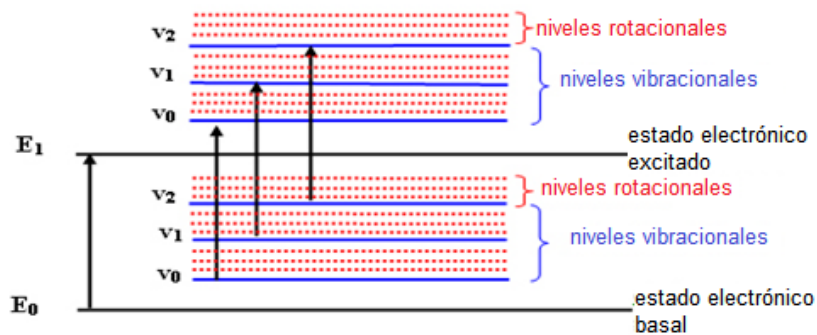


Figura 1.29 Niveles de energía en los que se mueve un electrón al ser excitado por la radiación UV-Vis.

Al solaparse los saltos electrónicos con los vibracionales y rotatorios la consecuencia es un espectro continuo con picos anchos en forma de campana y, por tanto, difícil de interpretar. A pesar de ello el espectro UV puede dar información de la presencia o ausencia de determinados grupos funcionales como los cromóforos en los compuestos orgánicos.

En los compuestos orgánicos se presentan tres “tipos” básicos de electrones. Los que están involucrados en orbitales moleculares σ (sigma) (enlaces sencillos C-C), en orbitales moleculares π (pi) (enlace doble C=C) y los electrones no compartidos. Las últimas transiciones requieren de grupos que suministren orbitales π ; centros absorbentes insaturados denominados cromóforos.

En la Tabla 1.10, se presentan algunos grupos cromóforos que pueden ser identificados en el rango UV, el disolvente que ayuda a revelarlos y el tipo de transición que presentan (Silverstein, 2005).

Tabla 1.10. Grupos cromóforos y la longitud de onda (λ) en que se pueden identificar, considerando el disolvente revelador del cromóforo.

| Cromóforo | Ejemplo | Disolvente | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | $\xi_{\text{máx}}$ | Tipos de transición |
|-----------|---|-------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|
| Alqueno | $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$ | n-Heptano | 177 | 13 000 | $\pi \pi^*$ |
| Alquino | $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$ | n-Heptano | 178 | 10 000 | $\pi \pi^*$ |
| | | | 196 | 2 000 | **** |
| | | | 225 | 160 | **** |
| Carbonilo | $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_3$ | n-Hexano | 186 | 1 000 | $n \delta^*$ |
| | | | 280 | 16 | $n \pi^*$ |
| Carboxilo | $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$ | Etanol | 204 | 41 | $n \pi^*$ |
| Amida | $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$ | Agua | 214 | 60 | $n \pi^*$ |
| Azo | $\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{NH}_2$ | Etanol | 339 | 5 | $n \pi^*$ |
| Nitro | CH_3-NO_2 | Iso-Octanol | 280 | 22 | $n \pi^*$ |
| Nitroso | $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$ | Etiléter | 300 | 100 | ***** |
| | | | 665 | 20 | $n \pi^*$ |
| Nitrato | $\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$ | Dioxano | 270 | 12 | $n \pi^*$ |

1.7.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopía en el infrarrojo (IR) se utiliza para hacer determinaciones cualitativas de compuestos orgánicos y para deducir estructuras moleculares a partir de sus grupos funcionales tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos, mediante la medición de la radiación absorbida por la molécula en las bandas vibracionales entre los 4000 y 400 cm^{-1} .

El uso de esta técnica en la caracterización de pigmentos puede ayudar en la identificación de su estructura molecular. Se basa en la determinación de los enlaces químicos de las sustancias que tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de

la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y posiblemente, el acoplamiento vibracional. Si la molécula recibe luz con la misma energía de esa vibración, entonces la luz será absorbida si se dan ciertas condiciones. Para que una vibración aparezca en el espectro infrarrojo, la molécula debe someterse a un cambio en su momento dipolar durante la vibración.

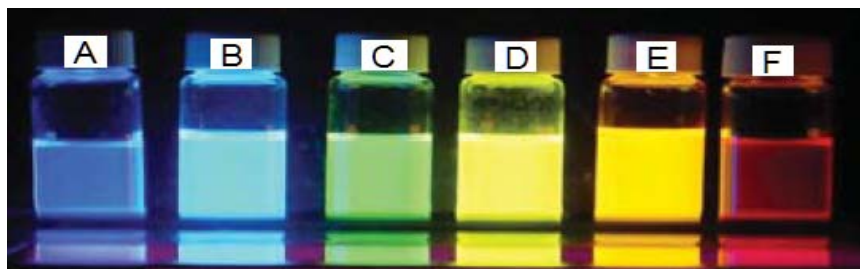
Los enlaces pueden vibrar de seis maneras: estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, tijeras, rotación, giro y wag. Con el fin de analizar una muestra, se transmite un rayo monocromo de luz infrarroja a través de ésta, y se registra la cantidad de energía absorbida.

Repetiendo esta operación en un rango de longitudes de onda de interés (por lo general, 4000 a 400 cm^{-1}) se puede construir un gráfico que corresponde a un espectrograma (Silverstein, 2005).

1.7.3 Espectrofluorimetría

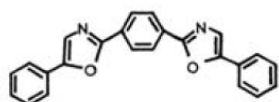
La luminiscencia es la capacidad que tienen algunos materiales de emitir luz cuando éstos alcanzan estados electrónicos excitados. Esto se debe a que cuando en estados excitados, el electrón del orbital excitado se aparea con un electrón en estado basal también regresa a su estado basal gira de manera rápida lo cual se refleja mediante la emisión de fotones. La luminiscencia se divide en dos categorías: la fosforescencia y la fluorescencia.

La fosforescencia es la emisión de luz de estados excitados de tripletes, en los cuales los electrones en los orbitales excitados tienen la misma orientación de giro que en el estado basal. Las transiciones al estado basal están prohibidas durante la excitación, las emisiones de luz son lentas (10^3 a 10^0 s^{-1}), es por eso que el tiempo de vida de la fosforescencia van de milisegundos a segundos e incluso más como lo es materiales que “brillan en la oscuridad”. En la Figura 1.30 se muestran las estructuras de algunas sustancias fluorescentes.

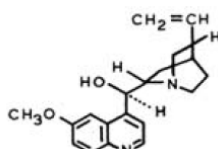


A) 1,4-Bis(5-feniloxazol-2-yl)

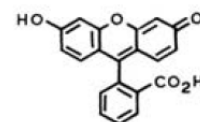
benzeno



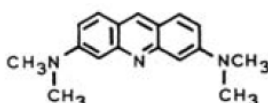
B) Quinina



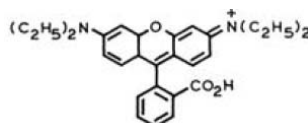
C) Fluoresceína



D) Acridina Naranja



E) Rhodamina B



F) Piridina 1

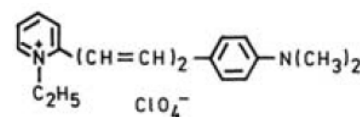


Figura 1.30 Estructuras de algunas sustancias fluorescentes bajo luz UV.

La fluorescencia es la emisión de luz de estados excitados de singuletes, en los cuales los electrones en los orbitales excitados tienen diferente orientación de giro a los electrones a los cuales se emparejan. Las emisiones de luz son rápidas (10^8 s^{-1}), así que el tiempo de vida típico de la fluorescencia es cercano a 10 ns. Un fluorocromo es una molécula capaz de absorber fotones y emitir fotones de menor energía (mayor longitud de onda), un fluoróforo es la parte del fluorocromo que es responsable de la emisión de fotones.

Entre los tipos de fluorescencia se encuentran la fluorescencia primaria que es la que se presenta de manera inherente a la estructura molecular del material que es muy común en muchos sistemas aromáticos, y existe también la fluorescencia secundaria que es cuando un fluoróforo es introducido en una molécula de estudio para darle fluorescencia. En la Tabla 1.11 se muestran algunos trazadores comerciales y sus usos y en la Tabla 1.12 se muestran algunos trazadores naturales fluorescentes y sus usos.

Tabla 1.11 Trazadores comerciales y sus usos

| Autor | Trazador | Uso | Perjuicio |
|-----------------------|----------------------------------|---|-------------------------|
| Purschke et al., 2010 | Hoechst 33342 ® | Trazador en ADN, activación de células madre | Mutagénico, carcinógeno |
| Ferro et al., 2017 | DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) | Trazador de cromosomas | Mutagénico, carcinógeno |
| Lakowick., 2006 | Naranja de acridina | Detección de microorganismos en órganos reproductivos | Mutagénico, carcinógeno |

Tabla 1.12 Trazadores naturales comerciales y sus usos

| Autor | Trazador | Uso | Perjuicio |
|-------------------------|-----------------------------|--|---------------------|
| Franco y Longart., 2009 | Proteína verde fluorescente | Trazador neuronal Estudio de interacción proteínica | Fototoxicidad leve. |
| Pogue et al., 2010 | Fluoresceína | Detección de tumores cerebrales Limpieza ocular | Fototoxicidad leve |

1.7.4 Resonancia Magnética Nuclear

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es la herramienta analítica que proporciona mayor información estructural y estereoquímica en un tiempo aceptable. La técnica no es destructiva y tiene aplicaciones en todas las áreas de la Química y en algunas de la Biología. Disponiendo de accesorios adecuados permite la observación de tejidos (accesorio de microimagen). Con otros tipos de instrumentos es una técnica de diagnóstico en Medicina.

La Resonancia Magnética Nuclear es una espectroscopía de absorción cuyo fundamento es la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo

magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. Las partes fundamentales de un espectrómetro de RMN son un imán, actualmente una bobina superconductora, que suministra el campo magnético principal, un oscilador de radiofrecuencias que suministra la energía necesaria para cambiar la orientación de los núcleos, una bobina detectora que recibe las señales y un sistema informatizado que gobierna todo el aparato y que incluye un sistema de amplificación y registro.

Entre los núcleos más frecuentes en los compuestos orgánicos son magnéticamente activos están el protón (^1H), carbono (^{13}C), nitrógeno (^{15}N), fósforo (^{31}P) y flúor (^{19}F).

Las muestras, generalmente, son disoluciones en disolventes que no tengan átomos de protio (^1H). Frecuentemente se usan el deuterocloroformo, hexadeuterodimetilsulfóxido, óxido de deuterio, deuterobenceno, deuteropiridina y otros.

Los espectros más comunes son representaciones de la intensidad de absorción frente a la frecuencia de resonancia, generalmente a través del parámetro de desplazamiento (δ) y presentan señales cuya posición, forma y tamaño están íntimamente relacionadas con la estructura molecular. El análisis detallado de estos espectros proporciona valiosa información estructural y estereoquímica. Espectros bidimensionales permiten establecer relaciones entre distintos núcleos o distintas magnitudes del mismo núcleo.

1.7.5 Espectrometría de masas

Es una técnica de análisis que permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. El espectrómetro de masas es un dispositivo que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación entre masa y carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto.

El espectrómetro de masas mide razones masa/carga de iones, calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector, que permite analizar el compuesto. En la industria es altamente utilizada en el análisis elemental de semiconductores, biosensores, cadenas poliméricas complejas, fármacos, productos de síntesis química, análisis forense, contaminación medioambiental, perfumes y todo tipo de analitos que sean susceptibles de pasar a fase vapor e ionizarse sin descomponerse.

La técnica de detección de iones se basa en el fenómeno conocido como pulverización catódica (sputtering, en inglés) de partículas centradas en un blanco, que son bombardeadas mediante iones, átomos o moléculas. Dependiendo del intervalo de energía de la partícula primaria, ocurren colisiones elásticas e inelásticas: en el intervalo de los keV, las interacciones dominantes son las elásticas; las colisiones inelásticas aumentan según aumenta la energía. Estas son más comunes en el intervalo de energía de los MeV.

El proceso de dispersión produce iones secundarios en el rango de las energías cinéticas traslacionales. Las distribuciones de energía son distintas según se trate de iones atómicos o moleculares. La eficiencia de ionización del SIMS se define como la fracción de los átomos esparcidos que se ionizan. La eficiencia varía con respecto al elemento de análisis en varios órdenes de magnitud. Las influencias más obvias son el potencial de ionización y la afinidad electrónica de los iones negativos.

2. MÉTODO

En la Figura 2.1 se muestra un diagrama de bloques donde se ilustra de forma general las etapas que se llevaron a cabo en la presente investigación y en los siguientes apartados se describe cada una de ellas.

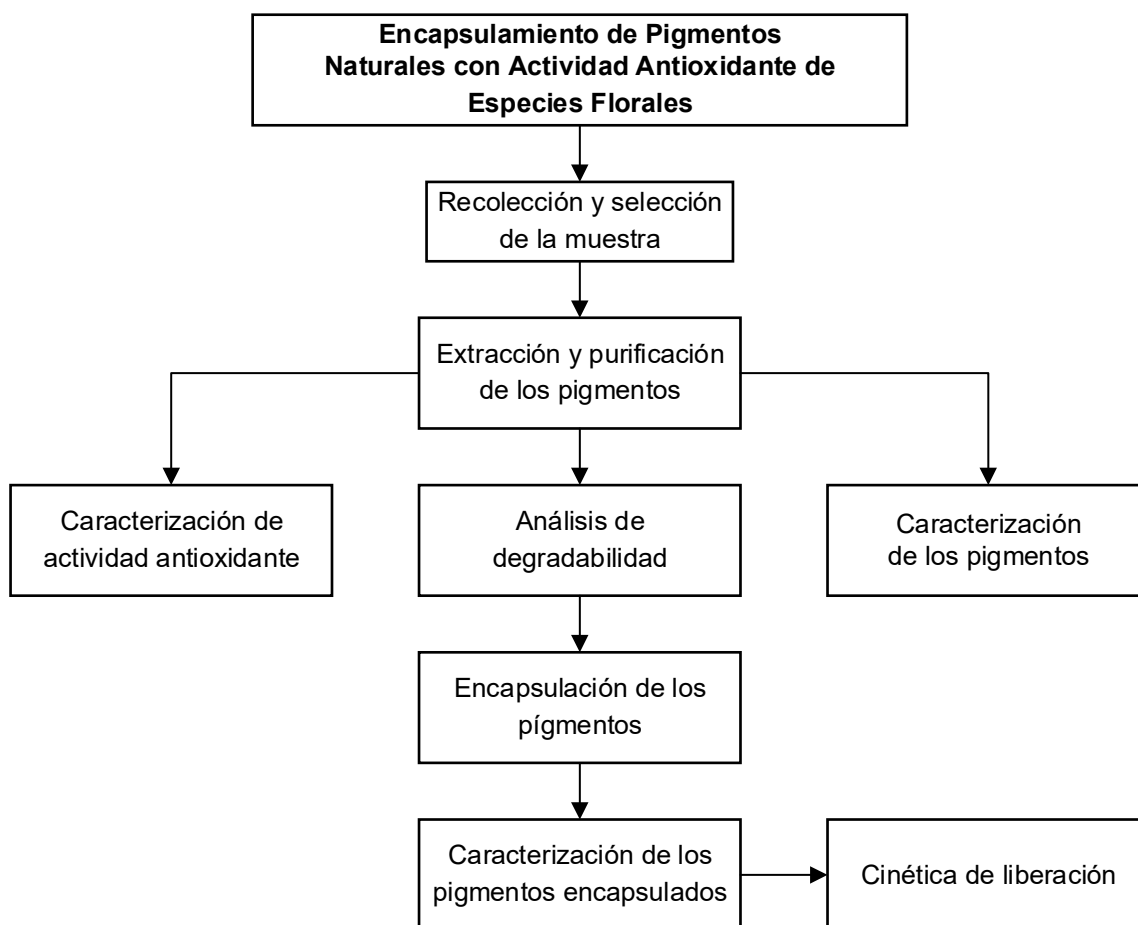


Figura 2.1 Diagrama de encapsulamiento de pigmentos naturales con actividad antioxidante de especies florales

Debido a que las muestras de flores que se usaron para extraer los pigmentos son campestres, estas se recolectaron de diferentes lugares de Metepec y Toluca, Estado de México, justo en el momento de la floración (apertura del capullo), para facilitar la extracción de los pigmentos. La parte aprovechada fueron únicamente los pétalos de las especies. Una vez seleccionadas, las muestras se colocaron en frascos de 250 mL con 20 mL de solución de etanol al 80%, procurando no saturar el volumen de la solución. Los frascos se almacenaron en refrigeración a temperatura de -5 °C, para su posterior uso.

