



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC



TESIS

**ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS
DE SEMILLA DE *Moringa oleifera* MEDIANTE GELIFICACIÓN
IÓNICA**

Para obtener el título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Presenta:

IBQ. IVÁN RIVERA ABASCAL

Directora:

DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ

Co-directora Interna:

DRA. IVET GALLEGOS MARÍN

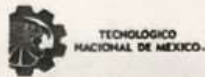
Co-directora Externa:

DRA. SOMARIS ELENA QUINTANA MARTÍNEZ

TUXTEPEC, OAXACA

NOVIEMBRE 2022





Instituto Tecnológico de Tuxtepec
División de Estudios Profesionales

Autorización de Presentación Electrónica de Tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., **16/Noviembre/2022**

Oficio No. DEP/CT-6344

**C. IVÁN RIVERA ABASCAL
EGRESADO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
CON NÚMERO DE CONTROL M15350689
P R E S E N T E**

POR MEDIO DE LA PRESENTE ME PERMITO COMUNICARLE QUE EL COMITÉ TUTORIAL INTEGRADO POR LOS CC. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ, IVET GALLEGOS MARÍN, SOMARIS ELENA QUINTANA MARTÍNEZ, JUAN GABRIEL TORRUCO UCO Y BETSABÉ HERNÁNDEZ SANTOS, REVISÓ Y APROBÓ EN SU TOTALIDAD EL TRABAJO PROFESIONAL DENOMINADO "ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE SEMILLA DE MORINGA OLEIFERA MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA." PRESENTADO POR USTED COMO PRODUCTO DE TESIS DE ACUERDO AL LINEAMIENTO DE TITULACIÓN CORRESPONDIENTE, PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS.

POR LO ANTERIOR Y DE ACUERDO A LOS LINEAMIENTOS INSTITUCIONALES SE LE DA TRÁMITE LEGAL PARA QUE PROCEDA A LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO PROFESIONAL

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica.


**JULIÁN KURI MAR
SUBDIRECTOR ACADÉMICO**

ccp. Depto. Servicios Escolares
Archivo
M/C/mdom*



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC

**SUBDIRECCIÓN
ACADÉMICA**



Av. Dr. Victor Bravo Ahuja Num. 561, Col. Predio el Paraíso, C.P.68350 Tuxtepec, Oaxaca
Tel. (287) 8751044 y (287) 51880 e-mail: cyd_tuxtepec@tecnm.mx | tuxtepec.tecnm.mx



DEDICATORIAS

A DIOS al gran arquitecto del universo que cada día nos llena de energía para poder lograr nuestros objetivos, es la fuerza que nos motiva, la mano que nos sustenta, el amor que nos alienta y la gracia que nos protege. Gracias al ser supremo omnipotente que me permitió lograr una meta en este camino llamado vida.

A LA VIDA Y AL UNIVERSO por las oportunidades que me han dado durante estos 24 años, por darme la oportunidad de conocer personas que me han brindado su amistad y confianza, por ayudarme a cerrar las puertas que no son para mí y abrir las puertas que sí lo son.

A LA FRATERNIDAD UNIVERSAL ya que todos somos hijos del gran arquitecto del universo, y nos conduce a un amor recíproco hacia el prójimo, ayudar a nuestros semejantes y hacer por ellos lo que nos gustaría que algún día hicieran por nosotros mismos. Tenemos que saber que el mundo sólo se puede captar mediante la acción y no la contemplación. El impulso más poderoso, en el ascenso del hombre, es el placer que le produce su propia habilidad. Disfrutemos haciendo lo que hacemos bien, y habiéndolo hecho bien, gocémonos haciéndolo mejor y lo que no sabemos aprendámoslo y sentirnos bien aprendiendo y luego seremos mejores porque habremos aprendido con gusto.

A MIS ABUELAS Y ABUELOS que de una u otra manera me han impulsado a seguir adelante. Por qué siempre han estado pendiente de mí a pesar de sus ocupaciones, por la paciencia que me han tenido toda la vida.

RECONOCIMIENTOS

A LA DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ por su valioso apoyo en la realización de este proyecto de investigación, así como también por la confianza, paciencia y la amistad que me brindó durante mi estancia dentro de la Maestría en Ciencias en Alimentos. Por ser una gran investigadora y siempre dar un buen ejemplo de dedicación, esfuerzo y de amor al trabajo. Por tener un gran corazón y siempre estar al pendiente de cada uno de los proyectos que dirige, así como también siempre estar al pendiente de sus estudiantes y nunca dejarnos solos ante las adversidades.

AL COMITE DEL PROYECTO: DRA IVET GALLEGOS MARÍN, DRA. SOMARIS ELENA QUINTANA MARTINEZ, DR JUAN GABRIEL TORRUCO UCO Y DRA BETSABE HERNÁNDEZ SANTOS por sus aportaciones y comentarios constructivos en la realización del presente proyecto.

AL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO, INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC por permitirme el acceso a las instalaciones para la realización del presente proyecto así como también facilitar el uso del laboratorio de ciencias en alimentos, de los materiales y equipos que se encuentran dentro del mismo. De igual manera, por abrirme las puertas desde hace más de 7 años y ser mi segundo hogar.

A LOS PROFESORES-INVESTIGADORES DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS que compartieron su conocimiento y experiencias en distintos temas enfocados a los alimentos durante los dos semestres que me dieron clases, así como también sus comentarios y aportaciones en los seminarios de investigación que fueron constructivos y ayudaron en la realización del presente proyecto de investigación.

A LOS PRODUCTORES Y CULTIVADORES DE LOS ÁRBOLES DE MORINGA porque sin ellos no sería posible poder recolectar los frutos de esta planta, además de que la investigación no sería posible, ya que de ellos depende la materia prima utilizada, gracias por ser parte fundamental de este proyecto y de todos los demás que se realizan en esta institución educativa.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) por la beca otorgada por 24 meses desde enero 2020 a enero 2022.

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca al día 14 de Noviembre del 2022, el que suscribe **C. Iván Rivera Abascal** alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Alimentos con número de control: **M15350689**, adscrito al Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Tuxtepec, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Cecilia Eugenia Martínez Sánchez** y cede los derechos del trabajo titulado: **“ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS DE SEMILLA DE *Moringa oleifera* MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA”**. Al Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Tuxtepec para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a los correos: ivanrivera97@hotmail.com y cecilia.ms@tuxtepec.tecnm.mx, si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



IBO. IVÁN RIVERA ABASCAL
NOMBRE Y FIRMA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y DE NO PLAGIO

Yo, **C. Iván Rivera Abascal** con Número de control: **M15350689**, RFC: **RIAI971121**, alumno de la Maestría en Ciencias en Alimentos, del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtepec, autor de la Tesis titulada “**ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCÓHOLICOS DE SEMILLA DE *Moringa oleifera* MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA**”

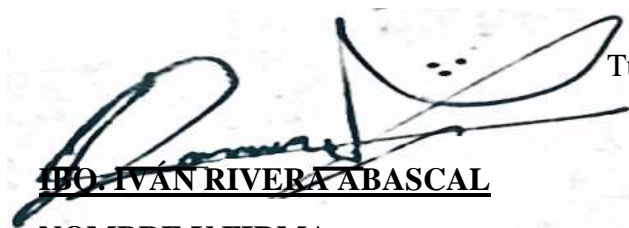
DECLARO QUÉ:

1. El presente trabajo de investigación y tema de la tesis presentada para la obtención del Título de Maestro en Ciencias en Alimentos es original y asignado por mi Director de tesis la **Dra. Cecilia Eugenia Martínez Sánchez**, siendo resultado de mi trabajo experimental y escritura personal, el cual no he copiado de otro trabajo de investigación, ni utilizado ideas, fórmulas, ni citas completas, así como ilustraciones diversas, sacadas de cualquier tesis, obra, artículo, memoria, etc., (en versión digital o impresa). Caso contrario, menciono de forma clara y exacta su origen o autor, tanto en el cuerpo del texto, figuras, cuadros, tablas u otros que tengan derechos de autor.

2. Declaro que el trabajo de investigación que pongo en consideración para evaluación no ha sido presentado anteriormente para obtener algún grado académico o título, ni ha sido publicado en sitio alguno.

3. Soy consciente de que el hecho de no respetar los derechos de autor y hacer plagio, es objeto de sanciones administrativas y/o legales por parte del Instituto, por lo que asumo cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de irregularidades en la tesis, así como de los derechos sobre la obra presentada.

Asimismo, me hago responsable ante la Institución o terceros, de cualquier irregularidad o daño que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado. De identificarse falsificación, plagio, fraude, o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente del Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Tuxtepec.



IBO. IVÁN RIVERA ABASCAL
NOMBRE Y FIRMA

Tuxtepec, Oaxaca a 14 de Noviembre del 2022.

RESUMEN

Rivera-Abascal Iván. Maestría en Ciencias en Alimentos. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Noviembre, 2022. **ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS DE SEMILLA DE *Moringa oleifera* MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA.** Directora: Dra. Cecilia Eugenia Martínez-Sánchez, Co-directora: Dra. Ivet Gallegos-Marín

El objetivo del presente proyecto fue obtener las mejores condiciones para la encapsulación de extractos hidroalcohólicos de semilla de *Moringa oleifera* mediante gelificación iónica. La materia prima fue polvo de semilla de *Moringa oleifera*, de la cual se obtuvo el extracto hidroalcohólico (70 mL etanol/30 mL agua) con una relación 1/18 P/V. Posteriormente, se realizó la extracción de compuestos bioactivos por extracción asistida por ultrasonido (30 min, 80 kHz y 30 °C). Se realizó un diseño de tratamientos factorial completo utilizando el software Design-Expert 7.0, teniendo como variables de respuesta la morfología (tamaño), el contenido de compuestos bioactivos (contenido de polifenoles y flavonoides totales), eficiencia de encapsulación, y la actividad antioxidante (DPPH* y ABTS*) y como variables independientes la mezcla a diferentes proporciones del extracto de semilla de *Moringa oleifera* (50, 75, 100 mL) con alginato de sodio (AS) (2, 2.5 y 3 g) y goma xantana (0.5 g). La encapsulación fue realizada por el método de gelificación iónica empleando la extrusión. Las cápsulas se almacenaron durante 4 semanas (28 días) a 8 °C bajo las mismas condiciones que el extracto. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por un análisis de varianza (ANDEVA) con una comparación de medias, empleando la prueba de Tukey con el software STATISTICA 10. Las cápsulas tuvieron un contenido de humedad de 78.7 a 92.43%, la cual disminuyó a los 28 días teniendo como efecto la disminución del diámetro (4.58-3.93 mm) y logrando una mayor rapidez en su tiempo de liberación (33.51 a 37.53 min). En los parámetros de color, las muestras encapsuladas no presentaron cambios de color durante las cuatro semanas de almacenamiento, sin embargo las muestras del polvo y el extracto tuvieron tonalidades más oscuras, lo cual significa que las cápsulas lograron conservar su color durante el almacenamiento. Se considera que la cápsula 6 (100 mL E-2.5g AS) fue el mejor tratamiento que se obtuvo en la encapsulación de extractos hidroalcohólicos de semilla de *Moringa oleifera*, ya que fue la que logró conservar un mayor contenido de polifenoles (125.13 a 14.85 mg EAG/g extracto) y flavonoides totales (22.31 a 6.87 mg EQ/g extracto) durante las 4 semanas de

almacenamiento, así como también logró conservar más del 85% del porcentaje de inhibición antioxidante DPPH* (31.29-14.25%) y ABTS* (36.78-16.15%) durante las 4 semanas del almacenamiento. En base a los resultados obtenidos de la actividad antioxidante DPPH* y ABTS*, se calculó la concentración inhibitoria media del extracto y de la cápsula 6 durante el tiempo inicial y final del almacenamiento, de la cual se obtuvieron valores de 1.47 a 18.97 mg de extracto/mL en el extracto de semilla de *Moringa oleifera*, por otro lado la cápsula obtuvo mejores resultados teniendo una concentración inhibitoria media de 1.84 a 4.88 mg de extracto/mL durante el tiempo inicial y final del almacenamiento, lo cual es favorable, ya que a diferencia del extracto, la cápsula logró conservar un mayor potencial antioxidante, demostrando que la encapsulación por gelificación iónica puede llegar a ser una alternativa en la conservación del extracto hidroalcohólico de semilla de *Moringa oleifera*.

