



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Estudio de la encapsulación de antocianinas con técnica sol-gel para su aplicación
como colorante para alimentos


TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencia y
Tecnología de Alimentos

Presenta:
Diana Soto Aguilar

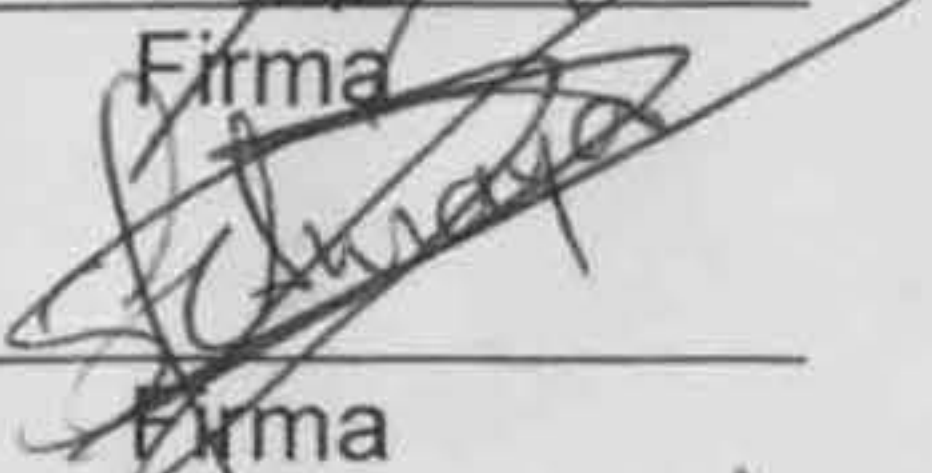
Dirigido por:
Dr. Eduardo Castaño Tostado

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Presidente



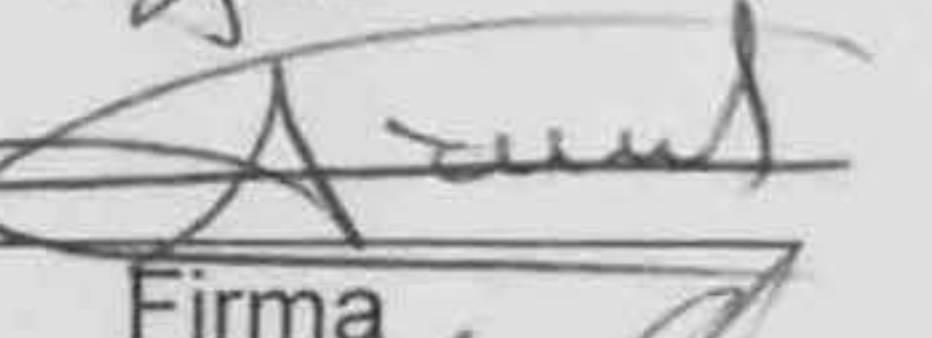
Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Secretario



