



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL
EXTRACTO ENCAPSULADO DE *Cosmos bipinnatus*
DURANTE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARGARITA ZARZA ABUNDO

ASESORA

DRA. MA. DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES

ASESORA ADJUNTA

DRA. ANDREA YAZMIN GUADARRAMA LEZAMA



TOLUCA, MÉX., 2026

Contenido

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Marco teórico.....	4
2.1. Alimentos funcionales.....	4
2.1.1. Nutracéuticos.....	4
2.2. <i>Cosmos bipinnatus</i>	6
2.3. Antocianinas.....	7
2.3.1. Estabilidad de las antocianinas.....	7
2.4. Microencapsulación.....	8
2.4.1. Material de recubrimiento	9
2.4.2. Técnicas de microencapsulación	11
2.5. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	12
2.5.1. Fase Oral.....	13
2.5.2. Fase gástrica	14
2.5.3. Fase Intestinal	14
3. Objetivos.....	16
3.1. Objetivo general	16
3.2. Objetivos particulares	16
4. Hipótesis.....	17
5. Materiales y Métodos.....	18
5.1. Obtención de la biomasa inicial	18
5.2. Obtención del extracto hidroalcohólico a partir de la biomasa seca de <i>C. bipinnatus</i>	18
5.3. Caracterización fitoquímica del extracto acuoso de <i>Cosmos bipinnatus</i>	18
5.3.1. Antocianinas monoméricas.....	18
5.3.2. Fenoles totales	19
5.3.3. Flavonoides totales.....	19
5.3.4. Capacidad antioxidante mediante el método DPPH.....	19
5.3.5. Capacidad antioxidante mediante el método de ABTS	19
5.4. Microencapsulación por liofilización del extracto acuoso de <i>Cosmos bipinnatus</i> 20	
5.4.1. Eficiencia de microencapsulación	20
5.4.2. Humedad	20
5.5. Evaluación de los microencapsulados del extracto de <i>Cosmos bipinnatus</i> a través de la digestión <i>in vitro</i>	21

5.5.1.	Fase oral	21
5.5.2.	Fase gástrica	21
5.5.3.	Fase intestinal	22
5.5.4.	Evaluación de la actividad antioxidante y liberación de compuestos bioactivos de los microencapsulados durante la digestión <i>in vitro</i>	22
5.6.	Análisis estadístico	24
6.	Resultados y discusión	25
6.1.	Obtención del extracto hidroalcohólico a partir de la biomasa seca de <i>C. bipinnatus</i>	25
6.1.1.	Composición fitoquímica del extracto de <i>Cosmos bipinnatus</i>	25
6.2.	Extracto de <i>Cosmos bipinnatus</i> microencapsulado mediante liofilización	26
6.3.	Evaluación de los microencapsulados durante la digestibilidad <i>in vitro</i>	27
6.3.1.	Fase oral	28
6.3.2.	Fase gástrica	28
6.3.3.	Fase Intestinal	29
6.3.4.	Evaluación de la actividad antioxidante y liberación de compuestos bioactivos de los microencapsulados de <i>C. bipinnatus</i> a través de la digestión <i>in vitro</i>	31
7.	Conclusiones	38
8.	Referencias	39
9.	Anexos	43
	Anexo 1. Cuantificación de antocianinas monoméricas	43
	Anexo 2. Cuantificación de fenoles totales	43
	Anexo 3. Cuantificación de flavonoides	45
	Anexo 4. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH	47
	Anexo 5. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de ABTS ..	50
	Anexo 6. Preparación de las soluciones SFS, SFG Y SFI para el proceso de digestión <i>in vitro</i>	52
	Anexo 7. Cuantificación de antocianinas poliméricas	52
	Anexo 8. Cuantificación de azúcares reductores	54

Resumen

Un alimento funcional se refiere a productos que, además de su valor nutricional aportan beneficios a la salud de los consumidores. En la actualidad, este término engloba tanto alimentos naturales como a los procesados que contengan componentes con actividad biológica capaces de contribuir con la prevención y manejo de algunas enfermedades, lo que ha impulsado su popularidad en la industria alimentaria. Entre las principales fuentes de estos compuestos se encuentran diversas plantas, cuyas propiedades provienen de metabolitos bioactivos que en algunos casos también actúan como pigmentos naturales. El aprovechamiento de esta clase de pigmentos se debe a su potencial como colorantes naturales remplazando así a los colorantes sintéticos asociados a efectos adversos en la salud, entre los colorantes naturales más relevantes se encuentran los flavonoides, grupo del cual destacan las antocianinas. El presente trabajo expone a *Cosmos bipinnatus* comúnmente conocida como girasol morado como una fuente vegetal con gran potencial para la formulación de alimentos funcionales debido a su alta disponibilidad además del contenido de compuestos fenólicos como flavonoides, especialmente antocianinas las cuales proveen la coloración púrpura y a su vez la actividad antioxidante de la especie. Sin embargo, la inestabilidad de los compuestos ante distintos factores ambientales sugiere su encapsulación para su preservación.

Con base en lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar la actividad antioxidante del extracto encapsulado de *Cosmos bipinnatus* durante un proceso de digestión *in vitro*, con el fin de determinar la estabilidad del pigmento con actividad biológica. El extracto hidroalcohólico se obtuvo a partir de la maceración asistida con ultrasonido de los pétalos de *C. bipinnatus*, al cual se le determinó mediante espectrofotometría de luz UV el contenido de fenoles (86.88 ± 0.06 mg EAG/g de extracto seco), flavonoides (76.66 ± 0.01 mg EQ/g de extracto seco), antocianinas (0.93 ± 0.06 mg Cyn-3-glu/g de extracto seco) y actividad antioxidante (88.70 ± 1.55 % de inhibición con DPPH y 93.71 ± 2.63 % de inhibición con ABTS). Posteriormente se encapsuló el extracto por liofilización, utilizando como agentes encapsulantes goma arábiga y maltodextrina en tres formulaciones diferentes: extracto-goma arábiga (E-GA), extracto-maltodextrina (E-MD) y extracto-maltodextrina-goma arábiga (E-MD-GA) logrando una eficiencia de encapsulación mayor al 80% en todos los tratamientos. Las microcápsulas fueron sometidas a un proceso simulado de digestión de tres fases (oral, gástrica e intestinal), al final de cada fase se evaluó por espectrofotometría de luz UV la capacidad antioxidante, el contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas, además de la cantidad de azúcares reductores de cada tratamiento.

Los resultados obtenidos mostraron que el extracto encapsulado mantuvo su actividad antioxidante al terminar la digestión *in vitro*, entre los tratamientos evaluados, la combinación de maltodextrina y goma arábiga destacó como la más efectiva para la preservación de los compuestos bioactivos ante las condiciones gastrointestinales, además de favorecer una mejor digestibilidad de la goma arábiga.

1. Introducción

Originalmente, a mitad de los años 80, en Japón se introdujo por primera vez el término “alimento funcional” que describía a todo aquel alimento con propiedades medicinales y beneficios a la salud, sin embargo, a través de los años el significado se ha extendido especificando las características a considerar para conceptuar que un alimento sea funcional. Los alimentos funcionales son alimentos naturales o procesados que contienen compuestos bioactivos y que además de su aporte nutricional proporcionan beneficios a la salud de los consumidores mediante la prevención y manejo de síntomas de algunas enfermedades tales como diabetes, obesidad, problemas cardiovasculares, etc., y como consecuencia influyen en el aumento de la esperanza de vida (Amiri *et al.*, 2020; Martirosyan & Miller, 2018), actualmente tienen gran popularidad en la industria alimentaria considerando lo descrito anteriormente.

El manejo de plantas con propiedades medicinales ha sido una práctica empleada desde varias épocas atrás, debido a que empíricamente se conocía que estas poseían ciertas propiedades que aportaban beneficios al cuerpo humano. Ahora se sabe que estas propiedades benéficas provienen de los compuestos bioactivos presentes en algunas plantas, los cuales les brindan actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antifúngicas, por mencionar algunas (Martirosyan & Miller, 2018). Algunos de los compuestos bioactivos además de sus propiedades benéficas a la salud, también fungen como pigmentos. Por tal motivo, las especies vegetales que los contienen son consideradas como fuente renovable para la obtención de pigmentos naturales (Cubillos & Pava, 2021). En la actualidad, los colorantes naturales tienen gran auge en la industria alimentaria incitando la búsqueda de nuevas fuentes naturales y saludables para la obtención de colorantes aplicados en alimentos, reemplazando así a los colorantes sintéticos. Cabe mencionar, que en los últimos años se ha reportado que algunos de los colorantes sintéticos podrían estar relacionados con perjuicios a la salud de los consumidores. Se les ha relacionado, por ejemplo, con la hiperactividad y problemas de memoria y aprendizaje en niños (Jasti *et al.*, 2022). Por otro lado, los colorantes naturales se dividen en varias clases, de las cuales las más importantes y comúnmente usadas en la industria alimentaria son los tetrapirroles siendo la clorofila el miembro más importante de estos, los tetraterpenoides grupo en el que se encuentran los carotenoides, y los flavonoides donde pertenecen las antocianinas (Cubillos & Pava, 2021).

Cosmos bipinnatus comúnmente conocida como girasol morado es una herbácea anual de coloraciones púrpuras, se distingue por su resistencia a una variedad de tipos de suelos, capacidad de auto siembra y abundante floración, por lo que erróneamente se le cataloga como un tipo de maleza. Sin embargo, se han reconocido algunas de las propiedades que posee como actividad farmacológica, antiinflamatoria, antígenotóxica y antioxidante teniendo en cuenta la presencia de compuestos bioactivos en la especie, principalmente se describen fenoles, alcaloides, flavonoides y antocianinas (Jasti *et al.*, 2022). Estas últimas son de gran interés por su relación con la actividad antioxidante, además de proporcionar los tonos púrpuras característicos de *Cosmos*, razón por la cual tiene potencial como fuente renovable para la obtención de pigmentos naturales, y a su vez ser considerada para el desarrollo de alimentos funcionales. Sin embargo, las antocianinas suelen ser inestables ante diversos factores como luz, temperatura, pH, y oxígeno, por lo que es importante

resguardarlas y una buena opción para ello es mediante encapsulación (Cortez *et al.*, 2017). Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo es llevar a cabo la evaluación de la actividad antioxidante del extracto encapsulado de *Cosmos bipinnatus* durante el proceso de digestión *in vitro* para determinar la estabilidad de los pigmentos bioactivos.

2. Marco teórico

2.1. Alimentos funcionales

El término “alimento funcional” se introdujo por primera vez en Japón a mediados de los 80’s. Este término describía a todo aquel alimento con propiedades medicinales y beneficios a la salud, sin embargo, a través de los años el significado se ha extendido especificando las características a considerar para conceptualizar que un alimento sea funcional. Los alimentos funcionales son alimentos naturales o procesados dentro de la dieta habitual que contienen compuestos bioactivos y que además de su aporte nutricional básico, proporcionan beneficios específicos a la salud de los consumidores mediante la prevención y manejo de síntomas de algunas enfermedades tales como diabetes, obesidad, problemas cardiovasculares, entre otras, y como consecuencia, influyen en el aumento de la esperanza de vida (Amiri *et al.*, 2020; Martirosyan & Miller, 2018; Meléndez-Sosa *et al.*, 2020). Hoy en día, el incremento en la popularidad de estos productos dentro de la industria alimentaria se debe a la amplia investigación referente a la intervención de los alimentos en determinadas funciones del cuerpo, lo que ha contribuido en la concientización de la población sobre la importante relación que existe entre los alimentos y la salud (Budai, 2020; Meléndez-Sosa *et al.*, 2020).

Un alimento convencional es clasificado como funcional si como resultado de su ingesta, se promueve el bienestar de los individuos por efecto de la actividad biológica de los elementos que disponga. En el caso de alimentos elaborados, se les considera funcionales si el propósito de su manipulación es aumentar la calidad nutricional del producto por medio de tecnologías que intervengan en la neutralización de agentes tóxicos o causantes de enfermedades, reemplazo de sustancias nocivas por benignas, adición de ingredientes incluidos o no normalmente en el producto, enriquecimiento de la concentración de nutrientes existentes de forma natural, o bien la modificación de la biodisponibilidad de algunos elementos (Budai, 2020; Meléndez-Sosa *et al.*, 2020).

De forma natural, dentro de la composición de los alimentos podemos encontrar compuestos bioactivos como carotenoides, vitaminas, fenoles, ácidos grasos, fitoestrógenos, probióticos, prebióticos, antocianinas, entre otros. El consumo de estos puede desencadenar efectos negativos o positivos en nuestro organismo, ciertos complejos logran desempeñar actividades tóxicas y antinutricionales que perjudican la salud mientras que otros contribuyen al bienestar impulsando acciones que favorecen el funcionamiento del cuerpo humano, como la regulación de procesos metabólicos, cardiovasculares y gastrointestinales. Estos últimos se conocen como nutraceuticos cuyo provecho ha dado paso a la creación de los alimentos funcionales (Budai, 2020; Meléndez-Sosa *et al.*, 2020).

2.1.1. Nutraceuticos

La expresión nutraceutico surgió en 1989 a partir de la combinación de las palabras nutrición y farmacéutico puesto que se refiere a los ingredientes o compuestos activos que

forman parte de un alimento capaces de contribuir tanto al rendimiento nutricional como al tratamiento de padecimientos de manera preventiva o terapéutica (Budai, 2020; Meléndez-Sosa *et al.*, 2020).

Este tipo de sustancias se encuentran naturalmente en fuentes vegetales, animales y minerales, y otras se obtienen mediante síntesis química, tienen la habilidad de actuar en presencia de matrices alimentarias o en solitario, lo que significa que pueden aislarse y suministrarse en dosis concentradas como polvos y cápsulas o adicionarse a formulaciones alimenticias para adjudicar propiedades de interés a un producto (Budai, 2020; Meléndez-Sosa *et al.*, 2020). Sin embargo, después de su extracción de la matriz de origen, su característica funcional puede perderse durante la producción, distribución y consumo de alimentos por temperaturas altas, radiación UV, presencia de metales, variaciones en el pH, humedad, oxígeno, entre otras condiciones no adecuadas para la manipulación de estos compuestos (Budai, 2020).

Los nutraceuticos se dividen en tres clases: a) nutrientes; como vitaminas, minerales, aminoácidos y ácidos grasos, b) herbales; donde pertenecen los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas y c) los suplementos dietéticos; derivados de otras fuentes (Meléndez-Sosa *et al.*, 2020).

2.1.1.1. Nutraceuticos de origen vegetal

El manejo de plantas con propiedades medicinales ha sido una práctica empleada desde varias épocas atrás, debido a que empíricamente se sabía que estas poseían ciertas propiedades que aportaban beneficios al cuerpo humano. Actualmente se entiende que estas propiedades benéficas provienen de los compuestos bioactivos presentes en algunas plantas, a los que también se les conoce como metabolitos secundarios o fitoquímicos. Pese a que estos compuestos no intervienen directamente en las funciones primarias como el desarrollo y crecimiento de las plantas, les brindan actividades biológicas de gran interés como antioxidantes, antiinflamatorias y antifúngicas, por mencionar algunas (Martirosyan & Miller, 2018).

Los nutraceuticos de origen vegetal más aprovechados por la industria alimentaria son los carotenoides, fitoesteroles, polifenoles incluyendo flavonoides y antocianinas, en vista de las funciones benéficas proporcionadas a la salud de los consumidores como antioxidantes, anticancerígenas, aporte energético, coadyuvantes en el reforzamiento de la salud cardiovascular, sistema óseo, sistema nervioso, sistema inmunológico y en el control de diabetes (Budai, 2020). Algunos de los compuestos bioactivos además de sus propiedades benéficas a la salud, también fungen como pigmentos.

2.1.1.2. Pigmentos vegetales

En la actualidad, los pigmentos vegetales tienen un gran auge en la industria alimentaria incitando la búsqueda de nuevas fuentes naturales y saludables para la obtención de

colorantes aplicados en alimentos, reemplazando así a los colorantes sintéticos. Debido a que la apariencia y el color son los primeros signos de calidad percibidos fácilmente por los consumidores, la adaptación de color en la producción de alimentos es esencial con la finalidad de reemplazar o intensificar coloraciones que se perdieron durante el proceso, minimizar los cambios entre lotes y darles color a alimentos incoloros, así pues, se logra perfeccionar y mantener atractivos los productos elaborados (Aberoumand, 2011; Guerrero *et al.*, 2020).

Cabe mencionar, que en los últimos años se ha reportado que algunos de los colorantes sintéticos podrían estar relacionados con perjuicios a la salud de los consumidores. Se les ha relacionado, por ejemplo, con la hiperactividad, problemas de memoria y aprendizaje en niños (Miller *et al.*, 2022), por tal motivo, ha incrementado recientemente la preferencia del público por el consumo de alimentos elaborados con ingredientes naturales adicionalmente de su aporte benéfico a la salud (Guerrero *et al.*, 2020).