ABSTRACT

Rivera-Abascal Iván. Master in food science. National Technological Institute of México/Technological Institute of Tuxtepec. November, 2022. **ENCAPSULATION OF HYDROALCOHOLIC EXTRACTS FROM *Moringa oleifera* SEEDS BY IONIC GELATION**. Advisor: Dr. Cecilia Eugenia Martínez-Sánchez, Co-advisor: Dr. Ivet Gallegos-Marín

The objective of this project was to obtain the best conditions for the encapsulation of hydroalcoholic extracts from *Moringa oleifera* seeds by ionic gelation. The raw material was *Moringa oleifera* seed powder, from which the hydroalcoholic extract was obtained (70 mL ethanol/30 mL water) with a 1/18 P/V ratio. Subsequently, the extraction of bioactive compounds was performed by ultrasound-assisted extraction (30 min, 80 kHz and 30 °C). A complete factorial treatment design was carried out using the Design-Expert 7.0 software, with morphology (size), bioactive compounds content (total polyphenols and total flavonoids content), encapsulation efficiency, and antioxidant activity as response variables. DPPH* and ABTS*) and as independent variables the mixture at different proportions of the *Moringa oleifera* seed extract (50, 75, 100 mL) with sodium alginate (SA) (2, 2.5 and 3 g) and xanthan gum (0.5 g). The encapsulation was carried out by the ionic gelation method using extrusion. The capsules were stored for 4 weeks (28 days) at 8 °C under the same conditions as the extract. The results obtained were statistically analyzed by an analysis of variance (ANOVA) with a comparison of means, using the Tukey test with STATISTICA 10 software.

The capsules had a moisture content of 78.7 to 92.43%, which decreased after 28 days, having the effect of reducing the diameter (4.58-3.93 mm) and achieving a faster release time (33.51 to 37.53 min). In color parameters, the encapsulated samples did not show color changes during the four weeks of storage, however the powder and extract samples had darker shades, which means that the capsules managed to retain their color during storage. It is considered that capsule 6 (100 mL E-2.5g SA) was the best treatment obtained in the encapsulation of hydroalcoholic extracts from *Moringa oleifera* seed, since it was the one that managed to preserve a higher content of polyphenols (125.13 to 14.85 mg EAG/g extract) and total flavonoids (22.31 to 6.87 mg EQ/g extract) during the 4 weeks of storage, as well as

preserving more than 85% of the percentage of antioxidant inhibition DPPH* (31.29-14.25%) and ABTS * (36.78-16.15%) during the 4 weeks of storage.

Based on the results obtained in the DPPH* and ABTS* antioxidant activity, the mean inhibitory concentration of the extract and capsule 6 was calculated during the initial and final storage time, from which values from 1.47 to 18.97 mg were obtained. extract/mL in the seed extract of *Moringa oleifera*, on the other hand the capsule obtained better results having an average inhibitory concentration of 1.84 to 4.88 mg of extract/mL during the initial and final storage time, which is favorable, since unlike the extract, the capsule managed to preserve a greater antioxidant potential, demonstrating that encapsulation by ionic gelation can become an alternative in the conservation of the hydroalcoholic extract of *Moringa oleifera* seed.

CONTENIDO

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	viii
CONTENIDO	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Generalidades de la Moringa	3
2.2. Descripción morfológica	3
2.3. Usos de la moringa	4
2.3.1. Gastronomía	4
2.3.2. Aceite	4
2.3.3. Purificación de agua.....	5
2.3.4. Agricultura y Ganadería	5
2.4. Propiedades y usos medicinales de la moringa	5
2.4.1. Propiedades nutrimentales de la semilla de <i>Moringa oleifera</i>	6
2.4.2. Componentes presentes en la semilla de <i>Moringa oleifera</i>	7
2.5. Conservación de propiedades físicas y biológicas de sustancias químicas	8
2.5.1. Métodos de protección y/o conservación de alimentos.....	8
2.6. Técnicas de encapsulación	9
2.7. Encapsulación.....	10
2.8. Encapsulación por extrusión	10
2.9. Gelificación iónica	11
2.10. Encapsulación con alginato de sodio	12
III. ANTECEDENTES	12
IV. JUSTIFICACIÓN	15
V. OBJETIVO GENERAL	16
5.1. Objetivos específicos	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1. Obtención de la materia prima	17

6.2.	Obtención del polvo de semilla de <i>Moringa oleifera</i>	17
6.3.	Análisis químico proximal del polvo de semilla de <i>Moringa oleifera</i>	17
6.4.	Extracción asistida por ultrasonido de los compuestos bioactivos	17
6.5.	Diseño de tratamientos.....	18
6.6.	Preparación de las muestras a encapsular	19
6.7.	Formación de las cápsulas por gelificación iónica.....	19
6.8.	Análisis de la muestra del encapsulado de extracto de semillas de moringa	19
6.8.1.	Caracterización morfológica y diámetro de las cápsulas	19
6.8.2.	Contenido de humedad	19
6.8.3.	Evaluación de la liberación de las cápsulas mediante la simulación del proceso gástrico	20
6.9.	Determinación de los compuestos bioactivos a las cápsulas de extracto de semillas de <i>Moringa oleifera</i>	20
6.10.	Actividad antioxidante	21
6.11.	Análisis Estadístico.....	23
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
VIII.	CONCLUSIONES.....	37
IX.	RECOMENDACIONES.....	39
X.	REFERENCIAS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico tomadas con diferentes magnitudes (5x, 10x y 40x).....	26
Figura 2. Imágenes obtenidas mediante un microscopio digital de la marca Ryscom-Amszoom observadas a una magnitud de 10x.....	27
Figura 3. Resultados obtenidos del análisis del contenido de polifenoles totales en extracto y cápsulas de semilla de <i>Moringa oleifera</i>	30
Figura 4. Resultados obtenidos del análisis de contenido de flavonoides totales en extracto y cápsulas de semilla de <i>Moringa oleifera</i>	31
Figura 5. Capacidad antioxidante, % de inhibición de radical DPPH* en extracto y cápsula de semilla de <i>Moringa oleifera</i> analizadas durante el almacenamiento.....	34
Figura 6. Capacidad antioxidante, % de inhibición de radical ABTS* en extracto y cápsula de semilla de <i>Moringa oleifera</i> analizadas durante el almacenamiento.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Información nutricional de la semilla de moringa.....	7
Tabla 2. Diseño de tratamientos.....	18
Tabla 3. Rendimiento del polvo de semillas de <i>Moringa oleifera</i>	24
Tabla 4. Resultados obtenidos en el contenido de humedad, diámetro y el tiempo de liberación de las cápsulas al inicio y a los 28 días.....	25
Tabla 5. Resultados de color de las cápsulas de extracto de semilla de <i>Moringa oleifera</i> analizadas al inicio y al final del almacenamiento.....	28
Tabla 6. Eficiencia de encapsulación del contenido de polifenoles y flavonoides totales de las cápsulas de extracto semilla de <i>Moringa oleifera</i>	32
Tabla 7. IC50 del radical DPPH* y ABTS* del extracto de semilla de <i>Moringa oleifera</i> y la cápsula 6 analizadas al inicio y al final del almacenamiento.....	35

I. INTRODUCCIÓN

La Moringa es el único género dentro de la familia *Moringaceae*, la cual comprende 13 especies, las cuales son árboles de climas tropicales y subtropicales. La moringa es una especie de árbol originario del norte de la India, conocido popularmente como árbol de la vida, árbol generoso, árbol milagroso y árbol de la esperanza. Crece en casi cualquier tipo de suelo, incluso en condiciones de elevada aridez estacional, lo que hace de esta planta un recurso para las poblaciones que habitan en estos lugares. La *Moringa oleifera* es una de las especies más conocidas y de mayor interés en la familia Moringaceae, debido a su importancia biológica es considerada como una planta medicinal, posee un elevado contenido de vitaminas (A, C, complejo B) y minerales (Ca, Fe, Mg), también posee un alto contenido de polifenoles, y flavonoides, los cuales le proporcionan propiedades bioactivas como anticancerígena, antioxidante, hipoglucémica, y antiinflamatoria.

Las vainas verdes, las hojas, las flores, las semillas y las raíces, ofrecen una amplia variedad de productos alimenticios ya que todas estas partes de la planta son comestibles. La semilla de moringa es rica en vitaminas, minerales, compuestos bioactivos, como aminoácidos esenciales y flavonoides que reducen el riesgo de cáncer por su actividad antioxidante. Las semillas son de las partes más importantes de esta planta, ya que contienen 19 de los 22 aminoácidos, incluyendo a los 9 aminoácidos esenciales que nuestro cuerpo no puede producir por sí mismo.

La mayoría de las plantas pierden sus propiedades nutritivas cuando se procesan, un ejemplo claro es cuando se compara el contenido nutritivo de la harina de semilla de moringa cruda, germinada y fermentada. Se encontró que los compuestos fitoquímicos eran más altos en la harina de semilla cruda, y el contenido de aminoácidos estaba en su punto máximo que en las harinas de semillas fermentadas y germinadas. Esto es el resultado de reacciones bioquímicas que ocurren durante la germinación y la actividad microbiana en la fermentación. Por lo cual es necesario la conservación y la protección de los compuestos bioactivos para que así tengan una alta estabilidad en el almacenamiento.

La encapsulación es un método utilizado en la protección y conservación de biomoléculas de alto valor alimentario y farmacéutico. En este proceso las sustancias bioactivas de los

alimentos se introducen en la matriz para impedir que se pierdan, así como protegerlas de la reacción con otros compuestos o bien, frenar las reacciones de oxidación a causa de la luz o el oxígeno. También se ha utilizado para la liberación sostenida o controlada de fármacos, sabores, aromas, perfumes, fertilizantes y otros.

La encapsulación fue realizada por el método de gelificación iónica utilizando alginato de sodio como principal agente encapsulante. El alginato es un polisacárido aniónico que proviene de las paredes celulares de las algas marinas pardas, el cual ha sido utilizado como agente encapsulante debido a su matriz biodegradable, no tóxica y resistente que protege a éstos de las condiciones adversas del entorno, enmascara sabores y olores y, mejora su estabilidad y biodisponibilidad. El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ion calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica, como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel.

La encapsulación de un alimento por gelificación iónica utilizando alginato de sodio, ofrece una posibilidad de diversificar la presentación de un mismo alimento con los beneficios que ofrece la encapsulación, prolongando sus características ya sea sensoriales y también las nutricionales, además de que protege el material activo de la degradación producida por el medio ambiente al cual es sometido ya sea directa o indirectamente como por ejemplo el calor, aire, luz y la humedad. Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue obtener las mejores condiciones para la encapsulación de extractos hidroalcohólicos de semilla de *Moringa oleifera* mediante gelificación iónica.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de la Moringa

La moringa es el único género de la familia *Moringaceae*. Este comprende 13 especies, las cuales son árboles de climas tropicales y subtropicales; la especie más popular es la *Moringa oleifera*.

La moringa es una especie de árbol originario del norte de la India, se conoce como árbol de la vida, árbol generoso, árbol milagroso, árbol de la esperanza. Crece en casi cualquier tipo de suelo, incluso en condiciones de elevada aridez estacional, lo que hace de esta planta un recurso para las poblaciones que habitan en estos lugares. Se ha extendido a otras partes de India, Bangladesh, Afganistán, Pakistán, Sri Lanka, sudeste asiático, Asia Occidental, Península Arábiga, África del Este y del Oeste, sur de la Florida, Caribe, Centroamérica y gran parte de América del Sur.

En América tropical se cultiva generalmente como planta ornamental, se cree que fue llevada de la India a África por los ingleses e introducida al Caribe por los franceses y de allí a Centroamérica (Medisan, 2012).

Se cultiva en muchos países tropicales para la alimentación humana y animal, en la que se obtienen buenos resultados en la producción avícola, porcina, ovina, caprina, de carnes, huevos y leche, así como para su uso como medicamento y para la purificación del agua. Posee un alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales y ofrece una amplia variedad de productos alimenticios ya que todas las partes de la planta son comestibles: las vainas verdes, las hojas, las flores, las semillas y las raíces.

2.2. Descripción morfológica

Es un árbol caducifolio, presenta rápido crecimiento, unos 3 m en su primer año pudiendo llegar a 5 m en condiciones ideales; adulto llega a los 10 o 12 m de altura máxima.

Tiene ramas colgantes quebradizas, con corteza suberosa, hojas color verde claro, compuestas, tripinnadas, de 30 a 60 cm de largo, con muchos folíolos pequeños de 1.3 a 2

cm de largo por 0.6 a 0.3 cm de ancho. Florece a los siete meses de su plantación. Las flores son fragantes, de color blanco o blanco crema, de 2.5 cm de diámetro.

Produce vainas colgantes color marrón, triangulares, de 30 a 120 cm de largo por 1.8 cm de ancho, divididas longitudinalmente en 3 partes cuando se secan; cada una contiene aproximadamente veinte semillas incrustadas en la médula. Semillas de color marrón oscuro, con tres alas. Su rusticidad lo hace muy fácil de cultivar (Duke-James, 1987).

2.3. Usos de la moringa

2.3.1. Gastronomía

El sabor de la moringa es agradable y sus partes se pueden comer crudas, especialmente las hojas y flores (que son de color crema y aparecen principalmente en épocas de sequía, cuando el árbol suele perder las hojas) o cocidas de varias formas (por ejemplo en guisos). Las flores son ricas en carbohidratos y tienen un buen sabor.

Las hojas pueden usarse para hacer jugos y tienen un gusto suavemente picante (una mezcla entre berro y rabanito). Además da fruto en forma de vainas que, estando verdes, se pueden cocer y tienen gusto parecido a las judías o chauchas, cuando están maduras se hierven con un poco de sal, se abren y se extraen las semillas ya listas para consumir, de sabor parecido al garbanzo y también se pueden tostar. Sin embargo su sabor amargo puede permanecer tiempo después del consumo. Las raíces son comestibles, parecen zanahorias pero de gusto picante.