2.1 Extracción y purificación de los pigmentos

Para llevar a cabo la extracción de los pigmentos, se probaron disolventes polares y no polares en diferentes proporciones, a fin de determinar el disolvente adecuado y como estudio previo a su clasificación dentro de la agrupación de pigmentos naturales.

En el caso del amarillo, la extracción de la especie A, dio un resultado positivo utilizando una mezcla etanol-agua al 80%, mientras que para la extracción del pigmento azul de la especie B se usó agua con sacarosa.

En ambos casos, la extracción se realizó con una agitación moderada de 100 rpm, durante un tiempo de contacto de dos a tres horas en condiciones de temperatura baja, una vez transcurrido ese tiempo, las muestras se microfiltraron con membranas marca Merck-Milipore con diámetro de poro de 0.75 μm para separar la biomasa de las flores del extracto.

La purificación de los pigmentos se realizó mediante cromatografía en columna utilizando como empaque sílica gel marca J.T. Baker 60-200 Mesh, el empaque fue pretratado con HCl 0.1 N, después se eluyeron alícuotas de 5 a 7 mL de pigmento a través de la columna.

2.2 Caracterización de los pigmentos

Ambos pigmentos fueron sometidos a técnicas de identificación general para determinar el grupo de procedencia, dentro de la clasificación de pigmentos naturales; posteriormente fueron caracterizados de acuerdo a algunas propiedades fisicoquímicas, espectrofotométricas y de degradación ante diferentes estímulos. Enseguida se describe cada uno de los métodos utilizados en la caracterización de los pigmentos.

2.2.1 Identificación del grupo de procedencia en la estructura química

Como primera prueba se realizó la identificación de los pigmentos. En el caso del amarillo, por presentar una tonalidad verde-amarillo, se consideró la probabilidad de agruparse en la clasificación de los flavonoides, descartando su identificación por carotenoides debido a que su extracción fue positiva con disolventes polares. En el caso del pigmento azul, por su tonalidad fue previamente identificado como una antocianina, además de ser soluble en disolventes polares, lo que identifica a este tipo de pigmentos. A continuación, se describe el método utilizado en cada caso.

Para la identificación del pigmento amarillo, se utilizó la prueba de formación de precipitado que identifica a las auronas (Andersen y Jordheim, 2010), se usaron 0.5 mL de $MgCl_2$ 0.2 N, como agente quelante con muestras de 5 mL de pigmento en tubos de ensaye de 15 mL, se añadieron alícuotas de NaOH 0.1 N como agente basificante hasta la formación completa de precipitado, indicado por el color.

Con respecto a la identificación del pigmento azul, las muestras se sometieron a diferentes valores de pH verificando que se trataba de una antocianina debido a la gama de colores que presentó en cada cambio de pH.

2.2.2 Determinación de características fisicoquímicas

Como características fisicoquímicas de los pigmentos, se determinaron pH, densidad y solubilidad.

En la determinación de pH se tomaron alícuotas de 20 mL de pigmento extraído en vasos de precipitado de 50 mL y se midió el pH con un potenciómetro marca Hanna Instruments modelo HF 9025, debido a que los pigmentos respondieron al cambio de pH con cambios en su coloración, se determinó el punto de vire, se utilizaron 5 mL de pigmento y se colocaron en vasos de precipitado de 25 mL y como soluciones ácido base se usaron NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N, para el registro de pH se usó el aparato usado en la determinación de pH. .

Para la determinación de la densidad se colocaron aproximadamente 220 mL de cada pigmento a una concentración de 1 g/L en una probeta graduada de 250 mL y se utilizó un densímetro marca Schneider.

En relación a la determinación de solubilidad, para el pigmento amarillo se utilizó como disolvente agua desionizada y una solución de etanol al 80% v/v. Previamente la muestra de pigmento se secó a 32 °C. Posteriormente, en alícuotas de 10 mL de agua y mezclas etanol agua, se agregaron muestras de pigmento seco de peso conocido poco a poco, para obtener una solución homogénea, hasta observar una solución no homogénea con partículas suspendidas en la solución o bien hasta saturar la solución, registrando la solubilidad del pigmento en mg/L de disolvente.

En el caso, de la determinación de la solubilidad del pigmento azul, la prueba se llevó a cabo utilizando como disolvente agua desionizada. De igual forma, que el pigmento amarillo, en una alícuota de 10 mL de disolvente se agregaron muestras secas de peso conocido de pigmento hasta observar partículas suspendidas en la solución o bien hasta saturar la solución, registrando la solubilidad del pigmento en mg/L.

2.2.3 Determinación de características espectrofotométricas UV-VIS y espectrométricas IR

Los análisis UV-Vis se realizaron tomando alícuotas de pigmento de 3 mL y se tomó como blanco etanol al 80%. Se realizaron barridos en un intervalo de 190 a 900 nm para determinar las bandas de absorción de los pigmentos. Para llevar a cabo esta determinación se utilizó un Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35, que se muestra en la Figura 2.2.



Figura 2.2. Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35

Para el análisis IR, las muestras se secaron y se almacenaron en un recipiente cerrado y se colocaron en un desecador para evitar que ganaran humedad, se obtuvieron los espectros IR correspondientes para cada pigmento de 400 a 4000 cm^{-1} . El equipo que se utilizó fue un espectroscopio Agilent Varian 640-IR FT-IR, que se muestra en la Figura 2.3.



Figura 2.3. Espectroscopio Agilent Varian 640-IR FT-IR

2.2.4 Determinación de características de Fluorescencia

Los análisis de Fluorescencia se realizaron tomando alícuotas de 3 mL de los pigmentos ajustados a 1 de absorbancia, se utilizó como blanco agua destilada. Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos de acuerdo a la longitud de onda en la región UV-Vis que cada pigmento tenía más pronunciada. El equipo que se utilizó fue un fluorímetro Horiba Fluorolog FL3C, que se muestra en la Figura 2.4.



Figura 2.4 Fluorímetro Horiba Fluorolog FL3C

2.2.5 Determinación de características de Resonancia Magnética

Para el análisis de resonancia magnética nuclear, las muestras se secaron y se almacenaron en un recipiente cerrado y se colocaron en un desecador para evitar que

ganaran humedad. Los análisis se realizaron en un equipo de Resonancia magnética nuclear Bruker 400 Mhz, que se muestra en la Figura 2.5 con agua deuterada.



Figura 2.5 Espectrómetro NMR Bruker 400 MHz

2.2.6 Determinación de características de Espectrometría de Masas

Para el análisis de espectrometría de masas, las muestras se secaron y se almacenaron en un recipiente cerrado y se colocaron en un desecador para evitar que ganaran humedad, se obtuvieron los espectros de masas para cada pigmento. Los análisis se realizaron en un Espectrómetro de masas Bruker Daltonics – Esquire6000, que se muestra en la Figura 2.6.



Figura 2.6 Espectrómetro de Masas Bruker Daltonics-Esquire6000

2.3 Análisis de degradabilidad de los pigmentos

Los extractos de pigmento se sometieron a un análisis de degradabilidad con las variables temperatura, radiación solar, O₂ ambiental y pH.

Para el análisis de degradabilidad se secaron previamente 125 mL de pigmento vegetal a 30 °C durante 5 días en cajas petri. Una vez seco se recuperó de las cajas y se almacenó en un frasco de vidrio y este se colocó en un desecador con el fin de mantenerlo seco.

Para analizar la degradabilidad por temperatura se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) hasta 800 °C, para lo cual se utilizaron 11.1 mg de pigmento amarillo, se obtuvo un diagrama TG vs DT, donde el eje TG representa la masa de la muestra y el eje DT que la diferencia de temperatura, siendo el instrumento utilizado un TGA PT-1600 Linseis, que se muestra en la Figura 2.7.



Figura 2.7 TGA PT-1600 Linseis

En la prueba de degradabilidad por O₂ ambiental y luz, se realizaron cuatro pruebas; en cada una se colocaron 5 mL de muestra en tubos de vidrio, diferenciándose por la tapa y el aislamiento de luz. El primer tubo se cerró con tapa enroscada, el segundo

con un tapón de algodón, el tercero fue envuelto en aluminio y se cerró con tapa enroscada y el cuarto, fue envuelto con aluminio y se le colocó un tapón de algodón.

El cambio en la tonalidad del pigmento fue monitoreado a través de espectrofotometría UV-Vis. Los análisis se realizaron por triplicado primero cada hora el primer día durante 8 horas, luego cada 24 horas hasta el día 30.

Para la prueba de degradabilidad debida a pH, las muestras se sometieron a distintos pH usando como base NaOH 0.1 N y como ácido HCl 0.1 N. Se registró el pH de vire, así como las pruebas de formación de precipitado.

2.4 Determinación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos totales

A continuación, se mencionan los métodos utilizados para la determinación de actividad antioxidante y compuestos fenólicos totales.

2.4.1 Método por Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico (ABTS).

La actividad antioxidante de los pigmentos se determinó mediante la metodología ABTS, establecida por Re, (1999) con algunas modificaciones ajustadas a las muestras y reactivos, de la siguiente forma, utilizando como reactivo referente el ácido ascórbico.

Para medir la actividad antioxidante, se preparó una solución de ABTS 7 mM y en esta misma solución, se agregó persulfato de potasio para alcanzar una de concentración de 2.45 mM; esta solución se dejó reposar a temperatura ambiente durante 18 horas. Después de ese tiempo, esta solución se diluyó con etanol puro hasta alcanzar una absorbancia de 1.6.

Simultáneamente se preparó una solución stock de ácido ascórbico de 0.5 g/L, a partir de la cual se hicieron diluciones considerando 5 concentraciones hasta llegar a cero.

Posteriormente se tomaron 20 μL de cada solución y se colocaron en frascos de 15 mL forrados con aluminio y se añadieron 980 μL de la solución de ABTS previamente preparada. Los frascos se calentaron 5 min a 37 °C a baño maría y se procedió a realizar la lectura de absorbancia a 750 nm y la construcción de la curva de calibración en el espectrofotómetro.

El mismo procedimiento empleado para la curva de calibración se siguió para la determinación de la actividad antioxidante sustituyendo la solución de ácido ascórbico por las muestras de los pigmentos azul y amarillo, cuidando que las muestras fueran de reciente extracción.

2.4.2 Método por 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

La actividad antioxidante de los pigmentos se determinó mediante la metodología DPPH, establecida por Shen *et al.*, (2010) con algunas modificaciones a las muestras y reactivos, de la siguiente forma, utilizando como reactivo referente el ácido ascórbico y se realizó mediante espectroscopia UV-Vis fijando el barrido en la banda patrón en 516 nm.

Se preparó una solución de DPPH 0.001 M y una solución de HCl-Tris 0.05 M, simultáneamente se preparó una solución stock de ácido ascórbico de 0.5 g/L, se hicieron diluciones considerando 5 concentraciones hasta llegar a cero.

Se tomaron alícuotas de 100 μL de cada pigmento en frascos ámbar cubiertos con papel aluminio, se les añadió 900 μL de HCl-Tris y 2000 μL de DPPH previamente preparados a cada muestra, se dejaron reposar 30 minutos y después se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante midiendo su concentración en relación a una curva de concentración establecida con el patrón y sus diluciones usando la ecuación 1.2.

2.4.3 Determinación de compuestos fenólicos totales por Folin Ciocalteu

La metodología aplicada para este análisis se realizó de acuerdo a Asada y Tamura (2012). Se preparó un stock de soluciones de ácido gálico de 0.5 g/mL considerando cinco concentraciones hasta llegar a cero, así mismo se preparó una solución de Na₂CO₃ al 10 %. Se tomaron 49.5 µL de cada pigmento y se llevaron a frascos ámbar cubiertos de papel aluminio, se les agregaron 491.7 µL de reactivo de Folin Ciocalteu, 491.7 µL de Na₂CO₃ y 1967.1 µL de agua destilada a cada muestra, se dejaron reposar una hora y se les midió la absorbancia.

2.5 Encapsulamiento de los pigmentos

En esta etapa, se utilizó maltodextrina y goma arábica como materiales encapsulantes, cada uno por separado. Enseguida se describen las metodologías utilizadas para llevar a cabo el encapsulamiento de cada pigmento.

2.5.1 Encapsulamiento del pigmento amarillo

Para el encapsulamiento del pigmento amarillo se utilizaron dos métodos, extrusión y secado por aspersión.