Por otro lado, los colorantes naturales se dividen en varias clases, de las cuales las más importantes y comúnmente usadas en la industria alimentaria son los tetrapirroles, siendo la clorofila el miembro más importante de estos, los tetraterpenoides, grupo en el que se encuentran los carotenoides, y los flavonoides, donde pertenecen las antocianinas (Aberoumand, 2011), además de su contribución como pigmento vegetal durante el procesamiento de alimentos, se han observado actividades biológicas propias de estos compuestos que participan en el bienestar de nuestro organismo, por esta razón la mayoría de los pigmentos vegetales son evaluados por su potencial como nutraceuticos (Guerrero *et al.*, 2020).

2.2. *Cosmos bipinnatus*

El género *Cosmos* pertenece a la familia *Asteraceae*, las 35 especies y 4 variedades que la conforman crecen nativamente en México. La variedad *Cosmos bipinnatus*, conocida también como “cosmos de jardín” o “girasol morado”, es una herbácea que florece anualmente, de tamaño mediano, se caracteriza por su resistencia a distintos tipos de suelo, su capacidad de auto siembra y abundante floración en cualquier hábitat abierto y extenso, se distingue por la variedad de colores que poseen sus flores como púrpura, rosa, rojo y blanco, por lo que tiene valor ornamental (Amamiya & Iwashina, 2016; Bhuiyan & Nahid, 2023). Adicionalmente, es considerada en la medicina tradicional como una planta medicinal para el tratamiento de dolores estomacales y de cabeza, debido a su actividad farmacológica, además se ha demostrado que posee ciertas propiedades como actividad antioxidante, antiinflamatoria, antígenotóxica y antimicrobiana, teniendo en cuenta la presencia de compuestos bioactivos en la especie (Bhuiyan & Nahid, 2023; Jasti *et al.*, 2022).

Algunas investigaciones han reportado que el tamizaje fitoquímico de *Cosmos bipinnatus* revela un concentrado significativo de fenoles, alcaloides, flavonoides y antocianinas existentes en diferentes partes de la planta, con mayor abundancia en los pétalos (Amamiya & Iwashina, 2016; Jasti *et al.*, 2022). Particularmente, los principales bioactivos señalados en la especie son antocianinas, como cianidina 3-O-glucósido y 3-O-rutinósido y

flavonoides, como apigenina 7-O-glucorónido, crisoeriol 7-O-glucurónido, luteolina 7-O-glucorónido, buteína, tricina, quercetina y butina (Amamiya & Iwashina, 2016; Bijani *et al.*, 2021).

Las antocianinas encontradas en *Cosmos bipinnatus* son de gran interés no solo porque están relacionadas con la actividad antioxidante, sino también por ser las responsables de proporcionar los tonos púrpuras que caracterizan a la especie.

2.3. Antocianinas

Las antocianinas son un grupo de compuestos fenólicos derivadas de los flavonoides, su estructura general se basa en la forma catiónica del flavilio, según la adición de otros grupos en las posiciones 3, 5 y 7 de este, y la sustitución del anillo B, estos compuestos proporcionan coloraciones rojo, morado y azul a frutas y vegetales, por lo que son considerados como pigmentos naturales solubles en agua (Khoo *et al.*, 2017).

Algunos estudios reportan como consecuencia de la biodisponibilidad de las antocianinas, efectos benéficos a la salud, tales como antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante y neuroprotector, así mismo, el aprovechamiento de estas para el tratamiento y prevención de algunas enfermedades, como diabetes, cáncer, obesidad y problemas cardiovasculares (Alappat & Alappat, 2020; Khoo *et al.*, 2017).

La inclinación por el manejo de antocianinas en la industria alimentaria se debe principalmente a la actividad antioxidante que poseen, a su potencial como colorante natural y a sus múltiples beneficios a la salud, estas características son de gran interés como nutraceuticos para la elaboración de alimentos funcionales (Alappat & Alappat, 2020).

2.3.1. Estabilidad de las antocianinas

Las antocianinas suelen disminuir su estabilidad acelerando su degradación cuando son expuestos a ciertos factores fisicoquímicos incluyendo alteraciones químicas en su estructura principal, lo que resulta en una variedad de tonalidades además del daño a las propiedades bioactivas de interés durante su procesamiento.

Diferentes autores afirman que la exposición prolongada a la luz, presencia de oxígeno y temperatura alta estimulan la oxidación de las antocianinas resultando en la pérdida de coloración hasta volverse incoloras. Lo mismo ocurre en presencia de valores de pH alcalinos donde se degradan adquiriendo matices azules, mientras que en condiciones ácidas se tiñen de un color rojo predominando así su forma más estable. Aunque la formación de nuevos complejos con otros compuestos o entre ellas mismas sea una estrategia en la mejora de la conservación de las antocianinas, esto también podría afectarlas, por ejemplo, la presencia de metales en el mismo sistema promueve su degradación (Alappat & Alappat, 2020; Cortez *et al.*, 2017). Las afectaciones provocadas por estos parámetros fisicoquímicos pueden originar modificaciones en la estructura

química de las antocianinas, tales como hidroxilación y metilación, por mencionar algunas, con la metilación de las antocianinas se presentan las tonalidades rojas, mientras que con la hidroxilación se visibilizan tonalidades azules; ambas modificaciones también contribuyen en la actividad antioxidante, se ha reportado que la metilación disminuye la oxidación de los compuestos favoreciendo su estabilidad (Cortez *et al.*, 2017; Khoo *et al.*, 2017).

A raíz del eventual deterioro de las antocianinas durante su manejo se han considerado diversas técnicas con el fin de conservar los compuestos al igual que su actividad biológica, se busca también evitar que la biodisponibilidad reduzca ante su potencial como nutraceuticos. Las antocianinas son capaces de interactuar con polisacáridos formando cápsulas que las protegen del exterior, proceso al que se le conoce como encapsulación, el cual ha sido reportado anteriormente como una solución eficaz para la protección de compuestos bioactivos (Cortez *et al.*, 2017; Zabot *et al.*, 2022).

2.4. Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica que consiste en el aislamiento de compuestos activos de interés dentro de matrices poliméricas que forman membranas para su recubrimiento con el objetivo de proteger y mantener su estabilidad (Celli *et al.*, 2015; Gómez, 2020). El agente activo líquido, sólido o gaseoso se encuentra disperso dentro del material de pared dando origen a partículas conocidas como microesferas o microcápsulas. Los términos encapsulación y microencapsulación difieren únicamente en el tamaño de la cápsula obtenida al final del proceso, se considera encapsulación cuando las partículas producidas alcanzan un tamaño mayor a 1000 micras y microencapsulación cuando el tamaño de las partículas oscila entre 1 a 1000 micras (Zabot *et al.*, 2022).

La microencapsulación tiene como finalidad mantener en condiciones favorables los compuestos activos durante el procesamiento y almacenamiento de productos alimenticios y farmacéuticos para ser aprovechados posteriormente extendiendo así su vida útil. Con esta tecnología se procura incrementar la estabilidad y solubilidad de los activos, mantener su biodisponibilidad a lo largo de la ingesta, disminuir la higroscopicidad además de retener las propiedades biológicamente activas para detener su reactividad antes de lo esperado. Esto contribuye al desarrollo y aplicación de alimentos en la industria alimentaria para beneficio de la salud de los consumidores (Celli *et al.*, 2015; Zabot *et al.*, 2022).

La microencapsulación se aplica con frecuencia en la industria alimentaria para la conservación de propiedades organolépticas como sabor y aroma, contribuye en la optimización de ingredientes como antioxidantes, vitaminas, acidulantes y aditivos poco estables (Gómez, 2020). Además, es una herramienta relevante para el aprovechamiento de compuestos bioactivos obtenidos a partir de plantas debido a su alta sensibilidad después de ser extraídos de la matriz vegetal de origen. Un ejemplo muy común es el caso de los compuestos fenólicos en la industria alimentaria, los cuales son atractivos por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, sin embargo, suelen deteriorarse si se exponen a ciertos factores como temperatura, luz y pH aminorando su valor en la industria, por consiguiente, se recurre a la encapsulación con biopolímeros para su conservación, los

más explotados son los basados en proteínas, lípidos y polisacáridos, estos últimos debido a su estructura y función fisiológica son apropiados para encapsular y administrar polifenoles (Zabot *et al.*, 2022). Así mismo, los pigmentos naturales son ingredientes alimentarios de alto valor, en particular las antocianinas que durante su procesamiento sufren afectaciones aminorando su bioactividad por lo cual se recurre a la encapsulación como protección (Cortez *et al.*, 2017; Zabot *et al.*, 2022).

Existen varios métodos para alcanzar el objetivo de la microencapsulación, elegir el método y material encapsulante adecuado para cada activo de interés dará como resultado la eficiencia del encapsulado, incluyendo las propiedades fisicoquímicas deseadas como solubilidad, partición y estabilidad. Es necesario estudiar las características del activo a encapsular como peso molecular, polaridad, temperaturas a las que suele degradarse, entre otras, para optar por el método más preciso (Celli *et al.*, 2015). El tipo de agente encapsulante influye en el resultado del encapsulado como el tamaño, la viscosidad y propiedades organolépticas, por esta razón debe analizarse la compatibilidad de las características del activo con las del material de pared (Zabot *et al.*, 2022). También deben de considerarse otros puntos como costo, regulaciones, etapas para la preparación, tiempo y volumen de producción.

Singularmente las antocianinas responden ante diversos factores que tienen la capacidad de aumentar o disminuir su estabilidad, por lo que es importante analizar la afinidad de estas con el material encapsulante y la técnica a aplicar. El calor es una variable que provoca la oxidación de las antocianinas por lo que se examinan métodos de encapsulación que requieran de temperaturas bajas. Gracias a la habilidad de las antocianinas de formar complejos con polisacáridos estos desempeñan un gran papel como material de pared para su encapsulación. Cortez y colaboradores (2017) citan estudios previos de microencapsulación de antocianinas obtenidas del jugo de zanahoria morada y negra, extracto de pétalos de azafrán, uvas rojas y flor de Jamaica, utilizando goma arábiga y maltodextrina como materiales de pared para mantener la funcionalidad de estas durante su almacenamiento. Estos autores reportaron alta eficiencia de protección de las antocianinas mediante este procedimiento aplicando goma arábiga y maltodextrina como materiales de pared, por lo fueron seleccionados en este estudio.

2.4.1. Material de recubrimiento

Los materiales de recubrimiento utilizados en la práctica pueden obtenerse de fuentes naturales o sintéticas, aunque usualmente se utilizan por preferencia los polisacáridos en vista de su biodegradabilidad, biocompatibilidad y su alto contenido nutricional en comparación con otros (Zabot *et al.*, 2022). Dentro de los más comunes se encuentran las celulosas, gelatina, lípidos (cera, parafina), proteínas (gluten, caseína), probióticos, carbohidratos (almidón, maltodextrina y ciclodextrina) y gomas (goma arábiga, agar, alginato de sodio, entre otros exudados de plantas) (Cortez *et al.*, 2017; Jiang & Zhang, 2023; Zabot *et al.*, 2022).

De acuerdo con Jiang & Zhang (2023) las gomas y los carbohidratos aplicados como material de pared para los recubrimientos son altamente eficientes, si a las antocianinas se refiere, la goma arábiga y la maltodextrina han reportado significantes porcentajes de

eficiencia de los microencapsulados obtenidos, si bien individualmente logran la conservación de los compuestos, la idea de combinarlos en una misma matriz podría ser una gran opción.

2.4.1.1. Goma arábica

La goma arábica es una secreción seca producida por incisiones en la corteza de los tallos de árboles de acacia, está compuesta principalmente por carbohidratos como arabinosa y galactosa, fibra, sales minerales como calcio, potasio y magnesio, y una mínima proporción de proteínas (Musa *et al.*, 2018; Zabot *et al.*, 2022).

Este ingrediente es altamente valorado en el sector alimentario por contribuir como material de recubrimiento debido a su habilidad para formar películas, retener compuestos volátiles, su estabilidad ante condiciones de temperaturas altas y la falta de interacción con otros compuestos químicos presentes en el medio; como espesante gracias a su capacidad de dominar las propiedades reológicas de matrices alimentarias, alta solubilidad en agua y baja viscosidad, y como estabilizador en virtud de sus condiciones de acidez e inhibición a reacciones de oxidación. Dado que la composición de la goma arábica implica un complejo proteico hidrofóbico y un complejo de carbohidratos hidrofílico es común su aplicación como agente emulsificante y floculante. Agregando también que no afecta las características organolépticas originales del producto al que se adicione como el sabor y el color, debido a que este material es incoloro y sin sabor (Cortez *et al.*, 2017; Musa *et al.*, 2018; Zabot *et al.*, 2022).

Estudios describen propiedades farmacológicas de interés en la goma arábica para el tratamiento de enfermedades de riñón, cardiovasculares, gastrointestinales y obesidad, encima de la presencia de actividad antioxidante. A pesar de que es un tanto difícil de digerir porque no se degrada en el intestino delgado, sino que se fermenta en el intestino grueso por la actividad enzimática de los microorganismos presentes en el colon, se ha demostrado un incremento de la absorción de sodio en el intestino delgado, de manera que mejora la digestión y el flujo de minerales y agua desde el lumen intestinal hasta la sangre (Musa *et al.*, 2018).

2.4.1.2. Maltodextrina

La maltodextrina es producto de la hidrólisis ácida o enzimática del almidón, comprende de un conglomerado de azúcares reductores pues está formada por unidades D-glucosa y equivalentes de dextrosa (Carpio & Figueroa, 2017; Gómez, 2020).

Los equivalentes de dextrosa (ED) señalan el grado de hidrólisis del almidón, las propiedades fisicoquímicas de la maltodextrina dependerán de este valor debido a que permite modificaciones en la composición de la molécula. Un número mayor de ED denota un mayor grado de hidrólisis (Carpio & Figueroa, 2017; Gómez, 2020). Maltodextrinas con valores superiores a 20 ED suelen cambiar de color y sabor en reacciones con calor y

absorber humedad, lo contrario a maltodextrinas con valores inferiores que no son higroscópicas, además de su dificultad para cristalizarse, buena solubilidad y baja viscosidad a altos contenidos de sólidos. Por lo anterior, las maltodextrinas con menor ED son ideales para su aplicación no solo como agente encapsulante para microencapsulación sino también para la formación de películas (Gómez, 2020; Hofman *et al.*, 2016).

En vista del gran aporte energético en forma de glucosa por su degradación durante la digestión se considera como aditivo para la producción de alimentos, bebidas, dietéticos y productos farmacéuticos. La alfa amilasa ubicada en el fluido salival convierte la maltodextrina en maltosa iniciando así su digestión, más tarde es arrastrada al intestino delgado para su asimilación donde se obtiene glucosa por la actividad enzimática de la amilasa pancreática, finalmente la glucosa resultante es transportada a la sangre por los enterocitos presentes en el intestino delgado (Hofman *et al.*, 2016).

2.4.2. Técnicas de microencapsulación

A pesar de las numerosas técnicas reportadas para la microencapsulación de compuestos activos, no todas son compatibles con el agente activo ni los materiales de pared, a continuación, se describen dos de las técnicas más aplicadas para la microencapsulación de antocianinas.

2.4.2.1. Secado por aspersión

El secado por aspersión es una técnica muy común para la encapsulación de ingredientes en la fabricación de productos alimenticios debido a su rentabilidad, tanto en costo como en tiempo de ejecución (Abdul *et al.*, 2021; Celli *et al.*, 2015), a pesar de eso es un método poco favorable para los compuestos termosensibles dado que el proceso requiere de calor para deshidratar la muestra. El procedimiento consiste de cuatro pasos fundamentales, en primer lugar se prepara una mezcla acuosa la cual incluye el ingrediente a encapsular y los materiales de pared que ayudaran a formar las cápsulas, esta mezcla es homogenizada para posteriormente esparcirse mediante atomización dentro de una cámara de secado la cual suministra aire caliente con el cual la mezcla se seca gracias a la evaporación en el sistema, como resultado se genera un polvo fino con un gran número de microcápsulas que se recolecta al final del proceso (Abdul *et al.*, 2021).

2.4.2.2. Secado en frío (liofilización)

La encapsulación por secado en frío o por liofilización es un método físico basado en la deshidratación mediante la exposición a baja temperatura y presión, por lo que favorece a aquellos agentes activos sensibles al calor (Abdul *et al.*, 2021; Celli *et al.*, 2015).