2.3.2. Aceite

El aceite extraído de sus semillas tiene muchas aplicaciones. Más de la tercera parte del contenido de las semillas es aceite de alta calidad, rico en ácidos grasos insaturados.

Se puede utilizar en la preparación de ensaladas y como combustible para lámparas. También se cultiva como un importante recurso para fabricar biodiésel de calidad. El cultivo tiene un rendimiento de 2.500 kg/hectárea, produciendo casi 1.500 L de aceite y más de 1.400 L de

biodiésel/hectárea, lo que ha llevado a que su cultivo se investigue en varios lugares del mundo.

2.3.3. Purificación de agua

Las vainas y semillas son útiles para purificación del agua. Contienen un polielectrolito catiónico que ha demostrado su eficacia en el tratamiento del agua para consumo humano (eliminación de turbidez), en sustitución del sulfato de aluminio o de otros floculantes, (Narasiah *et al* 1995). Las semillas de moringa contienen proteínas catiónicas diméricas que absorben y neutralizan las cargas coloidales en agua turbia, haciendo que las partículas coloidales se agrupen, y facilitando su eliminación mediante decantación o filtrado. La ventaja de usar estas semillas es doble: sustituye productos importados por uno local de fácil acceso y, a diferencia del sulfato de aluminio, es completamente biodegradable.

2.3.4. Agricultura y Ganadería

En agricultura, las hojas son útiles como abono y como fungicida contra los hongos que atacan las raíces. Sirve como forraje con una larga lista de características benéficas, ya que sirve tanto para ganado vacuno, porcino, ovino, caprino u avícola, entre otros, en los que genera importantes incrementos en el rendimiento, tanto de ganancia de peso como de producción de leche.

Su madera sirve como leña y para hacer carbón o celulosa para papel de gran calidad.

2.4. Propiedades y usos medicinales de la moringa

- **Raíz:** Antilitiásico, rubefaciente, vesicante, carminativo, para la fertilidad, antiinflamatorio, para estimular a pacientes en estado paralítico; también actúa como tónico cardiocirculatorio, como laxante, como método abortivo y se emplea para aliviar algunas afecciones: reumatismo, inflamaciones, dolores articulares y estreñimiento.

- **Hojas:** Pueden utilizarse como purgante, como cataplasma en las heridas, para minimizar los dolores de cabeza (frotarlas en la sien), las hemorroides, la fiebre, el dolor de garganta, la bronquitis, las infecciones óticas y oculares, el escorbuto y el catarro; el jugo de las hojas controla los niveles de glucosa y reduce la inflamación glandular.
- **Corteza del tallo:** Como rubefaciente, vesicante, para curar enfermedades oculares y para el tratamiento de pacientes delirantes. Asimismo, previene el agrandamiento del bazo y la formación de glándulas tuberculosas en el cuello, destruye los tumores y sana las úlceras. El jugo de la corteza del tallo alivia los dolores de oídos, se pone en la cavidad dentaria como analgésico y tiene actividad antituberculosa.
- **Goma o resina:** Se emplea para corregir las caries dentales, es astringente y rubefaciente; mezclada con el aceite de ajonjolí, alivia el dolor de cabeza, la fiebre, las molestias intestinales, la disentería y el asma.

Muchas veces se utiliza como abortivo y para tratar a pacientes con sífilis y afecciones reumáticas

- **Flores:** Poseen alto valor medicinal como estimulante, afrodisíaco, abortivo, colagogo y antiinflamatorio. Se emplean para aliviar enfermedades musculares, histeria, tumores, agrandamiento del bazo, para bajar los valores del colesterol, los fosfolípidos, los triglicéridos y el índice aterogénico; también disminuye el perfil lipídico del hígado, del corazón y de la aorta en conejos hipercolesterolémicos y aumenta la excreción de colesterol fecal.
- **Semillas:** El extracto de las semillas ejerce su efecto protector, disminuye los peróxidos lipídicos del hígado.

2.4.1. Propiedades nutrimentales de la semilla de *Moringa oleifera*

El contenido nutricional de las semillas de moringa renueva la energía, mejora la calidad del sueño, la presión sanguínea y equilibra los niveles de glucemia, fortalece el pelo y da firmeza a la piel. En un estudio se investigó el efecto anticancerígeno de las hojas, la corteza y los extractos de semillas de *Moringa oleifera*. Los extractos de hojas y corteza mostraron propiedades anticancerígenas notables, especialmente para cáncer de pecho y colon, mientras que, sorpresivamente, los extractos de semillas no exhibieron ninguna de tales propiedades (Alfaro *et al.*, 2018).

2.4.2. Componentes presentes en la semilla de *Moringa oleifera*

La semilla de moringa es rica en vitaminas, minerales, compuestos bioactivos, como aminoácidos esenciales y flavonoides que reducen el riesgo de cáncer por su actividad antioxidante. En la tabla se presenta la información nutricional en 140 g de semilla de moringa.

Tabla 1. Información nutricional de la semilla de moringa.

Información nutricional	
Tamaño de la porción: 140g	
Calorías: 37	
	% Valores diarios*
Carbohidratos	8.5 g
Proteínas	2 g
Grasa	1 g
Vitamina C	235%
Hierro	350%
Potasio	13%
Magnesio	28%
Calcio	3%

Las semillas de moringa también contienen 19 de los 22 aminoácidos, incluyendo a los 9 aminoácidos esenciales que el cuerpo humano no puede producir por sí mismo. Esta característica es similar a otras semillas ya conocidas como “nutritivas” como la semilla de girasol y la de chía.

La mayoría de las plantas pierden sus propiedades nutritivas cuando se procesan. Un ejemplo claro es cuando se compara el contenido nutritivo de la harina de semilla de moringa cruda, germinada y fermentada, se encontró que los compuestos fitoquímicos eran más altos en la harina de semilla cruda, y el contenido de aminoácidos estaba en su punto máximo que en las harinas de semillas fermentadas y germinadas. Esto es el resultado de reacciones bioquímicas que ocurren durante la germinación y la actividad microbiana en la fermentación. Por lo cual es necesario la conservación y la protección de los compuestos bioactivos y así tengan una alta estabilidad en el almacenamiento.

2.5. Conservación de propiedades físicas y biológicas de sustancias químicas

Se sabe que muchos alimentos, tales como jugos, zumos de frutas, vegetales y compuestos farmacológicos, fácilmente pierden su actividad biológica por oxidación, cuando se exponen al ambiente. Esta situación sugiere la necesidad de aplicar técnicas que impidan esta degradación o reducir los efectos del envejecimiento de las células.

La actividad biológica de estos compuestos es de muy corto plazo, debido a la rápida oxidación en condiciones ambientales y a la degradación durante el procesamiento de los alimentos, sucediendo una pérdida total o parcial de los mismos, ocasionando la pérdida de sus propiedades funcionales y limitando su aplicación para productos de consumo humano.

2.5.1. Métodos de protección y/o conservación de alimentos

- **Congelación:** La congelación permite conservar los alimentos por largos periodos de tiempo. Gracias a las bajas temperaturas (inferiores a 24 °C bajo cero) se detiene la actividad bacteriológica y enzimática que descompone los alimentos.
Para obtener buenos resultados, además de garantizar la inocuidad y la calidad de los alimentos este proceso debe hacerse de forma rápida y a muy bajas temperaturas.
- **Liofilización:** Es un proceso de deshidratación usado generalmente para conservar un alimento percedero o hacer el material más conveniente para el transporte.

La liofilización funciona congelando el material y luego reduciendo la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa, sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

- **Alta presión hidrostática (APH):** Es un tratamiento no térmico para la conservación de alimentos, que permite mejorar la seguridad microbiana de los productos sin que se produzca la pérdida de nutrientes, se generen compuestos potencialmente nocivos o se alteren las características sensoriales del alimento. El tratamiento APH consiste en someter al alimento, previamente sellado en su envase final flexible, a altos niveles de presión de forma homogénea durante unos segundos a minutos. Las muestras se introducen en una cámara de acero, que se rellena con un fluido de proceso, en la que se aumenta la presión mediante el bombeo del fluido de proceso con bombas e intensificadores de presión. Una vez alcanzada la presión deseada, se mantiene la cámara presurizada el tiempo necesario para realizar el tratamiento y posteriormente se vacía la cámara para extraer los alimentos tratados.
- **Encapsulación:** La encapsulación es un proceso mediante el cual sustancias bioactivas de los alimentos se introducen en una matriz para impedir que se pierdan, para protegerlas de la reacción con otros compuestos o para frenar reacciones de oxidación a causa de la luz o del oxígeno. La encapsulación constituye un medio de envasar, separar y almacenar materiales para su posterior liberación bajo condiciones controladas. Dentro de la industria alimentaria, esta tecnología aporta productos con mejores características sensoriales y nutricionales.

2.6. Técnicas de encapsulación

Existen varias técnicas para la preparación de microcápsulas, tales como: secado por aspersión, extrusión y recubrimiento por aspersión, coacervación, atrapamiento en

liposomas, polimerización interfacial e inclusión molecular. El uso de cada una de las distintas técnicas depende del tamaño de las partículas que se requieren producir, las propiedades de la sustancia encapsulante y también de la sustancia biológicamente activa a encapsular.

2.7. Encapsulación

La técnica de encapsulación ha sido descrita como un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo integrado a las cápsulas con variadas aplicaciones (Borgogna, *et al.*, 2010). Una definición general de encapsulación dada por Desai y Park (2005) se refiere al empaquetado de materiales sólidos, líquidos o gaseosos mediante cápsulas que liberan su contenido de forma controlada bajo condiciones determinadas.

Estas especificaciones han llevado a describir la encapsulación como la técnica de obtención de una barrera que retarda la interacción de un determinado producto con el medio que lo rodea promoviendo un aumento en la vida útil del mismo, la liberación gradual del compuesto encapsulado e incluso facilitando su manipulación al convertir un material líquido o gaseoso a una forma sólida llamada cápsula, microcápsula, nanocápsula, entre otras dependiendo de su tamaño. (Fangy Bhandari, 2010).

Una cápsula consiste en una membrana semipermeable, delgada y fuerte que rodea un núcleo sólido o líquido. El núcleo que compone la cápsula es también denominado fase interna o principio activo, así como la membrana se puede denominar capa externa o matriz. Se definen como microcápsulas aquellas con un diámetro que varía de pocos micrones a 1000 μm . En este sentido, las micropartículas, microcápsulas o microesferas son definidas como el producto del proceso de microencapsulación dependiendo de cuál sea su morfología y estructura interna (Singh, 2007; Saez *et al.*, 2007).

2.8. Encapsulación por extrusión

Esta técnica consiste en la formación de gotas de la solución de alginato que contiene el componente a encapsular al hacer pasar dicha solución por un dispositivo extrusor de tamaño

y velocidad de goteo controlado. Estas gotas caen sobre un baño que contiene la fuente del ion divalente, quien induce la gelificación mediante el mecanismo de gelificación externa (Chan *et al.*, 2009). La principal limitación presentada por esta técnica es el gran tamaño de las cápsulas o esferas formadas, comparado con aquél obtenido por emulsificación, y que depende fundamentalmente del diámetro de la boquilla del dispositivo extrusor, además existe, la dificultad de producción a gran escala debido a que la formación de las cápsulas se logra una a una o de pocas en pocas lo cual trae como consecuencia largos tiempos de gelificación (Mofidi *et al.*, 2000). Adicionalmente, hay que considerar aspectos que influyen en la forma esférica y tamaño de las esferas, como la distancia de separación de la boquilla al baño, el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución que induce la gelificación (Chan *et al.*, 2009). A pesar de todos estos factores, la técnica de encapsulación por extrusión ha sido empleada tradicionalmente al permitir la producción de cápsulas o esferas con tamaños uniformes, empleando desde una simple jeringa hasta dispositivos extrusores más sofisticados. Recientes estudios demuestran que la aplicación de esta técnica mejora notablemente al incorporar dispositivos extrusores como boquillas múltiples y discos aspersores (Champagne *et al.*, 2000), inyectores con impulsos vibratorios (Dohnal y Stepánek, 2010) e incluso con flujo de aire incorporado (Mark *et al.*, 2009), todos diseñados con el mismo objetivo, la producción masiva de cápsulas.

2.9. Gelificación iónica

La gelificación iónica es una técnica de encapsulación que permite obtener como resultado cápsulas con diámetros mayores a 1000 μm , mediante el método de extrusión manual. Para llevar a cabo la gelificación son necesarios materiales de recubrimiento o de pared, los cuales pueden ser gomas, carbohidratos, celulosas, lípidos, proteínas y también materiales inorgánicos, además de una solución reticulante o receptora que, por lo general, son iones de calcio (cloruro de calcio). La gelificación iónica consiste principalmente en producir pequeñas gotas de solución a partir de la mezcla del material de recubrimiento y el compuesto que se desea encapsular o recubrir. El material de recubrimiento o de pared que comúnmente es utilizado en este método es el alginato de sodio, debido a que es un polímero de fácil acceso, baja viscosidad y alta reactividad con los iones calcio. Esta solución se fuerza a través de boquillas generando gotas, y éstas caen en un baño de iones calcio formando así una

cápsula de gel que dependiendo de la concentración utilizada de alginato de sodio puede llegar a ser fuerte, suave o elástico. Este mecanismo se denomina gelificación externa y es de las más comunes y fáciles de utilizar para ambos tipos de compuestos, solubles e insolubles.