En el método por extrusión se prepararon 4 mezclas de materiales utilizando grenetina, sacarosa, maltodextrina y goma arábica; las proporciones consideradas de cada componente se indican a continuación en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Formulaciones de mezclas de material encapsulante

| Componente | Mezcla 1 | Mezcla 2 | Mezcla 3 | Mezcla 4 |
|------------------|----------|----------|----------|----------|
| H ₂ O | 25 mL | 25 mL | 25 mL | 25 mL |
| Grenetina | 7.5 g | 5 | 5 | 5 |
| Sacarosa | 10 g | 10 g | 10 g | 10 g |
| Ácido cítrico | 0.3 g | 0.3 g | 0.3 g | 0.3 g |
| NaCl | 0.3 g | 0.3 g | 0.3 g | 0.3 g |
| Maltodextrina | - | 2.5 g | - | 1.25 g |
| Goma arábica | - | - | 2.5 g | 1.25 g |
| Pigmento | 5 mL | 5 mL | 5 mL | 5 mL |

Las mezclas se llevaron a 75 °C en placa de calentamiento y se homogenizaron, luego se dejaron reposar hasta alcanzar una temperatura de 35 °C y las soluciones se gotearon en una columna de aceite comestible a 10 °C para la formación de cápsulas; una vez formadas, se recuperaron los encapsulados y se lavaron con soluciones frías de etanol al 80 % agua destilada.

De las 4 mezclas utilizadas se seleccionó, aquella que proporcionara una mayor estabilidad a los encapsulados y el mantenimiento de la pigmentación.

En el método por secado, se utilizó como material encapsulante, la maltodextrina. En este caso, 500 mL de extracto de pigmento amarillo filtrado se llevó a 15% de etanol y se mezcló con Maltodextrina llevándose la concentración de ésta al 2% en masa.

Posteriormente las muestras se secaron en un secador por aspersion Mini Sprühtrockner B-290 marca Buchi que se muestra en la Figura 2.8. Las condiciones de secado fueron temperatura de entrada 170 °C, temperatura de salida 100 °C.



Figura 2.8 Secador por aspersión Mini Sprühtrockner B-290

2.5.2 Encapsulamiento del pigmento azul

El pigmento azul fue encapsulado mediante la técnica por extrusión, siguiendo la misma metodología del pigmento amarillo.

2.6 Caracterización de los pigmentos encapsulados

La caracterización de los pigmentos encapsulados consistió en realizar pruebas de degradabilidad a las matrices encapsulantes en relación al cambio de pH y resistencia a la temperatura, así como cinética de liberación del pigmento, a continuación, se describen las metodologías utilizadas.

2.6.1 Pruebas de degradabilidad

En esta etapa se utilizaron los encapsulados para realizar la prueba de degradabilidad por pH y temperatura.

Para ambos pigmentos, se realizaron las mismas pruebas. Se tomaron 25 cápsulas con pigmento y se colocaron en vasos de precipitado de 20 mL, se midió su masa y se añadieron alícuotas de agua de 10 mL a condiciones ambientales, la prueba de pH se ajustó al inicio con NaOH 0.1N a pH 3 y finalizó en pH de 9, mientras que la prueba de temperatura se realizó colocando 25 cápsulas en un vaso de precipitados de 50 mL mediante agitación constante, iniciando a la temperatura ambiental y finalizando en 50 °C en una placa magnética de calentamiento.

2.6.2 Cinética de liberación

Para esta prueba se realizó de dos maneras, la primera de liberación prolongada y la segunda de liberación acelerada,

La cinética de liberación prolongada se realizó de la siguiente forma, se tomaron 25 cápsulas de pigmento, en vasos de precipitado de 20 mL, se midió su masa y se añadieron alícuotas de agua de 10 mL a condiciones ambientales, se tomó el tiempo en que el pigmento se incorpora por completo a alícuota de agua.

Mientras que para la cinética de liberación acelerada se tomaron 25 cápsulas de pigmento, en vasos de precipitado de 20 mL, se midió su masa y se añadieron alícuotas de agua de 10 mL a una temperatura de 30 °C, se registró el tiempo de inicio y se determinó el tiempo en que el pigmento se incorporó por completo al agua añadida.

3. RESULTADOS

3.1 Extracción y purificación de los pigmentos

a) Pigmento amarillo

La Figura 3.1 muestra del lado izquierdo el pigmento extraído y del lado derecho dos fracciones obtenidas del proceso de purificación del pigmento amarillo mediante cromatografía en columna. En ambas imágenes se observa la tonalidad amarilla de la flor, mostrando la extracción fue eficiente.



Figura 3.1 Imagen de una muestra de la extracción del pigmento y del pigmento extraído de la especie floral A.

Bhajan y Avinash (2014), mencionan que la alizarina y la apigenina, (quinonas amarillas) pueden ser extraídas mediante el contacto directo con etanol y metanol, también hace referencia que las flavonas son solubles en agua y etanol. Por otro lado, Zwergel *et al.*, (2012) mencionan que las coloraciones amarillo brillante en flores son brindadas directamente por auronas y chalconas y que además son altamente solubles en etanol. De acuerdo al color y la solubilidad que presentó el pigmento en etanol, se puede inferir que se trata de un flavonoide como una chalcona, una flavona, una aurona, o bien una quinona.

b) Pigmento azul

La Figura 3.2 muestra la tonalidad azul de la flor, mostrando una extracción la eficiente.



Figura 3.2 Pigmento extraído, especie floral B

Andersen y Jordheim (2010), mencionan que los pigmentos azules en flores son resultado de acilaciones de antocianinas con flavonas, combinación que es conocida como metaloantocianina, dichos pigmentos no son compatibles con alcoholes, por lo tanto, el pigmento azul puede ser una metaloantocianina, de acuerdo al color y la buena solubilidad que presentó el pigmento en agua, los reportes indican que se puede tratar de una antocianina.

3.2 Caracterización de los pigmentos

3.2.1 Identificación del grupo de procedencia

En relación a la prueba de precipitación realizada en el pigmento amarillo, éste corresponde a pigmentos naturales del grupo de flavonoides y su estructura química corresponde a las auronas.

En la Tabla 3.1, se indican el tipo de precipitado y la formación de la coloración del precipitado obtenido en la prueba con CaCl_2 y MgCl_2 como agentes precipitantes a pH básico.

Tabla 3.1 Pruebas de precipitación para el pigmento amarillo.

| Unidades agregadas | Color | Precipitado |
|----------------------------------|-------|-------------------------------------|
| 10 (1 mL) NaOH y CaCl_2 | Rojo | Precipitación parcial, rojo carmín |
| 10 (1 mL) MgCl_2 y NaOH | Rojo | Precipitación completa, rojo cereza |

La Figura 3.3 muestra los cambios observados durante la prueba de formación de precipitados para el pigmento utilizando CaCl_2 (izquierda) y MgCl_2 (derecha) como agente precipitante respectivamente; donde se observa que, en medio básico, la sal de magnesio produce una precipitación completa del pigmento, en contraste con la sal de calcio cuya precipitación es parcial. Los resultados de esta prueba indican que el pigmento es un flavonoide tipo aurona, por lo que su identificación se confirma como este tipo de pigmentos.

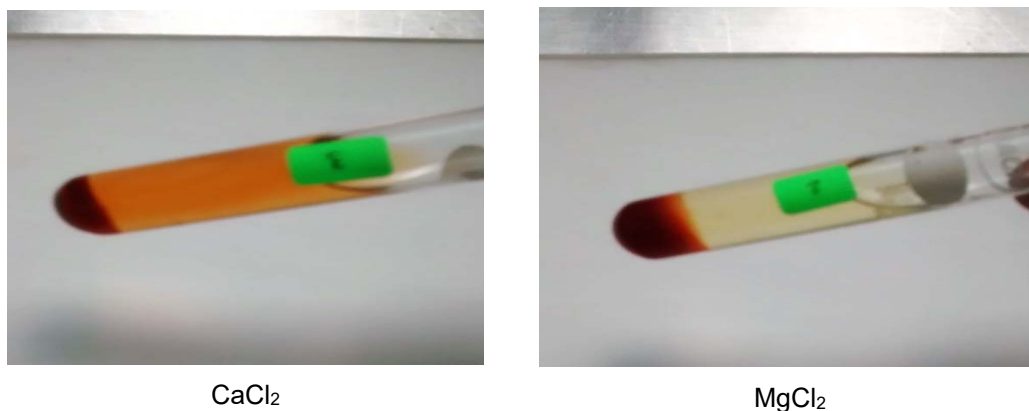


Figura 3.3 Pruebas de formación de precipitado del pigmento

3.2.2 Determinación de características fisicoquímicas

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de los pigmentos extraídos se muestran enseguida en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Características fisicoquímicas de los pigmentos

| Parámetro | Pigmento amarillo | Pigmento azul |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| pH | 4.3 | 5.9 |
| Densidad (g/mL) | 0.9108 en EtOH 80% | 1.254 en H ₂ O |
| Solubilidad | 0.336 g/10 mL en H ₂ O | 1.12 g /10 mL en H ₂ O |
| | 0.9457 g/10 mL en EtOH 80% | |

El pH es notoriamente más ácido en el pigmento amarillo que en el azul, la densidad es mayor en el azul que en el amarillo, esto debido a que los disolventes utilizados para la extracción son diferentes.

Con respecto a la solubilidad, el pigmento amarillo tuvo mayor solubilidad en etanol al que en agua, situación que probablemente se deba a que el pigmento tiene una estructura química afín a la de los compuestos fenólicos, mientras que el pigmento azul no es soluble en alcoholes debido a que tiene una estructura química glucosídica.

3.2.3 Caracterizaciones Espectrofotométrica UV-VIS y Espectroscópica IR

Los resultados espectroscópicos en UV-VIS de los pigmentos amarillo y azul, se presentan considerando varias muestras, para el amarillo: pigmento extraído y filtrado, y purificado mediante columna de cromatografía.

En el caso de los resultados FTIR, éstos se presentan para muestras secas de pigmento. Para el azul, la muestra corresponde a una solución del pigmento seco.

a) Pigmento amarillo

En la Figura 3.4 se muestra el espectro UV-Vis que corresponde a la muestra extraída y microfiltrada. Como se observa, el espectro muestra un pigmento posiblemente impuro, lo que dificulta la identificación de bandas, sin embargo, se distingue una probable banda en el rango de luz visible de 380 a 420 nm, indicando una coloración verde-amarilla del pigmento de acuerdo a espectro visible.

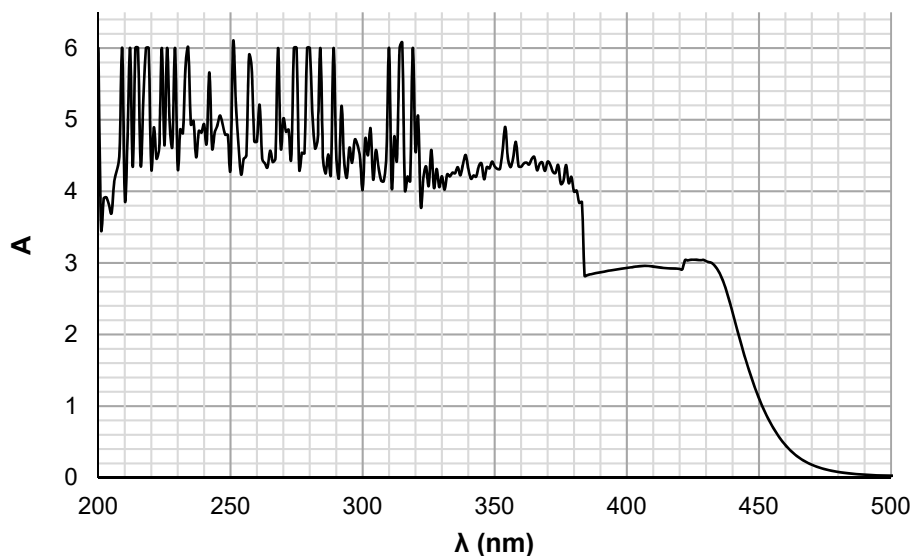


Figura 3.4 Espectro UV-Vis de extracto de pigmento amarillo.

En la Figura 3.5 se muestran los espectros UV-Vis de las fracciones obtenidas del pigmento amarillo purificado mediante cromatografía en columna, observando un espectro similar en cada caso. El resultado muestra que la purificación ayudó a remover algunas impurezas, ya que fue posible la definición de bandas en 257, 272, 350 y 400 nm. La presencia de estas bandas se atribuye a varias causas. 1) Bandas en 257 y 272 nm, relacionadas al contenido de polifenoles, asociada a flavonoides, específicamente, auronas, compuestas por 2 anillos fenólicos ligados a una cadena lineal de tres carbonos o con 3 átomos de carbono formando una estructura de 5 miembros. 2) Con respecto a la banda 350, ésta se relaciona con transiciones electrónicas por grupo de átomos que constituyen el cromóforo, de la forma $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$, que dan señales relativamente intensas en la región visible y UV próxima,

formados básicamente por agrupación de átomos $-\text{COOH}$ (grupo funcional característico de los llamados ácidos carboxílicos) el grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), el anillo bencénico o los dobles enlaces $\text{C}=\text{C}$, $\text{N}=\text{N}$, $\text{N}=\text{O}$ y $\text{C}=\text{S}$. Además, se considera que debido a que el pigmento se encuentra en etanol (disolvente polar), la banda se encuentra desplazada de forma batocrómica. A lo anterior, a la banda también se atribuye a la conjugación de cromóforos, debido a que en un sistema conjugado existen determinadas interacciones entre enlaces múltiples separados por un enlace simple en moléculas en las que se alternan estos enlaces como $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ o $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{N}$. La conjugación de cromóforos produce normalmente un desplazamiento batocrómico y se presenta en compuestos orgánicos con insaturaciones (es decir, enlaces dobles o triples). Sus absorciones principales, debidas a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, aparecen entre 160 y 220 nm, si el cromóforo está aislado, y entre 200 y 360 nm si está conjugado, pudiendo dar también bandas muy intensas en la zona visible (380-700 nm), lo cual identifica a muchos pigmentos naturales que presentan colores muy intensos.

La banda localizada en 400 nm, corresponden a la coloración verde y amarilla, pero debido a lo expuesto o resto de impurezas, es posible que se encuentren ligeramente desfasadas hacia el rango UV.

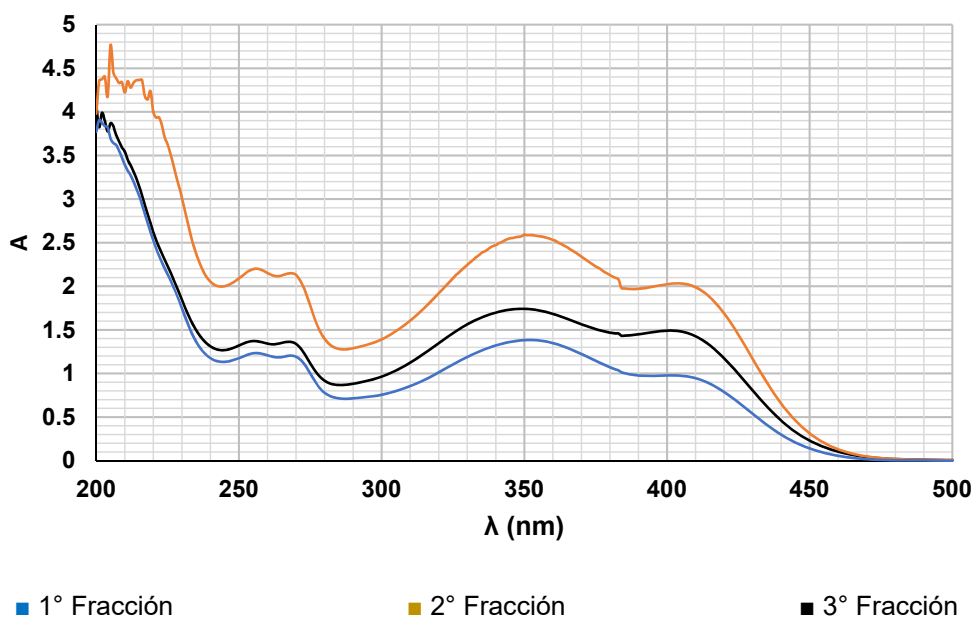


Figura 3.5. Espectros UV-Vis de pigmento amarillo purificado en columna.