Inicialmente se prepara el medio de dispersión que consiste en la homogeneización del agente encapsulante y el agente activo. Posteriormente la mezcla homogénea se congela, durante este paso el agua de la muestra se cristaliza en forma de hielo obteniendo un sólido. Por último, la muestra es deshidratada por sublimación directa que inicia cuando la presión disminuye a valores inferiores a la presión de vapor del hielo con el fin de extraer la cantidad de agua total presente en la muestra dando como resultado el encapsulado compactado que después es pulverizado (Abdul *et al.*, 2021).

Aunque la prolongación del ciclo de deshidratación y la alta demanda de niveles de energía para desarrollar la liofilización sean un inconveniente, la técnica es aprovechada para la encapsulación de compuestos sensibles al calor como las antocianinas considerando que se ha demostrado la preservación de las propiedades originales de la muestra como el color, sabor, aroma y actividad biológica, además del alcance de la eficiencia del encapsulado debido a los productos obtenidos de características altamente porosos y de bajo peso a nivel microestructural, sin dejar a un lado que gracias a la falta de agua dentro del sistema es casi nula la probabilidad de crecimiento microbiano permitiendo la conservación de los productos por largos periodos de tiempo (Abdul *et al.*, 2021; Celli *et al.*, 2015).

El análisis sobre la influencia de las antocianinas en el sector alimentario revela su potencial como nutraceutico a partir de las propiedades bioactivas que poseen además de su aporte como pigmento natural. Se han evaluado diversas causas de deterioro de las antocianinas y, se ha llegado a la conclusión de encapsularlas con polisacáridos para asegurar su estabilidad durante su tratamiento. Sin embargo, la información sobre la posible estabilidad de los compuestos a través de su paso por el tracto digestivo cuando se llevan a cabo los procesos digestivos es nula, por lo cual es incierto si las antocianinas son capaces de permanecer estables debido a las múltiples variables que engloban a la digestión, por ejemplo, el pH, temperatura y tiempos de reacción. Por tal motivo, se sugiere evaluar la estabilidad de las antocianinas durante un proceso de digestión *in vitro*, para conocer el comportamiento de las antocianinas incluyendo su actividad biológica (Minekus *et al.*, 2014).

2.5. Digestión gastrointestinal *in vitro*

La simulación del proceso gastrointestinal *in vitro* es un modelo utilizado para observar el comportamiento de los alimentos a lo largo de la digestión a través de la evaluación de la bioaccesibilidad de nutrientes, es decir, la cantidad de compuestos que permanecen disponibles para su absorción en el intestino tras ser expulsados de su matriz, la cual influye en la liberación de estos micronutrientes como metabolitos secundarios, minerales y elementos traza para ser transportados durante la digestión. Por esta razón, estos modelos son de gran importancia en el estudio de alimentos ya que están relacionados con la nutrición y salud de los consumidores (Minekus *et al.*, 2014; Sensoy, 2021).

Este modelo pretende reproducir los mecanismos fisiológicos y fisicoquímicos que engloban al proceso *in vivo* por medio de un sistema que incluye los factores característicos de la digestión a los que normalmente son expuestos los sustratos a evaluar principalmente los

fluidos digestivos secretados por las glándulas salivares, glándulas gástricas, páncreas e hígado; actividad de las enzimas digestivas, pH, temperatura, tiempo de tránsito de los alimentos ingeridos y movimientos peristálticos (Minekus *et al.*, 2014; Sensoy, 2021).

A pesar de que los modelos experimentales de digestión *in vitro* son menos costosos, más rápidos, reproducibles debido a que existe un mejor control sobre las condiciones del proceso, más accesibles por la falta de limitaciones éticas y sin duda son una gran técnica para predecir la conducta de productos alimenticios en su transcurso por el sistema digestivo, también es cierto que los ensayos nutricionales realizados en humanos aún son considerados como el modelo estándar para llevar a cabo este tipo de observaciones pues en los modelos dinámicos no se toma en cuenta la relación compleja que existe habitualmente entre los alimentos y el cuerpo humano (Minekus *et al.*, 2014; Sensoy, 2021). El resultado de los alimentos al finalizar los ensayos nutricionales *in vivo* también está sujeto a la edad, género y capacidad para comer de cada persona, variaciones como la masticación, vaciado gástrico, secreción de fluidos digestivos, tiempos de tránsito gastrointestinal entre individuos pueden alterar el resultado (Gómez, 2020; Minekus *et al.*, 2014; Sensoy, 2021).

El ensayo se integra de la fase oral, gástrica e intestinal, en algunas ocasiones se considera una cuarta fase en el intestino grueso para aquellos alimentos que son más difíciles de digerir por el intestino delgado, en la cual se lleva a cabo una fermentación gracias a la labor de los microorganismos ubicados en el colon (Minekus *et al.*, 2014; Sensoy, 2021).

2.5.1. Fase Oral

De entrada, en el interior de la cavidad oral los alimentos sólidos son transformados en el bolo alimenticio para continuar con su digestión en las etapas siguientes, esto ocurre cuando los alimentos reducen su tamaño en partículas más pequeñas por la masticación y modifican su textura cuando se humedecen y lubrican con fluido salival (Minekus *et al.*, 2014; Sensoy, 2021). La saliva es un fluido segregado por las glándulas salivares que se ubican dentro de la boca, está compuesta en su mayoría por agua y el resto por sales como sodio, potasio, calcio, bicarbonato, mucina y enzimas (amilasa y lipasa lingual) (Sensoy, 2021). Simultáneamente a la formación del bolo alimenticio, la amilasa se encarga de descomponer parcialmente los almidones en disacáridos de maltosa mientras que la lipasa lingual ayuda en la descomposición de lípidos, en vista del corto tiempo de estancamiento dentro de la boca la hidrólisis es escasa impidiendo que ocurra digestión de proteínas y grasas durante esta etapa (Minekus *et al.*, 2014; Sensoy, 2021). El pH óptimo para estimular a la amilasa salival es de 6.8, su actividad enzimática termina en presencia de medios ácidos como en el estómago (Minekus *et al.*, 2014).

Esta etapa es la más corta de todo el proceso, en promedio la duración para alimentos sólidos suele ser de 1 a 2 minutos, sin embargo, puede variar a causa de otras circunstancias como la fuerza mecánica usada y los ciclos de masticación de cada individuo, incluso por las propiedades de los alimentos como su composición, cantidad, textura, estructura y viscosidad (Sensoy, 2021). Por otro lado, la ingesta de alimentos

líquidos es más rápida que los sólidos, su tránsito por el esófago se simplifica gracias a la gravedad (Minekus *et al.*, 2014; Sensoy, 2021).

2.5.2. Fase gástrica

Enseguida de la fase oral, el bolo alimenticio transita por el esófago gracias a las contracciones peristálticas hasta llegar al estómago en cuestión de segundos dando inicio con la fase gástrica. El estómago se encarga de acondicionar los alimentos para agilizar su digestión en el intestino delgado, los alimentos se acumulan en la parte superior del estómago y después son transferidos lentamente a la parte inferior a la cual se le conoce como antro (Gómez, 2020; Minekus *et al.*, 2014).

En el antro, el bolo alimenticio se muele en partículas más pequeñas por las contracciones antrales y es diluido con el jugo gástrico producido por la mucosa gástrica que comprende de agua, enzimas digestivas (pepsina y lipasa gástricas), ácido clorhídrico, hormonas (gastrina y serotonina) y electrolitos como sodio, potasio, calcio, fosfato, sulfato y bicarbonato (Sensoy, 2021). Las proteínas existentes en el bolo alimenticio se degradan en polipéptidos más cortos como consecuencia de la actividad proteolítica de la pepsina gástrica, la producción de ácido clorhídrico permite que las condiciones ácidas en el medio sean las óptimas para facilitar la acción enzimática y la desnaturalización de los alimentos. La combinación viscosa y homogénea de la digestión parcial de los alimentos que se produce en esta etapa recibe el nombre de quimo. Gracias a su cercanía con el intestino delgado, el antro se ocupa de vaciar lentamente el quimo una vez que esté listo para la siguiente etapa al duodeno del intestino delgado (Minekus *et al.*, 2014; Gómez, 2020; Sensoy, 2021).

Como se mencionó anteriormente la ingesta de alimentos sólidos es más compleja que la de alimentos líquidos, los primeros necesariamente tienen que atravesar por un proceso de homogenización que tiene una duración aproximada de una hora, mientras que los alimentos líquidos adicionados con nutrientes como proteínas, lípidos y carbohidratos son vaciados exponencialmente en un lapso de media hora. Esta fase durante el proceso *in vivo* suele durar de 1 a 4 horas generalmente, dependiendo de la forma del alimento, tiempo de vaciado gástrico y otros factores que afectan el tiempo de tránsito, por esta razón los modelos de simulación *in vitro* sugieren incubar al sustrato por 2 horas, lo que representa la mitad de tiempo de vaciado de alimentos semisólidos (Minekus *et al.*, 2014).

2.5.3. Fase Intestinal

Después de que el quimo es gradualmente vaciado desde el antro hasta el duodeno del intestino delgado, este es neutralizado con el bicarbonato emitido por la estimulación del páncreas ante la presencia del quimo en el duodeno (Sensoy, 2021). En el tránsito aproximado de 1 a 3 horas por los segmentos del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), el quimo se mezcla con bilis y jugo pancreático que se compone de enzimas específicamente lipasa y amilasa pancreáticas y proteasas como tripsina y quimotripsina

para terminar de digerir las grasas, completar la digestión de macronutrientes como las proteínas y carbohidratos restantes de las fases anteriores, con el fin de absorber la mayor cantidad de nutrientes posible (Gómez, 2020; Minekus *et al.*, 2014; Sensoy, 2021).

La vesícula biliar es la responsable de reservar la bilis producida por el hígado para simplificar la digestión y absorción de los lípidos, entre tanto, las enzimas digestivas descomponen proteínas, carbohidratos, triacilglicéridos, lípidos y ácidos nucleicos para adecuarlos en formas más pequeñas y digeribles específicamente en monosacáridos, aminoácidos, péptidos, monoacilglicéridos, gliceroles, ácidos grasos libres, fosfatos, bases nitrogenadas, azúcar pentosa, minerales y vitaminas con el propósito de facilitar la absorción de nutrientes por la pared intestinal y preservar la asimilación correcta de los mismos en nuestro organismo (Sensoy, 2021).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar la preservación de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de tres formulaciones de extracto microencapsulado de *Cosmos bipinnatus* durante un proceso de digestión *in vitro*.

3.2. Objetivos particulares

- Obtener el extracto hidroalcohólico a partir de los pétalos de *Cosmos bipinnatus*.
- Cuantificar antocianinas, fenoles y flavonoides totales, además de determinar la actividad antioxidante mediante el método de DPPH y ABTS de los extractos obtenidos.
- Encapsular por liofilización el extracto de *Cosmos bipinnatus* usando dos polímeros como material de pared en tres formulaciones diferentes.
- Someter a digestión *in vitro* los extractos encapsulados y evaluar la actividad antioxidante, azúcares reductores y antocianinas monoméricas y poliméricas durante las distintas fases del proceso.

4. Hipótesis

Los materiales de pared utilizados en la encapsulación del extracto de *Cosmos bipinnatus* permitirán la conservación de la capacidad antioxidante del extracto durante el proceso de digestión *in vitro*.

5. Materiales y Métodos

5.1. Obtención de la biomasa inicial

Las flores de girasol morado (*Cosmos bipinnatus*) fueron recolectadas durante la segunda mitad del mes de septiembre del 2023 en las inmediaciones del Campus “El Cerrillo” de la Universidad Autónoma del Estado de México. Únicamente los pétalos de las flores de girasol morado más atractivos respecto a coloración y sin deterioros fueron desprendidos de las flores para llevarlos a ultracongelar a una temperatura de -85 °C. Después fueron liofilizados y macerados hasta conseguir un polvo fino de la biomasa, el cual se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente hasta su manipulación.

5.2. Obtención del extracto hidroalcohólico a partir de la biomasa seca de *C. bipinnatus*

La extracción de los componentes de la biomasa de *Cosmos bipinnatus* se alcanzó mediante la técnica de maceración asistida por ultrasonido, usando como solvente etanol-agua en una proporción de 80:20. Se disolvieron 165 mg de biomasa seca en 10 mL del solvente agitando constantemente por 5 minutos, se colocó en baño ultrasónico a 40 °C durante 40 minutos, posteriormente se mantuvo en agitación por una hora y se filtró al vacío dos veces para eliminar cualquier material sólido. Por último, el solvente alcohólico se separó de la solución mediante evaporación con rotavapor (IKA RV10). La solución obtenida se congeló a una temperatura de -85 °C en ultracongelador como pretratamiento para someterse a liofilizar en ciclos de 24 horas de duración cada uno en tanto se logró nuevamente un polvo seco del extracto (Gallardo-Sánchez *et al.*, 2024).

5.3. Caracterización fitoquímica del extracto acuoso de *Cosmos bipinnatus*

El extracto seco de *C. bipinnatus* producido como se menciona en el punto anterior se hidrató en una relación de 60 mg del polvo del extracto seco en 10 mL de agua destilada obteniendo así el extracto en su presentación acuosa, el cual fue sometido a las diferentes pruebas fitoquímicas descritas en los siguientes apartados.

5.3.1. Antocianinas monoméricas

La cuantificación de antocianinas monoméricas se llevó a cabo mediante la técnica de pH diferencial, descrita por Giusti & Wrolstad (2001) con algunas modificaciones. Se tomaron dos alícuotas de 400 µL del extracto acuoso, a la primera se le agregaron 1.6 mL de solución buffer pH 1.0 de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M, a la segunda se le agregaron 1.6 mL de buffer pH 4.5 de acetato de sodio (CH₃CO₂Na) 0.4 M. Se dejaron incubar por 15 minutos

en oscuridad, y se realizó un barrido de 400 a 700 nm en espectrofotómetro de luz UV (Anexo 1).

5.3.2. Fenoles totales

La cantidad de fenoles totales se especificó con la técnica de Folin-Ciocalteu reportada por Carpio & Figueroa (2017) con algunas variaciones. Se tomó una alícuota de 200 µL del extracto acuoso, se agregaron 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar por 8 minutos. Después se agregaron 200 µL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 14% y 1.5 mL de agua destilada, se dejó reposar por 60 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en espectrofotómetro de luz UV (Anexo 2).

5.3.3. Flavonoides totales

Para cuantificar el contenido de flavonoides se aplicó la metodología detallada por González (2023) con algunas modificaciones. A 1000 µL del extracto acuoso se le añadieron 500 µL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% y 500 µL de agua destilada. Se incubó por 10 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 425 nm en espectrofotómetro de luz UV (Anexo 3).

5.3.4. Capacidad antioxidante mediante el método DPPH

La capacidad antioxidante se determinó mediante dos métodos, para el primero se usó el método DPPH descrito por Gallardo-Sánchez *et al.*, (2024) con algunas variaciones. A 50 µL del extracto acuoso se le adicionaron 1.95 mL de reactivo DPPH 0.1 mM diluido, después de reposar 30 minutos en oscuridad, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm en espectrofotómetro de luz UV (Anexo 4).

5.3.5. Capacidad antioxidante mediante el método de ABTS

El segundo método que se empleó para determinar la capacidad antioxidante fue el de ABTS reportado por Gallardo-Sánchez *et al.*, (2024) con algunos cambios. A 50 µL del extracto acuoso se le adicionaron 1.5 mL de la solución diluida de ABTS 7 mM, después de reposar 10 minutos en oscuridad se midió la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm en espectrofotómetro de luz UV (Anexo 5).

5.4. Microencapsulación por liofilización del extracto acuoso de *Cosmos bipinnatus*

La microencapsulación mediante la técnica de liofilización se realizó de acuerdo con la metodología expuesta por Gallardo-Sánchez *et al.*, (2024). Primeramente, se preparó una resuspensión del extracto seco previamente acondicionado, se disolvieron 60 mg de extracto seco de *C. bipinnatus* en 10 mL de agua destilada. Los materiales de pared se prepararon al 30% (p/v) de tres formulaciones, la primera con goma arábica, otra con maltodextrina y la última que consta en la combinación de los dos materiales de pared (15% goma arábica y 15% de maltodextrina), a todas las formulaciones se les adiciono el extracto resuspendido como agente a encapsular ocupando el 70% restante de la composición.

Cada formulación se homogeneizó con dispersor (IKA T 50 digital ULTRA TURRAX) a 3400 rpm en lapsos de 2 minutos con un intervalo de 1 minuto de reposo, con una duración de 15 minutos en total hasta que la mezcla fuera homogénea. La mezcla se congeló en ultracongelador a una temperatura de -85 °C para después liofilizarse en dos ciclos de 24 horas cada uno, el sólido resultante se pulverizó con mortero y se tamizo con el fin de obtener un polvo fino de cada tratamiento encapsulado.