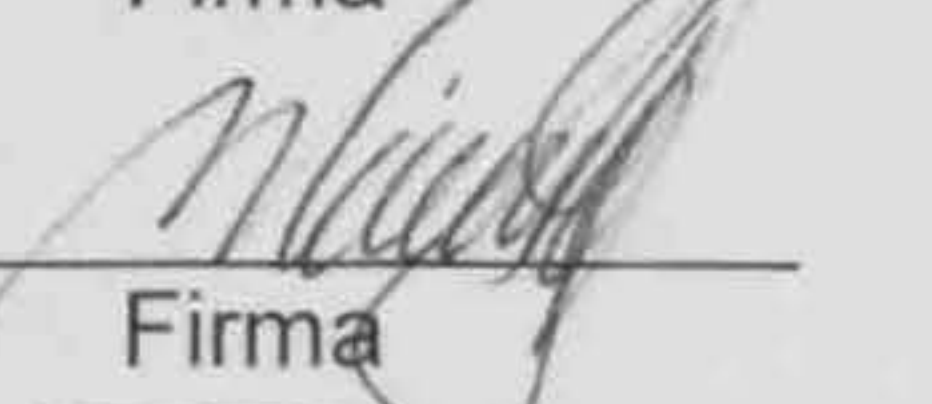
Firma

Dr. José Santos Cruz
Vocal



Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

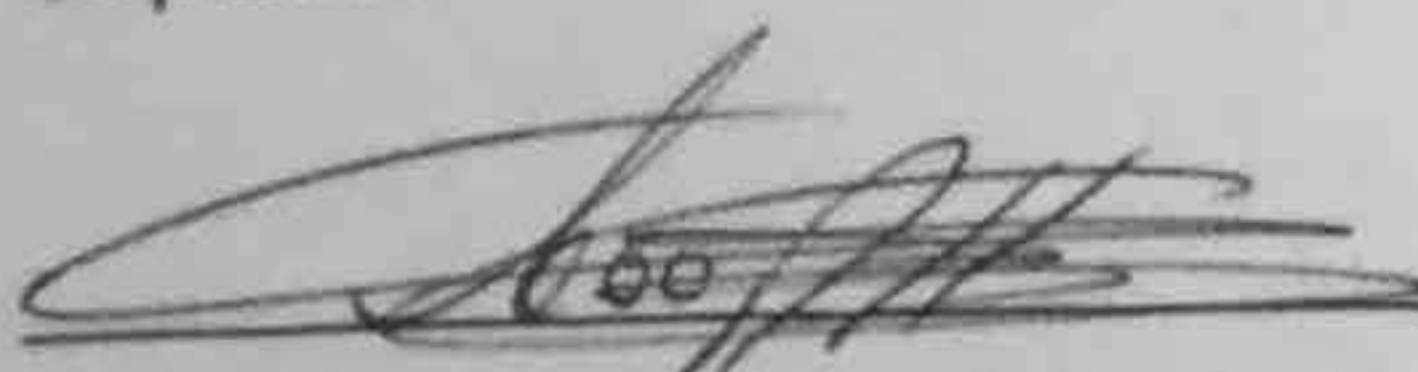


Firma

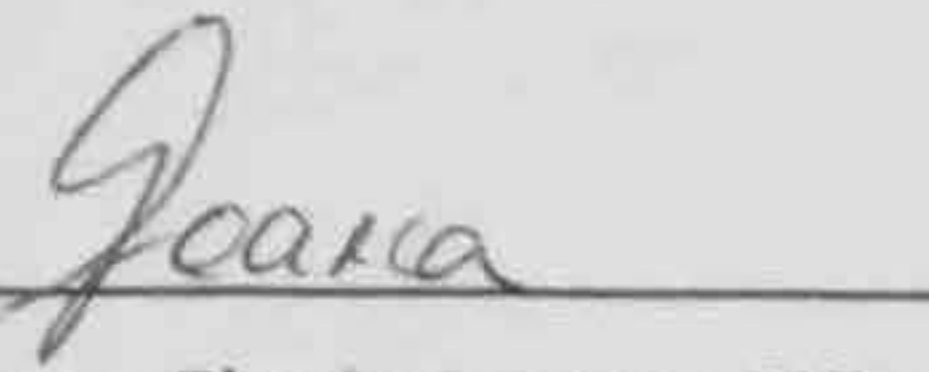
Dra. Sandra Olimpia Mendoza
Suplente



Firma



M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Los colorantes sintéticos en la industria alimentaria son ampliamente usados, pero debido a que se les ha asociado con respuestas alérgicas o tóxicas, se han buscado alternativas inocuas como los pigmentos naturales. Ejemplo de ello son las antocianinas de bayas, sin embargo, son inestables ante factores ambientales y de proceso por lo que su encapsulación podría aumentar su estabilidad y potencial aplicación. Por ello, en este estudio fue encapsulado el extracto de arándano (*Vaccinium corymbosum*) con la técnica sol - gel, que consiste en utilizar precursores orgánicos para formar una jaula de dióxido de silicio. Se realizó una extracción etanólica de frutas congeladas. Se midió su concentración de antocianinas monoméricas por espectrofotometría con el método pH diferencial. La encapsulación se realizó a 30 °C con los reactivos tetraetil ortosilicato (TEOS), etanol y ácido clorhídrico (HCl). Los factores estudiados en la encapsulación fueron: concentración de HCl, relación molar agua: TEOS (R), tiempo de reacción y cantidad de extracto. El sol obtenido se secó a temperatura ambiente (~25 °C) y al gelificar se trituró hasta obtener un polvo fino. Se estudió el grado de lixiviación de las antocianinas desde la matriz por espectrofotometría en rango UV-Visible. Se realizó una prueba de pH y se midió el color antes y después de la prueba con parámetros del sistema CIE L* a* b*, y parámetros croma y ángulo hue. Finalmente, dos muestras, con 7.92 mg y 10.81 mg de extracto agregado, se analizaron con espectroscopía infrarroja (FTIR). Los niveles que permitieron la formación de una matriz sol - gel que mantenía encapsuladas a las antocianinas fueron: HCl 0.37 M, R 5 y tiempo de reacción dos horas. El nivel de extracto que mostró resultados de color más intensos, y mayor estabilidad del color ante cambios de pH, fue el de 7.92 mg de 3-O glucósido de Cianidina. Finalmente, el análisis FTIR demostró que la matriz formada interactuaba por medio de puentes de hidrógeno con las antocianinas del extracto y que ello ocasionó que se estabilizaran ante cambios de pH. Se considera que el aditivo fabricado con nivel de extracto agregado de 7.92 mg de 3-O glucósido de Cianidina es adecuado para impartir color en alimentos.