Con respecto al análisis FTIR del pigmento amarillo. La Figura 3.6 muestra el espectro obtenido

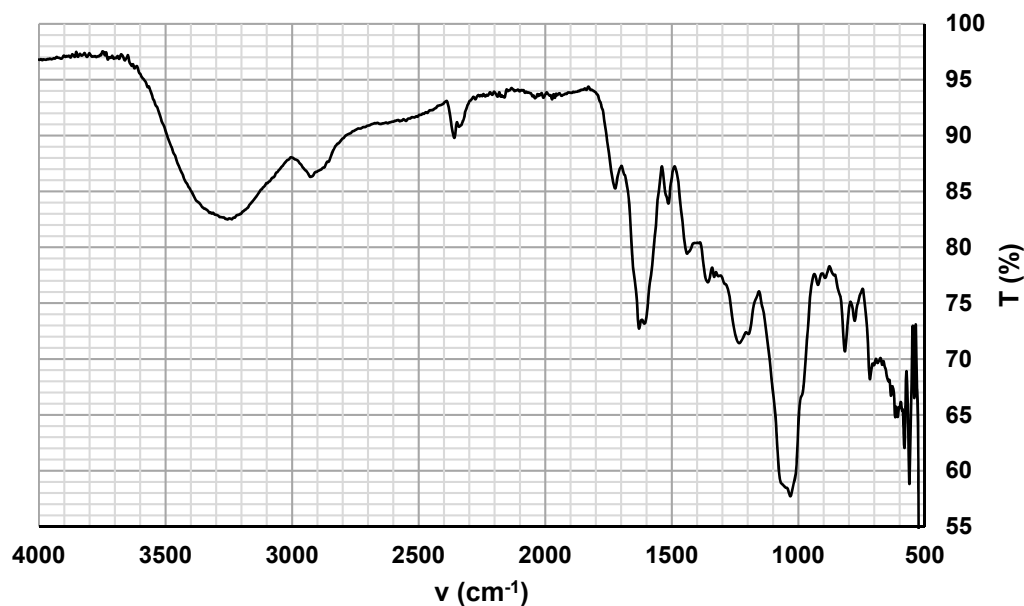
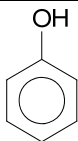



Figura 3.6 Espectro IR del pigmento amarillo

Considerando que el pigmento amarillo corresponda a una estructura flavonoide, específicamente auronas, se refiere que los grupos funcionales que definen al pigmento son los de las bandas identificadas en 1407, 1193 y 892 cm^{-1} , que corresponden a grupos fenólicos, furánicos y grupos OH sustituidos presentes en las auronas (ver Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Identificación de grupos funcionales del pigmento amarillo proveniente de *Especie floral A*

| Bandas (cm^{-1}) | Grupo funcional | Tipo de sustitución o posición | Fuentes |
|-----------------------------|---|---|--|
| 1407 | —COOH | Enlazado a la cadena | (Larkyn, 2011) |
| |  | Enlazado a la cadena | (Mistry, 2009) (Silverstein <i>et al.</i> , 2005) |
| 1193 |  | Enlazado a aromático | (Larkyn, 2011) (Mistry, 2009) |
| 892 | —OH | 1,3,5 trisustitución ligada a aromático | (Larkyn, 2011) |

Una probable estructura química del pigmento se presenta en la Figura 3.7 que corresponde a la de la aurona Cernuoside, la cual es un referente o patrón de las auronas (DellaGreca *et al.*, 2009).

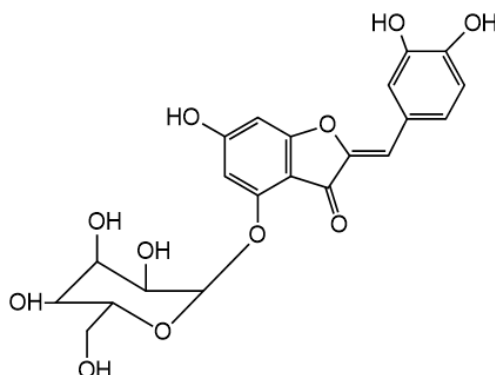


Figura 3.7 Estructura del Cernuoside.

b) Pigmento azul

En la Figura 3.8 se muestra el espectro UV-Vis que corresponde a la muestra extraída y microfiltrada del pigmento.

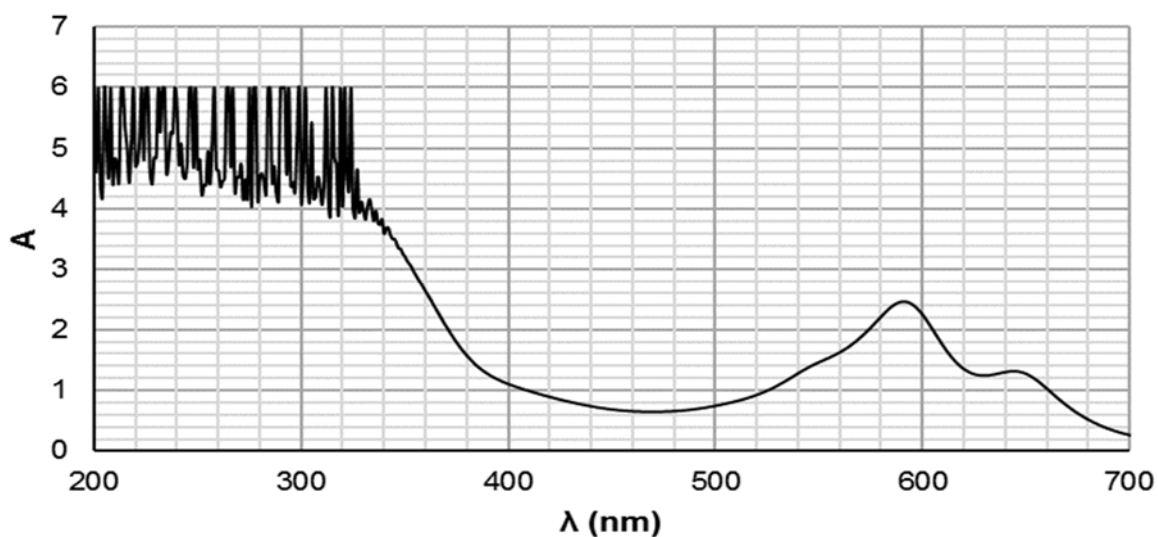


Figura 3.8 Espectro UV-Vis del pigmento azul.

El espectro del pigmento azul muestra tres bandas de absorción, la primera, apenas perceptible en 540 nm, la segunda en 590 y la tercera en 640 nm.

El comportamiento anterior, indica que se trata de una antocianina del tipo metalo antocianina complejada por Magnesio. De acuerdo a la información de Yoshida, (2009), este tipo de antocianinas, presentan una banda de absorción central de mayor absorbancia y dos hombros laterales de menor intensidad.

En relación al espectro IR del pigmento azul, la Figura 3.9 muestra el espectro obtenido.

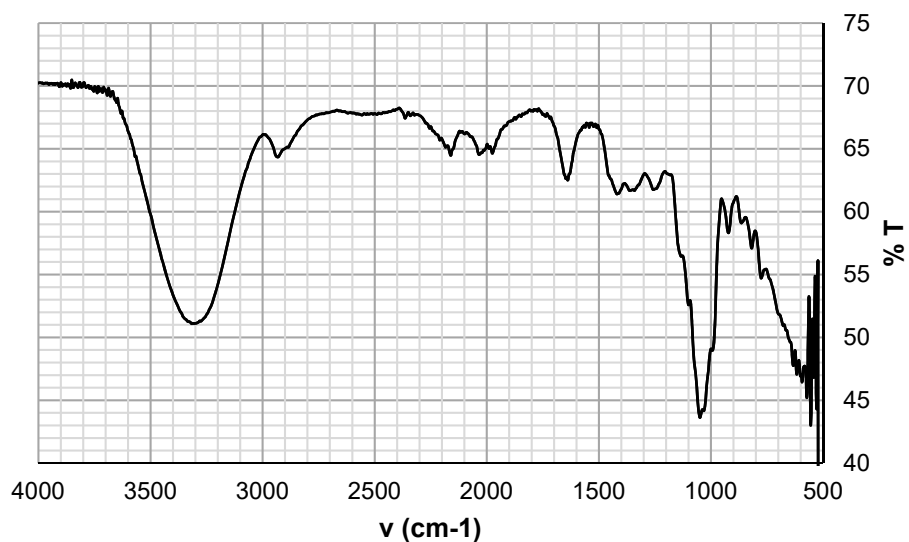
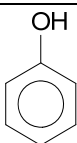


Figura 3.9 Espectro IR del pigmento azul

En este caso, se considera que los grupos funcionales que definen al pigmento son los de las bandas identificadas en 1409, 1652 y 833 cm^{-1} , que corresponden a grupos fenólicos, carboxílicos funcionales, carboxílicos enlazados a cadena y grupos OH sustituidos presentes en las metaloantocianinas.

La Tabla 3.4 muestra los grupos funcionales identificados en la muestra de pigmento azul, considerando del tipo de antocianina que fue identificado por UV- Vis y la especie floral de donde proviene. Se destaca principalmente los grupos C=O que son los ubicados en las acilaciones.

Tabla 3.4 Identificación de grupos funcionales del pigmento azul proveniente de *Especie floral B*

| Bandas (cm ⁻¹) | Grupo funcional | Tipo de sustitución o posición | Fuentes |
|----------------------------|---|---|--|
| 1409 | —COOH | Enlazado a la cadena | (Larkyn, 2011) |
| |  | Enlazado a la cadena | (Mistry, 2009) (Silverstein <i>et al.</i> , 2005) |
| 1652 | C=O | Enlazado a la cadena | (Larkyn, 2011) (Mistry, 2009) |
| 892 | —OH | 1,3,5 trisustitución ligada a aromático | (Larkyn, 2011) |

3.2.4 Caracterización Espectrofluorométrica

Los resultados de fluorescencia de los pigmentos amarillo y azul, se presentan en las Figuras 3.10 y 3.11 respectivamente.

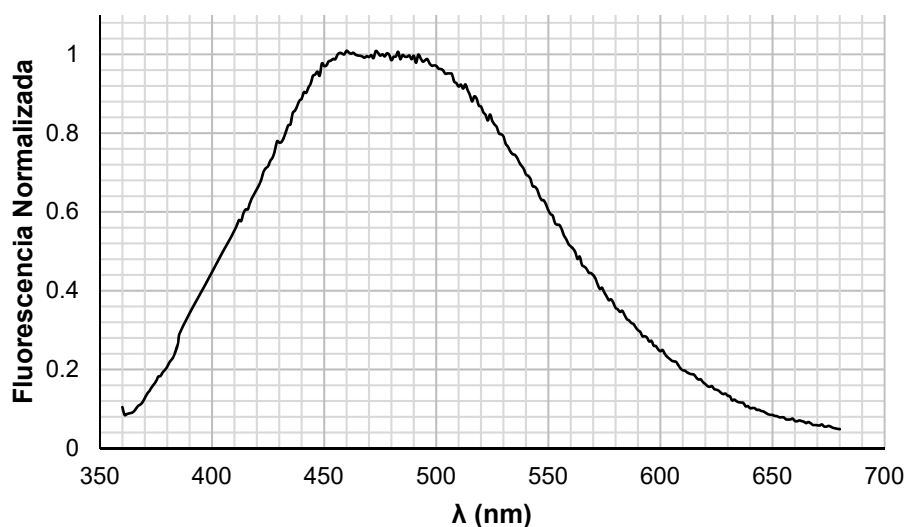


Figura 3.10 Espectro de fluorescencia del pigmento amarillo

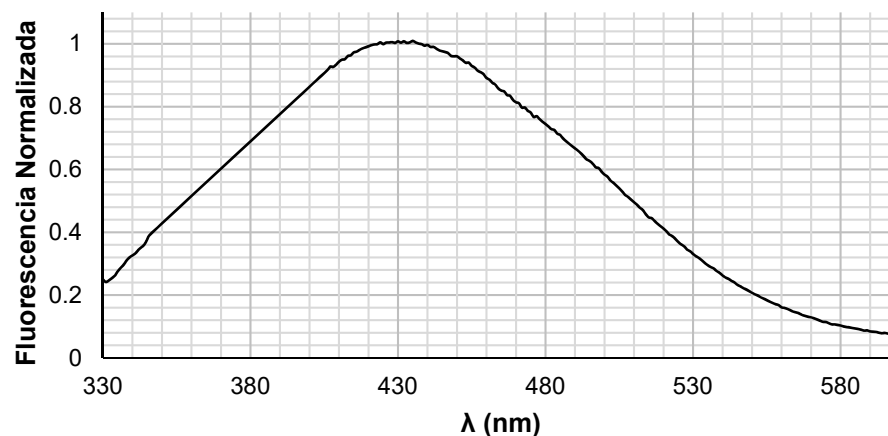


Figura 3.11 Espectro de fluorescencia del pigmento azul

Como se puede apreciar en Figuras 3.10 y 3.11 las bandas registradas en 475 y 433 nm muestran que los pigmentos amarillo y azul presentan fluorescencia. De acuerdo a Frank *et al.*, (2004) y Merzlyak *et al.*, (2008) la banda de 475 nm corresponden a la fluorescencia de flavonoides y la banda de 433 nm corresponde a la fluorescencia de las antocianinas, por lo que, a través de este análisis, también se identifica que los pigmentos corresponden a estas estructuras químicas.

3.2.5 Caracterización Espectrométrica de Masas

En seguida se muestran los espectros de masas del pigmento amarillo y del azul en las Figuras 3.12 y 3.13 respectivamente.