5.4.1. Eficiencia de microencapsulación

Para calcular el porcentaje de eficiencia de los microencapsulados (EM) se utilizó la ecuación 1 descrita en la metodología de González (2023) con algunas modificaciones. Se determinó el contenido total de antocianinas monoméricas del extracto seco de *C. bipinnatus* (A_{ES}) como se explica en el apartado 3.1. Para determinar el contenido total de antocianinas monoméricas de los microencapsulados (A_M) se realizó un tratamiento previo a las muestras mencionado con mayor detalle más adelante (apartado 5.4) con el objetivo de romper las microcápsulas y cuantificar el contenido de antocianinas a partir del sobrenadante con el método puntualizado en el apartado 3.1.

$$\% EM = \frac{A_{ES} - A_M}{A_{ES}} * 100 \quad \text{ecuación 1}$$

5.4.2. Humedad

El porcentaje de humedad se determinó con el método reportado por Gallardo-Sánchez *et al.*, (2024). Se colocó 1 g exactamente de cada microencapsulado a secar en horno durante 48 horas a una temperatura de 65 °C, se aplicó la ecuación 2 para calcular el contenido de humedad, donde **PF** es el peso final después del secado y **PI** es el peso inicial antes del secado.

$$\% Humedad = \frac{PF}{PI} * 100 \quad \text{ecuación 2}$$

5.5. Evaluación de los microencapsulados del extracto de *Cosmos bipinnatus* a través de la digestión *in vitro*

Para el proceso simulado de la digestión gastrointestinal *in vitro* se siguió la metodología detallada por Gómez (2020), considerando las recomendaciones propuestas por Minekus *et al.*, (2014) y algunas variaciones. Inicialmente se prepararon las soluciones de Simulación del Fluido Salivar (SFS), Simulación de Fluido Gástrico (SFG) y Simulación del Fluido Intestinal (SFI) (Anexo 6) necesarias para el desarrollo del estudio. El ensayo se llevó a cabo en vasos de precipitado, se mantuvo la temperatura a 37 °C en baño térmico con agitación constante. Las tres formulaciones de microencapsulados descritas anteriormente y el extracto sin encapsular fueron las muestras expuestas a cada etapa del ensayo.

5.5.1. Fase oral

Para la primera fase del ensayo, en un vaso de precipitado se hidrataron 0.5 g de la muestra (microcápsulas o extracto seco de *Cosmos bipinnatus*) con 3.5 mL de SFS, se adicionó 975 µL de agua a pH 7 y 25 µL de cloruro de calcio (CaCl₂) 0.3 M, antes de agregar la amilasa hidratada con 0.5 mL de SFS (75 U/mL) se ajustó el pH de la solución con NaOH 0.1 M obteniendo un volumen total de la solución de 5 mL. La solución se mantuvo a pH 7, 37 °C y agitación constante durante 2 minutos. Se extrajo una alícuota al final de la digestión y se detuvo la reacción por congelación inmediata a -85 °C en ultracongelador la cual fue almacenada para su posterior análisis.

El grado de hidrólisis en condiciones de pH básico durante la fase oral únicamente de las formulaciones que contienen goma arábiga se calculó aplicando la ecuación 3.

$$GH = 100 \times \frac{V \times N}{m \times h_{tot}} \times \frac{1}{1 - \alpha_{NH_2}} \quad \text{ecuación 3}$$

Donde **V** es el volumen gastado de NaOH 0.05 N (mL) durante la titulación, **N** es la normalidad de la base (meq/mL), **m** es la masa de la proteína (g), **h_{tot}** es el número de enlaces peptídicos por gramo de proteína y α_{NH_2} es el grado de disociación promedio calculado a partir de la ecuación 4.

$$\alpha_{NH_2} = \frac{10^{pH - pK_A(NH_2)}}{1 + 10^{pH - pK_A(NH_2)}} \quad \text{ecuación 4}$$

Donde **pH** es la concentración de iones hidrógeno y **pK_A** es el logaritmo negativo de la constante de disociación básica.

5.5.2. Fase gástrica

La solución resultante de la fase anterior, conocida como bolo oral, se mezcló con 3.75 mL de SFG, 2.5 µL de cloruro de calcio (CaCl₂) 0.3 M y 447.5 µL de agua a pH 3. El pH de la

solución descendió a 3 debido a la adición de HCl 0.1 M con el fin de incorporar pepsina porcina hidratada con 0.8 mL de SFG (2000 U/mL), alcanzando un volumen final de 10 mL. Después de 2 horas de reacción en que la solución permaneció a pH 3, 37 °C y en agitación constante, se tomó una muestra para detener la reacción por congelación inmediata a -85 °C en ultracongelador para pruebas posteriores.

El grado de hidrólisis en condiciones de pH ácido durante la fase gástrica únicamente de las formulaciones que contienen goma arábica se calculó aplicando la ecuación 5.

$$GH = 100 \times \frac{V \times N}{m \times h_{tot}} \times \frac{1}{1 - \alpha_{COOH}} \quad \text{ecuación 5}$$

Donde **V** es el volumen gastado de HCl 0.05 N (mL) durante la titulación, **N** es la normalidad del ácido (meq/mL), **m** es la masa de la proteína (g), **h_{tot}** es el número de enlaces peptídicos por gramo de proteína y α_{COOH} es el grado de disociación promedio calculado a partir de la ecuación 6.

$$\alpha_{COOH} = \frac{10^{pH - pK_A(COOH)}}{1 + 10^{pH - pK_A(COOH)}} \quad \text{ecuación 6}$$

Donde **pH** es la concentración de iones hidrógeno y **pK_A** es el logaritmo negativo de la constante de disociación ácida.

5.5.3. Fase intestinal

En la última fase del ensayo, al producto de la digestión previa denominado quimo gástrico, se le añadieron 3.375 mL de SFI, 10 µL de cloruro de calcio (CaCl₂) 0.3 M y 365 µL de agua a pH 7, seguido de NaOH 0.1 M hasta neutralizar a un pH 7 para integrar pancreatina hidratada previamente con 1.25 mL de SFI (100 U/mL), sumando un volumen final de 10 mL. El tiempo de reacción fue de 2 horas, en que la suspensión se mantuvo a pH 7, 37 °C y agitación constante, por último, se separó una parte de la suspensión para detener la reacción por congelación inmediata a -85 °C en ultracongelador para su posterior análisis.

El grado de hidrólisis en condiciones de pH básico durante la fase intestinal únicamente de las formulaciones que contienen goma arábica se calculó aplicando la ecuación 3 explicada en el apartado 5.1.

5.5.4. Evaluación de la actividad antioxidante y liberación de compuestos bioactivos de los microencapsulados durante la digestión *in vitro*

Las muestras colectadas durante las diferentes etapas de la simulación gastrointestinal recibieron un procedimiento previo con la finalidad de romper por completo las partículas del encapsulado. El procedimiento consistió en mezclar la muestra con un disolvente específico para cada material de pared, en el caso de las formulaciones con goma arábica se utilizó hexano-isopropanol (3:1) y para maltodextrina se usó agua destilada, se homogeneizó la mezcla en vórtex y centrifugó a 3400 rpm durante 5 minutos. El proceso se

duplicó con el sobrenadante obtenido, el cual fue analizado posteriormente para determinar la cantidad de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.

5.5.4.1. Determinación de la actividad antioxidante de los microencapsulados digeridos mediante el método de ABTS

Para determinar la actividad antioxidante de las muestras se aplicó el método de ABTS detallado por Gallardo-Sánchez *et al.*, (2024) con algunas modificaciones. A 50 μ L de la muestra se le agregaron 1.5 mL de la solución diluida de ABTS 7 mM, se homogeneizó y se dejó en reposo por 10 minutos en oscuridad, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm en espectrofotómetro de luz UV (Anexo 5).

5.5.4.2. Cuantificación de antocianinas monoméricas

El contenido de antocianinas monoméricas se cuantificó con el método de pH diferencial, reportado por Giusti & Wrolstad (2001) con algunos cambios. Se tomaron dos alícuotas de 400 μ L de la muestra, a una se le adicionaron 1.6 mL de solución buffer pH 1.0 de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M, a la otra se le adicionaron 1.6 mL de buffer pH 4.5 de acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$) 0.4 M. Después de 15 minutos de reposo en oscuridad se realizó un barrido de 400 a 700 nm en espectrofotómetro de luz UV (Anexo 1).

5.5.4.3. Cuantificación de antocianinas poliméricas

Para definir la cantidad de antocianinas monoméricas se determinó el color polimérico con el método descrito por Giusti & Wrolstad (2001) con ligeras variaciones. Se tomaron dos alícuotas de 1.4 mL de la muestra, a una se le adicionaron 100 μ L de bisulfito de potasio al 20% y a la otra 100 μ L de agua destilada, se dejó reposar por 15 minutos en oscuridad y se realizó un barrido de 400 a 700 nm en el espectrofotómetro de luz UV (Anexo 7).

5.5.4.4. Cuantificación de azúcares reductores

La cantidad de azúcares reductores se estableció a través del método ácido dinitrosalicílico (DNS) de acuerdo con la metodología presentada por Burgos (2020) con algunos cambios. Se añadieron 125 μ L de la muestra y 125 μ L del reactivo DNS 96 mM, después de homogeneizar se colocó en un baño de agua caliente durante 5 minutos seguido de un baño de hielos por otros 5 minutos, se agregaron 1.25 mL de agua destilada, se homogeneizó y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en espectrofotómetro de luz UV (Anexo 8).

5.6. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias (LSD de Fisher) con un nivel de confianza de 95% ($p < 0.05$) mediante el software Statgraphics Centurion 18.

6. Resultados y discusión

6.1. Obtención del extracto hidroalcohólico a partir de la biomasa seca de *C. bipinnatus*

Como resultado de la extracción mediante la técnica de maceración asistida con ultrasónico y posterior a un proceso de liofilización, se obtuvo un polvo fino con tonalidades púrpuras. Con base en la condición termosensible de los compuestos de interés se optó por llevar a cabo una extracción mínimamente invasiva empleando temperaturas debajo de los 40 °C, en oscuridad debido a la inestabilidad por la luz que presentan dichos compuestos. Los tiempos de extracción se redujeron con la asistencia del ultrasonido hasta 22 horas menos según lo reportado por Jasti *et al.*, 2022 lo que mejoró la preservación de los compuestos bioactivos, comparado con otros procesos de extracción (Alappat & Alappat, 2020; Jasti *et al.*, 2022).

6.1.1. Composición fitoquímica del extracto de *Cosmos bipinnatus*

Investigaciones previas sobre la composición fitoquímica de *Cosmos bipinnatus* revelan un contenido significativo de compuestos fenólicos en diferentes partes de la planta, particularmente en los pétalos de las flores se han reportado con mayor abundancia los flavonoides (Amamiya & Iwashina, 2016; Bijani *et al.*, 2021; Jasti *et al.*, 2022), además de flavonas, antocianinas y chalconas, estas últimas son ligeramente insolubles en agua por lo cual precipitan en la superficie del extracto acuoso (Bhuiyan & Nahid, 2023).

De acuerdo con los estudios preexistentes sobre la especie se realizaron pruebas cuantitativas para conocer la cantidad de antocianinas, fenoles y flavonoides presentes en los pétalos, de igual manera se evaluó la actividad antioxidante por su relación directa con el contenido fenólico presente en el extracto de la biomasa recolectada (Bhuiyan & Nahid, 2023). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de compuestos fitoquímicos del extracto acuoso de *Cosmos bipinnatus*.

Parámetro	Resultado
Antocianinas monoméricas (mg Cyn-3-glu/g de extracto seco)	0.93 ± 0.06
Fenoles totales (mg EAG/g de extracto seco)	86.88 ± 0.06
Flavonoides totales (mg EQ/g de extracto seco)	76.66 ± 0.01
Capacidad antioxidante por DPPH (% de inhibición)	88.70 ± 1.55
Capacidad antioxidante por ABTS (% de inhibición)	93.71 ± 2.63

Abreviaturas: Cyn-3-glu: cianidina-3-glucósido; EAG: equivalentes de ácido gálico; EQ: equivalentes de quercetina.

A simple vista el atractivo de las flores de *Cosmos bipinnatus* es la coloración púrpura que poseen, este fenómeno se debe al contenido de antocianinas en ellas, algunos estudios señalan que cianidin-3-glucósido es la más común dentro de la especie (Amamiya & Iwashina, 2016; Bhuiyan & Nahid, 2023). De acuerdo con el estudio reportado por Gallardo-Sánchez *et al.*, (2024) del cual se siguió la misma técnica de extracción, alcanzaron un valor de antocianinas tres veces más alto (3.96 mg Cyn-3-glu/g de extracto seco) comparado con el revelado en este estudio (Tabla 1), lo opuesto al contenido de flavonoides donde se encontró un contenido mayor en el presente estudio (76.66 mg EQ/g extracto seco) en contraste con 52.40 mg EQ/g de extracto seco (Gallardo-Sánchez *et al.*, 2024) y 44 mg EQ/g de extracto seco obtenido por Jasti *et al.*, (2022) en el que emplearon una extracción de Soxhlet y rotavapor con etanol como solvente a partir de las flores de *C. bipinnatus*. Con la metodología propuesta por Ortega-Medrano *et al.*, (2023) la cual consistió en suspender la biomasa seca de *Cosmos sulphureus* en etanol, se obtuvieron 82.60 mg EAG/g de extracto seco, un valor semejante obtenido en este estudio (Tabla 1) a pesar de las diferentes variedades analizadas, tienen cierta similitud. Las diferencias entre los valores consultados y los obtenidos pueden deberse a la diferencia geográfica donde se desarrolló la especie, así como el periodo de tiempo en que se recolectó el material vegetal, sin embargo, los valores alcanzados demuestran que la técnica empleada para la extracción de los compuestos bioactivos de *Cosmos bipinnatus* mejoran la preservación de estos comparado con otras técnicas y solventes (Alappat & Alappat, 2020; Jasti *et al.*, 2022).

La alta capacidad antioxidante de la especie se demostró con los porcentajes de inhibición obtenidos mediante ambos métodos aplicados en el estudio como se observa en la Tabla 1, con el método ABTS se alcanzó un porcentaje más alto (93.71%) que el obtenido con DPPH (88.70%), un valor mayor que el reportado por Jasti *et al.*, (2022) (52.87%) utilizando el mismo método DPPH a partir del extracto alcohólico de las flores de *Cosmos bipinnatus*. Dichos valores podrían estar relacionados con el amplio contenido de compuestos fenólicos presentes, de los cuales se presume su capacidad para disminuir los efectos provocados por radicales libres, es decir, propiedad antioxidante (Bijani *et al.*, 2021; Jasti *et al.*, 2022).

6.2. Extracto de *Cosmos bipinnatus* microencapsulado mediante liofilización

En vista del potencial de *Cosmos bipinnatus* como fuente vegetal para la extracción de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante de gran interés aplicados en diferentes campos industriales, como las antocianinas, uno de los compuestos con mayor presencia en la especie, se llevó a cabo la microencapsulación del extracto con el fin de garantizar la protección de los compuestos ya que suelen ser inestables ante diversos factores (Alappat & Alappat, 2020; Cortez *et al.*, 2017).

La exposición a temperaturas altas es una causa que acelera la degradación de las antocianinas y otros compuestos fenólicos, atendiendo esta condición se decidió encapsular el extracto mediante la técnica de liofilización, en la que se necesita de bajas temperaturas para desarrollar el proceso. Tras dos ciclos de 24 horas cada uno, se consiguió un polvo fino para las tres formulaciones de microencapsulado, con porcentajes de eficiencia de microencapsulación de 91.28 % en el caso de la formulación extracto-maltodextrina, 91.14 % para el extracto-maltodextrina-goma arábica y 87.16 % para el

extracto-goma arábica como se muestra en la Tabla 2, analizando estos datos se estima que la maltodextrina tiene potencial como material encapsulante para brindar mayor protección que la goma arábica, además de retener menor cantidad de agua de acuerdo con el porcentaje de humedad expuesto en la Tabla 2 de ambas formulaciones (E-MD y E-MD-GA) respecto a E-GA, un porcentaje de humedad bajo favorece la preservación de los productos manteniendo su estabilidad durante tiempos prolongados al evitar la liberación prematura de los compuestos o su degradación (Celli *et al.*, 2015).

Tabla 2. Caracterización de los microencapsulados del extracto de *Cosmos bipinnatus*.

Parámetro	E-MD	E-GA	E-MD-GA
Eficiencia de microencapsulación (%)	91.28 ± 0.20 ^a	87.16 ± 4.15 ^a	91.14 ± 0.58 ^a
Humedad (%)	0.92	2.50	1.13

Las letras superíndice diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Abreviaturas: E-MD: extracto-maltodextrina; E-GA: extracto-goma arábica; E-MD-GA: extracto-maltodextrina-goma arábica.