2.10. Encapsulación con alginato de sodio

La encapsulación de principios activos puede realizarse por diferentes técnicas. La selección de la técnica de encapsulación adecuada se ve determinada por las propiedades físicoquímicas del material soporte y la aplicación final deseada con el objetivo de asegurar la biodisponibilidad de los compuestos, su funcionalidad e incluso su incorporación en los alimentos sin la alteración de sus propiedades sensoriales (Pal, *et al.*, 2009). Al emplear el alginato como matriz polimérica, las técnicas de encapsulación en aplicaciones alimentarias se reducen a: emulsión, extrusión y secado por atomización. Considerando, que las técnicas empleadas en este estudio han sido emulsión y por extrusión, se realiza en este apartado una explicación ampliada de ambas.

III. ANTECEDENTES

Pérez-Tejas *et al.* (2020). Evaluaron la actividad hipoglucemiante de extractos hidroalcohólicos de semilla de *Moringa oleifera* en un modelo murino. La extracción de los compuestos se realizó mediante un diseño de experimentos central compuesto, con 3 variables independientes: amplitud 30-70 (%), proporción del disolvente 30-70 (EtOH/Agua) y tiempo de ultrasonidos 10-25 (min), las variables de respuesta fueron: contenido de polifenoles totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC), actividad antioxidante por DPPH* (2,2- difenil-1 picrilhidracilo) y ABTS* [2,2-azinobis-(3-etilbezotiazolin-6-sulfonico)]. Posteriormente, se realizó una optimización numérica para encontrar las mejores

condiciones de extracción buscando un mayor rendimiento en el contenido de polifenoles totales. Los resultados indicaron que en el grupo de experimentación que recibió la administración oral de los extractos hidroalcohólicos de semilla de Moringa en la concentración de 75 mg/kg de peso corporal hubo un mayor efecto superior al 65% de inhibición de la diabetes en el día 12 del experimento, los autores consideraron que a mayor concentración de extractos hidroalcohólicos de *Moringa oleifera* se presenta mayor efecto en la actividad hipoglucemiante esto se debe posiblemente a la presencia de compuestos como el tiocarbamato, isotiocianato fenilglucósido y los compuestos fenólicos. los cuales presentan actividad hipoglucemiante previamente documentada.

Linares et al. (2018). Investigaron cuatro distintos métodos de extracción, a partir de la *Moringa oleifera*, con la finalidad de obtener extractos foliares etanólicos crudos, con altos rendimientos de extracción y compuestos fenólicos. Determinaron la influencia de la extracción por agitación magnética, extracción estática, extracción por Soxhlet y extracción asistida por ultrasonido en el rendimiento del extracto crudo etanólico foliar y la concentración de compuestos fenólicos. También realizaron la caracterización fitoquímica del extracto y evaluaron el perfil cromatográfico mediante una cromatografía de capa fina. Los resultados mostraron que hubo un rendimiento de 185.89 mg g⁻¹ de masa seca y las mayores concentraciones de fenoles en el extracto (24.86 mg g⁻¹ de masa seca) con el método de extracción con agitación magnética. También observaron que en la caracterización química cualitativa del extracto fenólico de *M. oleifera* se comprobó la presencia de cumarinas volátiles, triterpenos, esteroides, flavonoides, taninos y compuestos fenólicos detectados en el análisis fitoquímico y de ácidos fenólicos, flavonoides glicosilados, aceites esenciales asociados a fenoles y compuestos con principio de picor y amargor en la cromatografía en capa fina. Los autores reportaron que mediante el método de extracción con agitación magnética por 3 h, se obtienen extractos foliares etanólicos crudos de *M. oleifera* con altos rendimientos de extracción y con una concentración de compuestos fenólicos de variada naturaleza.

Premi y Sharma, (2017). Evaluaron el efecto de diferentes combinaciones de agentes portadores como la maltodextrina, goma arábica y el concentrado de proteína de suero, en las propiedades de emulsión, eficiencia de encapsulación y la estabilidad oxidativa del polvo de aceite de la vaina de moringa encapsulada por secado por aspersión, con una presión de aire de 0.06 MPa y la velocidad de flujo de aire a 73 m³/h utilizando temperatura de entrada y de salida de 180 °C a 85 °C, respectivamente. Las características se estudiaron en términos de estabilidad de la emulsión, tamaño de gota y viscosidad. Los resultados mostraron que la estabilidad de las emulsiones de la maltodextrina y goma arábica fue cinéticamente estable después de las 24 h de homogeneización, mientras que las emulsiones preparadas a partir de maltodextrina y el concentrado de proteína de suero muestran la formación de espuma, aunque estos tienen buena propiedad emulsionante. También observaron propiedades de flujo medio y mejor estabilidad oxidativa con las microcápsulas obtenidas con maltodextrina y goma arábica. En el caso de la microestructura, no mostró grietas, es decir, con pared continua. Los autores reportaron que debido a que se mantuvo estable a 45 °C, se confirma el efecto protector de este agente transportador al encapsular el aceite de la vaina de *Moringa oleifera*.

Rodríguez-Pérez et al., (2016). Evaluaron el efecto de un multi-compuesto polimérico que utilizaron para la encapsulación del *Lactobacillus reuteri* con un extracto de concentrado de fibra de bagazo de carambola sobre la viabilidad de esta al ser sometido a condiciones extremas temperaturas. La técnica de encapsulación utilizada fue mediante extrusión utilizando la combinación de alginato de sodio y goma xantana como material de pared y un recubrimiento de quitosano. A las cápsulas obtenidas le calcularon la eficiencia de encapsulación haciendo un cálculo entre la diferencia de la muestra encapsulada final con la inicial. Las cápsulas también fueron sometidas a altas temperaturas (70, 80, 90 °C) durante 10 y 15 min para posteriormente evaluar la viabilidad. Obtuvieron como resultados un 87.33% de eficiencia de encapsulación en las cápsulas de alginato de sodio, goma xantana y quitosano y una mayor eficiencia de encapsulación en las cápsulas que contenían el extracto de bagazo de carambola la cual fue del 95.09% lo cual indicó que esta combinación favoreció la encapsulación del *Lactobacillus reuteri* beneficiando la viabilidad de las cepas probióticas conforme a los días de almacenamiento.

IV. JUSTIFICACIÓN

La *Moringa oleifera*, es una planta medicinal que posee un elevado contenido de vitaminas y minerales como el hierro y la vitamina C, que sumado a otros compuestos como carotenoides, quercetina, polifenoles, ácido clorogénico, entre otros, le proporcionan propiedades bioactivas como antioxidante, hipoglucémico, antiinflamatorio, entre otras.

Lamentablemente estos compuestos se pierden al momento de ser extraídos debido a distintos factores como cambios en la temperatura, interacción con la luz solar o simplemente por el tiempo de almacenamiento, por lo cual en este proyecto se optó por la encapsulación mediante gelificación iónica, ya que es un método que se ha utilizado ampliamente en la protección y conservación de biomoléculas de alto valor e interés alimentario y farmacéutico. Además de ser un método novedoso el cual no implica el uso de equipos costosos ni el uso de tecnologías de difícil acceso. Es por ello que el propósito de este proyecto de investigación fue estudiar y evaluar la eficiencia de la encapsulación utilizando el alginato de sodio como material de pared a distintas concentraciones permitiendo mejorar la estabilidad operacional en el procesamiento de encapsulación de extractos hidroalcohólicos de Moringa. Así como también evaluar el contenido de flavonoides y polifenoles parcialmente cada semana durante el tiempo de almacenamiento el cual fue de 28 días y la actividad antioxidante.

En el presente trabajo se hizo un estudio detallado de la encapsulación de extractos hidroalcohólicos de la semilla de *Moringa oleifera* mediante gelificación iónica, para obtener las mejores condiciones que permitan conseguir un producto que además de conservar las propiedades bioactivas de la moringa, tenga una alta estabilidad en el almacenamiento.

V. OBJETIVO GENERAL

Obtener las mejores condiciones para la encapsulación de extractos hidroalcohólicos de semilla de *Moringa oleifera* mediante gelificación iónica.

5.1. Objetivos específicos

- Obtener un extracto hidroalcohólico de la harina de semilla de *Moringa oleifera*.
- Evaluar el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante en el extracto.
- Encapsular el extracto hidroalcohólico mediante gelificación iónica.
- Evaluar la eficiencia de encapsulación y sus características físicas.
- Evaluar la liberación de las cápsulas mediante la simulación del proceso gástrico.
- Determinar el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de los encapsulados.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Obtención de la materia prima

La materia prima fue cosechada y recolectada en el municipio de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. De la cual se obtuvieron los mejores frutos de *Moringa oleifera*, el cual consiste en una vaina seca que posteriormente se abrió con ayuda de unas pinzas para separar la semilla y la almendra. Los reactivos a utilizar fueron grado HPLC o superior adquiridos con diferentes proveedores.

6.2. Obtención del polvo de semilla de *Moringa oleifera*

Las semillas que fueron seleccionadas se secaron a 60 °C en un horno (RIOSSA, E-41. México) durante 24 h para eliminar el contenido de humedad. Posteriormente se molieron utilizando un molino universal M20. El tamaño de partícula se ajustó a un tamiz de malla N° 80 (0.177 mm). Dicho polvo tamizado es el que se utilizó para obtener los extractos hidroalcohólicos.

6.3. Análisis químico proximal del polvo de semilla de *Moringa oleifera*

Se realizó la determinación por triplicado del análisis químico proximal del polvo de semilla de moringa siguiendo los métodos de la AOAC (2005): humedad (925.10); cenizas (942.05); proteína (960.52); y grasa (948,22). Fibra cruda se determinó por digestión ácido-alcalina (Tejada, 1992), y carbohidratos totales se determinó por diferencia.

6.4. Extracción asistida por ultrasonido de los compuestos bioactivos

La extracción se realizó asistida por ultrasonidos, con un tiempo de extracción de 30 min, a una frecuencia de 80 kHz/100% y a una temperatura de 30 °C. El solvente utilizado fue

etanol/ agua (70:30 mL), y la proporción del polvo y el solvente fue en relación 1:18 P/V. Posteriormente las mezclas obtenidas por ultrasonidos se filtraron al vacío para así eliminar el solvente alcohólico y dejar el extracto acuoso con ayuda de un rotaevaporador (Buchi Labortechnik, AG 9230, Flawil/Switzerland). Después de la rotaevaporación se continuó con la encapsulación.

6.5. Diseño de tratamientos

Se realizó un diseño experimental factorial completo para la obtención de las cápsulas por gelificación iónica, empleando el software DESING-EXPERT 7.0. Obteniendo como variables de respuesta la morfología (la estructura y el diámetro de las cápsulas), el contenido de compuestos bioactivos y la eficiencia del encapsulado. En la siguiente tabla se muestran los tratamientos a realizar con las distintas combinaciones de extracto de semilla *de Moringa oleifera*, alginato de sodio y goma xantana.

Tabla 2. Diseño de tratamientos

Tratamientos	Harina de semilla de <i>Moringa oleifera</i> (mL)	Alginato de sodio (g)	Goma Xantana (g)
1	50	2	0.5
2	75	2	0.5
3	100	2	0.5
4	50	2.5	0.5
5	75	2.5	0.5
6	100	2.5	0.5
7	50	3	0.5
8	75	3	0.5
9	100	3	0.5

6.6. Preparación de las muestras a encapsular

Las mezclas para encapsular se prepararon de acuerdo con el diseño de tratamientos mencionado anteriormente, donde se mezcló el extracto de semilla de *Moringa oleifera* con las distintas concentraciones de alginato de sodio y goma xantana. Se preparó utilizando un homogeneizador de alta velocidad (T18 Ultra-Turrax, IKA India Pvt., Ltd.) a 10,000 rpm durante 5 min.

6.7. Formación de las cápsulas por gelificación iónica

Para la obtención de las cápsulas se utilizó el método de gelificación iónica por goteo aplicando la extrusión, en donde se mantuvo cada una de las mezclas a encapsular en agitación constante durante 10 min. Posteriormente se realizó la extrusión con ayuda de una jeringa de 10 mL con una aguja de calibre 21Gx32 mm a una velocidad aproximada de 3.5 mL/min, dejando caer gota por gota en una solución de cloruro de calcio al 0.2 M, después se filtró al vacío y se almacenó bajo refrigeración a 4 °C.

6.8. Análisis de la muestra del encapsulado de extracto de semillas de moringa

6.8.1. Caracterización morfológica y diámetro de las cápsulas

La morfología se analizó mediante la obtención de las micrografías, utilizando un microscopio óptico (Axiostar plus) y un microscopio digital (Ryscom-Amszoom). Se observó a 5X, 10X, 40X. El diámetro de las cápsulas se midió con ayuda de un Vernier de la marca General-Ultratech Stainless Steel. Se tomó una muestra de 50 cápsulas al azar de cada tratamiento y se registró el diámetro de cada una.