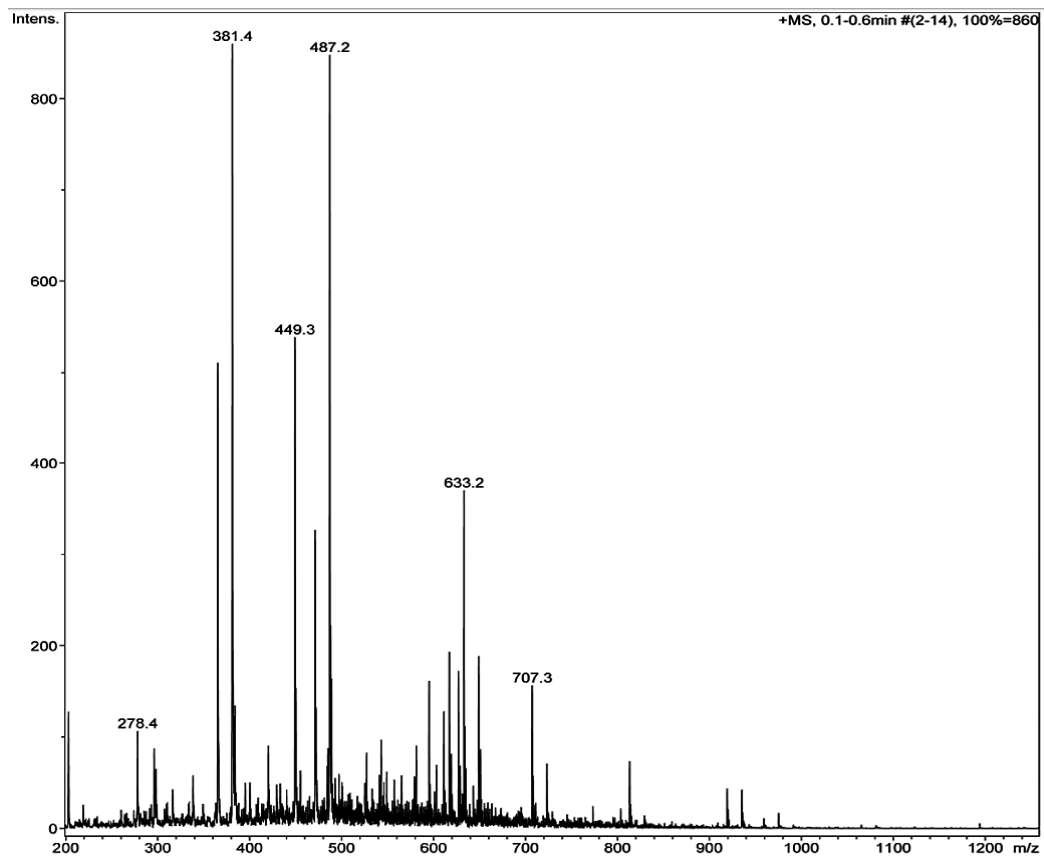


Figura 3.12 Espectro de masas del pigmento amarillo

La Figura 3.12 muestra el espectro de masas del pigmento amarillo, el cuál exhibe seis picos, entre los cuales se identifica la del Cernuoside en 449.3 m/z, el resto corresponden a fracciones de la estructura del pigmento, este resultado asegura que la estructura del pigmento amarillo corresponde a las auronas y que posiblemente se trate de una mezcla de las mismas.

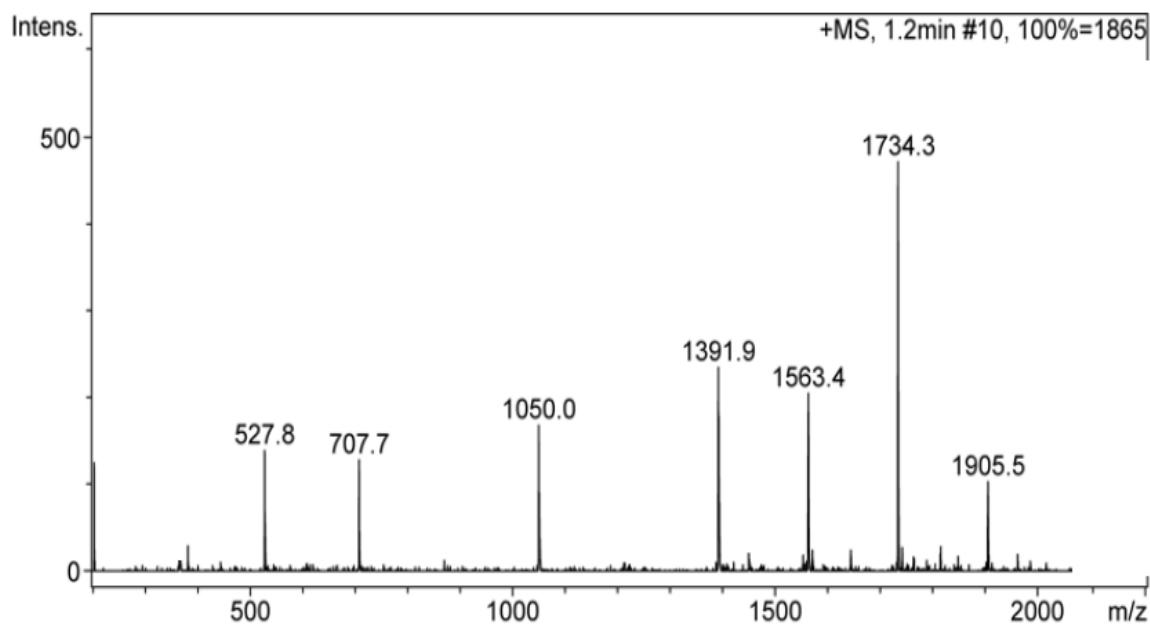


Figura 3.13 Espectro de masas del pigmento azul

El espectro de la Figura 3.13 que pertenece al pigmento azul exhibió siete picos, de entre los cuales se identificó el de 1563 m/z que corresponde a las metaloantocianinas y que de acuerdo a Zechmeister *et al.*, (2012) y a Kondo *et al.*, (1994) identifican a la metaloantocianina debido a los picos exhibidos en las regiones cercanas a 1400, 1550 y 1750 m/z de acuerdo a su relación (m/z), el pigmento al ser un compuesto natural puede venir acompañado de flavonoides y glucósidos libres o bien conjugados entre sí, los picos cercanos a 530 y 710 y 1050 m/z pueden pertenecer a estas estructuras de acuerdo a Mateus *et al.*, (2002).

3.2.6 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear

A continuación, en las Figuras 3.14 y 3.15 se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de los pigmentos amarillo y azul respectivamente, el eje de las abscisas es el desplazamiento (δ) en ppm, mientras que el eje de las ordenadas es la intensidad de la señal, que generalmente no se muestra en estos espectros.

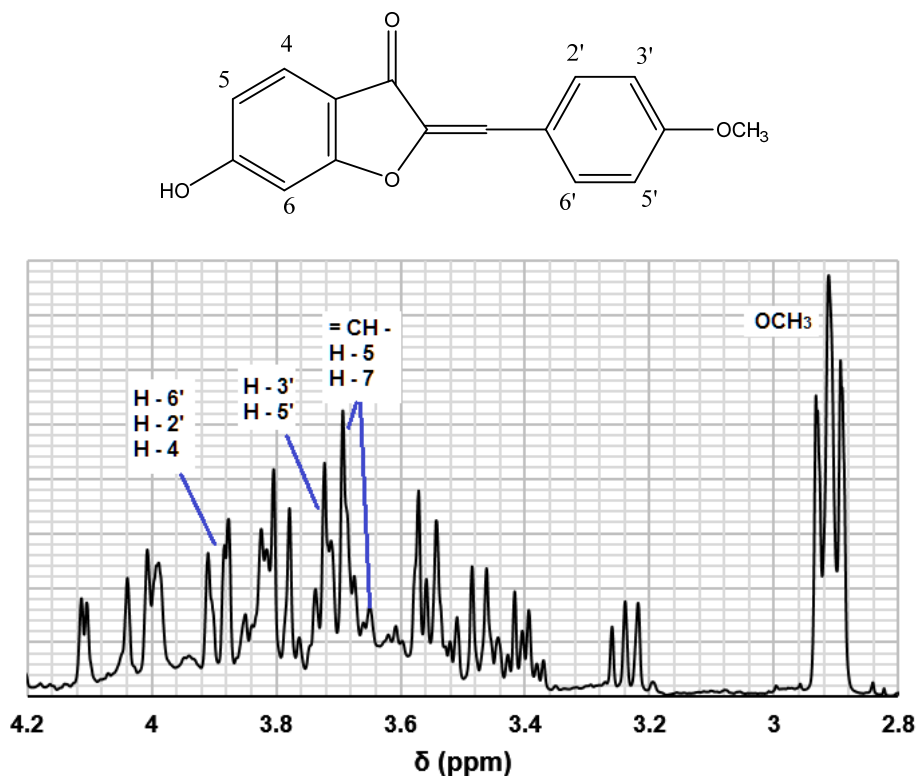


Figura 3.14 Espectro de RMN-¹H del pigmento amarillo y esqueleto patrón de auronas

La Figura 3.14 muestra en la parte superior del 6-hidroxi-2-(4-metoxibencilideno)benzofuran-3(2H)-ona que es el esqueleto patrón de las auronas y en la parte inferior el espectro de RMN-¹H del pigmento amarillo. Como se puede apreciar en el espectro de la Figura 3.14 se han identificado los protones desplazados, de acuerdo a Mabry (1970), estas señales son características de las auronas, las cuales tienen señales que se exhiben de manera singular de (derecha a izquierda) un doblete seguido de tres singuletes; de estos singuletes el primero es el más pronunciado, la ubicación de las señales en la región mencionada puede ser recorrida debido al tipo de disolvente utilizado o bien a que se encuentren apantallados por otras moléculas añadidas.

El resto de las señales registradas se deben probablemente a otras estructuras añadidas por las acilaciones enzimáticas como terminaciones carboxílicas y glucósidos de acuerdo a Mateus *et al.*, (2002). Con respecto a las señales entre 3.6 y

3.8 estos se deben específicamente a los hidrógenos de los anillos bencénicos que rodean al furano, y que de forma característica forman un doblete seguido de tres singuletes (de derecha a izquierda).

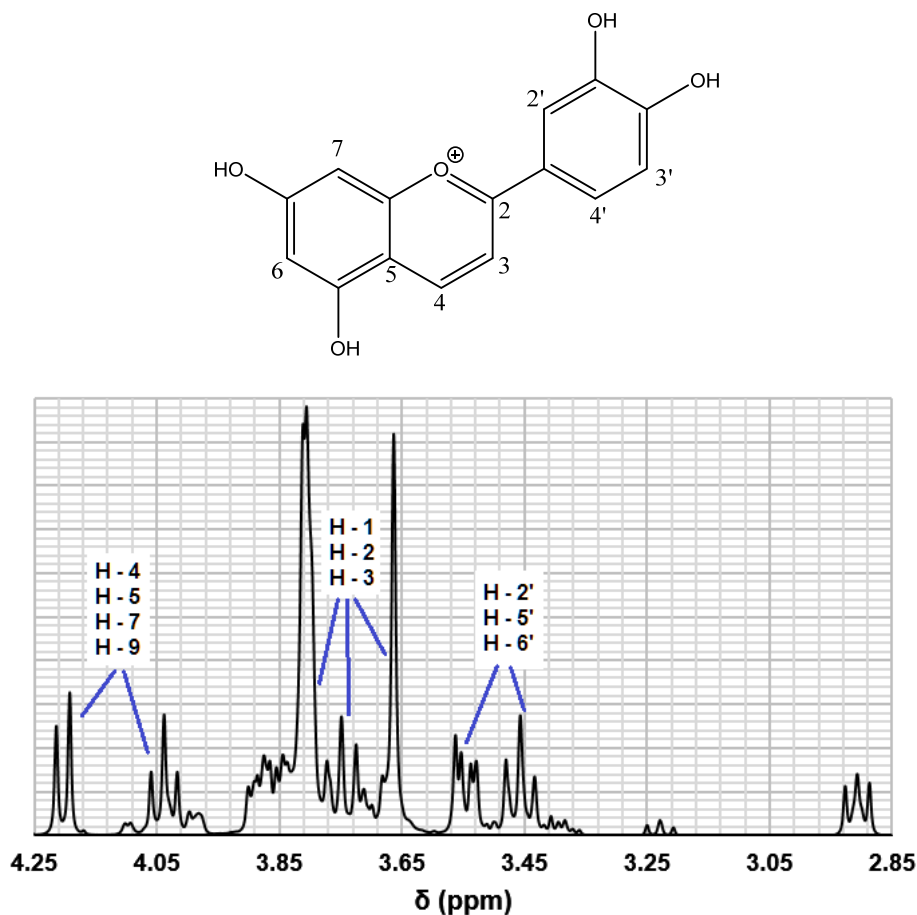


Figura 3.15 Espectro de RMN-¹H del pigmento azul

En la Figura 3.15 se muestra en la parte superior el esqueleto básico de las antocianinas, el catión flavilium y en la parte inferior el espectro RMN-¹H del pigmento azul. Los picos corresponden a los protones localizados en rango de 3.45 a 4.25 ppm como se muestra en la Figura 3.15 y corroboran que la estructura es una antocianina debido a un doble de dobles y tripletes que son característicos de estos pigmentos de acuerdo a Kondo *et al.*, (1992) y a Mabry (1970).

Las señales características tienen una secuencia un doble de dobletes, y dos singuletes pronunciados de 3.6 a 3.8 ppm (de derecha a izquierda respectivamente), que corresponden a los protones de los anillos aromáticos pertenecientes a la estructura, el resto de los picos corresponden a glucósidos y flavonoides añadidos según Mateus *et al.*, (2002) y Mcghie *et al.*, (2006).

3.3 Análisis de degradabilidad de los pigmentos

1) Pigmento amarillo

a) Degradabilidad por pH. La Figura 3.16 muestra los cambios de tonalidad del pigmento amarillo con respecto al pH, donde el color rojo corresponde a un pH básico, el naranja a un pH neutro y el amarillo es la coloración original del pigmento en cual se encuentra a un pH ácido de 4.3.

Los cambios de tonalidad del amarillo a rojo son resultado de la degradación que sufre la molécula del pigmento al ser desprotonada en su pH inicial, lo cual identifica que el pigmento amarillo posee grupos funcionales que corresponden a las auronas (Xu *et al.*, 2010).



Figura 3.16 Cambios de tonalidad con respecto al pH del pigmento amarillo

La Figura 3.17 muestra un probable mecanismo de desprotonación y complejación de una aurona, lo cual podría explicar la coloración y complejación debida a Na^+ y Mg^{2+} .