6.3. Evaluación de los microencapsulados durante la digestibilidad *in vitro*

El ensayo se seccionó en tres etapas importantes, en todas ellas se mantuvo una temperatura de 37 °C y agitación constante en un baño térmico con el fin de mantener las condiciones (temperatura y movimientos peristálticos) en las que normalmente se lleva a cabo el proceso de digestión *in vivo* en el cuerpo humano. En cada etapa se ajustó el pH de acuerdo con las optimizaciones establecidas para el buen funcionamiento de las enzimas digestivas usadas respectivamente en cada fase. Al término de cada fase se extrajo una alícuota de la solución final la cual se ultracongeló a una temperatura de -86 °C para detener la reacción enzimática. Posteriormente con las alícuotas colectadas se realizaron análisis de cuantificación de antocianinas monoméricas y poliméricas, cuantificación de azúcares reductores y la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS con el objetivo de analizar la bioaccesibilidad de los compuestos de interés durante la simulación gastrointestinal para todas las formulaciones.

En virtud de la nula presencia de proteínas en *Cosmos bipinnatus* (Jasti *et al.*, 2022), y la poca cantidad de proteínas en la estructura de la maltodextrina aplicada como material de pared en el estudio, únicamente se calculó el grado de hidrólisis a través de las ecuaciones 3 y 5 (explicadas en los apartados 5.1 y 5.2), según sea el caso, de las formulaciones con goma arábica (extracto-goma arábica (E-GA) y extracto-maltodextrina-goma arábica (E-MD-GA)).

6.3.1. Fase oral

En la Tabla 3 se expone el grado de hidrólisis alcanzado por las formulaciones antes mencionadas durante la primera etapa de la simulación gastrointestinal, la fase oral, supervisada cada minuto durante el tiempo corto de reacción (2 minutos). El mayor grado de hidrólisis lo consiguió la mezcla de los dos materiales encapsulantes (goma arábica con maltodextrina) en el primer minuto, a pesar de ello el porcentaje de hidrólisis de ambas formulaciones es menor al 1% por lo tanto no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Durante esta etapa inicia la descomposición de almidones y otros carbohidratos que componen a los materiales de pared debido a la presencia de la amilasa en el sistema, esta enzima es responsable de romper enlaces de almidón convirtiendo a la molécula en oligosacáridos más pequeños como maltosa y dextrinas (Aleixandre, 2022; Sensoy, 2021; Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020), lo que se logra es una digestión parcial de estos complejos por el poco tiempo de incubación esperando que se concluya en las siguientes fases para retener el mayor tiempo posible los compuestos bioactivos atrapados en las microcápsulas y la liberación de estos ocurra en la parte intestinal donde se espera que sean absorbidos y transportados a las diferentes partes del cuerpo para cumplir con las propiedades funcionales de interés.

Como la maltodextrina es un subproducto de la hidrólisis del almidón y la goma arábica se compone en su mayoría de carbohidratos (González, 2023) puede explicarse que el grado de hidrólisis fuera mayor en E-MD-GA ya que hay más sustrato para facilitar la reacción de la enzima en comparación con E-GA. Sin embargo, en el punto final las dos formulaciones obtuvieron el mismo porcentaje de hidrólisis, dando paso a la siguiente etapa de la simulación gástrica.

Tabla 3. Grado de hidrólisis (%) de las formulaciones: extracto-goma arábica (E-GA) y extracto-maltodextrina-goma arábica (E-MD-GA) durante la fase oral.

Tiempo (min.)	Grado de hidrólisis (%)	
	E-GA	E-MD-GA
0	0 ^a	0 ^a
1	0.52 ± 0.01 ^a	0.94 ± 0.37 ^a
2	0.25 ± 0.05 ^a	0.24 ± 0.08 ^a

Las letras superíndice diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

6.3.2. Fase gástrica

En la Figura 1 se observa la cinética del grado de hidrólisis de los microencapsulados con goma arábica (extracto-goma arábica (E-GA) y extracto-maltodextrina-goma arábica (E-MD-GA)) a lo largo de la etapa gástrica de la simulación *in vitro*. Del mismo modo que en la fase anterior, el extracto-maltodextrina-goma arábica (E-MD-GA) obtuvo un grado de hidrólisis mayor en comparación con la otra formulación, alcanzado un punto máximo cercano al 6% en los primeros 10 minutos de la etapa, durante el resto se registraron

algunos puntos debajo del 1% de manera constante antes de los 40 minutos de la digestión y después cada cierto tiempo, al final de la etapa no se reconoció más actividad por parte de la enzima manteniendo la hidrólisis en 0%. El extracto-goma arábica (E-GA) tuvo un comportamiento similar a la primera formulación durante toda la etapa, el punto más alto que consiguió fue casi del 3%, por lo que se tienen diferencias estadísticas entre los tratamientos y el tiempo de reacción ($p < 0.05$).

A lo largo de esta etapa se percibió una digestión superior a la presentada en la parte anterior, esto se debe principalmente a la diferencia en los tiempos de reacción, también a la adición de ácido clorhídrico en la solución que además de adaptar las condiciones para estimular el funcionamiento de la pepsina, la cual se activa en condiciones de acidez, acelera la descomposición de las proteínas. La finalidad de este proceso es efectuar el rompimiento de enlaces peptídicos de las proteínas presentes en los estructurados para obtener partículas menos complejas de fácil absorción como aminoácidos a través de la acción enzimática de la pepsina, este fenómeno es de suma importancia para definir la conservación de los microencapsulados a partir del deterioro de los materiales de pared, además de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos y su disponibilidad para ser absorbidos en la fase siguiente (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020).

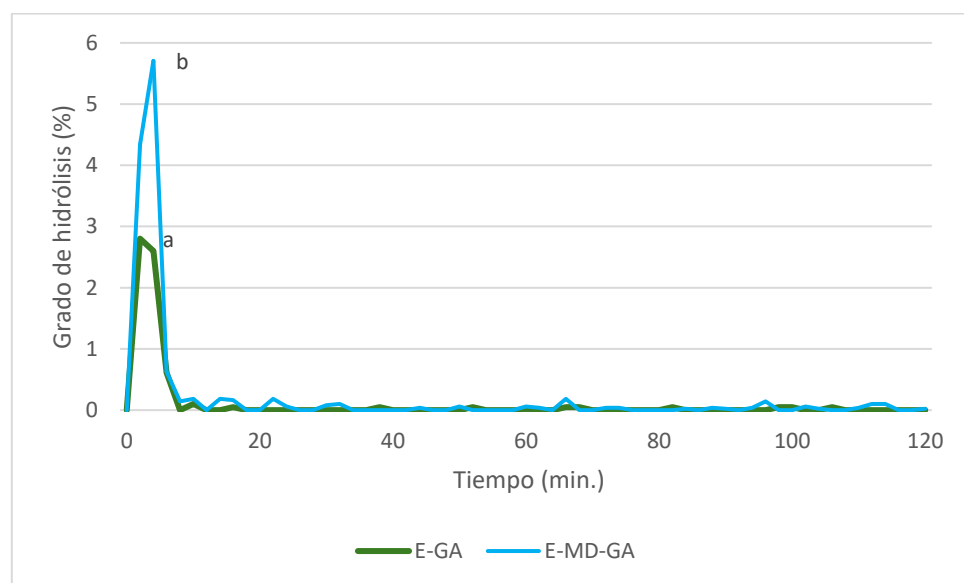


Figura 1. Grado de hidrólisis (%) de las formulaciones: Extracto-Goma arábica (E-GA) y Extracto-Maltodextrina-Goma arábica (E-MD-GA) durante la fase gástrica. Las letras (a, b) diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

6.3.3. Fase Intestinal

La Figura 2 muestra la hidrólisis de los tratamientos extracto-goma arábica (E-GA) y extracto-maltodextrina-goma arábica (E-MD-GA) en el transcurso de la simulación de la digestión intestinal, en esta se percibe un resultado inferior a los obtenidos en el periodo gástrico (Figura 1), incluso que el registrado en la primera fase (Tabla 1) lo que significa

que la digestión de los tratamientos pudo completarse en los ciclos previos y solo una limitada cantidad de compuestos logra mantenerse aún en la suspensión. Los puntos revelados en el gráfico de la Figura 2 demuestran la escasa actividad enzimática de la pancreatina sobre los microencapsulados en los cuales existen diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.05$), los tratamientos alcanzaron su punto máximo de hidrólisis en los 10 minutos iniciales de la reacción, mientras que E-MD-GA se posicionó entre 0.6 y 0.7%, E-GA solo obtuvo un 0.4%, a partir de este lapso únicamente se reportaron unos cuantos puntos más por debajo del 0.1% en 25 minutos, posteriormente la reacción continuó sin presencia de actividad enzimática indicando que la digestión de los compuestos a cargo de la pancreatina finalizó.

Con la etapa intestinal se pretende completar la descomposición de los agregados en unidades más pequeñas con el fin de que la absorción de los nutrientes sea más accesible por la pared intestinal para posteriormente transportarse por el torrente sanguíneo a diferentes sitios funcionales del cuerpo humano (Sensoy, 2021), este fenómeno se desarrolla gracias a la labor de la pancreatina. Productos derivados del almidón, en este caso la maltodextrina llega a degradarse en glucosa en forma de maltosa e isomaltosa (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020) lo mismo pasa con los carbohidratos que componen a la goma arábiga (Sensoy, 2021).

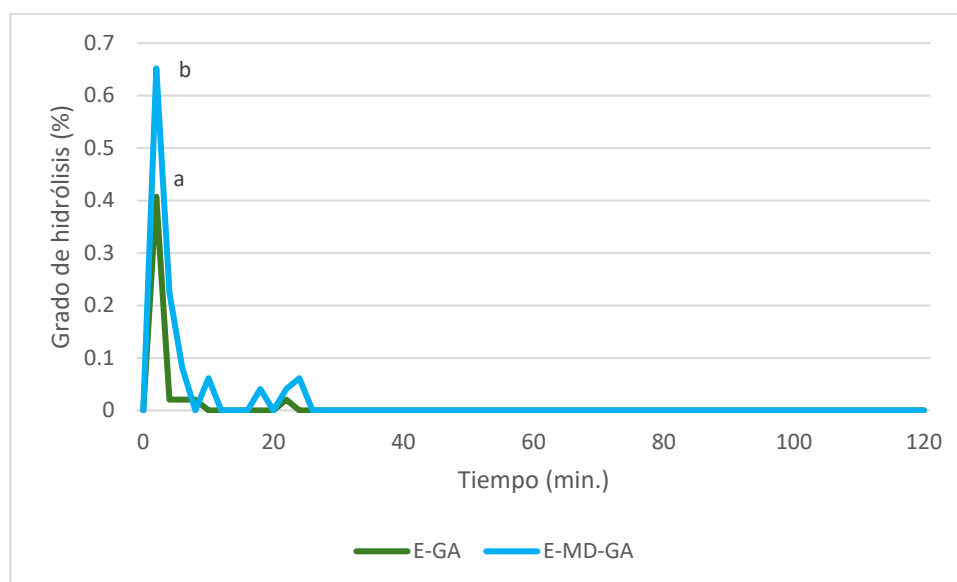


Figura 2. Grado de hidrólisis (%) de las formulaciones: Extracto-Goma arábiga (E-GA) y Extracto-Maltodextrina-Goma arábiga (E-MD-GA) durante la fase intestinal. Las letras (a, b) diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Desde la parte inicial del ensayo hasta el final de este se percibió que, E-MD-GA tenía porcentajes superiores a los de E-GA, sugiriendo que la goma arábiga en conjunto con maltodextrina para la formulación de microcápsulas incita una mayor degradación enzimática de los mismos, además de que la goma arábiga por sí sola es compleja de digerir. Los estudios sobre el comportamiento de la goma arábiga y la maltodextrina durante el proceso de digestión son escasos, sin embargo, se ha reportado su eficiencia en técnicas

de microencapsulación para la conservación de compuestos bioactivos, principalmente compuestos fenólicos (Čujić-Nikolić *et al.*, 2018).

6.3.4. Evaluación de la actividad antioxidante y liberación de compuestos bioactivos de los microencapsulados de *C. bipinnatus* a través de la digestión *in vitro*

A raíz del tratamiento previo que recibieron las muestras tomadas al final de cada etapa de la simulación gastrointestinal, se logró la ruptura total de las microcápsulas eliminando por completo los restos de los materiales de pared que cubrían a los compuestos bioactivos de interés, de esta manera se aseguró que no existiera interferencias en las lecturas analizadas con el espectrofotómetro de luz UV. Las alícuotas de todos los tratamientos tomadas durante el ensayo se analizaron en conjunto con un punto inicial (punto 0) que se refiere a la cuantificación de compuestos antes de la digestión.

6.3.4.1. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS

La capacidad antioxidante de las tres formulaciones de microencapsulados (E-MD, E-GA y E-MD-GA), además del extracto seco sin encapsular de *C. bipinnatus* se determinaron de acuerdo con el método ABTS (apartado 3.5) reportando los valores obtenidos como porcentaje de inhibición mostrados en la Figura 3. Mediante el gráfico presentado se analizó la actividad antioxidante de las cuatro muestras estudiadas evidenciando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, lo que indica que la actividad antioxidante depende del tratamiento de encapsulación y las condiciones digestivas en las que ocurre cada etapa del ensayo. En la Figura 3 se observa que el extracto seco sin encapsular de *C. bipinnatus* tuvo mayores porcentajes de actividad antioxidante durante la mayoría de las etapas contempladas, esto puede deberse a la saturación de la concentración del polvo dentro del sistema en comparación con los microencapsulados, sin embargo, de las tres formulaciones, E-MD-GA fue la que obtuvo mejores porcentajes de actividad antioxidante.

En el punto inicial, es decir, antes de la digestión, el extracto seco se encuentra arriba del 80%, E-GA y E-MD-GA tienen un valor similar por arriba del 60%, siendo E-MD-GA mayor que la otra y E-MD es la formulación que presenta menor porcentaje alcanzando apenas el 20%. En la primera fase del estudio, la fase oral, el E-MD-GA registró el porcentaje más alto no solo de esta etapa sino de todo el proceso alcanzando el 100% mientras que E-MD fue la formulación más baja con el 40%. En la fase gástrica las tres formulaciones se encuentran dentro del mismo rango debajo del 20% donde sobresale la formulación E-MD con muy poca diferencia entre ellas. Por último, en la fase intestinal, E-GA se encuentra muy por debajo de las otras dos formulaciones obteniendo menos del 10% de actividad antioxidante.