6.8.2. Contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad se realizó por el método gravimétrico 925.10 (AOAC, 2012). Se pesó una cantidad de aproximadamente 5 g de muestra encapsulada en una balanza analítica, posteriormente las muestras fueron depositadas en charolas a peso constante en una estufa BINDER a 110 °C durante 24 h. La cuantificación se reportó como la diferencia entre el peso inicial y el final. Esta prueba fue realizada por triplicado.

6.8.3. Evaluación de la liberación de las cápsulas mediante la simulación del proceso gástrico

Se midió el tiempo de liberación de las cápsulas mediante la simulación del jugo gástrico, se prepararon soluciones de ácido clorhídrico ajustando el pH de 1 a 3, posteriormente se colocaron en un baño ultrasónico a 30 kHz/100% a una temperatura de 37 °C. Se midió el tiempo inicial y se realizó el conteo en minutos de cada tratamiento al momento de ser colocadas en el baño ultrasónico. Esta evaluación fue realizada en las cápsulas durante la semana inicial de ser elaboradas y finalmente a los 28 días (4 semanas) del almacenamiento.

6.8.4. Colorimetría

El color de las muestras encapsuladas se determinará mediante el uso de un colorímetro triestímulo Hunter lab (MiniScan Hunter Lab, modelo 45/0L, Hunter Associates Lab., Ind., Reston Virginia U.S.A). En donde se obtuvieron los valores L^* (claridad), a^* (cromaticidad rojo-verde) y b^* (cromaticidad amarillo-azul) a partir de los cuales se calcularon los valores de C^* (cromaticidad), h° (ángulo Hue) y ΔE (diferencia total de color).

6.9. Determinación de los compuestos bioactivos a las cápsulas de extracto de semillas de *Moringa oleifera*

6.7.1 Evaluación del contenido de polifenoles totales y flavonoides totales

6.7.1.1 Cuantificación de polifenoles totales (TPC)

El contenido de polifenoles totales en los extractos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu modificado por Singleton y Rossi (1965). Cada muestra se analizó por triplicado preparando un blanco de reactivos. Las muestras liofilizadas se disolvieron para tener una concentración entre 1-2.5 mg/mL. La curva de calibración se llevó a cabo con ácido gálico

con diferentes concentraciones: 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 y 0.05 mg/mL. Los resultados se reportaron como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto.

6.7.1.2 Cuantificación de Flavonoides totales (TFC)

El contenido de flavonoides totales se llevó a cabo por el método descrito por Liu & Zhu, 2002. A cada una de las muestras o estándares se adicionaron 1250 µL de agua desionizada, 75 µL de NaNO₂ al 5% y se dejaron reposar durante 6 min, posteriormente se adicionaron 150 µL de AlCl₃ al 10% y se dejó reposar durante 5 min. Después se adicionaron 500 µL de NaOH 1M y se completó la disolución a 2.5 mL con agua desionizada. Las muestras fueron leídas a 510 nm después de 30 min de incubación. La curva de calibración se preparó con quercetina como estándar a diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL). Los resultados se reportaron como mg equivalentes de quercetina/g de extracto.

6.7.1.3. Eficiencia de encapsulación (%)

La eficiencia de encapsulación fue calculada utilizando las siguientes ecuaciones, respectivamente para cada análisis y cada muestra:

$$\frac{\text{Contenido de polifenoles Extracto}}{\text{Contenido de polifenoles Cápsula}} \times 100\% \quad \text{ó} \quad \frac{\text{Contenido de flavonoides Extracto}}{\text{Contenido de flavonoides Cápsula}} \times 100\%$$

6.10. Actividad antioxidante

6.8.1 Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*)

Se pesaron 2.4 mg del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH*) y se aforó a 100 mL con metanol. Se prepararon las muestras tomando como inicio 10000 ppm; se hicieron diluciones a 5000, 2500, 1000, 500, 250, 50 y 25 ppm. Posteriormente en tubos eppendorf forrados con aluminio se adicionaron 975 µL de DPPH* y 25 µL de muestra, se dejaron reposar durante 15 min en total oscuridad. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EUA) a 515 nm (Braca *et al.*, 2002). La capacidad antirradicalaria fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\%DPPH^* = \frac{Ac - Am}{AC} \times 100$$

Donde:

%DPPH*: Actividad antirradicalaria

Ac: absorbancia control

Am: absorbancia de la muestra

6.9.2. Método del radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS*)

Se empleó el método descrito por Re *et al.* (1999); en el cual se pesaron 77.6 mg de reactivo ABTS* y se adicionaron 20 mL de agua destilada para obtener una concentración de 7 mM en solución acuosa. Posteriormente se pesaron 13.2 mg de persulfato de potasio (2.45 mM) y se hicieron reaccionar en un frasco ámbar con la solución de ABTS*. Se homogenizaron y cubrieron con papel aluminio; para incubarlas entre 12-16 h a temperatura ambiente y en total oscuridad, considerando que el radical permanece estable hasta por 2 días cuando se mantienen estas condiciones. La solución ABTS* se diluyó en etanol absoluto hasta obtener una absorbancia inicial de 0.7 ± 0.02 a 732 nm. Posteriormente se adicionó el radical ABTS* a las muestras en una relación 0.1:10 (v/v), teniendo la muestra a diferentes concentraciones (10000, 5000, 2500, 1000, 500, 250, 50 y 25 ppm). La capacidad antirradicalaria fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\%ABTS^* = \frac{Ac - Am}{AC} \times 100$$

Donde:

%ABTS*: Actividad antirradicalaria

Ac: absorbancia control

Am: absorbancia de la muestra

6.11. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en cada prueba fueron analizados estadísticamente por un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) con una comparación de medias empleando la prueba de Tukey para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de cada tratamiento utilizado con un nivel de confianza del 95%, empleando el software STATISTICA 10.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Rendimiento del polvo de semilla de *Moringa oleifera*

El resultado obtenido del rendimiento del polvo de semillas de *Moringa oleifera* se muestra en la tabla 3, estos resultados indican un rendimiento de 61.21% y una pérdida de 38.79%, esto se debe a que algunas semillas presentaban características de descomposición debido a su alto contenido de humedad, además de mostrar daño físico en su estructura externa. También se debe a las pérdidas que se pudo tener durante el proceso de molienda y tamizado de la semilla.

Tabla 3. Rendimiento del polvo de semillas de *Moringa oleifera*.

Materia Prima	Peso de semillas completas (kg)	Peso del almendro de la semilla (kg)	Peso del polvo obtenido (kg)	Rendimiento (%)
Semilla (<i>Moringa oleifera</i>)	4.81	3.52	2.94	61.21

7.2. Análisis Químico Proximal del polvo de semilla de *Moringa oleifera*

Los resultados mostraron que las semillas contenían un porcentaje de humedad de 4.97%. El contenido de proteína cruda (40.44%), fibra cruda (4.40%) y cenizas (5.35%) fue mayor al reportado por Pérez-Tejas en el 2020. Esto se debe principalmente a la materia prima utilizada, ya que los resultados pueden variar dependiendo del tipo de suelo de cultivo, de donde se obtuvieron los frutos, también depende de factores climatológicos de la región y de los cuidados que recibió el árbol, como la cantidad de agua recibida en el año de cosecha y los nutrientes que le fueron proporcionados. El contenido de grasas (44.28%) fue menor a lo reportado por Pérez-Tejas en el 2020. (46.27 a 48.89%), esto puede deberse al tiempo de exposición que tuvieron las semillas después de haber sido cosechadas y si tuvieron contacto directo con la luz solar, lo que pudo provocar una oxidación y degradación de los ácidos grasos que se encontraban presentes antes de ser estudiadas.

7.3. Parámetros físicos de las cápsulas

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en el contenido de humedad de las cápsulas, diámetro y el tiempo de liberación de las cápsulas analizadas durante dos distintos tiempos, es decir, al crear las cápsulas y 4 semanas después (aproximadamente 28 días).

Tabla 4. Resultados obtenidos en el contenido de humedad, diámetro y el tiempo de liberación de las cápsulas al inicio y a los 28 días.

Muestra	Humedad%		Diámetro (mm)		Liberación (min)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	84.36±1.19 ^{dA}	80.78±0.87 ^{cB}	3.34±0.29 ^{bA}	2.69±0.29 ^{bB}	36.43±0.92 ^{bA}	35.51±0.90 ^{bcB}
2	89.35±0.51 ^{bA}	82.12±0.32 ^{bB}	3.51±0.34 ^{abA}	2.86±0.43 ^{abB}	38.46±0.45 ^{aA}	37.53±0.4 ^{aB}
3	92.43±0.03 ^{aA}	85.39±1.14 ^{aB}	4.14±0.73 ^{abA}	3.49±0.21 ^{abB}	37.16±0.28 ^{abA}	36.49±0.26 ^{bB}
4	78.7±1.06 ^{eA}	71.42±0.64 ^{eB}	3.64±0.25 ^{abA}	2.99±0.65 ^{abB}	36.21±0.57 ^{bA}	35.41±0.59 ^{bcB}
5	85.34±1.72 ^{cdA}	79.72±1.24 ^{cB}	3.67±0.40 ^{abA}	3.02±0.23 ^{abB}	36.16±0.28 ^{bA}	35.53±0.36 ^{bcB}
6	87.65±0.55 ^{bcA}	83.31±0.92 ^{bB}	4.58±0.27 ^{aA}	3.93±0.09 ^{aB}	35.40±0.69 ^{cA}	34.48±0.74 ^{cB}
7	84.43±1.28 ^{dA}	77.99±1.28 ^{dB}	3.45±0.30 ^{abA}	2.81±0.17 ^{abB}	33.51±0.75 ^{dA}	32.50±0.72 ^{dB}
8	85.07±1.41 ^{cdA}	78.33±1.32 ^{dB}	4.05±0.16 ^{abA}	3.41±0.53 ^{abB}	35.33±0.15 ^{cA}	34.52±0.08 ^{cB}
9	86.71±0.24 ^{cdA}	80.44±0.44 ^{cB}	4.53±0.50 ^{aA}	3.88±0.49 ^{aB}	34.10±0.20 ^{cdA}	33.05±0.16 ^{cdB}

Los valores son la media ± desviación estándar (n = mínimo tres réplicas); los valores con letras minúsculas indican diferencia significativa (p<0.05) entre los distintos tratamientos. Letras diferentes en mayúsculas indican diferencia significativa (p<0.05) entre las muestras analizadas en distinto tiempo. M=Muestra

En el contenido de humedad se observa que todas las cápsulas elaboradas presentaron un contenido de humedad mayor al reportado por Salas en el 2020, el cual fue de 53.81%, esto se debe a que la muestra que se encapsuló fue un extracto en estado líquido, que al eliminar el 70% del solvente (etanol) quedó una solución acuosa, la cual correspondía al 30% (agua destilada) de esa solución hidroalcohólica. Las muestras que presentaron un mayor contenido de humedad fueron la 1, 2 y 3 (de 84.36 a 92.43%) ya que esas contenían en menor proporción las concentraciones de alginato de sodio (2 g). Todas las muestras presentan diferencias

significativas entre cada tratamiento, al igual que en el tiempo final, hubo disminuciones en el contenido de humedad, las cuales fueron significativas. En el tamaño de diámetro obtenido de las cápsulas, se muestran variaciones numéricas entre cada una de las muestras, sin embargo, no son estadísticamente significativas. En el tiempo final, hubo una disminución significativa, lo cual puede deberse a la pérdida de humedad que tuvieron las cápsulas durante los 28 días de almacenamiento. Uno de los principales factores que influyen en el tamaño de las cápsulas es la distancia de separación existente entre la jeringa y la solución receptora de cloruro de calcio, la viscosidad de la solución a encapsular y las concentraciones de alginato de sodio utilizadas. En la liberación de las cápsulas hubo mejores resultados en los tratamientos que contenían una mayor concentración de alginato de sodio, ya que los tiempos de liberación fueron más rápidos, los cuales iban de 33.51 a 34.10 min. Esto se debe a que el alginato de sodio se presenta más soluble en soluciones con un pH ácido, es decir que, a mayor concentración de alginato de sodio, mayor será la liberación de la cápsula.