Palabras clave: (colorante, antocianinas, sol - gel)

SUMMARY

In the food industry, synthetic dyes are widely used, nevertheless they have been associated with allergic or toxic responses, innocuous alternatives such as natural pigments have been sought. An example of this are the anthocyanins from berries, however, they are unstable to environmental and process factors so their encapsulation could increase their stability and potential application. Therefore, in this study a blueberry (*Vaccinium corymbosum*) extract was encapsulated by the sol - gel technique, which consists of using organic precursors to form a silicon dioxide cage. Ethanolic extraction of frozen fruits was carried out; 3 different lots. Its concentration of monomeric anthocyanins was measured by spectrophotometry using the differential pH method. The encapsulation was performed at 30 °C with tetraethyl ortho-silicate (TEOS), ethanol and hydrochloric acid (HCl). The factors studied in the encapsulation were: HCl concentration, molar ratio water: TEOS (R), reaction time and amount of extract. The sol obtained was dried at room temperature (~25 °C) and upon gelation it was triturated to a fine powder. The degree of leaching of the anthocyanins from the matrix was studied by spectrophotometry in UV-Visible range. A pH test was performed and it was measured the color before and after the test with CIE L * a * b * system parameters, and chroma and hue angle parameters. Finally, two samples, of 7.92 mg and 10.81 mg of added extract, were analyzed with infrared spectroscopy (FTIR). The levels that allowed the formation of a sol-gel matrix that kept the anthocyanins encapsulated were: [HCl] 0.37 M, R 5 and reaction time of two hours. The level of extract that showed enhanced color results, and greater color stability to changes in pH, was 7.92 mg of cyanidin-3-glucoside. Finally, the FTIR analysis showed that the matrix formed interacted through hydrogen bonds with the anthocyanins in the extract and caused them to stabilize to changes in pH. The additive manufactured with the added extract level of 7.92 mg of cyanidin-3-glucoside is considered to be suitable for imparting color in food.

Key words: (dye, anthocyanin, sol-gel)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Eduardo Castaño Tostado por la guía e ideas para el proyecto, el apoyo para presentar el proyecto en el Simposio INNOVA 2017 y los consejos personales a lo largo de la maestría. Ha sido el mejor asesor y profesor que he tenido en mi vida académica.

A la Dra. Silvia L. Amaya y al Dr. José Santos les agradezco los recursos y los consejos para el proyecto, el apoyo para presentar el proyecto en el Simposio INNOVA 2017 y el tiempo invertido en la revisión de la tesis escrita.

A la Dra. Minerva Ramos y la Dra. Sandra O. Mendoza les agradezco la revisión del proyecto escrito.

Al Dr. Sergio de Jesús Romero le agradezco mucho el espacio prestado en sus laboratorios, los consejos personales y académicos y los muchos momentos de entretenimiento.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención otorgada en el periodo 2015- 2017.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Colorantes en industria de alimentos	1
2	REVISIÓN DE ANTECEDENTES	4
2.1	Antocianinas	4
2.2	Encapsulación	9
2.2.1	Sol-gel	10
3	OBJETIVOS	14
4	MÉTODOS	15
4.1	Extracción con etanol	15
4.2	pH diferencial	15
4.3	Encapsulamiento	16
4.3.1	Prueba de lixiviación / lavados	18
4.3.2	Prueba de color	18
4.3.3	Estabilidad en pH	19
4.3.4	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	19
4.3.5	Análisis estadístico	19
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1	Extracción con etanol	21
5.2	pH diferencial	22
5.3	Encapsulamiento	23
5.3.1	Experimento 1	26
5.3.1.1	Prueba de lixiviación	30
5.3.1.2	Prueba de color	33
5.3.2	Experimento 2	40