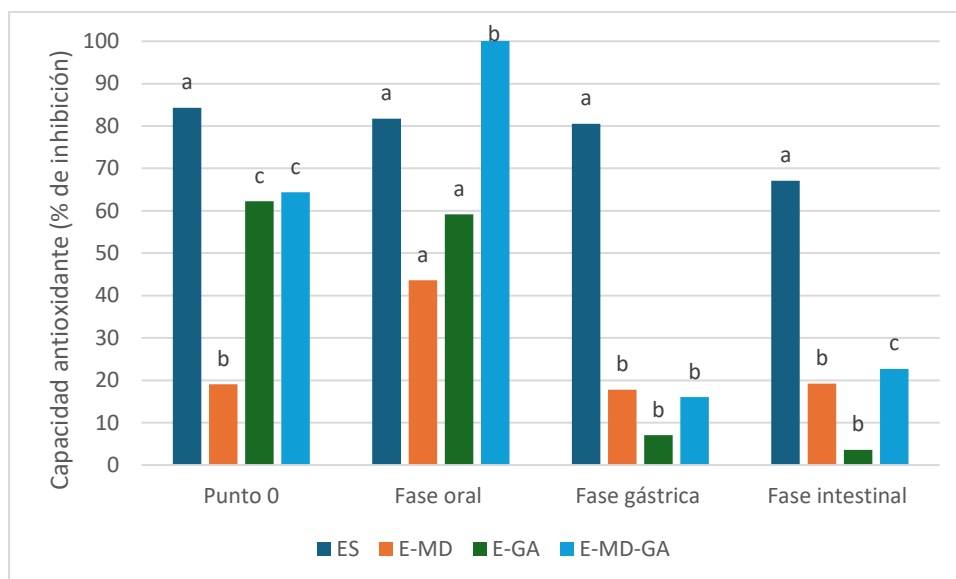


Figura 3. Determinación de la capacidad antioxidante por método ABTS (% de inhibición) del extracto seco (ES) y los microencapsulados: extracto-maltodextrina (E-MD), extracto-goma arábica (E-GA) y extracto-maltodextrina-goma arábica (E-MD-GA) antes de la simulación gastrointestinal (Punto 0) y durante las diferentes etapas del ensayo (Fase oral, Fase gástrica y Fase intestinal). Las letras (a, b, c) diferentes en la misma etapa del ensayo indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

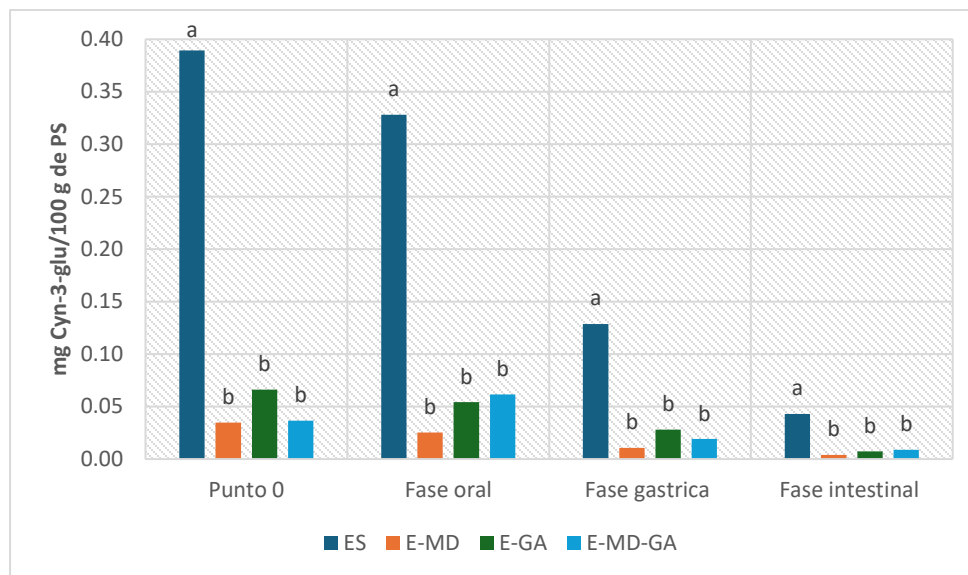
Una de las etapas que registró menor actividad antioxidante fue la fase gástrica que se llevó a cabo en condiciones ácidas, las cuales pueden afectar la hidrólisis de los compuestos de manera negativa perjudicando la capacidad antioxidante que pudieran tener (González, 2023), sin embargo, se ha reportado que los compuestos antioxidantes actúan diferente tanto en condiciones de pH ácidas como alcalinas teniendo una mejor capacidad de eliminación de radicales libres en ambientes neutros (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020), como se observa durante la primera etapa del ensayo, en la cual se percibe una alta actividad antioxidante que también puede deberse al tiempo limitado de interacción entre los componentes del sistema. Lo mismo ocurre al final de la digestión, aunque no se observa la misma actividad antioxidante que al inicio del proceso, hay un incremento después de lo reportado en la fase gástrica, excepto con la formulación E-GA la cual está por debajo de las otras dos formulaciones en ambas etapas.

La actividad antioxidante se asocia con la cantidad de compuestos fenólicos, en este estudio se analizaron las antocianinas, que derivado de la estructura que presentan en consecuencia del valor de pH esta actividad puede incrementar o disminuir (Oliveira *et al.*, 2019), la cantidad de compuestos y su relación con la capacidad antioxidante registrada se reporta en el siguiente apartado.

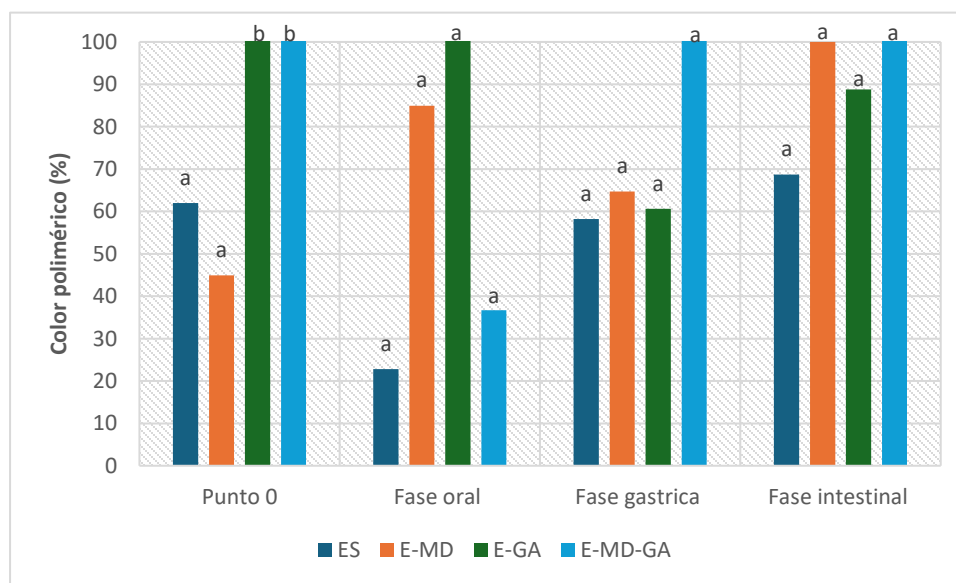
6.3.4.2. Cuantificación de antocianinas monoméricas y poliméricas

La Figura 4 presenta el contenido de antocianinas monoméricas (Figura 4A) y poliméricas (Figura 4B) previo y durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de las tres formulaciones: extracto-maltodextrina (E-MD), extracto-goma arábica (E-GA) y extracto-maltodextrina-goma arábica (E-MD-GA), además del extracto sin encapsular de *C. bipinnatus* obedeciendo la metodología descrita en los apartados 5.4.2 y 5.4.3.

En todas las fases del estudio analizadas se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. El extracto sin encapsular domina el contenido de antocianinas monoméricas durante toda la simulación gastrointestinal, incluso antes de esta difiriendo significativamente de los encapsulados. Previo al ensayo de digestión *in vitro* la formulación E-GA tiene mayor cantidad de antocianinas monoméricas (encima de 0.05 mg Cyn-3-glu/100 g de peso seco) que el resto, lo contrario a la etapa inicial donde el número de antocianinas de esta formulación disminuye mientras que el de E-MD-GA incrementa reportando un valor arriba del 0.05 mg Cyn-3-glu/100 g de peso seco. Aunque en la etapa gástrica la concentración de antocianinas monoméricas determinadas en E-GA disminuye, esta formulación es la que registra una mayor concentración a las demás cercana al 0.05 mg Cyn-3-glu/100 g de peso seco. En el caso del punto final, se muestra una disminución de antocianinas monoméricas en todos los tratamientos incluido el extracto sin encapsular, menor al 0.05 mg Cyn-3-glu/100 g de peso seco, los tratamientos E-GA y E-MD-GA presentan un contenido similar entre ellos dejando por debajo al tratamiento E-MD. En resumen, la porción de antocianinas monoméricas analizadas a cuatro tiempos diferentes no supera el 0.05 mg Cyn-3-glu/100 g de peso seco en las formulaciones a diferencia del extracto sin encapsular, lo que indica que los compuestos bioactivos podrían estar formando complejos de mayor tamaño entre ellos mismos o con otros compuestos presentes en el mismo sistema, proceso al que se le conoce como polimerización, expresado en la Figura 4B donde se expone un considerable número de antocianinas poliméricas sobre las que se encontraron de manera individual (Figura 4A), sin embargo, durante todo el ensayo no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).



A) Contenido de antocianinas monoméricas (mg Cyn-3-glu/100 g de peso seco).



B) Contenido de antocianinas poliméricas (% color polimérico).

Figura 4. Cuantificación de antocianinas monoméricas y poliméricas del extracto seco (ES) y los microencapsulados: extracto-maltodextrina (E-MD), extracto-goma arábica (E-GA) y extracto-maltodextrina-goma arábica (E-MD-GA) antes de la simulación gastrointestinal (Punto 0) y durante las diferentes etapas del ensayo (Fase oral, Fase gástrica y Fase intestinal). Las letras (a, b) diferentes en la misma etapa del ensayo indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Abreviaturas: Cyn-3-glu: cianidina-3-glucósido; PS: peso seco.

En la Figura 4A se mostró que el extracto no encapsulado contenía el mayor número de antocianinas monoméricas durante todo el estudio en relación con el contenido en los encapsulados, caso contrario con respecto a las poliméricas, el tratamiento que incluye a los dos materiales de pared (E-MD-GA) registra una cantidad superior de antocianinas poliméricas alcanzando el 100% del color polimérico presente en la mayoría de los puntos muestreados, excepto durante la etapa oral en la cual se observa una disminución cercana al 40%. En el caso de E-GA obtiene el pico más grande en la etapa oral alcanzando el 100%, 60% en la etapa media y el 80% en la etapa final. Por otro lado, la formulación con maltodextrina (E-MD) registra su punto menor antes de la digestión (40%) y el mayor durante la fase intestinal exactamente del 100%. La capacidad de compuestos bioactivos como las antocianinas de unirse mediante enlaces a grupos diferentes o semejantes a ellas produciendo de esta manera complejos que les otorguen estabilidad surge como mecanismo de defensa ante la exposición a factores que tienden a acelerar su degradación como pH y temperatura, mismos parámetros que influyen en el desarrollo de la digestión gastrointestinal. La pérdida de fitoquímicos de esta clase analizada en el presente estudio está asociada con los cambios en el pH del sistema, actividad enzimática sobre los materiales de pared que los recubren y la exposición prolongada a temperaturas altas recordando que estos compuestos son altamente sensibles al calor, resultando en la hidrólisis y la transformación en la estructura de las moléculas (González, 2023; Oliveira *et al.*, 2019; Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020).

Algunos autores reportan sobre la digestión de compuestos fenólicos un descenso en el contenido de antocianinas individuales específicamente en la etapa intestinal a causa del medio alcalino, la disposición de oxígeno y presencia de iones metálicos de transición en el transcurso del proceso lo que incita a la oxidación de estos compuestos, a diferencia de la parte gástrica en la cual se conservan mayormente debido a las condiciones ácidas (Čujić-Nikolić *et al.*, 2018; Peanparkdee & Iwamoto, 2020; Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020). Tal oxidación o degradación logró percibirse a simple vista durante la simulación gastrointestinal dependiendo de los valores de pH de cada etapa según la coloración que presentó la solución, bajo condiciones ácidas (etapa gástrica) las antocianinas expresaron tonalidades rosáceas donde estructuralmente predominó el catión flavilio, mientras que en los escenarios alcalinos (etapa oral e intestinal) el catión se deterioró transformándose en la pseudobase chalcona incolora la cual manifestó coloraciones verde-marrón (McDougall *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2019; Peanparkdee & Iwamoto, 2020).

6.3.4.3. Cuantificación de azúcares reductores

Como parte del estudio de la degradación de los materiales de pared a través de la digestión de las formulaciones extracto-maltodextrina (E-MD), extracto-goma arábica (E-GA) y extracto-maltodextrina-goma arábica (E-MD-GA) se realizó un análisis para determinar la cantidad de azúcares reductores en relación con la hidrólisis de estos, el extracto sin encapsular (ES) fue sometido a la misma prueba. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de todas las fases analizadas ($p < 0.05$).

Antes de la simulación de la digestión, es decir, en el punto 0 el contenido de azúcares reductores del extracto de *C. bipinnatus* sin encapsular es el más alto entre las cuatro muestras, próximo a 600 mg EGlu/100 g de peso seco dejando en último lugar a E-GA (contenido cercano a los 50 mg EGlu/100 g de peso seco). El extracto-maltodextrina concluye la primera fase obteniendo el valor mayor de azúcares reductores aproximadamente de 800 mg EGlu/100 g de peso seco, a continuación, se encuentran E-MD-GA y el extracto no encapsulado con valores cercanos entre sí de 500 mg EGlu/100 g de peso seco, por último, se encuentra el E-GA arriba de 100 mg EGlu/100 g de peso seco. Al final de la fase gástrica se observó un comportamiento similar al punto anterior con menores cantidades, donde el E-MD alcanzó más de 200 mg EGlu/100 g de peso seco mientras que en el E-GA se determinó un contenido debajo de 50 mg EGlu/100 g de peso seco. De igual manera en la etapa terminal del ensayo la formulación E-MD reporta una cantidad de azúcares reductores arriba de 100 mg EGlu/100 g de peso seco, seguido de los tratamientos E-MD-GA y extracto seco con valores similares alrededor de 60 mg EGlu/100 g de peso seco, seguido de la formulación E-GA el cual apenas alcanza los 20 mg EGlu/100 g de peso seco (figura 5).

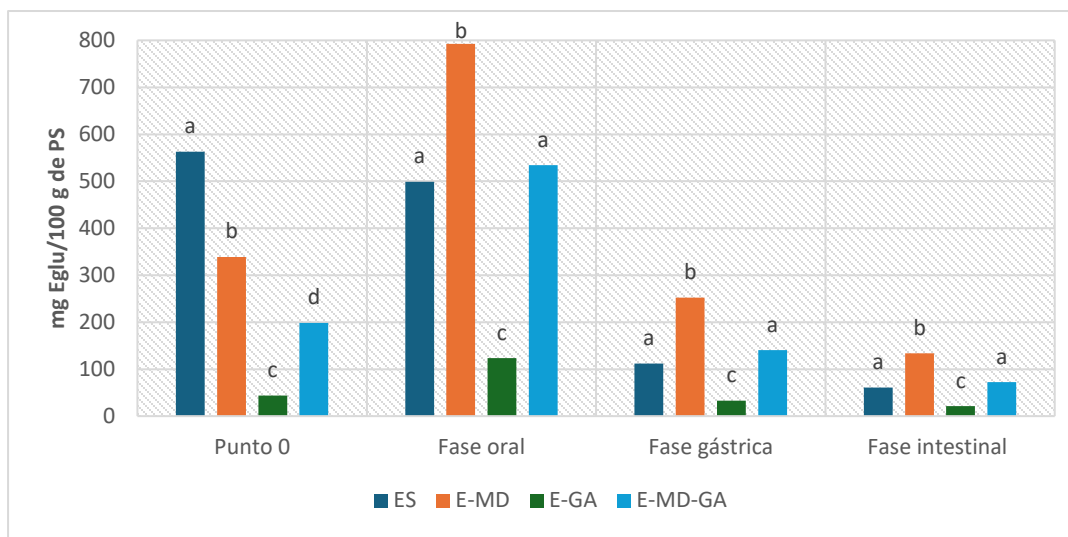


Figura 5. Cuantificación de azúcares reductores (mg EGlu/g de microcápsula) del extracto seco (ES) y los microencapsulados: extracto-maltodextrina (E-MD), extracto-goma arabiga (E-GA) y extracto-maltodextrina-goma arabiga (E-MD-GA) antes de la simulación gastrointestinal (Punto 0) y durante las diferentes etapas del ensayo (Fase oral, Fase gástrica y Fase intestinal). Las letras (a, b, c, d) diferentes en la misma etapa del ensayo indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Abreviaturas: EGlu: equivalentes de glucosa; PS: peso seco.

La Figura 5 expone que el microencapsulado con maltodextrina a través de simulación gastrointestinal contiene un número mayor de azúcares reductores comparado con los datos obtenidos por las tres muestras restantes, esto se debe a las unidades D-glucosa que conforman al material de pared, se observa que en la fase oral alcanza el punto máximo de cuantificación de azúcares reductores como consecuencia de la actividad enzimática de la amilasa la cual se encarga de romper los enlaces de la molécula resultando en

oligosacáridos de menor tamaño tales como glucosa, maltosa y dextrinas (Cruz, 2012). Por otro lado, los subproductos obtenidos a partir de la hidrólisis de la goma arábiga se encuentran en menor proporción encontrando principalmente arabinosa y galactosa como azúcares reductores. Considerando los compuestos formados en la hidrólisis de ambos materiales de pared por separado, se obtuvo un comportamiento intermedio con la formulación maltodextrina-goma arábiga.

7. Conclusiones

A partir de los pétalos de *Cosmos bipinnatus* se logró la extracción eficiente de compuestos fitoquímicos como antocianinas (0.93 ± 0.06 mg Cyn-3-glu/g de extracto seco), fenoles (86.88 ± 0.06 mg EAG/g de extracto seco) y flavonoides (76.66 ± 0.01 mg EQ/g de extracto seco), los cuales se caracterizan por su actividad antioxidante, misma que se comprobó obteniendo altos porcentajes ($88.70\% \pm 1.55$ con el método DPPH y $93.71\% \pm 2.63$ por método ABTS), con estos resultados es evidente el potencial de la especie para emplearse como nutracéutico.

La liofilización como método de encapsulación empleando maltodextrina y goma arábica como agentes encapsulantes para la conservación de fitoquímicos (como las antocianinas), alcanzó porcentajes de eficiencia de microencapsulación arriba del 80%, lo que permite garantizar su estabilidad y manipulación.

Con base en los datos obtenidos en las diferentes pruebas analíticas se considera un mejor rendimiento con la formulación extracto-maltodextrina-goma arábica (E-MD-GA), la cual logra preservar los compuestos bioactivos de interés en el estudio, así como las actividades funcionales de estos hasta la parte intestinal, sitio final donde se espera que se absorban y sean aprovechados por los diferentes sitios específicos del cuerpo humano. Además, se comprobó que la cinética de digestión con la formulación señalada alcanzó mejores porcentajes de hidrólisis, sugiriendo que, con la adición de maltodextrina, la goma arábica podría ser digerida en mayor proporción.