7.4. Morfología y estructura

En la figura 1 se muestran las imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico a distintas magnitudes, se observa que el interior de la cápsula no presenta grietas o fisuras que pudieran

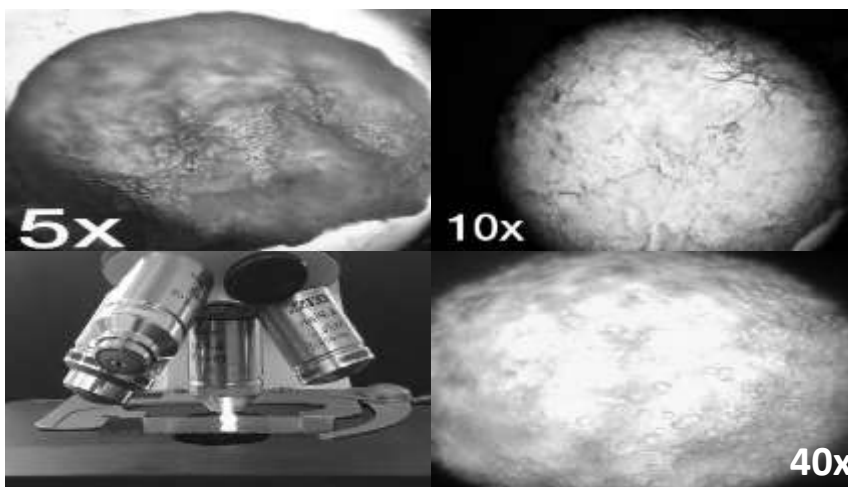


Figura 1. Imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico tomadas con diferentes magnitudes (5x, 10x y 40x).

afectar la calidad de las mismas. Las cápsulas con mayor contenido de alginato de sodio presentaron una estructura más rígida y compacta.



Figura 2. Imágenes obtenidas mediante un microscopio digital de la marca Ryscom-Amszoom observadas a una magnitud de 10x.

En la figura 2 se muestran las imágenes obtenidas con un microscopio digital, en donde se puede apreciar la estructura externa de la cápsula, la cual muestra una estructura esférica con una superficie lisa y homogénea. Las cápsulas con una menor concentración de alginato de sodio presentaron una estructura irregular y una superficie agrietada. Se considera que las cápsulas elaboradas con una concentración media de alginato de sodio (2.5 g) presentaron una estructura esférica (regular), lisa, sólida y con una mayor estabilidad, lo cual es característico de las cápsulas elaboradas con alginato de sodio.

7.5. Determinación de Color

Se realizó el análisis colorimétrico al extracto y a cada una de las cápsulas, para poder determinar las diferencias puntuales entre cada una de las muestras obtenidas y así comparar si existen cambios significativos entre el tiempo inicial y al final del almacenamiento. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos, en la cual se observa que en el extracto hubo cambios significativos entre el tiempo inicial y final en todos los parámetros analizados, ya

que el extracto contiene en su mayoría ácidos grasos, los cuales le dieron tonalidades más oscuras al final del almacenamiento y esto puede deberse a que se degradaron estos compuestos o hubo una reacción de oxidación como consecuencia del efecto de la luz a la cual pudo estar sometida durante las cuatro semanas de almacenamiento. Las cápsulas tuvieron variaciones numéricas durante el tiempo inicial y final, sin embargo, no fueron estadísticamente significativas. Esto da como resultado que la encapsulación con alginato de sodio logró proteger el extracto en todos sus atributos de color por un tiempo aproximado de 28 días, en donde no se presentaron cambios significativos en cada una de las cápsulas realizadas, lo cual indica que es un buen protector contra los efectos de luz que pudieran oxidar los ácidos grasos y degradar los compuestos bioactivos presentes en el extracto.

Tabla 5. Resultados de color de las cápsulas de extracto de semilla de *Moringa oleifera* analizadas al inicio y al final del almacenamiento.

M	L*		C*		h°		ΔE	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
E	36.34±0.11 ^{cA}	23.63±0.18 ^d B	3.84±0.20 ^{bA}	1.80±0.11 ^{cB}	0.25±0.02 ^{eA}	0.35±0.03 ^{ab} A	63.31±0.12 ^a B	75.77±0.18 ^{aA}
1	54.99±1.51 ^{bA}	54.84±1.33 ^b A	1.74±0.19 ^{cdA}	1.95±0.27 ^{cA}	1.36±0.06 ^{bA}	1.27±0.04 ^{ab} A	45.87±1.51 ^d eA	44.58±1.32 ^{cA}
2	49.32±0.52 ^{bA}	49.82±1.18 ^b cA	1.85±0.29 ^{cA}	1.85±0.01 ^{cA}	1.44±0.13 ^{aA}	1.45±0.10 ^{aA}	49.64±0.52 ^b cA	49.59±1.18 ^{bA}
3	50.67±0.08 ^{bA}	50.63±0.57 ^b A	1.81±0.03 ^{cA}	2.06±0.15 ^{bA}	1.41±0.02 ^{abA}	1.24±0.09 ^{ab} A	48.74±0.07 ^c A	48.79±0.56 ^{bA}
4	47.86±0.59 ^{bA}	50.34±1.04 ^b A	1.84±0.28 ^{cA}	1.88±0.17 ^{cA}	1.47±0.05 ^{aA}	1.46±0.22 ^{aA}	48.17±0.58 ^c A	46.08±1.04 ^{bc} A
5	47.66±0.09 ^{cA}	47.61±0.25 ^c A	1.54±0.06 ^{cdA}	1.46±0.23 ^{cA}	1.25±0.04 ^{cA}	1.23±0.07 ^{ab} A	51.52±0.09 ^b A	51.81±0.25 ^{bA}
6	43.09±3.29 ^{bcA}	43.85±0.46 ^b cA	1.34±0.35 ^{dA}	1.74±0.28 ^{cA}	1.21±0.23 ^{cA}	1.04±0.06 ^{cA}	53.48±3.29 ^b A	49.56±0.47 ^{bA}
7	53.56±0.79 ^{bA}	54.28±1.53 ^b A	1.76±0.25 ^{cdA}	1.44±0.37 ^{aA}	1.11±0.29 ^{bA}	1.06±0.34 ^{dA}	46.44±0.17 ^d A	46.07±1.43 ^{bc} A

8	52.07±0.51 ^{ba}	53.93±0.91 ^b A	1.43±0.21 ^{dA}	1.88±0.48 ^{cA}	1.31±0.09 ^{bcA}	0.98±0.21 ^{cA}	46.43±0.79 ^d A	45.49±0.92 ^{cA}
9	48.58±0.16 ^{ba}	48.59±3.31 ^c A	1.61±0.42 ^{cdA}	3.12±0.08 ^{abB}	0.88±0.39 ^{dA}	0.35±0.06 ^{cd} A	50.67±0.18 ^b cA	50.89±3.29 ^{ba}

Los valores son la media ± desviación estándar (n = mínimo tres réplicas); Letras diferentes en la misma fila indican valores significativamente diferentes (p<0.05) de acuerdo a la prueba de Tukey. M= Muestra, E=Extracto de semilla de *Moringa oleifera*.

Las cápsulas presentaron colores verde-amarillo, y tonalidades claras (blanco), en todos los tratamientos estudiados, estos atributos fueron conservados durante los 28 días de almacenamiento y no sufrieron algún tipo de cambio físico durante ese tiempo.

Uno de los factores a los que se les atribuye las diferencias en los atributos de color del extracto y de las cápsulas puede deberse a la presencia y concentración de alginato de sodio, de acuerdo a lo reportado por Murga *et al.*, 2014, menciona que al aumentar las concentraciones del material de pared utilizado en la encapsulación los valores de luminosidad aumentan significativamente, lo cual demostró en sus resultados obtenidos en un estudio realizado a cápsulas de pulpa de guayaba, ya que al agregar la maltodextrina (material de pared utilizado) sus valores en luminosidad fueron altos. Esto coincide también con lo reportado por Blanquicett *et al.*, 2016, menciona que al agregar alginato de sodio con hidróxido de calcio, encontraron cápsulas con tonalidades más altas y un aumento en los valores de luminosidad en cápsulas de jugo de sabia con naranja.

7.6. Evaluación del contenido de polifenoles totales (TPC)

Los resultados obtenidos de la cuantificación de polifenoles totales se muestran en la figura 3, en donde se observa una comparación del contenido de polifenoles totales del extracto y de los 9 tratamientos de cápsulas, que fueron analizados en un tiempo inicial y monitoreado durante cuatro semanas de estudio.

El extracto tuvo un contenido inicial de 166.02 mg extracto de ácido gálico/g extracto, el cual disminuyó significativamente durante la primera semana, perdiendo más del 80% del

contenido de polifenoles y llegando a un contenido final de 0.27 mg EAG/g extracto en la semana 4 del estudio.

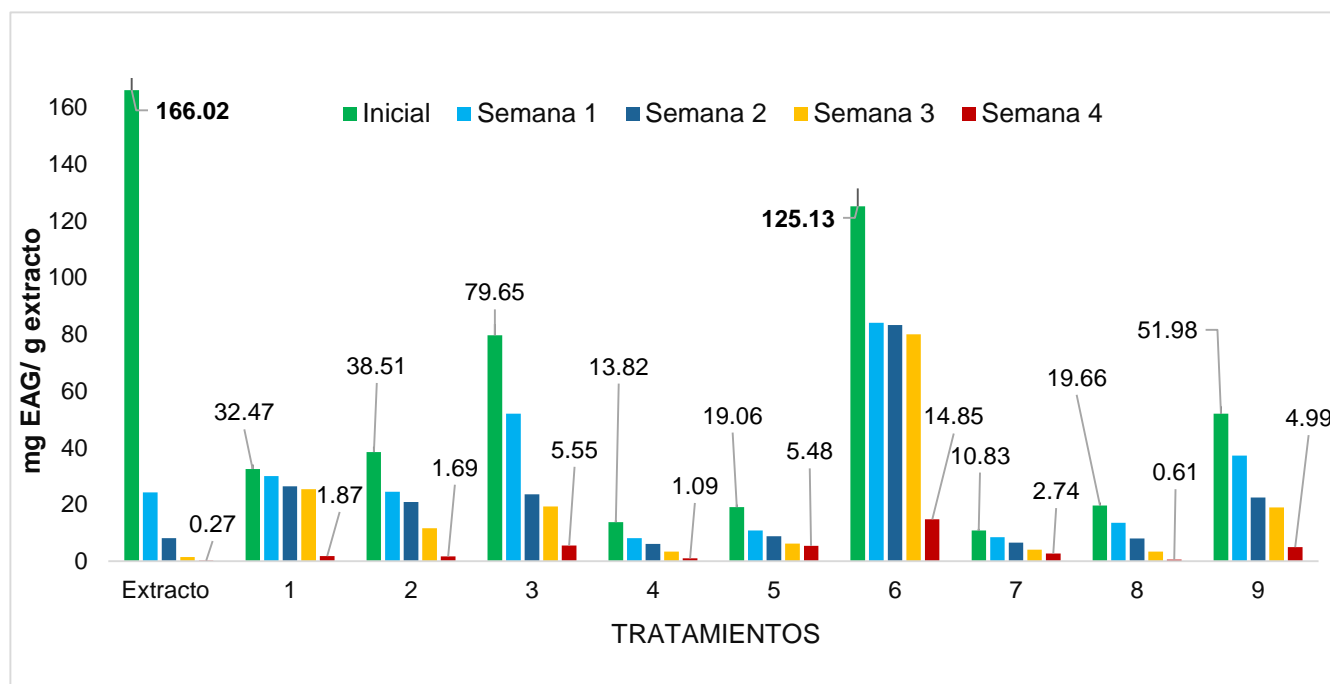


Figura 3. Resultados obtenidos del análisis del contenido de polifenoles totales en extracto y cápsulas de semilla de *Moringa oleifera*.

Las condiciones de encapsulación del tratamiento 6, consistían en 100 mL de extracto de semilla de *Moringa oleifera*, 2.5 g de alginato de sodio y 0.5 g de goma xantana, y se observa que fue el mejor tratamiento con respecto al contenido de polifenoles totales, el cual fue de 125.13 mg EAG/g extracto, con una eficiencia de encapsulación del 75.02%, siendo la que tuvo un mayor contenido inicial y la que logró conservar una menor pérdida de polifenoles totales durante las 4 semanas de estudio. Durante las primeras 3 semanas de almacenamiento la cápsula 6 logró conservar más del 70% del contenido de polifenoles totales, teniendo una pérdida significativa hasta la semana 4, que llegó a un contenido mínimo de 14.85 mg EAG/g extracto. Lo cual indica que estas condiciones fueron las adecuadas para la conservación y protección de polifenoles totales presentes en el extracto de semilla de *Moringa oleifera*.

7.7. Evaluación del contenido de flavonoides totales (TFC)

Los resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides totales se muestran en la figura 4, en donde se observa una comparación del contenido de flavonoides totales del extracto y de los 9 tratamientos de cápsulas, que fueron analizados en un tiempo inicial y monitoreado durante cuatro semanas de estudio. El extracto tuvo un contenido inicial de 37.95 mg extracto de quercetina/g extracto, el cual disminuyó significativamente más de un 85% durante la primera semana de almacenamiento, sin embargo, no hubo diferencia significativa en la semana 2, hasta la semana 3 y 4 en donde perdió del 95 al 99% del contenido de flavonoides totales.