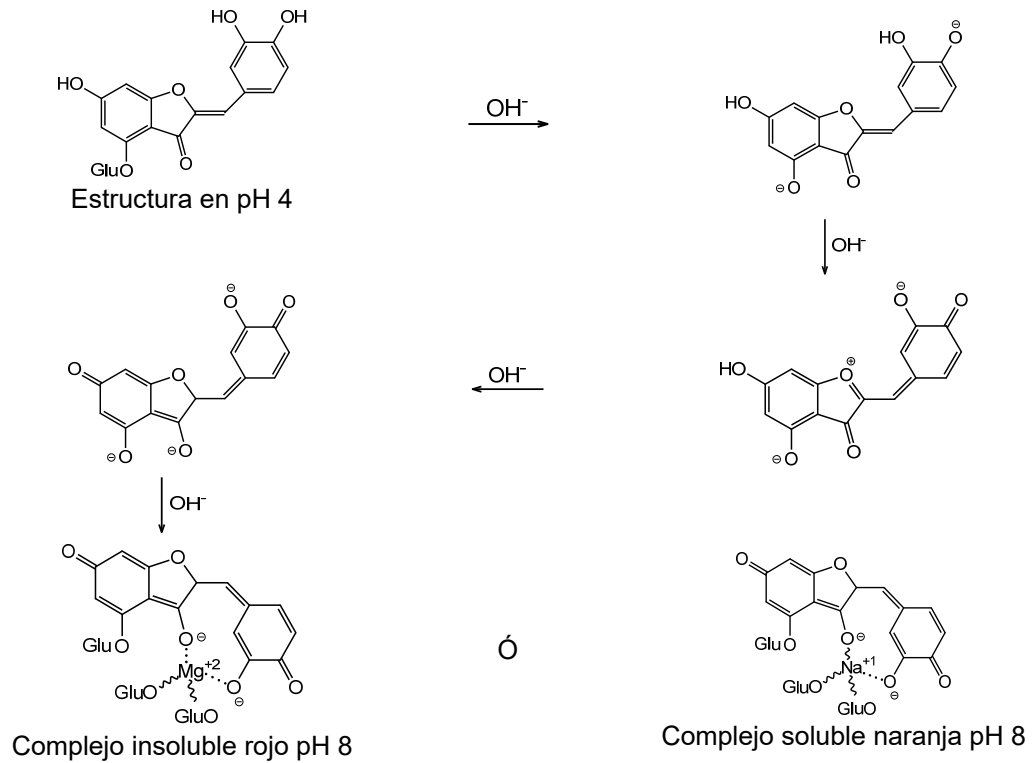


Figura 3.17 Cambios estructurales de auronas y formación de complejos

c) Degradabilidad por temperatura.

El termograma obtenido de una muestra de pigmento amarillo, se muestra en la Figura 3.18 y en la Tabla 3.5 se muestran las relaciones entre TG y DT.

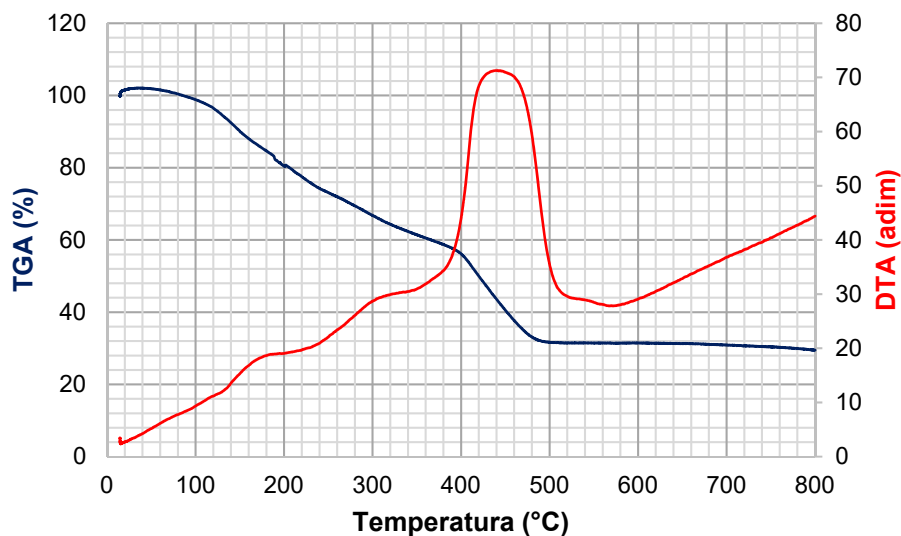


Figura 3.18 Termograma del pigmento amarillo hasta 800 °C

Tabla 3.5 Relaciones de TG y DT

| Temperatura (°C) | TG (%) | DTA (adim) |
|------------------|--------|------------|
| 182.8 | 84.19 | 18.8 |
| 319.8 | 65.06 | 19.9 |
| 440.1 | 43.12 | 43.4 |
| 495.3 | 31.9 | - |

Considerando que la molécula del pigmento corresponda a una aurona y que probablemente se refiera a una estructura química Cernuoside o similar, se verifica que en el primer cambio a 182.8 °C corresponde a la liberación del grupo cíclico éter, el segundo cambio a 319.8 °C, la liberación corresponde a los grupos OH, y finalmente 440.1 °C la oxidación completa de la molécula. La temperatura en 495.3 °C, refleja las cenizas del pigmento (Gabbott, 2008). De acuerdo a Craig y Reading (2007), este tipo de moléculas suelen liberar primero los grupos funcionales OH, siguiéndole los oxígenos intermoleculares y posteriormente el resto de los grupos funcionales. Sin embargo, en este caso, los resultados se deben a que el éter cíclico se encuentra unido a la molécula mediante un oxígeno, por tanto, se libera primero.

Según el estudio térmico mostrado, el pigmento amarillo presenta una gran resistencia térmica a la degradación, lo que se destaca por ser una muestra de origen natural. Esta característica puede ser aprovechada, en la industria de procesado de alimentos y farmacéutica como compuesto bioactivo, ya que éstos no rebasan los 250 °C en su descomposición.

c) Degradabilidad por oxígeno y luz. La Figura 3.19 muestra los barridos UV-Vis de muestras del pigmento amarillo después de 30 días de haber sido expuestas a oxígeno y luz. Los resultados indican que el pigmento no sufrió cambios en la pigmentación, por tanto, no fue degradable en las condiciones estudiadas.

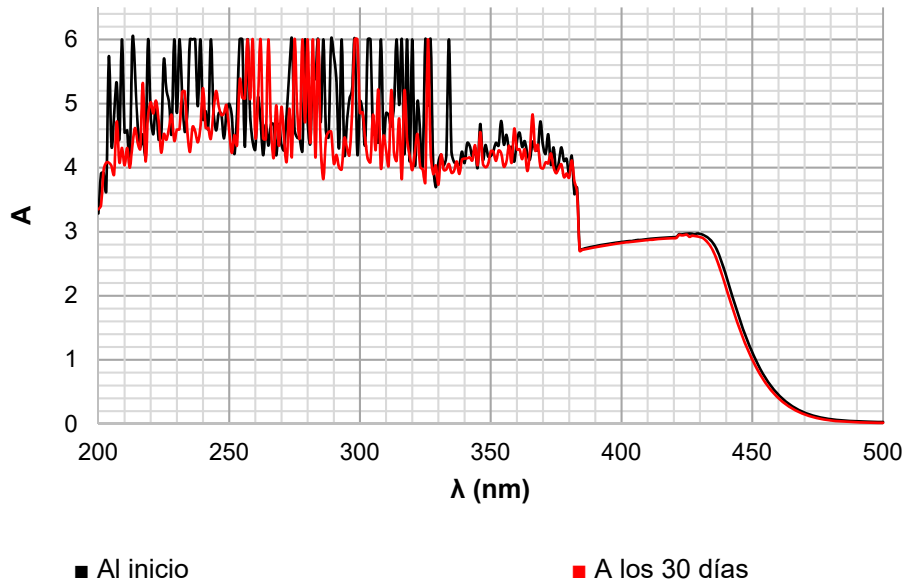


Figura 3.19 Comparación de Espectros UV-Vis de pigmento amarillo para pruebas de degradación de oxígeno y luz.

2) Pigmento azul

a) Degradabilidad por pH. En la Figura 3.20 el primer tubo de izquierda a derecha tiene un color azul que corresponde a un de pH 6.2, el segundo tubo una coloración roja correspondiente a un de pH 2.7, el tercer tubo una coloración amarilla correspondiente a un pH de 9.1 y el cuarto una coloración amarillo tenue correspondiente a un pH de 10.4. Estas coloraciones no fueron reversibles.

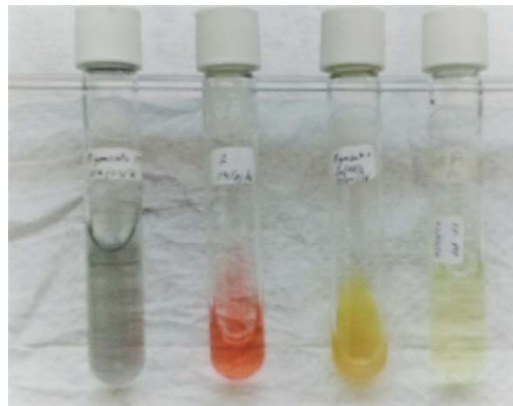


Figura 3.20 Cambios de tonalidad con respecto al pH del pigmento azul

Los cambios de coloración del pigmento azul por variación de pH, son característicos en las antocianinas. De acuerdo a Krieger y Verporte (1994), todas las antocianinas son susceptibles a la hidrólisis ácida, básica y una hidrólisis por exceso de agua. Adicionalmente, en el caso de las metaloantocianinas, el metal que las compleja es deslocalizado y de esta manera los cambios estructurales se hacen irreversibles.

b) Degradabilidad por temperatura. La prueba de termosensibilidad de la coloración del pigmento azul, mostro pérdida de inmediato, una vez que fue expuesto al calor a 34 °C. Lo anterior indica que existe limitación en su aplicación bajo condiciones de temperatura mayores a 25 °C, pero puede aplicarse con seguridad en alimentos que deben conservarse o se procesen a temperaturas menores de 25 °C.

En la Figura 3.21 se muestra la imagen que contrasta el pigmento azul recién extraído con el expuesto hasta 34 °C a baño maría.



Figura 3.21 Prueba de degradabilidad por temperatura

c) Degradabilidad por oxígeno y luz.

La Figura 3.22 muestra imágenes del pigmento azul sometido a esta prueba durante un periodo de 15 días, donde es observable que el pigmento muestra también una alta sensibilidad al oxígeno y luz, sufriendo una degradación irreversible.



Figura 3.22 Análisis de degradabilidad por O₂ y luz

3.4 Actividad antioxidante

3.4.1 Actividad Antioxidante por ABTS

La construcción de la curva de calibración con ácido ascórbico se muestra en la Figura 3.23 y los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3.6.

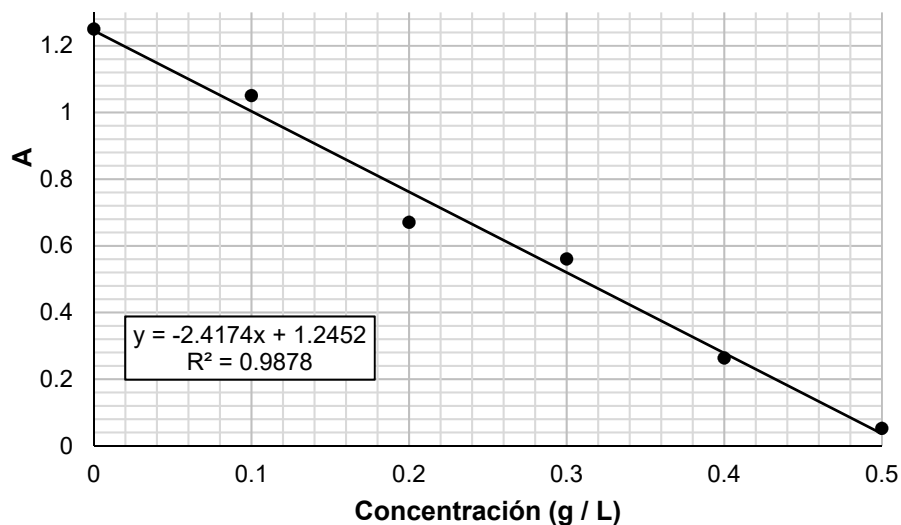


Figura 3.23 Curva de calibración de ABTS con ácido ascórbico

Tabla 3.6 Actividad antioxidante por ABTS

| Muestra | Gramos equivalentes de ácido ascórbico | % Actividad antioxidante |
|-------------------|--|--------------------------|
| Pigmento azul | 0.1450 | 30 |
| Pigmento amarillo | 0.0995 | 21 |

Como se muestra en la Tabla 3.6 la actividad antioxidante del pigmento azul es mayor con respecto al amarillo, situación que puede deberse a la sacarosa añadida durante la extracción ya que, de acuerdo a Tovar (2013) los glucósidos exhiben actividad antioxidante debido a su estructura anillada.

La actividad antioxidante promedio de Tovar (2013) corresponde a un análisis de especies vegetales, las actividades antioxidantes promedios de Boo *et al* (2012) y Floelgel *et al* (2012) corresponde a pigmentos naturales provenientes de una gran variedad de vegetales y frutos comestibles, de entre los cuales sólo los pigmentos obtenidos por Floelgel *et al* (2012) se deben principalmente a bayas, con respecto a lo anterior la actividad antioxidante determinada por ABTS para los pigmentos se coloca dentro del promedio de los porcentajes referidos en bibliografía.

La actividad antioxidante reportada por Tovar (2013) está en un rango de 20-35%, la reportada por Boo *et al* (2012) entre 17-35 y la de Floelgel *et al* (2012) entre 8-20%, lo cual ubica la actividad antioxidante determinada por este método dentro de los rangos reportados.

3.4.2 Actividad Antioxidante por DPPH

La construcción de la curva de calibración con ácido ascórbico se muestra en la Figura 3.24 y los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3.7.

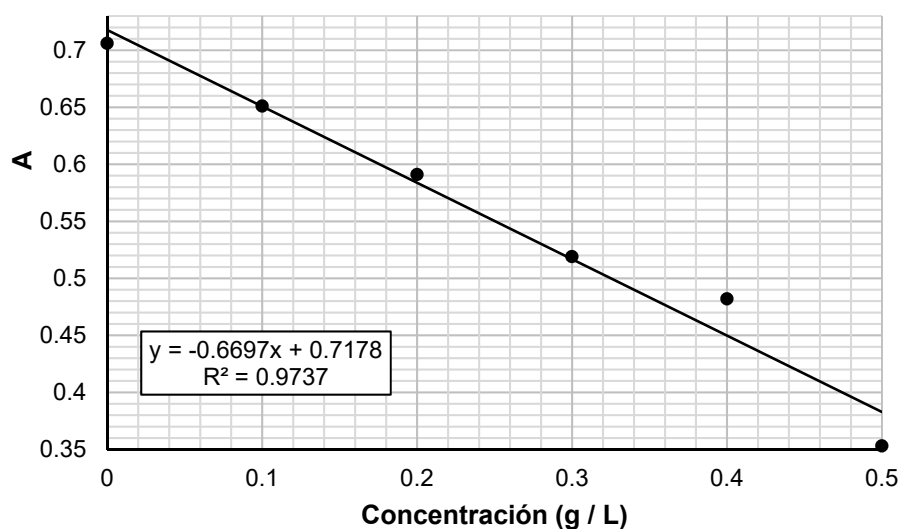


Figura 3.24 Curva de calibración de DPPH con ácido ascórbico

Tabla 3.7 Actividad antioxidante por DPPH

| Muestra | Gramos equivalentes de ácido ascórbico | % Actividad antioxidante |
|-------------------|--|--------------------------|
| Pigmento azul | 0.4595 | 34 |
| Pigmento amarillo | 0.4108 | 32 |

Con respecto a lo anterior la actividad antioxidante determinada por DPPH para los pigmentos se coloca dentro del promedio de los porcentajes referidos en literatura.