8. Referencias

1. Abdul, S.K, Khatiman M.N., Hashim, N.A., Che Man, R. & Arshad, Z.M.I. (2021). A short review on encapsulation of bioactive compounds using different drying techniques. *Materials Today: Proceedings*, 42(1), 288-296. ISSN 2214-7853. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.543>.
2. Aberoumand, A. (2011). A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 6(1), 71-78.
3. Alappat, B., & Alappat, J. (2020). Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics. *Molecules*, 25(23).
4. Aleixandre, A. (2022). Going from digestion to microestructure of starch-based food products: understanding the role of polyphenols. Tesis de doctorado. Universitat Politècnica de València.
5. Amamiya K. & Iwashina T. (2016). Qualitative and Quantitative Analysis of Flower Pigments in *Chocolate Cosmos*, *Cosmos Atrosanguineus*, and its Hybrids. *Natural Product Communications*, 11(1), 77-78. doi10.11771934578X1601100122
6. Amiri Ardekani, E., Askari, H. & Mohagheghzadeh, A. (2020). Memorial functional foods: a new concept from Bavi tribe. *Journal of Ethnic Foods*, 7(9). <httpsdoi.org10.1186s42779-020-00046-4>
7. Bhuiyan MNI. & Nahid M. (2023). Comparison of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Two Types of *Cosmos* (*Cosmos bipinnatus* Cav. and *Bidens ferulifolia* (Jacq.)) Leaf Essential Oils Introduced in Bangladesh. *Journal of Chromatography and Separation Techniques*, 14(515).
8. Bijani S., Gharari Z., Ahmadnia A., Danafar H., Sharafi A. (2021). A Comparative Study of Apigenin Content and Antioxidant Potential of *Cosmos bipinnatus* Transgenic Root Culture. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 7(2), 87-96. <http://dx.doi.org/10.18502/pbr.v7i2.7361>
9. Budai, S. (2020). Capítulo 14: Nutracéuticos, fitoquímicos y alimentos funcionales. *Química de los alimentos (6ta. Ed.)*, (595-606). México: Pearson Educación. ISBN 9786073250740.
10. Burgos, L. J. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Revista De Investigación*, 13(1), 57–66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>
11. Carpio, R.E. & Figueroa, T. (2017). Efecto de la adición de goma arábiga y maltodextrina en el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en el extracto de sancayo (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado. Tesis de Ingeniería. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

12. Celli, G.B., Ghanem, A. & Brooks, M.S.L. (2015). Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods—a Review of Methods and Current Limitations. *Food Bioprocess Technol*, 8, 1825–1837.
13. Cortez, R., Luna-Vital, DA., Margulis, D. & Mejia, Elvira. (2017). Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 16(1), 180-198. DOI: 10.1111/1541-4337.12244.
14. Čujić-Nikolić, N., Stanisavljević, N., Šavikin, K., Kalaušević, A., Nedović, V., Bigović, D., & Janković, T. (2018). Application of gum Arabic in the production of spray-dried chokeberry polyphenols, microparticles characterisation and in vitro digestion method. *Lekovite Sirovine*, 38(1), 9–16. <https://doi.org/10.5937/leksir1838009C>
15. Cubillos Castañeda, L. N., & Pava Mora, L. Y. (2021). Evaluación de la Extracción de Pigmentos Vegetales como la Antocianina a partir de diferentes frutos silvestres para uso alimenticio. Trabajo de grado. Fundación Universidad de América.
16. Cruz, K.A. (2012). Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidones gelatinizados del fruto de la planta de banano. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
17. Gallardo-Sánchez, J. E., Orozco-Villafuerte, J., Buendía-González, L., Alvarez-Ramírez, J. & Hernández-Jaimes, C. (2024). Effect of temperature on the stability of *Cosmos bipinnatus* pigments encapsulated by freeze-drying. *Biotecnia*, 26, e2236. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v26.2236>.
18. Gómez, D. (2020). Evaluación de la proteólisis durante la digestión *in vitro* e *in silico* de microcápsulas elaboradas con PSL y PSL-MD. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México.
19. González, L. (2023). Evaluación de compuestos bioactivos y propiedades funcionales durante la digestión *in vitro* simulada de emulsiones con extractos de propóleos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
20. Giusti, M. & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13.
21. Guerrero, I., López, E., Armenta, R.E. & García, R. (2020). Capítulo 7: Pigmentos. *Química de los alimentos (6ta. Ed.)*, (339-362). México: Pearson Educación. ISBN 9786073250740.
22. Hofman, D.L., Van Buul, V.J. & Brouns, F. (2016). Nutrition, Health, and Regulatory Aspects of Digestible Maltodextrins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(12), 2091-2100, DOI: 10.1080/10408398.2014.940415
23. Jasti, T., Senapathi, M., Sasank, P., Bobbarala, V., Prameela, K. (2022). Evaluation of Anti-oxidant, Anti-microbial and Phytochemical analysis of different parts of *C. bipinatus*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 15(4), 1455-0. DOI: 10.52711/0974-360X.2022.00241

24. Jiang, M. & Zhang, Y. (2023). Biopolymer-based encapsulation of anthocyanins as reinforced natural colorants for food applications, *Journal of Agriculture and Food Research*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100488>
25. Khoo, H.E., Azlan, A., Tang S.T., Lim, S.M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, *Food & Nutrition Research*, 61(1). DOI 10.1080/16546628.2017.1361779
26. Martirosyan, D., & Miller, E. (2018). Bioactive compounds: The key to functional foods. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 1(3), 36-39. DOI: <https://doi.org/10.31989/bchd.v1i3.539>
27. McDougall, G.J., Fyffe, S., Dobson, P. & Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage-stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68, 1285-1294. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.02.004
28. Meléndez-Sosa, M.F., García-Barrales, A.M. & Ventura-García, N.A. (2020). Perspectivas e impacto en la salud del consumo de los alimentos funcionales y nutraceuticos en México. *Revista de Divulgación del Instituto de Ciencias de la BUAP*, 6(1), 114-136. ISSN 2448-5829
29. Miller, M.D., Steinmaus, C., Golub, M.S., Castorina, R., Thilakartne, R., Bradman, A. & Marty, M.A. (2022). Potential impacts of synthetic food dyes on activity and attention in children: a review of the human and animal evidence. *Environmental Health*, 21(45). <https://doi.org/10.1186/s12940-022-00849-9>
30. Minekus, M., Alving, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... & Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124
31. Musa, H.H., Ahmed, A.A. & Musa, T.H. (2018). Chemistry, Biological, and Pharmacology Properties of Gum Arabic. *Bioactive Molecules in Food*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54528-8_11-1
32. Oliveira, L., Braga, A.C., Santa, A. I., Asenova, Z., Martins de Oliveira, A.A., Couto, J.A., Martins, V. & Pereira, S. (2019). In vitro gastrointestinal evaluation of a jucara-based smoothie: effect of processing on phenolic compounds bioaccessibility
33. Ortega-Medrano, R.J.; Ceja-Torres, L.F.; Vázquez-Sánchez, M.; Martínez-Ávila, G.C.G.; Medina-Medrano, J.R. (2023). Characterization of *Cosmos sulphureus* Cav. (Asteraceae): Phytochemical Screening, Antioxidant Activity and Chromatography Analysis. *Plants*, 12, 896. <https://doi.org/10.3390/plants12040896>
34. Peanparkdee, M. & Iwamoto, S. (2020). Encapsulation for Improving in Vitro Gastrointestinal Digestion of Plant Polyphenols and Their Applications in Food Products. *Food Reviews International.*, 38(4), 335-353. DOI: 10.1080/87559129.2020.1733595
35. Sensoy, I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used *in vitro* models. *Current Research in Food Science*, 4, 308-319, <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>.
36. Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzynski, M., Nowakowska, D. & Matwijczuk, A. (2020). Influence of In vitro Digestion on composition, Bioaccessibility and Antioxidant activity of Food Polyphenols- A Non-Systematic Review. *Nutrients*, 12, 1401. Doi:10.3390/nu12051401
37. Zabet, G.L., Schaefer, F., Polano, L., Vinícius, M., Herrera, E., Palacin, H., Córdova-Ramos, J.S., Best, I. & Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of Bioactive

Compounds for Food and Agricultural Applications. *Polymers*, 14(4194).
<https://doi.org/10.3390/polym14194194>

9. Anexos

Anexo 1. Cuantificación de antocianinas monoméricas

Para la determinación de antocianinas monoméricas se prepararon soluciones buffer previo al análisis de las muestras.

1. Buffer pH 1.0 de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M. Se disolvieron 1.86 g de KCl con agua destilada, se ajustó el pH adicionando HCl concentrado hasta alcanzar un valor de 1.0. Finalmente, se aforó a un volumen de 1 litro con agua destilada.
2. Buffer pH 4.5 de acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$) 0.4 M. Se disolvieron 54.43 g de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ con agua destilada, se ajustó el pH adicionando HCl concentrado hasta alcanzar un valor de 4.5. Finalmente, se aforó a un volumen de 1 litro con agua destilada.

Se tomaron dos alícuotas de 400 μL de la muestra, a la primera se le agregaron 1.6 mL de la solución buffer de pH 1.0 de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M, a la segunda se le agregaron 1.6 mL de buffer pH 4.5 de acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$) 0.4 M. Se dejaron incubar durante 15 minutos en oscuridad, y se realizó un barrido de 400 a 700 nm en espectrofotómetro de luz UV reportando la absorbancia máxima detectada y la absorbancia a 700 nm. Cada muestra se realizó por triplicado. La cantidad de antocianinas monoméricas se calculó de acuerdo con la ecuación 7.

$$\frac{\text{mg Cyn-3-glu}}{L} = \frac{(A)(PM)(FD)(1000)}{\epsilon * 1} \quad \text{ecuación 7}$$

Donde:

$$A = (A_{\text{máx}} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\text{máx}} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

PM = peso molecular de antocianina, 449.02 g/mol.

FD = factor de dilución.

ϵ = coeficiente de extinción molar, 26,900 L/cm mol.

Anexo 2. Cuantificación de fenoles totales

Previo al análisis se prepararon las soluciones necesarias para la determinación de fenoles totales.

1. Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 14% p/v. Se disolvieron por completo 14 g de Na_2CO_3 con agua destilada caliente, después de enfriar la solución, se filtró y aforó a un volumen de 100 mL con agua destilada.

2. Solución patrón de ácido gálico (0.1 mg/mL). Se disolvieron 0.005 g de ácido gálico en 1 mL de etanol, después se aforó a un volumen de 50 mL con agua destilada.

Para realizar la curva patrón de fenoles (figura 6), se realizaron diluciones a partir de la solución patrón de ácido gálico con la finalidad de obtener diferentes concentraciones, como se muestra en la tabla 4. Se tomaron 200 μL de cada dilución a los cuales se les agregaron 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu y se dejó reposar por 8 minutos en oscuridad. Posteriormente se agregaron 200 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 14% y 1.5 mL de agua destilada, se dejó reposar por 60 minutos más en oscuridad y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en espectrofotómetro de luz UV.

Tabla 4. Diluciones a partir de una solución patrón de ácido gálico 0.1 mg/mL para fenoles totales.

Solución patrón de ácido gálico 0.1 mg/mL (μL)	Agua destilada (μL)	Concentración final de ácido gálico (mg/mL)
0	200	0
40	160	0.02
80	120	0.04
120	80	0.06
160	40	0.08
200	0	0.1

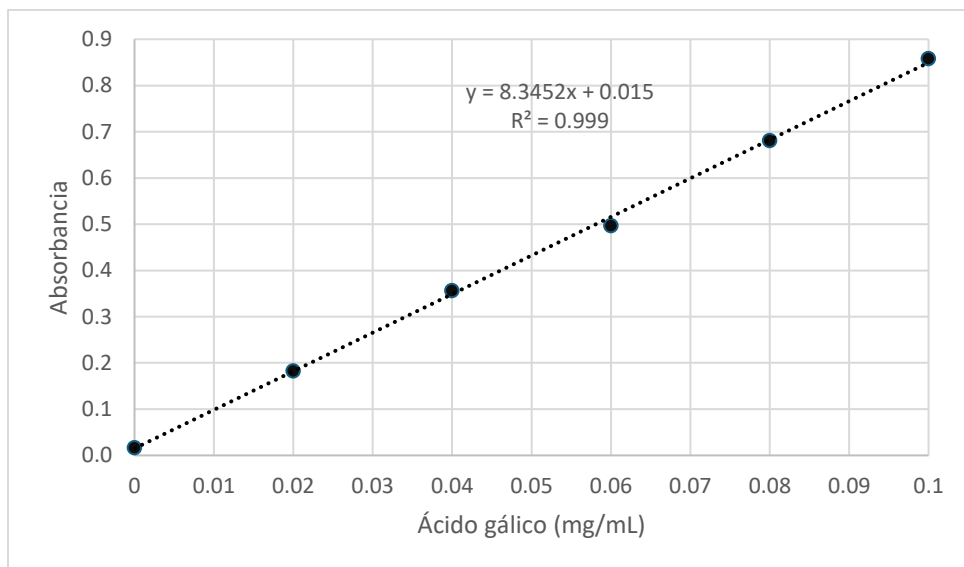


Figura 6. Curva patrón de fenoles totales.

De acuerdo con los datos obtenidos en la curva patrón (figura 6) se determinó la concentración de fenoles totales cumpliendo con la ecuación 8.

$$\frac{mg \text{ EAG}}{mL} = \left(\frac{Abs + b}{m} \right) * FD \text{ ecuación 8}$$

Donde:

EAG = equivalentes de ácido gálico.

Abs = absorbancia de la muestra a 765 nm.

b = ordenada al origen, 0.015.

m = pendiente, 8.3452.

FD = factor de dilución.

Anexo 3. Cuantificación de flavonoides

Previo al análisis se prepararon las soluciones necesarias para la determinación de flavonoides.

1. Solución de tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 2%. Se disolvieron 0.90525 g de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ con agua destilada y se aforó a un volumen de 25 mL.
2. Solución patrón de quercetina (0.15 mg/mL). Se disolvieron 0.0015 g de quercetina con metanol-agua destilada (1:1) y se aforó a un volumen de 10 mL.

Para realizar la curva patrón de flavonoides (figura 7), se realizaron diluciones a partir de la solución patrón de quercetina para alcanzar diferentes concentraciones como se muestra en la tabla 5. Se tomaron 1000 μL de cada dilución, se agregaron 500 μL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% y 500 μL de agua destilada. Se dejó reposar por 10 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 425 nm en espectrofotómetro de luz UV.

Tabla 5. Diluciones a partir de una solución patrón de quercetina 0.15 mg/mL para flavonoides.

Solución patrón de quercetina 0.15 mg/mL (μL)	Metanol:agua destilada (1:1) (μL)	Concentración final de quercetina (mg/mL)
0	1000	0
30	970	0.0045
60	940	0.009
90	910	0.0135
120	880	0.018
150	850	0.0225
180	820	0.027
200	800	0.03

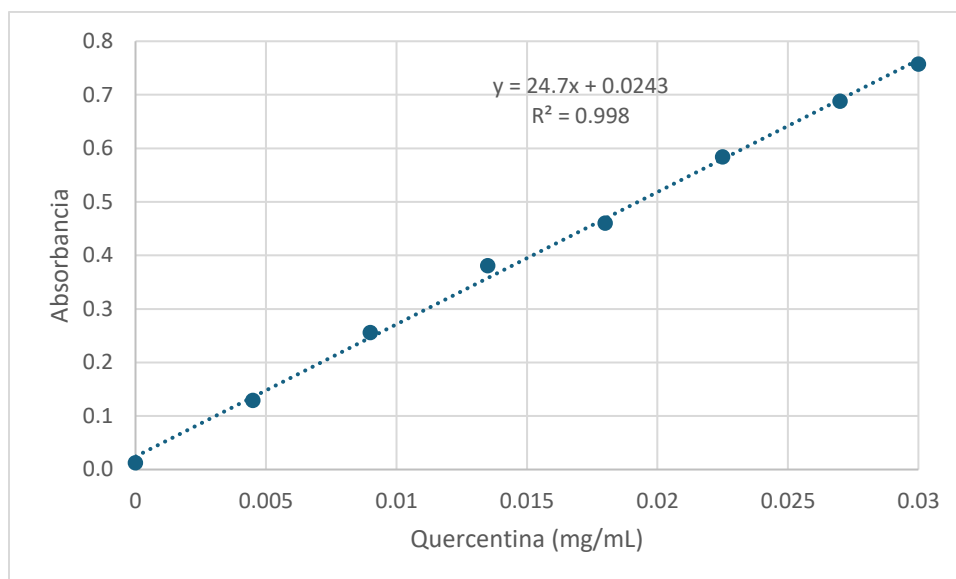


Figura 7. Curva patrón de flavonoides.