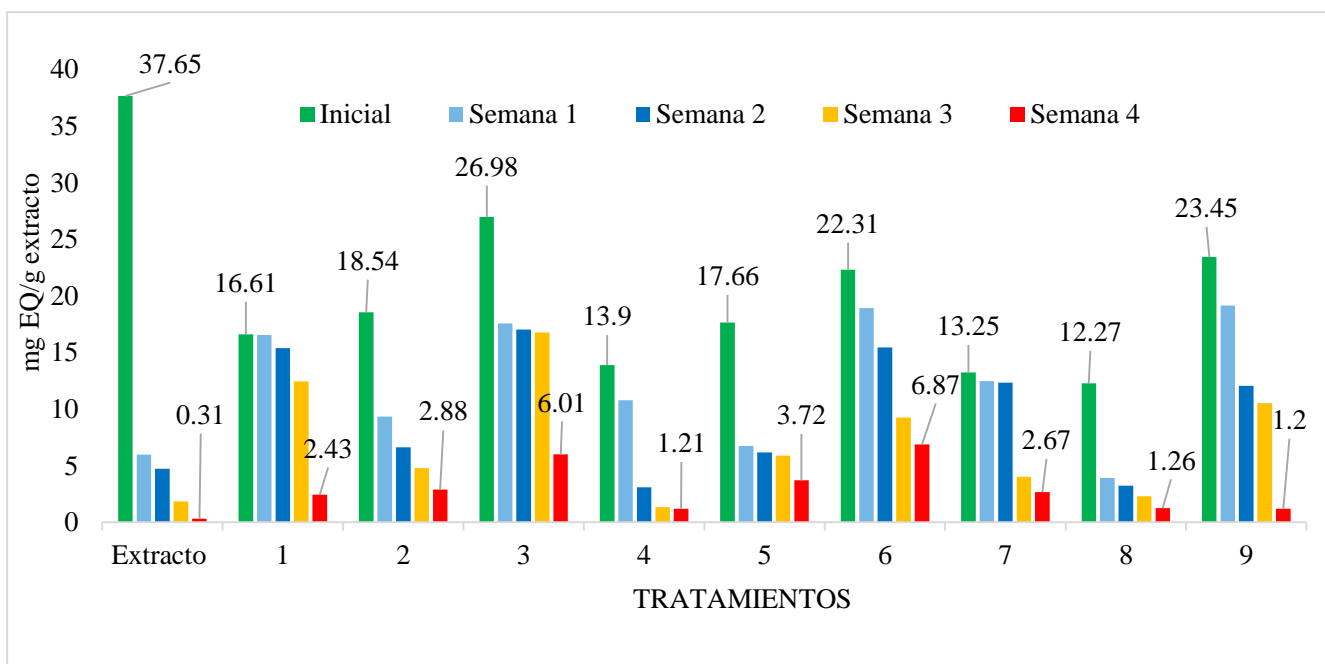


Figura 4. Resultados obtenidos del análisis de contenido de flavonoides totales en extracto y cápsulas de semilla de *Moringa oleifera*.

La cápsula 3 fue la que tuvo una mayor eficiencia de encapsulación, la cual fue del 71.66% con un contenido de 26.98 mg EQ/g extracto durante la semana inicial, la cual fue disminuyendo paulatinamente durante la semana 1, 2 y 3, hasta que en la semana 4 tuvo un contenido final de 6.01 mg EQ/g extracto.

Por otro lado, la cápsula 6 tuvo una eficiencia de encapsulación menor (59.26%), con un contenido de 22.31 mg EQ/g extracto, siendo significativamente menor que la cápsula 3, pero durante la semana 2, la pérdida de flavonoides de la cápsula 6 fue menor que la cápsula 3. En la semana 4 del estudio, la capsula 6 fue la que tuvo un mayor contenido de flavonoides

totales (6.87 mg EQ/g extracto) pero no fue significativamente diferente que la cápsula 3 (6.01 mg EQ/g extracto), ya que no hubo diferencias estadísticas entre estas dos muestras, en el caso del contenido de flavonoides totales, lo cual indica que ambos tratamientos resultaron buenos en la conservación y protección de este compuesto bioactivo. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos por Romero *et al.*, 2016, que obtuvo eficiencias de encapsulación de 50% a 77% en cápsulas de quercetina mediante gelificación iónica utilizando como material de pared quitosano.

7.8. Eficiencia de encapsulación

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en el cálculo del porcentaje de la eficiencia de encapsulación de cada uno de los tratamientos elaborados.

Tabla 6. Eficiencia de encapsulación del contenido de polifenoles y flavonoides totales de las cápsulas de extracto semilla de *Moringa oleifera*.

EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN (%)		
T	Polifenoles (CPT)	Flavonoides (CFT)
1	17.39 ± 1.92 ^c	24.11 ± 2.12 ^d
2	20.63 ± 2.79 ^c	49.24 ± 1.98 ^b
3	42.66 ± 1.49 ^b	71.66 ± 2.65 ^a
4	7.4 ± 2.11 ^d	37.13 ± 2.35 ^c
5	35.21 ± 3.52 ^b	46.91 ± 2.05 ^b
6	75.02 ± 1.27 ^a	59.26 ± 2.14 ^a
7	5.8 ± 2.41 ^d	25.21 ± 1.84 ^d
8	10.21 ± 2.28 ^d	32.59 ± 3.42 ^c
9	36.18 ± 1.71 ^b	52.28 ± 2.19 ^{ab}

Los valores son la media ± desviación estándar (n = mínimo tres réplicas); Letras diferentes en la misma columna indican valores significativamente diferentes (p<0.05) de acuerdo a la prueba de Tukey.

El porcentaje en la eficiencia de encapsulación en el contenido de polifenoles y flavonoides totales fue mayor en las cápsulas que tenían un mayor contenido de extracto hidroalcohólico de semilla de *Moringa oleifera*, esto se debe principalmente a que estos tratamientos tenían

100 mL de extracto, el cual en su mayoría está compuesto por agua y pudo haber favorecido la formación de los puentes de hidrógeno entre la mezcla del material de pared y el extracto.

También se le atribuye al material de pared utilizado, ya que el alginato de sodio es un compuesto de bajo peso molecular que favoreció la presencia de estos compuestos al momento de ser analizados, de acuerdo a lo reportado por Hari *et al.*, 1996, el cual menciona que al aumentar las concentraciones del material de pared y de la muestra a encapsular aumenta significativamente la eficiencia de encapsulación. Chan *et al.*, 2011, mencionan que se ha demostrado que existe un aumento en la eficiencia de encapsulación al aumentar el contenido de alginato de sodio en las cápsulas elaboradas. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos por Rezende *et al.*, 2018, que obtuvo una eficiencia de encapsulación del 69.34% en cápsulas que contenían polifenoles totales de pulpa de acerola.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó la cápsula 6 como el mejor tratamiento y se le determinó la capacidad antioxidante DPPH* y ABTS*, ya que obtuvo una eficiencia del $75.02 \pm 1.27\%$ en el contenido de polifenoles totales, independientemente de que en la eficiencia en flavonoides totales haya sido de $59.26 \pm 2.14\%$ y en la cápsula 3 haya sido mayor ($71.66 \pm 2.65\%$), estadísticamente no fueron diferentes, además de que los flavonoides forman parte de los polifenoles.

7.9. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH* y ABTS*

Se realizó la evaluación de la capacidad antioxidante a la cápsula 6 y se comparó con el extracto el porcentaje de inhibición inicialmente y consecutivamente cada 7 días, durante un periodo de análisis de 4 semanas (28 días). Se midió la capacidad antioxidante a distintas concentraciones (de 1000 ppm a 25 ppm).

En la figura 5 se muestra el porcentaje de inhibición del radical DPPH* en donde se observa mayor inhibición a 1000 ppm, tanto extracto (38.67%) y cápsula (31.29%) tuvieron altos porcentajes durante el tiempo inicial y la semana 1, sin embargo a partir de la semana 2, el potencial del extracto disminuyó significativamente hasta perder más del 85% de inhibición en la semana 4, que a diferencia de la cápsula logró conservar mayormente durante todo el

tiempo del almacenamiento, teniendo un valor final de inhibición de 3.79% y 14.25% respectivamente del extracto y cápsula.

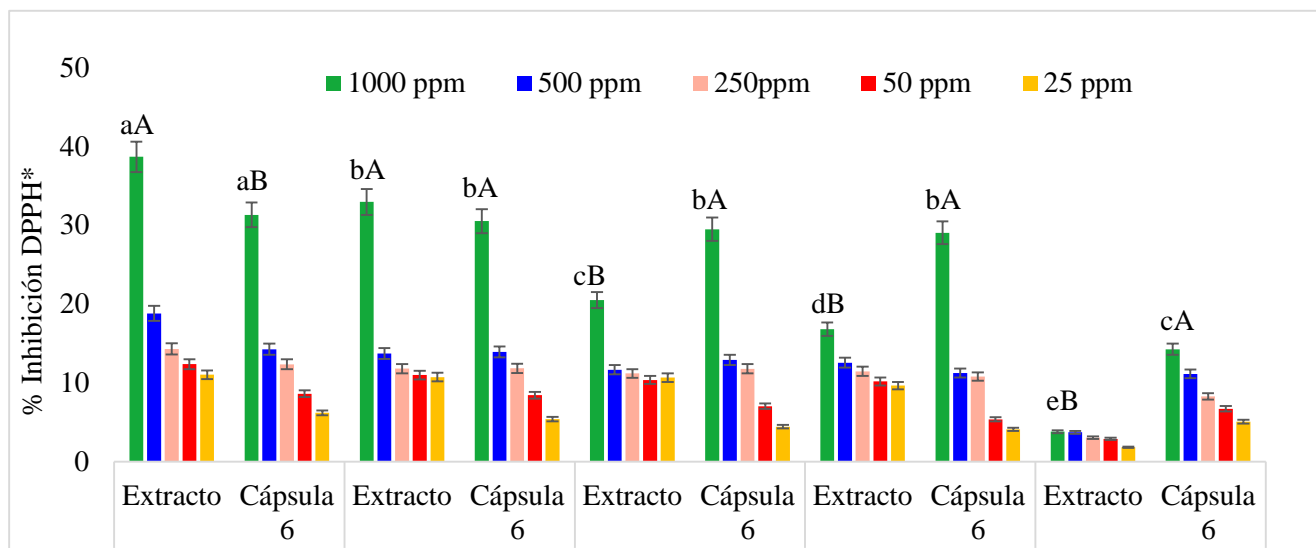


Figura 5. Capacidad antioxidante, % de inhibición de radical DPPH* en extracto y cápsula de semilla de *Moringa oleifera* analizadas durante el almacenamiento. Letras minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el mismo tratamiento en diferente tiempo. Letras mayúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre distinta muestra analizada en el mismo tiempo.

En el estudio de la capacidad antioxidante ABTS* se obtuvieron valores de inhibición iniciales de 42.34% en extracto y de 36.78% en la cápsula, los cuales se muestran en la figura 6.

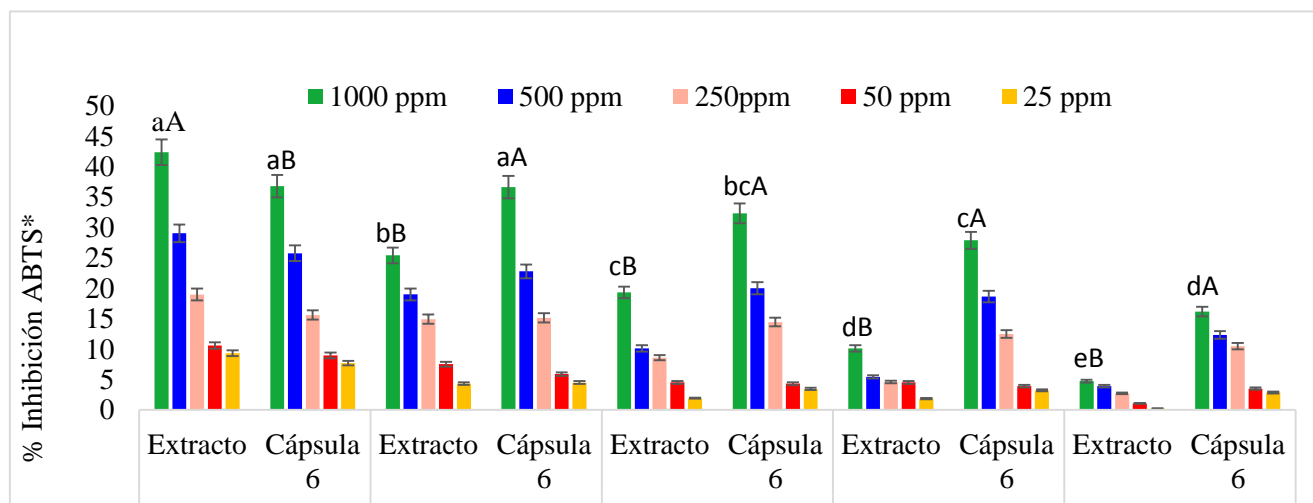


Figura 6. Capacidad antioxidante, % de inhibición de radical ABTS* en extracto y cápsula de semilla de *Moringa oleifera* analizadas durante el almacenamiento. Letras minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el mismo tratamiento en diferente tiempo. Letras mayúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre distinta muestra analizada en el mismo tiempo.