5.3.2.1 Lavado de polvos	41
5.3.2.2 Prueba de color	42
5.3.2.3 Prueba de pH	46
5.3.3 Experimento 3	52
5.3.3.1 Lavado de polvos	52
5.3.3.2 Prueba de color	54
5.3.3.3 Prueba de pH	56
5.3.4 FTIR	62
<u>6 CONCLUSIONES</u>	<u>68</u>
<u>7 ANEXO 1</u>	<u>69</u>
<u>8 ANEXO 2</u>	<u>70</u>
<u>9 ANEXO 3</u>	<u>75</u>
<u>10 REFERENCIAS</u>	<u>76</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las antocianidinas (Rodríguez-Saona y Wrolstad, 2001)	4
Figura 2. Estructura de las seis principales agliconas (Espino, 2014)	6
Figura 3. Cambio de conformación de las antocianinas en diferente pH (Ananga <i>et al.</i> , 2013)	7
Figura 4. Estructura de alcóxido tetraetil ortosilicato (TEOS) (Kandimalla <i>et al.</i> , 2008)	11
Figura 5. Hidrólisis de alcóxido metálico en síntesis sol-gel (Serra y Fernández-Francos, 2016)	11
Figura 6. Condensación en síntesis sol-gel con alcohol como producto (Serra y Fernández-Francos, 2016)	12
Figura 7. Condensación en síntesis sol-gel con agua como producto (Serra y Fernández-Francos, 2016)	12
Figura 8. Ejemplo de una matriz sol-gel encapsulando una molécula (Barczak <i>et al.</i> , 2016)	13
Figura 9. Esquema de los tres tipos de grupos silano en la superficie de la matriz sol-gel (Ismail <i>et al.</i> , 2002)	24
Figura 10 Parámetros CIE L* a* b* (Bora <i>et al.</i> , 2015)	33
Figura 11. Parámetro cromaticidad (http://bit.ly/2xdaOAI)	37
Figura 12. Parámetro ángulo hue (http://bit.ly/2xdaOAI)	38

Figura 13. Diagrama de interacción entre SRB y una matriz sol-gel (Yip <i>et al.</i> , 2009)	51
Figura 14. Átomo de oxígeno (negro); Átomo de sílice (gris). Estiramiento simétrico perpendicular al ángulo del enlace Si-O-Si (a) y (b).	63
Figura 15. Átomo de oxígeno (negro); Átomo de sílice (gris). Estiramiento asimétrico paralelo a la línea de Si-Si entre los dos cationes enlazados (c) y (d)	63
Figura 16. Átomo de oxígeno (negro); Átomo de sílice (gris). Movimiento “rocking” paralelo al eje del enlace Si- Si (e) y (f)	66
Figura 17. Sol formado	69
Figura 18. Variación de color de extracto de arándano en valores de pH de 1 – 6	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales sustituyentes del anillo B (Durst y Wrolstad, 2001)	5
Tabla 2. Resumen de experimentos realizados	17
Tabla 3. Cantidad de extracto obtenido	22
Tabla 4 Concentración de antocianinas monoméricas de arándano azul*	23
Tabla 5. Tratamientos de experimento 1 (Lote de extracto 1)	26
Tabla 6. Tratamientos de experimento 1 (Lote de extracto 2)	27
Tabla 7. Absorbancia obtenida de la prueba de lixiviación. Experimento 1 (Lote 1)*	30
Tabla 8. Absorbancia obtenida de la prueba de lixiviación. Experimento 1 (Lote 2)*	31
Tabla 9. Niveles adecuados para la encapsulación de antocianinas*	32
Tabla 10. Parámetros de color Experimento 1 (Lote 1)*	34
Tabla 11. Parámetros de color Experimento 1 (Lote 1)*	37
Tabla 12. Niveles de factores para una encapsulación adecuada	40
Tabla 13. Tratamientos de experimento 2	41
Tabla 14. Absorbancia obtenida del lavado de los polvos Experimento 2*	42
Tabla 15. Parámetros de color Experimento 2*	43
Tabla 16. Color de polvos según el programa <i>Delta-E Calculator</i> Experimento 2	46
Tabla 17. Parámetros de color de prueba de pH Experimento 2*	47

Tabla 18. Parámetros de color de prueba de pH Experimento 2*	47
Tabla 19. Color de los polvos de prueba de pH de acuerdo a <i>Delta-E Calculator</i> Experimento 2	50
Tabla 20. Tratamientos de experimento 3	52
Tabla 21. Absorbancia obtenida del lavado de los polvos Experimento 3*	53
Tabla 22. Parámetros de color Experimento 3*	54
Tabla 23. Parámetros de color Experimento 3*	54
Tabla 24. Color de polvos según el programa Delta-E Calculator Experimento 3	56
Tabla 25. Parámetros de color de prueba de pH Experimento 3*	57
Tabla 26. Parámetros de color de prueba de pH Experimento 3*	58
Tabla 27. Color de los polvos de prueba de pH de acuerdo a <i>Delta-E Calculator</i> Experimento 3	61
Tabla 28. Bandas de los espectros infrarrojo	62
Tabla 29. Parámetros de color Experimento 1 (Lote 2)	70
Tabla 30. Parámetros de color Experimento 1 (Lote 2)	71