3.4.3 Compuestos fenólicos totales

La construcción de la curva de calibración con ácido gálico se muestra en la Figura 3.25 y los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3.8.

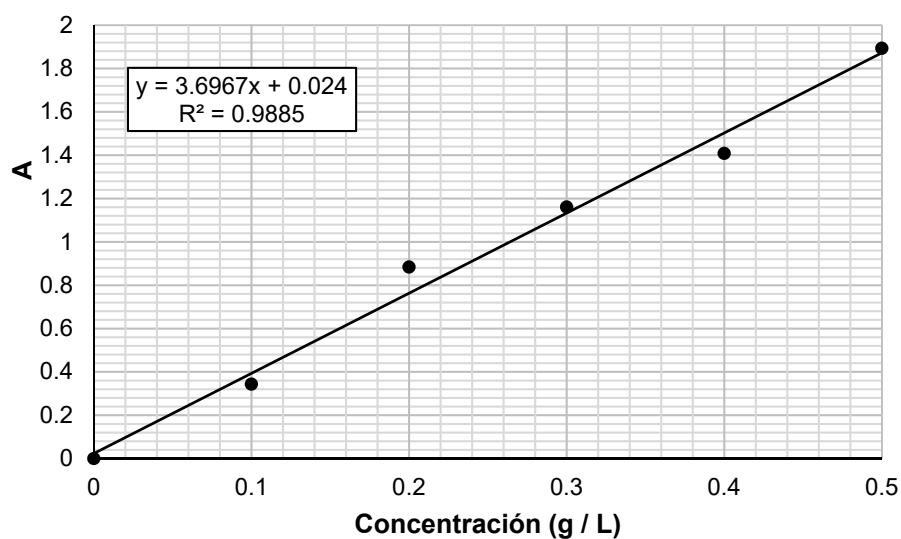


Figura 3.25 Curva de calibración de Folin Ciocalteu con ácido gálico

Tabla 3.8 Compuestos fenólicos totales

| Muestra | Gramos equivalentes de Ácido Gálico | CFT g ácido gálico / g muestra |
|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Pigmento azul | 0.1178 | 2.94 |
| Pigmento amarillo | 0.1476 | 3.69 |

Como se muestra en la Tabla 3.8, la concentración de los compuestos fenólicos totales del pigmento amarillo es mayor con respecto al azul, esto se puede deber a que la estructura del amarillo se adecúa más a los fenólicos que a los glucósidos.

Los resultados obtenidos en contraste a los de Tovar (2013), Boo *et al* (2012) y Lim *et al* (2014) se encuentran dentro del rango para el tipo de muestras a las que pertenecen.

3.5 Encapsulación de los pigmentos

3.5.1 Encapsulación por extrusión

Los encapsulados de ambos pigmentos obtenidos por extrusión, se muestran en la Figura 3.26, como se puede observar las esferas tuvieron forma regular y además una buena consistencia, también se observa que el pigmento se mantuvo distribuido a lo largo de las esferas debido a la extrusión y a los materiales usados.

Este tipo de encapsulamiento ha sido usado principalmente para ingredientes activos, sabores y medicamentos, haciendo uso de materiales como alginato, maltodextrinas y ciclodextrinas, almidón entre otros (Tackenberg y Kleinebudde 2015, Risch 2012, Castro *et al.*, 2015), lo que ha permitido conservar sus propiedades activas. Sin embargo, para pigmentos naturales los reportes indican sólo el método de encapsulamiento por secado, por lo tanto, no existen referencias para comparar los resultados obtenidos.



Figura 3.26 Encapsulados de los pigmentos

3.5.2 Encapsulación por secado

La Figura 3.27 muestra el encapsulado del pigmento amarillo en maltodextrina, una vez secado por aspersión (imagen de la izquierda). Como se puede observar la consistencia del encapsulado es polvosa. La muestra de una solución de este pigmento, se muestra del lado derecho de la figura, donde se observa que la tonalidad amarilla fue conservada después del secado.

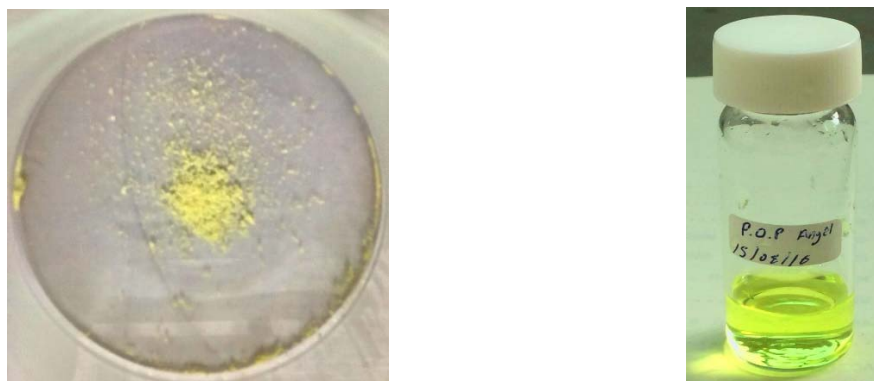


Figura 3.27 Pigmento amarillo seco y en solución acuosa

En la Figura 3.28 se muestra un espectro UV-Vis de una solución del pigmento seco encapsulado en maltodextrina.

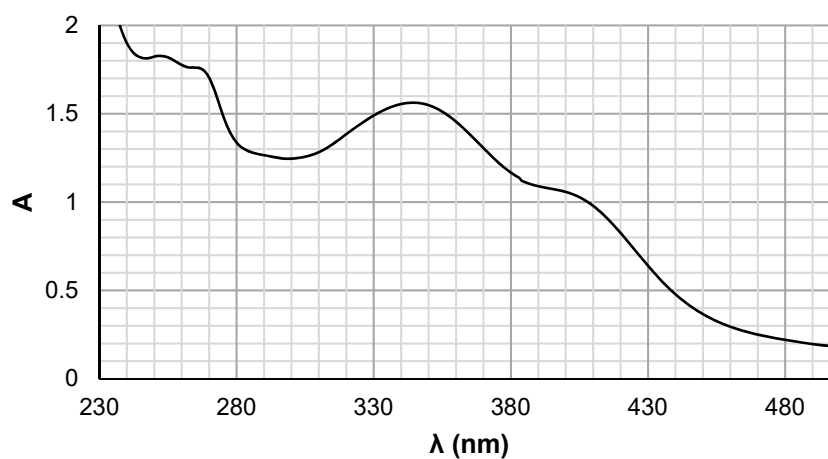


Figura 3.28 Espectro UV-Vis de pigmento amarillo encapsulado en maltodextrina y secado por aspersión.

El espectro describe las bandas características ya identificadas para el pigmento, confirmándose las cuatro bandas mostradas en la Figura 3.28, e indicando que después del proceso de encapsulado y secado, éste no fue modificado.

3.6 Caracterización de los pigmentos encapsulados

3.6.1 Pruebas de degradabilidad

A continuación, en la Tabla 3.9 se muestran los resultados de las pruebas de degradación por pH y temperatura.

Tabla 3.9 Pruebas de degradación por pH

| Encapsulado | pH | Color | Solubilidad |
|-------------------|----|----------|-------------|
| Pigmento Amarillo | 4 | Amarillo | Completa |
| | 7 | Amarillo | Parcial |
| | 9 | Rojo | Parcial |
| Pigmento Azul | 4 | Rojo | Completa |
| | 7 | Azul | Parcial |
| | 9 | Amarillo | Parcial |

Los resultados de degradación por pH obedecen a un cambio en el color de los encapsulados, además que en pH ácido los encapsulados se solubilizan por completo, esto puede deberse a que el material encapsulante es fácilmente soluble en ácidos.

Tabla 3.10 Pruebas de degradación por Temperatura

| Encapsulado | Temperatura | Color | Solubilidad |
|-------------------|-------------|----------------|-------------|
| Pigmento Amarillo | 22 °C | Amarillo | Parcial |
| | 30 °C | Amarillo | Completa |
| | 50 °C | Amarillo | Completa |
| Pigmento Azul | 22 °C | Azul | Parcial |
| | 30 °C | Azul-degradado | Completa |
| | 50 °C | Incoloro | Completa |

Las pruebas de degradación por temperatura se muestran en la Tabla 3.10 y señalan que a temperatura ambiente la solubilidad de los encapsulados es parcial, mientras que a una temperatura mayor los encapsulados son completamente solubles, sin embargo para los encapsulados del pigmento azul cuando se somete a temperaturas mayores el color se ve degradado, y en comparación al pigmento sin encapsular el pigmento encapsulado resiste arriba de los 30 °C.

3.6.2 Cinética de liberación de los pigmentos

Los resultados de la prueba de cinética de liberación se presentan en las Tablas 3.11 y 3.12 y corresponden a la formulación encapsulante con goma arábica ya que fue la que mejor conservó el color.

Tabla 3.11 Cinética de liberación prolongada

| Pigmento | No. Cápsulas | Masa (g) | Volumen (mL) | Tiempo (min) |
|----------|--------------|----------|--------------|--------------|
| Amarillo | 25 | 2.51 | 10 | 6.3 |
| Azul | 25 | 2.78 | 10 | 9.6 |

Tabla 3.12 Cinética de liberación acelerada

| Pigmento | No. Cápsulas | Masa (g) | Volumen (mL) | Tiempo (min) |
|----------|--------------|----------|--------------|--------------|
| Amarillo | 25 | 2.4 | 10 | 1.2 |
| Azul | 25 | 2.89 | 10 | 3.6 |

Los resultados de la cinética de liberación de pigmento muestran que la liberación acelerada se realiza en un menor tiempo, esto puede deberse a que el calor añadido acelera la disolución y liberación de los pigmentos. También sobresalen los tiempos de liberación del pigmento azul, esto se puede atribuir a que el pigmento tuvo mayor interacción con el material encapsulante ya que se liberó conforme el material encapsulante se incorporaba en la solución, mientras que el pigmento amarillo casi al contacto con el agua comenzó a liberarse dejando al final la cápsula incolora, es decir el material encapsulante libre de pigmento.

Lo anterior puede explicarse por la similitud química que presenta el pigmento azul con el material encapsulante perteneciendo más a los glucósidos que a los fenólicos como es el caso del pigmento amarillo.

CONCLUSIONES

La prueba de capacidad de formación de precipitado ha servido para la identificación cualitativa de Auronas mientras que la prueba de pH sirvió como prueba cualitativa de Antocianinas. Una vez que el pigmento azul se sometió a disolventes como el etanol y la acetona se reveló que la estructura principal pertenecía a una metaloantocianina debido a que su estructura tiende a cristalizarse en contacto con dichos disolventes al tener una estructura más parecida a los glucósidos que a los compuestos fenólicos. Se determinó que el pigmento amarillo, a pesar de ser de origen vegetal, tuvo una gran resistencia a la temperatura ya que el proceso de degradación más grande de la molécula ocurre alrededor de los 450 °C, mientras que para el pigmento azul se lograron buenos resultados de estabilización al no degradarse en menos de media hora luego de su extracción, alcanzando en su estado encapsulado hasta nueve meses en refrigeración.

Las caracterizaciones: espectrofotométricas, espectroscópicas y espectrométricas permitieron identificar el tipo de moléculas de los pigmentos estudiados en este trabajo. Para el pigmento amarillo se determinó que correspondía a flavonoides pertenecientes a las auronas y para el pigmento azul se determinó que pertenecía a antocianinas pertenecientes al grupo de las metaloantocianinas. La actividad antioxidante así como los compuestos fenólicos totales fueron parámetros que se ubicaron dentro de los valores promedio reportados en literatura, haciendo posible que en una posible aplicación en productos alimenticios puedan dar dichas propiedades al producto final. Finalmente, el encapsulado de los pigmentos permitió conservar las propiedades de pigmentación y de actividad antioxidante siendo la goma arábiga el material que mejores propiedades protectoras mantuvo durante los análisis de degradación, finalmente estos encapsulados mostraron una buena cinética de liberación de pigmentos ya que al final el material encapsulante quedó prácticamente incoloro; por lo tanto el método como los materiales empleados convierten a los encapsulados en adecuados vehículos para una aplicación directa en un producto comestible.

REFERENCIAS

Abelson N., Simon I. (2009) "Methods in enzymology". California Institute of Technology Pasadena, California. 82. 12-14, 498-501.

Aguilera M., Reza del M., Chew R. y Meza J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. Revista de ciencias biológicas y de la salud. Universidad de Sonora. 13(2). 16-22

Aguilera M., Alanis M., García C. y Hernández C. (2009). Caracterización y estabilidad de antocianinas de higo, variedad Mission. Ujat publicaciones. Universidad y ciencia; trópico húmedo. 25 (2). 151-158.

Aguilera M., Reza M. C. del, Chew R. y Meza J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. Universidad de Sonora. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 13 (2); 16-22.

Arrazola G., Herazo I. y Alvis A. (2014). Microencapsulación de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena L.*) mediante Secado por Aspersión y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. Información Tecnológica. 25(3): 31-42.

Barrón R. M., García M. R. del, Soto M. R., Colinas T. y Kite G. (2011). Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. Rev. Fitotec. Mex. 34 (3): 151 – 157.

Ben G. M., Sánchez L.G., Jacquot A., Probst L. y Desobry S. (2014). Alginate/sodium caseinate aqueous-core capsules: A pH-responsive matrix. Journal of Colloid and Interface Science. Elsevier. 440. (2015) 1–8.

Boo H., Hwang S., Bae C., Park S., Heo B. y Gorinstein S. (2012). Extraction and characterization of some natural plant pigments. Industrial Crops and Products. 40. 129-135.

Cárdenas B., López A., Martínez B., Bermudez K. y Trejo G. (2012). Advances in the phytochemistry of *Cuphea aequipetala*, *C. aequipetala* var. *hispida* and *C. lanceolata*: Extraction and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 11, No. 3 401-413.

Craig D. y Reading M. (2007). "Thermal analysis of pharmaceuticals". CRC Press. 194-210.

CONABIO, página de internet: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico>, especies consultadas: *Especie floral A* y *Especie floral B*, fecha de consulta 22 de noviembre de 2015.