Hubo una mayor inhibición del radical ABTS* en comparación con el radical DPPH*, y esto se debe principalmente al tipo de antioxidantes que se encuentran presentes dentro de la semilla de *Moringa oleifera*, y al mecanismo de reacción, ya que el ABTS*, cuya naturaleza simula a una especie reactiva del oxígeno, a diferencia del radical DPPH* que reacciona con compuestos antioxidantes que reducen al radical donando un átomo de hidrógeno. De acuerdo a estudios reportados (Arnao, 2000), mencionan que el radical ABTS* se utiliza principalmente para medir la actividad antioxidantes de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, los cuales se encuentran presentes dentro del extracto de *Moringa oleifera* ya que el contenido de lípidos es alto y lograron conservarse dentro de la cápsula durante el tiempo de almacenamiento y a su vez proporcionarle a la cápsula una mayor inhibición del radical ABTS*, ya que una de las ventajas de este método de gelificación iónica y la utilización del alginato de sodio como material pared es que permite la encapsulación de compuestos de naturaleza lipofílica e hidrofílica sin presentar problema alguno.

7.9.1. IC₅₀ de la capacidad antioxidante de la cápsula analizada

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en el cálculo del IC₅₀ del radical DPPH* y ABTS* del extracto y capsula 6 en un tiempo inicial y final.

Tabla 7. IC₅₀ del radical DPPH* y ABTS* del extracto de semilla de *Moringa oleifera* y la cápsula 6 analizadas al inicio y al final del almacenamiento.

Muestra	IC ₅₀ DPPH* (mg de extracto/mL)	IC ₅₀ ABTS* (mg de extracto/mL)
Extracto Inicial	1.47 ± 1.10 ^a	1.22 ± 0.40 ^a
Extracto Final	18.97 ± 1.59 ^c	14.50 ± 2.64 ^c
Cápsula Inicial	1.84 ± 0.13 ^a	1.44 ± 0.70 ^a
Cápsula Final	4.88 ± 0.61 ^b	3.49 ± 0.21 ^b

Los valores son la media ± desviación estándar (n = mínimo tres réplicas); Letras diferentes en la misma columna indican valores significativamente diferentes (p<0.05) de acuerdo a la prueba de Tukey. DPPH*: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, ABTS*: 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

A diferencia de la actividad antioxidante ya sea la capacidad antioxidante DPPH* y/o ABTS*, que los resultados con mayor porcentaje de inhibición son más favorables, en el cálculo de la concentración inhibitoria al 50% resulta ser todo lo contrario, ya que a menores concentraciones indica que la muestra necesita una menor concentración para poder inhibir el 50% del radical. Se observa que la IC₅₀ del radical DPPH* del extracto (1.47 ± 1.10 mg de extracto/mL) inicialmente tuvo un mejor resultado a diferencia de la cápsula (1.84 ± 0.13 mg de extracto/mL), sin embargo no hubo diferencia estadística significativa, lo cual se notó significativamente y resaltó la importancia del encapsulado, ya que al final del almacenamiento el extracto tuvo un aumento significativo en el valor de la IC₅₀ hasta llegar a un valor de 18.97 ± 1.59 mg de extracto/mL y la cápsula aumentando mínimamente a 4.88 ± 0.61 mg de extracto/mL a los 28 días de que fueron almacenadas, cabe resaltar que tanto el extracto como la capsula fueron almacenadas bajo las mismas condiciones a una temperatura de 8 °C. Lo mismo sucedió con la IC₅₀ calculada del radical ABTS*, hubo cambios significativos durante el tiempo inicial y final del extracto y de la cápsula aumentando desde 1.22 ± 0.40 mg de extracto/mL y 1.44 ± 0.70 mg de extracto/mL hasta 14.50 ± 2.64 mg de extracto/mL y 3.49 ± 0.21 mg de extracto/mL respectivamente, demostrando que la cápsula del tratamiento 6 puede llegar a ser una alternativa fácil de utilizar en la conservación del potencial antioxidante del extracto de semilla de *Moringa oleifera* durante 28 días de almacenamiento.

VIII. CONCLUSIONES

- Las cápsulas elaboradas con una mayor cantidad de extracto de semilla de *Moringa oleifera*, presentaron un mayor contenido de humedad, la cual disminuyó a los 28 días de su elaboración, sin embargo su estructura física siguió siendo resistente y uniforme en comparación con las otras cápsulas.
- La liberación de las cápsulas fue más rápida en las que fueron elaboradas con un mayor contenido de alginato de sodio, debido a que este es más soluble en soluciones con un pH ácido. Lo cual indica que a mayor contenido de alginato de sodio, menor será el tiempo de liberación, independientemente de su estructura física y tamaño de partícula.
- En los parámetros de color, las muestras encapsuladas no presentaron cambios de color durante las cuatro semanas de almacenamiento, sin embargo las muestras del polvo y el extracto tuvieron tonalidades más oscuras, lo cual quiere decir que las cápsulas lograron conservar su color durante el almacenamiento.
- Los tratamientos 3 (100 mL E/2 g AS) y 6 (100 mL E/2.5 g AS) lograron conservar un mayor contenido de flavonoides totales durante las 4 semanas de almacenamiento, que comparado con el extracto sin encapsular la diferencia es significativa. El extracto tuvo una pérdida mayor al 80% de contenido de flavonoides durante la semana 1 y 2.
- En el caso del contenido de polifenoles totales, el tratamiento 6 fue el que tuvo una mayor eficiencia de encapsulado, además de que logró conservar un mayor contenido de polifenoles totales durante el tiempo de almacenamiento, a diferencia del extracto el cual perdió el 99% durante el mismo tiempo de almacenamiento.
- El extracto tuvo una pérdida mayor al 80% de contenido de flavonoides durante la semana 1 y 2. En el caso del contenido de polifenoles totales, la muestra 6 (100 mL E-2.5g AS), fue la que tuvo una mayor eficiencia de encapsulado con un 75.02%, del

cual se conservó más del 65% de polifenoles totales durante las primeras tres semanas. En la semana 4, lograron conservar más del 10% de polifenoles totales, a diferencia del extracto el cual perdió el 99% durante el mismo tiempo de almacenamiento.

- Se considera que el tratamiento 6 (100 mL E/2.5 g AS) fue el mejor tratamiento que se obtuvo en la encapsulación de extractos hidroalcohólicos de semilla de *Moringa oleifera*, ya que fue el que logró conservar un mayor contenido de polifenoles y flavonoides totales durante las cuatro semanas de almacenamiento.
- Los tratamientos 3 (100 mL E/2 g AS) y 6 (100 mL E/2.5 g AS) lograron conservar un mayor contenido de flavonoides totales durante las 4 semanas de almacenamiento, que comparado con el extracto sin encapsular la diferencia es significativa. El extracto tuvo una pérdida mayor al 80% de contenido de flavonoides durante la semana 1 y 2.
- El tratamiento 6 (100 mL E/2.5 AS) logró conservar más del 85% de inhibición antioxidante DPPH* y ABTS* durante las 4 semanas de almacenamiento, demostrando que puede llegar a ser una alternativa en la conservación del extracto hidroalcohólico de semilla de *Moringa oleifera*.
- El extracto sin encapsular perdió en gran cantidad los compuestos bioactivos presentes, así como también su propiedad biológica que le proporciona la capacidad antioxidante.
- El alginato de sodio con el que fueron elaboradas las cápsulas demostró que este método de encapsulación puede ser considerado como una opción para conservar la inhibición de las especies reactivas del oxígeno (ABTS*) y del hidrógeno (DPPH*).

IX. RECOMENDACIONES

- Es importante la separación inmediata de las semillas de *Moringa oleifera* al momento de ser seleccionadas para la elaboración del polvo, ya que en la mayoría de los casos, se encuentran semillas en estado de descomposición y tiende a la formación de microorganismos como hongos y mohos, lo cual puede contaminar al instante a las semillas que se encuentren en buen estado físico. De la misma manera se recomienda aislar totalmente del ambiente a las semillas seleccionadas de mejor calidad, para así evitar la ganancia de humedad y favorecer la vida útil de las mismas y aumentar el rendimiento de la harina.
- Al momento de la elaboración de los extractos es importante protegerlos de cualquier fenómeno físico que pudiese llegar a alterar o afectar los valores al momento de ser analizados inicialmente en el contenido de compuestos bioactivos o actividad antioxidante, así como también se recomienda el análisis inmediato dentro de las primeras horas de su elaboración.
- Al preparar la muestra para el análisis se utiliza una gran cantidad de muestra, la cual ya no vuelve a ser utilizada para análisis posteriores, por lo tanto este método de encapsulación suele ser destructivo para su análisis y se necesitan grandes cantidades de muestra, por lo tanto se recomienda preparar más cápsulas de las necesarias. Así como también preparar la muestra al momento de ser sometida al análisis a realizar y homogeneizarla correctamente para mejores resultados.
- Debido a su alto contenido de humedad, las cápsulas tienden a la formación de microorganismos como hongos y mohos, los cuales no se pueden evitar mediante la esterilización de la mezcla a encapsular en el autoclave ya que este procedimiento afectaría directamente a los compuestos bioactivos presentes.

X. REFERENCIAS

1. Abdull, A.F., Ibrahim, M.D., y Kntayya, S.B. **2014**. Beneficios para la salud de Moringa oleifera. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15: 8571-8576.
2. AOAC, **2006**. Association of officials of Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of Association of Officials of Analytical Chemists. 18th ed. Arlington: AOAC.
3. Alfaro, C.N. and Martínez, W. **2008**. Uso potencial de la moringa (*Moringa oleifera*, Lam) para la producción de alimentos nutricionalmente mejorados. Ciudad de Guatemala: INCAP.
4. Azwanida, N. **2015**. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Medicinal and Aromatic Plants 4: 196.
5. Benita, S. **2005**. Microencapsulation: methods and industrial applications. NY: London Press. p. 99.
6. Bose, C.K. **2007**. Possible role of *Moringa oleifera* Lam root in epithelial ovarian cancer. Med Gen Med. 9:26.
7. Campo, C.M. **2015**. Análisis farmacognóstico preliminar de las semillas de *Moringa oleifera* Lam cosechadas en Cuba. Revista Cubana de Farmacia 49: 360-374.
8. Chumark, P. and Khunawat, P. **2008**. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of Moringa oleifera Lam leaves. J Ethnopharmacol. 116: 439-46.

9. Encina, C., Vergara, C., y Giménez, B. **2016**. Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil. *Trends in Food Science and Technology* 56: 46-60.
10. Fahey, J. **2005**. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part I. *Trees Life J.* 1-5.
11. Ganguly, R. and Guha, D. **2008**. Alteration of brain monoamines and EEG wave pattern in rat model of Alzheimer's disease and protection by *Moringa oleifera*. *Indian J Med Res.* 128: 744-751.
12. Gopalakrishnan, K. and Doriya, D.S. **2016**. *Moringa Oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application, *Food Science and Human Wellness*.
13. Gómez, D., Pita, V., y Zumalacárregui, B. **2016**. Caracterización de aceites de las semillas de *Moringa oleifera* a partir de la extracción por diferentes métodos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18: 106-111.
14. Kabir, M. Y. and Mannan, M. A. **2014**. Physico-chemical characterization of drumstick (*Moringa oleifera L.*) germplasm available in south western region of Bangladesh. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 5:4287-300.
15. Krishnan, S. and Kshirsagar, A. **2005**. The use of gum Arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers.* 62:309-315.
16. Kumari, D.J. **2010**. Hypoglycemic effect of *Moringa oleifera* and *Azadirachta indica* in type-2 diabetes. *Bioscan.* 5: 211-14.
17. Medina, N., Ayora, T., y Espinosa, H. **2017**. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy* 7: 1-19.

18. MINAG, **2011**. Grupo Nacional de Agricultura Urbana y Suburbana. Instrucciones técnicas para el manejo de la *Moringa oleifera* en organopónicos. La Habana: Instituto Finlay.
19. Moringa News (Moringa et plantes resources du future), **2014**. Disponible en <http://www.moringanews.org/> (Fecha de consulta: 15/05/2020).
20. Moyo, B. and Masika, P. J. **2004**. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. African Journal of Biotechnology. 60: 12925-12933.
21. Price, M. L. **2007**. The moringa tree. ECHO technical note, 17391, 1-19.
22. Saéñz, C., Tapia, S., y Chávez, J. **2009**. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus indica*). Food chemistry, 114: 616-622.
23. Sahaya, A. and Samrot, A. **2010**. Bioactivity of *Moringa oleifera*. National Journal on ChemBiosis 2: 10-14.
24. Santos, F. H. and Silveira, B. M. **2020**. Influence of wall materials on the microencapsulation of *Pequi* oil by spray drying. Brazilian Journal of Food Technology, 23: 2019132.
25. Torres, J.A., Sinagawa, S., y Gutiérrez, A. **2013**. *Moringa oleifera*: phytochemical detection, antioxidants, enzymes and antifungal properties. International Journal of Experimental Botany 82: 193-202.
26. Valdez, M.A. and Mejía, V.Y. **2015**. Nutritional content and elemental and phytochemical analyses of *Moringa oleifera* grown in Mexico. Journal of Chemistry 1:9.

27. Vongsak, B., Sithisarn, P., y Mangmool, S. **2013**. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products* 44: 566-5