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Parámetro CIE L* experimento 1 (Lote 1)	35
Gráfica 2. Parámetro CIE a* experimento 1 (Lote 1)	35
Gráfica 3. Parámetro CIE b* experimento 1 (Lote 1)	36
Gráfica 4. Parámetro croma experimento 1 (Lote 1)	39
Gráfica 5. Parámetro ángulo hue experimento 1 (Lote 1).	39
Gráfica 6. Parámetro CIE L* Experimento 2.	43
Gráfica 7. Parámetros CIE a* y b* Experimento 2	44
Gráfica 8. Parámetros croma y ángulo hue Experimento 2	45
Gráfica 9. Parámetro CIE L* de prueba de pH Experimento 2	48
Gráfica 10. Parámetros CIE a* y b* de prueba de pH Experimento 2	49
Gráfica 11. Parámetro CIE L* Experimento 3	55
Gráfica 12. Parámetros CIE a* y b* Experimento 3	56
Gráfica 13. Parámetro CIE L* de prueba de pH Experimento 3	59
Gráfica 14. Parámetros CIE a* y b* de prueba de pH Experimento 3	60
Gráfica 15. Parámetros croma y ángulo hue de prueba de pH Experimento 3	60
Gráfica 16. Espectro IR de tratamiento 27 ¹	64
Gráfica 17. Espectro IR de tratamiento 28 ¹	65
Gráfica 18. Parámetro CIE L* Experimento 1 (Lote 2)	72
	X

Gráfica 19. Parámetro CIE a* Experimento 1 (Lote 2)	72
Gráfica 20. Parámetro CIE b* Experimento 1 (Lote 2)	73
Gráfica 21. Parámetro croma Experimento 1 (Lote 2)	73
Gráfica 22. Parámetro ángulo hue Experimento 1 (Lote 2)	74

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Colorantes en industria de alimentos

Los aditivos colorantes se definen como cualquier colorante, pigmento o sustancia capaz de impartir color cuando es añadido o aplicado a un alimento, medicamento o cosmético (Guisti *et al.*, 2003).

En un producto alimenticio, el color es una propiedad física y sensorial muy importante cuando el consumidor evalúa su calidad. La industria cuida esta propiedad y la utiliza para asegurar uniformidad, para mejorar la apariencia original de los alimentos o incluso para restaurarla después de un proceso (Guisti *et al.*, 2003; Loypimai *et al.*, 2016).

Actualmente, los colorantes usados se pueden clasificar en sintéticos y naturales. De los sintéticos, el primero que se elaboró fue en 1856 y con ello la búsqueda de otros similares hizo a un lado a los colorantes naturales (Shahid y Mohammad, 2013). Sin embargo, con el tiempo se ha mostrado que los colorantes sintéticos están vinculados con respuestas alérgicas, tóxicas y carcinogénicas, además de que tienen efectos adversos en el medio ambiente, por lo que se han reducido el número de los permitidos y se ha buscado su sustitución (Guisti *et al.*, 2003; Restrepo, 2007; Shahid y Mohammad, 2013).

Los colorantes extraídos de fuentes naturales son una opción para esta sustitución, tal es el caso de pigmentos que pueden ser sintetizados por plantas superiores, algunos animales y microorganismos (Shahid y Mohammad, 2013). De entre los grupos más importantes, destaca el de los flavonoides, donde se encuentran las antocianinas (Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán 2015).

Las antocianinas en alimentos han probado ser efectivas y seguras, y han sido consumidas sin efectos adversos por siglos (Guisti *et al.*, 2003; Guisti y

1. INTRODUCCIÓN

Wrolstad, 2001; Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán 2015; Gonzalez *et al.*, 2015).

Éstas se encuentran permitidas como colorantes de alimentos en Estados Unidos bajo la categoría de color de jugo de fruta o vegetal, especificando que sólo puede usarse la porción comestible de las plantas (Guisti *et al.*, 2003). En el caso de su uso como extractos de materiales secos, la restricción es que el solvente utilizado debe ser agua; sin embargo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) tiene registrados aditivos de los que es posible extraer pigmentos con solventes con la especificación de que el solvente residual no esté presente en más de 50mg/kg (Guisti *et al.*, 2003; FAO, 2017).

En México, la Secretaría de Salud emitió un documento llamado “Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias”, en donde se establece que las antocianinas (SIN¹ 163) son permitidas como colorantes en alimentos, y presenta una tabla especificando las condiciones de uso para algunos alimentos como productos cárnicos, bebidas destiladas, bebidas saborizadas no alcohólicas, alimentos preparados a base de cereales, suplementos alimenticios, etc.

Sin embargo, dicho acuerdo no menciona las condiciones para la obtención de las antocianinas. En este caso, la Secretaría de Salud ha establecido que en situaciones de esta índole, las normas internacionales son aplicables.

Por ello, al considerar la producción de colorantes alternativos e innovadores, es necesario revisar la legislación y tomar en cuenta las restricciones establecidas.