De acuerdo con los datos obtenidos de la curva patrón (figura 7) se determinó la concentración de flavonoides siguiendo la ecuación 9.

$$\frac{mg\ EQ}{mL} = \left(\frac{Abs + b}{m} \right) * FD \text{ ecuación 9}$$

Donde:

EQ = equivalentes de quercetina.

Abs = Absorbancia de la muestra a 425 nm.

b = ordenada al origen, 0.0243.

m = pendiente, 24.7.

FD = factor de dilución.

Anexo 4. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH

Previo al análisis se prepararon las soluciones necesarias para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH.

1. Solución DPPH 0.1 mM. Se disolvieron 0.0039 g de DPPH con metanol y se aforó a un volumen de 100 mL. Esta solución se diluyó con metanol hasta alcanzar una absorbancia cercana al 1.000 en una longitud de onda de 515 nm.
2. Solución trolox 2 mM. Se disolvieron 0.005 g de trolox con metanol y se aforó a un volumen de 10 mL.

Para realizar la curva patrón del método de DPPH (figura 8), se realizaron diluciones a partir de la solución de trolox obteniendo diferentes concentraciones como se muestra en la tabla 6. A 50 μL de cada dilución se le adicionaron 1.95 mL de la solución diluida DPPH, después de reposar por 30 minutos en oscuridad, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm en espectrofotómetro de luz UV.

Tabla 6. Diluciones a partir de una solución patrón de trolox 2 mM para determinar capacidad antioxidante por método DPPH.

Solución patrón de trolox 2 mM (μL)	Metanol (μL)	Concentración final de trolox (mM)
0	1000	0
6	994	0.012
15	985	0.03
75	925	0.15
150	850	0.3
300	700	0.6
450	550	0.9
600	400	1.2

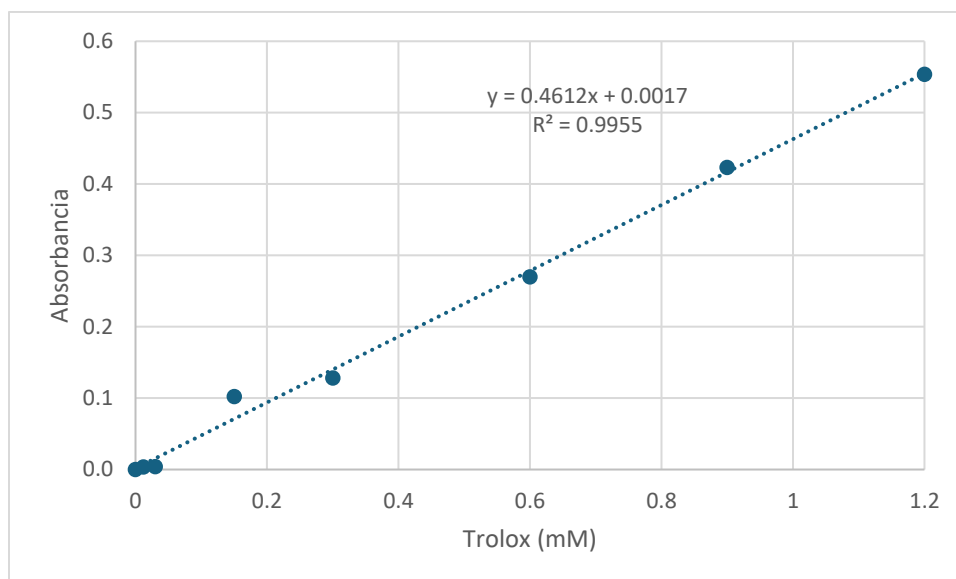


Figura 8. Curva patrón DPPH.

De acuerdo con los datos obtenidos de la curva patrón (figura 8) se determinó la capacidad antioxidante obedeciendo la ecuación 10.

$$mM ET = \left(\frac{Abs_{real} + b}{m} \right) * FD \quad \text{ecuación 10}$$

Donde:

ET = equivalentes de trolox.

b = ordenada al origen, 0.0017.

m = pendiente, 0.4612.

FD = factor de dilución.

$$Abs_{real} = (Abs_{blanco} - Abs_{muestra})$$

El % de inhibición para determinar la capacidad antioxidante por el método DPPH también se determinó siguiendo la ecuación 11.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{Abs_{blanco} - Abs_{muestra}}{Abs_{blanco}} * 100 \quad \text{ecuación 11}$$

Donde:

Abs_{blanco} = absorbancia del blanco de reacción.

Abs_{muestra} = absorbancia de la muestra analizada.

Anexo 5. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de ABTS

Previo al análisis se prepararon las soluciones necesarias para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS.

1. Solución trolox 2 mM. Se disolvieron 0.005 g de trolox con metanol y se aforó a un volumen de 10 mL.
2. Solución ABTS 7 mM. Se disolvieron 0.0192 g de ABTS con metanol y se aforó a un volumen de 5 mL.
3. Solución de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 140 mM. Se disolvieron 0.3784 g de $K_2S_2O_8$ en metanol y se aforó a un volumen de 10 mL.

Para la solución utilizada en la reacción ABTS se mezclaron 5 mL de la solución preparada de ABTS 7 mM con 88 μ L de la solución de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 140 mM, se agitó y se dejó reposar por 24 horas en refrigeración y oscuridad. Posteriormente se diluyó la solución con metanol hasta alcanzar una absorbancia de 0.740 a una longitud de onda de 734 nm en espectrofotómetro de luz UV.

La curva patrón de actividad antioxidante por ABTS (figura 9) se llevó a cabo con las diluciones a partir de la solución de trolox para obtener diferentes concentraciones como se muestra en la tabla 7. A 50 μ L de cada dilución se le adicionaron 1.5 mL de la solución diluida ABTS, después de reposar por 10 minutos en oscuridad se midió la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm en espectrofotómetro de luz UV.

Tabla 7. Diluciones a partir de una solución patrón de trolox 2 mM para determinar capacidad antioxidante por método ABTS.

Solución patrón de trolox 2 mM (μ L)	Metanol (μ L)	Concentración final de trolox (mM)
0	1000	0
5	995	0.01
50	950	0.1
100	900	0.2
200	800	0.4

300	700	0.6
400	600	0.8

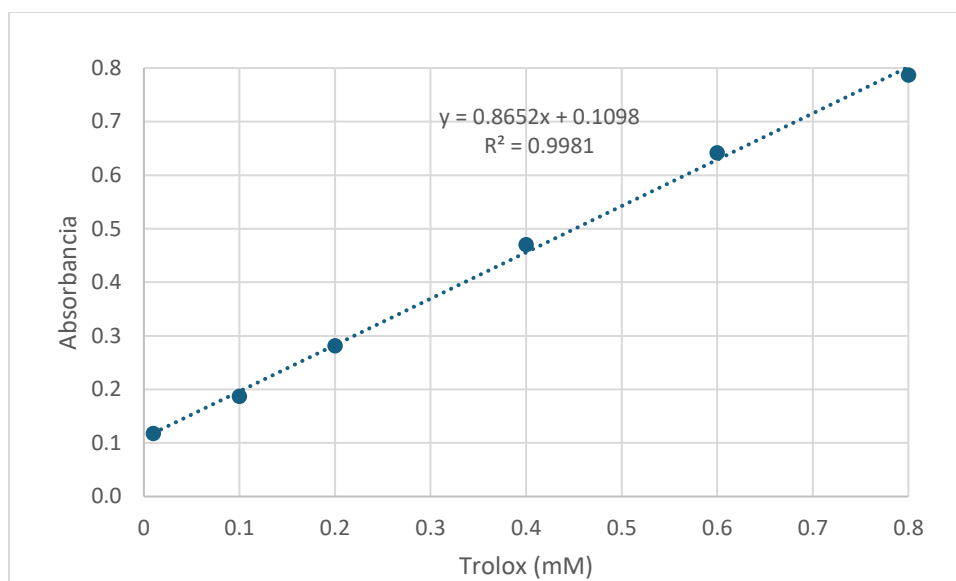


Figura 9. Curva patrón ABTS.

De acuerdo con los datos obtenidos de la curva patrón (figura 9) se determinó la capacidad antioxidante siguiendo la ecuación 12.

$$mM ET = \left(\frac{Abs_{real} + b}{m} \right) * FD \text{ ecuación 12}$$

Donde:

ET = equivalentes de trolox.

b = ordenada al origen, 0.1098.

m = pendiente, 0.8652.

FD = factor de dilución.

$$Abs_{real} = (Abs_{blanco} - Abs_{muestra})$$

El % de inhibición para determinar la capacidad antioxidante por el método ABTS también se determinó siguiendo la ecuación 13.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{Abs_{\text{blanco}} - Abs_{\text{muestra}}}{Abs_{\text{blanco}}} * 100 \text{ ecuación 13}$$

Donde:

Abs_{blanco} = absorbancia del blanco de reacción.

Abs_{muestra} = absorbancia de la muestra analizada.

Anexo 6. Preparación de las soluciones SFS, SFG Y SFI para el proceso de digestión *in vitro*

Las soluciones de Simulación de Fluido Salival (SFS), Simulación del Fluido Gástrico (SFG) y Simulación del Fluido Intestinal (SFI) aplicadas en el ejercicio de la digestión *in vitro* se prepararon conforme las concentraciones sugeridas por Minekus *et al.*, (2014) mostradas en la tabla 8. Todas las soluciones alcanzaron un volumen final de 500 mL complementadas con agua destilada.

Tabla 8. Preparación de las soluciones stock (1.25x) de fluidos simulados de la digestión *in vitro*.

Compuesto	Concentración stock (g/L)	SFS (mL)	SFG (mL)	SFI (mL)
KCl	37.3	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	68	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	84	6.8	12.5	42.5
NaCl	117	-	11.8	9.6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.5	0.4	1.1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.06	0.5	-
CaCl ₂ *	44.1	0.025*	0.0025*	0.01*

*CaCl₂ no se agrega directamente a las soluciones stock, las concentraciones indicadas representan la cantidad final en el ensayo.

Anexo 7. Cuantificación de antocianinas poliméricas

Previo al análisis se prepararon las soluciones necesarias para la cuantificación de antocianinas poliméricas mediante la determinación de color polimérico.

1. Buffer pH 1.0 de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M. Se disolvieron 1.86 g de KCl con agua destilada, se ajustó el pH adicionando HCl concentrado hasta alcanzar un valor de 1.0. Finalmente, se aforó a un volumen de 1 litro con agua destilada.

2. Solución de bisulfito ($K_2S_2O_5$) al 20%. Se disolvió 1 g de $K_2S_2O_5$ en agua destilada y se aforó a un volumen de 5 mL. Para disolver por completo el reactivo se sometió en baño ultrasónico durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se determinó el factor de dilución de las muestras con el buffer pH 1.0 de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M, posteriormente se tomaron dos alícuotas de 1.4 mL de la muestra, a la primera se le agregaron 100 μ L de la solución de bisulfito (muestra blanqueada) y a la segunda se le adicionaron 100 μ L de agua destilada (muestra control), se dejó reposar por 15 minutos en oscuridad y se realizó un barrido de 400 a 700 nm en el espectrofotómetro de luz UV reportando la absorbancia a 420 nm, 700 nm y la absorbancia máxima detectada. Cada muestra se realizó por triplicado.

Las absorbancias obtenidas de las muestras tratadas con agua (muestras control) se aplicaron para determinar la densidad de color obedeciendo la ecuación 14.

$$\text{Densidad de color} = [(A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{\text{máx}} - A_{700 \text{ nm}})] * FD \text{ ecuación 14}$$

Donde:

$A_{420 \text{ nm}}$ = absorbancia de la muestra a 420 nm.

$A_{700 \text{ nm}}$ = absorbancia de la muestra a 700 nm.

$A_{\text{máx}}$ = absorbancia máxima de la muestra detectada.

FD = factor de dilución

Las absorbancias obtenidas de las muestras tratadas con la solución de bisulfito (muestras blanqueadas) se aplicaron para determinar el color polimérico siguiendo la ecuación 15.

$$\text{Densidad de color} = [(A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{\text{máx}} - A_{700 \text{ nm}})] * FD \text{ ecuación 15}$$

Donde:

$A_{420 \text{ nm}}$ = absorbancia de la muestra a 420 nm.

$A_{700 \text{ nm}}$ = absorbancia de la muestra a 700 nm.

$A_{\text{máx}}$ = absorbancia máxima de la muestra detectada.

FD = factor de dilución

Finalmente, los resultados obtenidos se reportaron como % de color polimérico calculado con la ecuación 16.

$$\% \text{ Color polimérico} = \frac{\text{Color polimérico}}{\text{Densidad de color}} * 100 \text{ ecuación 16}$$

Anexo 8. Cuantificación de azúcares reductores

Previo al análisis se prepararon las soluciones necesarias para la determinación azúcares reductores.

1. Reactivo DNS 96 mM. Se prepararon las soluciones a) y b) por separado, con agitación lenta se mezclaron ambas soluciones y se aforaron a un volumen final de 100 mL con agua destilada.
 - a) Se disolvieron 30 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) con 20 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 2 M.
 - b) Se disolvieron 0.5 g ácido 3,5-dinitrosalicílico ($\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2\text{COOH}$) en 50 mL de agua destilada.
2. Solución patrón de glucosa (3 mg/mL). Se disolvieron 75 mg de glucosa con agua destilada y se aforo a un volumen final de 25 mL.

Para realizar la curva patrón de azúcares reductores (figura 10), se realizaron diluciones a partir de la solución patrón de glucosa con la finalidad de obtener diferentes concentraciones, como se muestra en la tabla 9. Se tomaron 125 μL de cada dilución a los cuales se les agregaron 125 μL de reactivo DNS 96 mM, se agitó y se llevó a un baño de agua caliente (aproximadamente 100 °C) durante 5 minutos. Posteriormente se enfriaron en un baño de hielos por 5 minutos, se agregaron 1.25 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en espectrofotómetro de luz UV.

Tabla 9. Diluciones a partir de una solución patrón de glucosa 3 mg/mL para determinar azúcares reductores.

Solución patrón de glucosa 3 mg/mL (μL)	Agua destilada (μL)	Concentración final de glucosa (mg/mL)
33	967	0.1
166	834	0.5
333	667	1
500	500	1.5
666	334	2
833	167	2.5

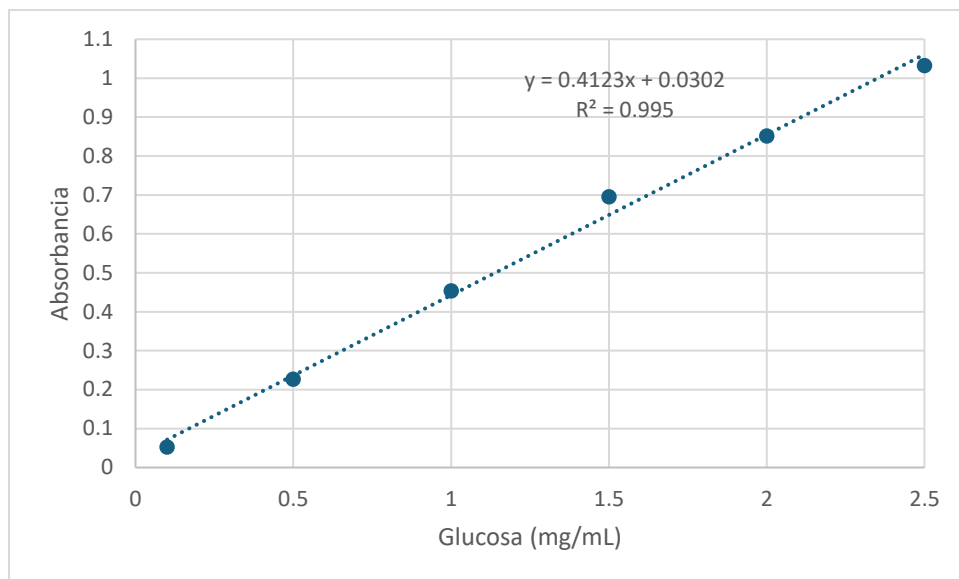


Figura 10. Curva patrón de azúcares reductores.

De acuerdo con los datos obtenidos de la curva patrón (figura 10) se determinó la cantidad de azúcares reductores siguiendo la ecuación 17.

$$\frac{mg \text{ EGlu}}{mL} = \left(\frac{Abs + b}{m} \right) * FD \quad \text{ecuación 17}$$

Donde:

EGlu = equivalentes de glucosa.

b = ordenada al origen, 0.0302.

m = pendiente, 0.4123.

FD = factor de dilución.