Davies K., Bloor S., Spiller G. y Deroules S. (2002). "Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*". The Plant Journal 13 (2). Blackwell Science, Wiley. 259-266.

DellaGreca M., Purcaro R., Previtiera L., y Zarrelli A. (2008). Phenyl Cinnamate Derivatives from *Especie floral B*. Verlag Helvetica Chimica Acta AG, Zurich. Chemistry & Biodiversity. 5. 2408-2414.

DellaGreca M., Previtiera L., Purcaro R., y Zarrelli A. (2009). Phytotoxic Aromatic Constituents of Especie floral B. Verlag Helvetica Chimica Acta AG, Zurich. Chemistry & Biodiversity 6. 459-465.

Dreyer L., Esler K. y Zietsman J. (2006). Flowering phenology of South African Oxalis—possible indicator of climate change?. South African Journal of Botany. Elsevier. 72 150 – 156.

Downham, A. and Collins, P., (2000). Colouring our Foods in the last and next Millenium. Int. J. Food Science Tech. 35: 5-22.

Dueñas M., Pérez J., Santos C. y Escribano T. (2008). “Anthocyanin composition in fig (*Ficus carica* L.)”. Journal of food composition and analysis. Elsevier. 21 (2). 107-115.

Edem D. (2012). “Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review”. Plant Foods for Human Nutrition. Springer. 57(3). 319-341.

Fernández H. (2008). Tesis: “Pigmentos orgánicos e inorgánicos utilizados en las industrias de pinturas o recubrimientos y del plástico”. Universidad de Chile. 5-57.

Ferro A., Mestre T., Carneiro P., Sahumbaiev I., Seruca R. y Sanches J. (2017). “Blue intensity matters for cell cycle profiling in fluorescence DAPI-stained images”. Laboratory Investigation. 1-11.

Floegel A., Kim D., Chung S., Koo S. y Chun O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. Journal of Food Composition and analysis. 24. 1043-1048.

Forghan P., Khorramizadeh M. R. y Waller E. K. (2014). Silibinin inhibits accumulation of myeloid –derived suppressor cells and tumor growth of murine breast cancer. Cancer Medicine John Wiley & Sons Ltd. 3(2): 215–224.

Franco A. y Longart M. (2009). “Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso”. Revista de Estudios Transdisciplinarios 1(2). 84-96.

Frank H., Young A., Britton G. y Cogdell R. (2004). The Photochemistry of Carotenoids. Kluwer Academic Publishers. 32-98.

Gandía F., Jiménez M., Cabanes J., García F. y Escribano J. (2010). Stabilization of the bioactive pigment of opuntia fruits through maltodextrin encapsulation. Journal of agricultural and food chemistry 58. 10646-10652.

Garzón G. (2008). Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds a review. Acta boil. Colomb., 13(3): 27-36.

Goufo P. y Trindade H. (2014). Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proantho cyanidins, tocopherols, tocotrienols, c-oryzanol, and phytic acid. Wiley Periodicals, Inc. Food Science & Nutrition; 2(2): 75–104.

González M., Soto. M., Kite G. y Martínez M. (2007). "Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *Berlandieri* Schauer)". *Revista fitotecnica mexicana* 30 (1), Sociedad mexicana de fitogenética. pp 43-49.

Ghelardi E., Degano I., Colombini M. P., Mazurek J., Schilling M., Khanjian H., Learner T. (2015). A multi-analytical study on the photochemical degradation of synthetic organic pigments. *Dyes and Pigments* 123. 396-403.

Guerra M., Ortega G. (2006). Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. Parte I. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 40 (2); 35-44.

Güçlütürk I., Detsi A., Weiss E., Ioannou E., Roussis V. y Kefalasa P. (2012). Evaluation of Antioxidant Activity and Identification of Major Polyphenolics of the Invasive Weed *Espece floral B.* John Wiley & Sons, Ltd. *Phytochemical Analysis*. 23, 642–646.

Groos J. (1991). "Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids". Springer Business Media New York. pp 148-155.

Hailong Y. y Huang Q. (2010). Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. *Elsevier. Food Chemistry* 119. 669–674.

Hee-Ock B., Hwang S., Bae C., Park S., Heo B., Gorinstein S. (2012). Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products* 40. 129–135.

Hsin L., Hsin P., Shih H., Ting J. y Su C. (2015). Chemical characterization and antioxidative activity of four 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-substituted flavonoid glycosides from *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Botanical Studies. Springer Open Journal*. 56 8.

Hassan S. y Kitamoto Y. (2015). Synthesis and characterization of sub-micrometer $\text{SiO}_2@ \text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}$ beads and $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}$ capsules for biomedical applications. *Electrochimica acta. Elsevier*. XX. xx. (Hassan y Kitamoto, 2015).

Ibrahim M., Hussain I., Imran M., Hussain N., Hussain A., Mahboob T. (2013). Corniculatin A, a new flavonoidal glucoside from *Oxalis corniculata*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23, Issue 4. 630-634.

Ibrahim R., El-Halawany A., Saleh D., El Naggat M., El-Rahman O., Shabrawy El. y El-Hawary S. (2015). HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. *Elsevier, Revista Brasileira de Farmacognosia* 25. 134–141.

Kaisoon O., Siriamornpun S., Weerapreeyakul N. y Meeso N. (2011). "Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand". *Journal of functional foods. Elsevier*. Vol 3 (2). 88-89.

Kondo T., Yoshida T., Nakagawa A., Kawai T., Tamura H. y Goto T. (1992). "Structural basis of the blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*". *Letters to nature* 358. 515-518.

Kopjar M., Tadi M. y Piližota V. (2015). Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. Springer Open Journal. 2:1

Lara E., Belloso O., Osorio P., Barrera L., Sánchez J. y Bautista S. (2014). "Actividad antioxidante, composición nutrimental y funcional de flores comestibles de Dalia". *Revista Chanpingo Serie Horticultura*, 20 (1). 101-116.

Larkin P.J. (2011). "IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation". Elsevier. 73-117.

Lakowicz J. (2006). "Principles of Fluorescence Spectroscopy". Springer 1-70.

Lim C., Tiong W. y Loo J. (2014). "Antioxidant activity and total phenolic content of different varieties of *Portulaca grandiflora*". *International Journal of Phytopharmacy* 4 (1), pp.01-05.

Lozano M. (2009). Obtención de microencapsulados funcionales de zuma de *Opuntia stricta* mediante secado por atomización. Universidad politécnica de Cartagena. 26-44.

Martínez N., Arévalo K., Verde M., Rivas C., Oranday A., Núñez Ma. A., Morales Ma. E. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schlttdl (zarzamora). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 42 (4). 66-71.

Mateus N., Silva A., Santos C., Rivas J. y De Freitas V. (2002). "Identification of Anthocyanin-Flavanol Pigments in Red Wines by NMR and Mass Spectrometry". *J. Agric. Food Chem.* 50, 2110-2116.

Meneses J., Soto R., Espinosa T. y Ramírez M. (2008). Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencia* 42. 425-433.

Merzlyak M., Bernt T. y Naqvi K. (2008). "Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection". *Journal of Experimental Botany*, 59(2), pp. 349-359.

Messaoudi R., Abbeddou S., Mansouri A., Calokerinos A. y Kefalas P. (2011). "Phenolic profile and antioxidant activity of date-pits of seven algerian date palm fruit varieties". *International Journal of Food Properties*. Taylor & Francis Group, LLC 16:1037-1047.

Mistry B.D. (2009). "A handbook of spectroscopic data, Chemistry (UV, IR, PMR, CNMR and Mass Spectroscopy)". Oxford Book Company. 26-64.

Miyazaki K., Suzuki K., Iwaki K., Kusumi T., Abe T., Yoshida S. Fukui H. (2006). "Flower pigment mutations induced by heavy ion beam irradiation in an interspecific hybrid of *Torenia*". *Plant Biotechnology*. 23 (2). 163-167.

Munin A. y Edwards F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*. 3, 793-829.

Mcghie T., Rowan D. y Edwards P. (2006). "Structural Identification of Two Major Anthocyanin Components of Boysenberry by NMR Spectroscopy". *J. Agric. Food Chem.* 54, 8756–8761.

Nakayama M., Koshioka M., Shibata M., Hiradate S., Sugie H. y Yamaguchi M. (2014). "Identification of Cyanidin 3-O-(3",6"-O-Dimalonyl- β -glucopyranoside) as a Flower Pigment of *Chrysanthemum (Dendranthema grandiflorum)*". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 61(9), 1607-1608.

National Institute of Standards and Technology (NIST). Infrared data spectra. <http://webbook.nist.gov/>. Fecha de consulta 19-02-16.

Nurettin S. (2004). Isolation and characterization of a diazotrophic, oxalate-oxidizing bacterium from sour grass (Especie floral B L.). Elsevier. *Research in Microbiology* 156. 452–456.

Ochoa I. y Ayala A. (2004). "Los Flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos". *Ingeniería y Competitividad. Universidad del Valle.* 6(2). 93-104

Oyama K. y Kondo T. (2004). "Total síntesis of apigenin 7, 4'-di-O- β -glucopyranoside, a component of blue flower pigment of *Salvia patens*, and seven chiral analogues". *Tetrahedron* 60 (9). 2025-2034.

Özkan G. y Ersus S. (2014). Microencapsulation of natural food colourants. *International Journal of Nutrition and Food Sciences.* 3, No. 3, 2014, 145-156.

Pangestuti R. y Kima S. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of functional foods.* 3. 255–266.

Petsikos C., Dalias P., Troumbis A. Y. (2007). Effects of Especie floral B L. invasion in olive groves. Elsevier. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 120. 325–329

Pimentel G. (1984). "Caracterización del pigmento rojo de la jiotilla *Escontria chiotilla*". Tesis de Licenciatura Facultad de Química. UNAM, México. 23-28.

Ramos E., Castañeda B. y Ibañez L. (2008). "Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas". *Revista académica Perú salud* Vol 15 (1). 42-46.

Restrepo M. (2007). "Sustitución de colorantes en alimentos". *Resvista Lasallista de investigación.* 4 (1). 35-39.

Parra R. (2010). Microencapsulación de Alimentos. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 63(2) 5669-5684.

Pogue B., Gibbs S., Valdés P., Samkoe K., Roberts D. y Paulsen K. (2010). "Review of Neurosurgical Fluorescence Imaging Methodologies". *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 16(3). National Institutes of Health. 493-505.

Purschke M., Rubio N., Held K. y Redmond R. (2010). "Phototoxicity of Hoechst 33342 in time-lapse fluorescence microscopy." *Photochemical & Photobiology Sciences.* Royal Society of Chemistry. 9(12):1634-1639

Ramírez E., Gandul B., Romero C., Brenes M., Gallardo L. (2015). Composition of pigments and colour changes in green table olives related to processing type. Elsevier, Food Chemistry 166. 115–124.

Rubio A., Jiménez M., Acosta N. y Morales M. (2014). Encapsulación de jugo de maracuyá (*Passiflora edulis* variedad flavicarpa) mediante aspersión liofilización. Memorias del XXXV encuentro nacional de la AMIDIQ. 233-238.

Socaciu C. (2008). Food colorants; Chemical and functional properties. CRC Press Taylor & Francis Group. 241-270.

Subramanian R., Subbramaniyan P. y Raj V. (2015). "Isolation of bergenin from *Peltophorum pterocarpum* flowers and its bioactivity". Elsevier. Beni-suef university journal of basic and applied sciences. 4 (3). 256-261.

Sandoval A., Rodríguez E. y Ayala A. (2004). "Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos". Ingeniería y Competitividad. Universidad del valle 5 (2). 73-83.

Sarı A., Alkan C., Özcan A. N. (2015). Synthesis and characterization of micro/nano capsules of PMMA/capric–stearic acid eutectic mixture for low temperature-thermal energy storage in buildings. Energy and Buildings. Elsevier. 90. 106–113.

Silverstein R. M., Webster F. X. y Kiemle D. J. (2005). "Spectrometric identification of organic compounds 7th.". John Wiley & Sons, Inc. 83-138.

Shibata K., Nagai I. y Kishida M. (1916). The occurrence and physiological significance of flavone derivates in plants. Journal Biological Chemistry. ASBMB. 28. 93-108.

Temsamani K., Bouchta D., Fahmi T., Benicha M., Bennouna M. y Azmani A. (1995). Evaluation of the photosynthesis inhibitory effect of new sulfonylureas derivatives on Especie floral B. Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Elsevier. 38. 63-66.

Tonal L., Kambu K., Ngirubi N., Mesial K., Penge O., Lusakibanza M., Cimanga K., De Bruyne T., Apers S., Torte J., Pieters L., y Vlietinck J. A. (2000). Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. Phytomedicine. Urban & Fischer Verlag., 7(1), pp . 31-38

Tovar J. 2013. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Universidad Tecnológica de Pereira. 57-59.

Verdaguer D., Sala A., Vila M. (2010). Effect of environmental factors and bulb mass on the invasive geophyte Especie floral B development. Elsevier. Acta Oecologica 36. (20) 92-99.

Vergara C. (2013). Tesis: "Extracción y estabilización de betalainas de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) mediante tecnología de membranas y microencapsulación, como colorante alimentario". Universidad de Chile Doctorado en nutrición y alimentos.

Villanueva J., Concezo L. y Asquiere E. (2009). Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciarita dubia* (H.B.K.) McVaugh). Revista Ciencia e Tecnología de Alimentos 30 (1). 151-160.

Wu C. B., Wu G., Yang X., Liu Y.J., Gao C. X., Ji Q. H., Wang M. y Chen H. Z. (2014). "Preparation of Mannitol@Silica core-shell capsules via an interfacial polymerization process from water-in-oil emulsion". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Elsevier. 457. 487-494.

Xu R., Ye Y., Zhao W. (2010). *Introduction to natural products chemistry*. CRC Press Taylor & Francis Group. 176-184.

Xu Y., Burton S., Kim C. y Sismour E. (2015). "Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties". *Food Science & Nutrition* published by Wiley Periodicals, Inc. 1. 56-65.

Yeveerino M. (1997). Tesis: "Determinación cuantitativa de carotenoides en hojas de cinco especies del género *Leucaena*". Universidad Autónoma de Nuevo León, División de ciencias biológicas, División de estudios de postgrado. 15-28.

Yoshida K., Mori M. y Kondo T. (2009). Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural product reports*. 26 (7). 857-964.

Zavala M., Pérez S., Pérez C., Vargas R., Pérez R. (1998). "Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Especie floral A* and *Alternanthera repens*". Elsevier, *Journal of Ethnopharmacology* 61. 41-47.

Zechmeister L. (2012). *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer Science & Business Media. 154-214.

Zwergel C., Gaascht F., Valente S., Diederich M., Bragel D. y Kirsch G. (2012). "Aurones: Interesting natural and synthetic compounds with emerging biological potencial". *Natural Product Communications* 7(3). 389-394.