¹ SIN Sistema Internacional de Numeración de aditivos alimentarios

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar las características de las antocianinas y proponer un método innovador para estabilizarlas y poder considerarlas como un aditivo para la industria de alimentos.

El Capítulo 2 muestra una revisión de los antecedentes con respecto a las antocianinas y sus características fisicoquímicas, las ventajas de su encapsulación y explica cómo el método sol-gel es una oportunidad de innovación en el ámbito de los aditivos.

El Capítulo 3 muestra los objetivos planteados para el presente proyecto y el Capítulo 4 presenta la metodología seguida para su realización.

En Capítulo 5 se muestran los resultados obtenidos y se discuten con base en la literatura revisada. Finalmente, en el Capítulo 6 se presentan las conclusiones del trabajo.

2 REVISIÓN DE ANTECEDENTES

2.1 Antocianinas

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en todas las plantas vasculares, responsables de diversas funciones fisiológicas como la pigmentación (con colores del rojo hasta el azul, incluyendo amarillo e incoloro), además de la atracción de polinizadores o protección contra radiación ultravioleta u organismos fitopatógenos (Munin y Edwards-Lévy, 2011; Hashim *et al.*, 2012; Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán 2015). Los diferentes grupos de esta clasificación tienen en común la presencia de uno o varios ciclos de bencenos con uno o varios grupos hidroxilo, además de que derivan del metabolismo del ácido shikímico y del poliacetato (Munin y Edwards-Lévy, 2011).

Las antocianidinas o agliconas pertenecen a este grupo., son diferenciadas debido a su estructura de 15 carbonos, dos anillos aromáticos (A, B) unidos por un tercer anillo de C₃O₁ (C) (Figura 1) y son únicas con respecto a otros compuestos fenólicos por su capacidad de formar cationes flavilio (Munin y Edwards-Lévy, 2011; Gould *et al.*, 2009).

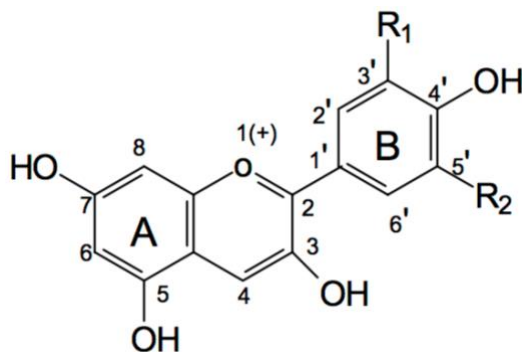


Figura 1. Estructura química de las antocianidinas (Rodríguez-Saona y Wrolstad, 2001)

2. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

El anillo B puede tener diferentes patrones de sustitución, los cuales determinan el tipo de aglicona (Tabla 1). En la naturaleza se encuentran seis, comúnmente: cianidina (Cy), peonidina (Pn), pelargonidina (Pg), malvidina (Mv), delphinidina (Dp), y petunidina (Pt), de los cuales surge aproximadamente el 95% de todas las antocianinas hasta ahora conocidas (Figura 2) (Giusti *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2015).

El anillo A tiene un patrón de hidroxilación común en el C-5 y el C-7, y en menor proporción en el C-6 o el C-8. Finalmente, el anillo C tiene dos dobles enlaces que generan una carga positiva, denominada ion oxonio o catión flavilio (Munin y Edwards-Lévy, 2011; Gould *et al.*, 2009).

Las antocianidinas son llamadas antocianinas cuando presentan glucosilaciones. Éstas forman una red de enlaces de hidrógeno intramolecular por medio de uniones entre los grupos hidroxilo presentes en la estructura y moléculas de azúcar (He y Giusti, 2010; González *et al.*, 2015). Se sabe que más del 90% de las antocianinas contienen glucosa, pero son encontradas en menor proporción soforosa, rutinosa, ramnosa, galactosa, arabinosa y xilosa (Del Rio, 2010; Jayaprakasha y Patil, 2015).

Tabla 1. Principales sustituyentes del anillo B (Durst y Wrolstad, 2001)

AGLICONA	SUSTITUCIÓN	
	R1	R2
PELARGONIDINA	H	H
CIANIDINA	OH	H
DELFINIDINA	OH	OH
PEONIDINA	OCH3	H
PETUNIDINA	OCH3	OH
MALVIDINA	OCH3	OCH3

2. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

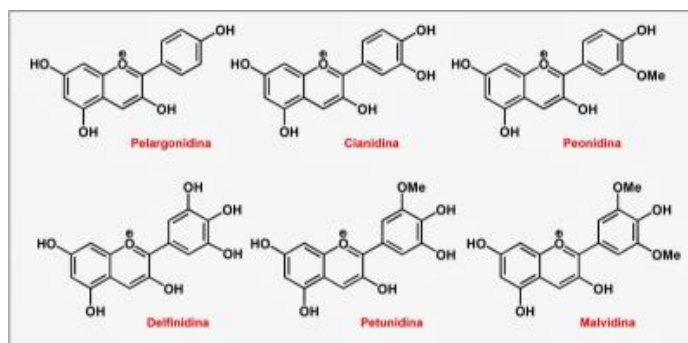


Figura 2. Estructura de las seis principales agliconas (Espino, 2014)

Por su parte, los residuos de azúcar pueden contener acilaciones, generalmente presentes en el C-3 o esterificados en el grupo 6-OH, ya sea por grupos aromáticos o ácidos (Guisti *et al.*, 2003).

Cuando se ha tratado de incorporar a las antocianinas en alimentos se ha observado que debido a sus características estructurales existe cierta inestabilidad en el procesamiento, distribución o almacenamiento, y por ende su uso se ha limitado a aquellos que tienen limitada exposición al calor del proceso, baja actividad de agua, corto tiempo de almacenamiento, etc. (Reynoso *et al.*, 1997; Munin y Edwards-Lévy, 2011). Los factores que las pueden afectar son: pH, temperatura, luz, oxígeno, actividad de agua, presencia de otros metabolitos, enzimas, entre otros (Guisti *et al.*, 2003; Munin y Edwards-Lévy, 2011; Hashim *et al.*, 2012).

El pH afecta a las antocianinas por la presencia del ion oxonio, ya que éste cambia su estructura reversiblemente entre cuatro diferentes formas en solución acuosa (Hashim *et al.*, 2012). En pH 1 - 3, la estructura de catión flavilio predomina y genera coloraciones rojas. A medida que el pH incrementa, se lleva a cabo una hidratación en C-2 y se forma la pseudobase carbinol entre pH 4 – 5, y genera color morado a incoloro. Posteriormente, ocurre una desprotonación que forma la base quinonoidal en pH de 6 a 8 de coloración azul y, finalmente, de pH 8 a 14, la estructura se ioniza para llevar una o dos cargas negativas, con lo cual se

2. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

forma una chalcona de color amarillo a incoloro (Figura 3) (Guisti *et al.*, 2003; Hashim *et al.*, 2012).

La chalcona estructuralmente es una cetona aromática insaturada, lo que significa que, al ionizarse por la variación de pH, el anillo C se abre. Si la condición básica se mantiene y luego se acidifica de nuevo, dicho anillo no tiene la capacidad de regenerarse (Insuasty-Obando 2016). En cambio, las demás estructuras sí tienen la capacidad de interconvertirse, por lo que la antocianina en estructura chalcona se considera degradada.

Por otro lado, se ha observado que una temperatura mayor a 40°C causa degradación en las moléculas por dos distintos mecanismos. Se puede presentar hidrólisis del enlace glucosídico generando la formación de la aglicona menos estable o, por ataque hidrolítico, puede originar la mencionada estructura chalcona (Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán, 2015).

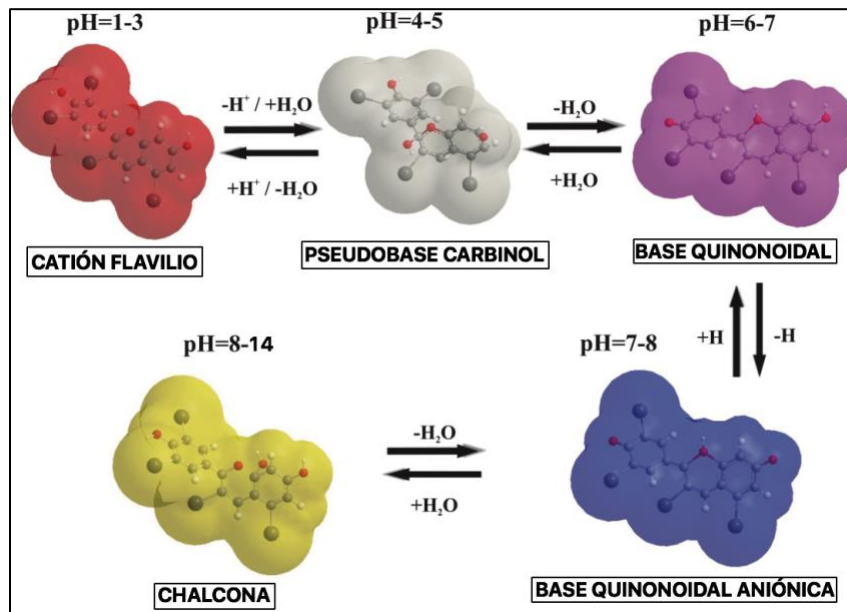


Figura 3. Cambio de conformación de las antocianinas en diferente pH (Ananga *et al.*, 2013)

Así es que, para poder incorporar a las antocianinas en sistemas alimentarios exitosamente, se han estudiado los factores mencionados y se han

2. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

encontrado distintas soluciones. Por ejemplo, tomando en consideración que las antocianinas a pH ácido muestran coloraciones rojas y estables, se les ha introducido en alimentos con pH menor a 3, así se asegura que predomine la estructura de catión flavilio y se estabiliza la molécula. En otros casos, la acidez mencionada –junto con bajas temperaturas de almacenamiento y corta vida de anaquel– se ha probado en productos lácteos (Rodríguez-Saona *et al.*, 1999; Guisti *et al.*, 2003).

Otro ejemplo es aquél en el que, buscando nuevas fuentes de antocianinas, se encontraron algunas que mostraban complejos patrones de glicosilación y acilación que causaban amplia estabilidad en la molécula cuando se sometían a cambios de pH, tratamientos térmicos o exposición a la luz. Se sugirió que los mecanismos involucrados podrían ser copigmentación intramolecular e intermolecular, autoasociación o complejación con metales (Guisti *et al.*, 2003; Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán, 2015).

El caso de la copigmentación es muy interesante, ya que se ha reportado que si existe doblamiento de la parte acil se puede proteger a la aglicona. En el caso de las monoaciladas, sólo puede haber un efecto débil intermolecular porque sólo un lado del catión flavilio podrá protegerse ante el ataque nucleofílico del agua. Pero en las antocianinas diaciladas se ha mostrado una mayor estabilidad, ya que presentan apilamiento tipo *sandwich* y causan interacciones hidrofóbicas entre residuos planares aromáticos de los grupos acilo y el núcleo flavilio cargado positivamente, y así disminuyen la formación de la pseudobase (Guisti *et al.*, 2003).

Considerando lo anterior, una forma de estabilizar a las antocianinas ante cambios de pH, es decir, que no presenten cambios de color por causa de este factor, puede ser encontrar algún modo de evitar que se formen las distintas estructuras.

Es necesario encontrar una fuente accesible de antocianinas, y considerar que sea una donde la encapsulación ayude a mejorar sus características de

2. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

estabilidad. Tal es el caso de las bayas (Guinot *et al.*, 2006; Arrazola *et al.*, 2014; Serna-Cock *et al.*, 2015; Urias-Lugo *et al.*, 2015), las cuales contienen antocianinas en gran proporción. Los colores que presentan se deben principalmente a su perfil de antocianinas y a la cantidad de cada una de ellas; sin embargo, tienen principalmente mono y diglucósidos con limitada estabilidad (Guisti *et al.*, 2003; Jayaprakasha y Patil, 2015).

Un ejemplo de estas bayas es el arándano azul (*Vaccinium corymbosum*). Sus antocianinas más comunes son las derivadas de la cianidina (Cacace y Mazza, 2003; Guisti *et al.*, 2003). Y debido a su carácter perecedero, existe una gran cantidad de subproducto descartado, por lo que son una fuente potencial de pigmentos naturales (Jayaprakasha y Patil, 2015).

2.2 Encapsulación

En este orden de ideas, la encapsulación ha probado ser un proceso innovador, su función es proveer protección a compuestos frágiles o inestables contra variaciones fisicoquímicas del ambiente que los rodea. La encapsulación de antocianinas ha servido para estabilizarlas y poder incorporarlas en matrices complejas, donde generalmente mostrarían gran inestabilidad (Arrazola *et al.*, 2014; Zaidel *et al.*, 2014; Yousuf *et al.*, 2016)

Los materiales de encapsulamiento pueden ser polímeros naturales o sintéticos, y existen métodos físicos, químicos o fisicoquímicos, pero debido a que las antocianinas son altamente inestables es necesario que el tipo de encapsulación carezca de condiciones de oxidación que puedan afectarlas (Munin y Edwards-Lévy, 2011).

Tal es el caso de la metodología sol-gel, un proceso que se realiza a temperatura ambiente y puede no involucrar solventes oxidantes, por lo que la estructura de la antocianina puede mantenerse intacta (Gupta y Chaudhury, 2007; Jurmanovic *et al.*, 2010).

2. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

Otras ventajas que presenta la metodología sol-gel son: transparencia del material, alta durabilidad química, mejor protección de las moléculas atrapadas (Rottman *et al.*, 1992; Jurmanovic *et al.*, 2010) y manipulación sencilla de la síntesis debido al uso de pequeñas moléculas precursoras (Ciriminna *et al.*, 2012). Al poder manipular los factores involucrados en la síntesis, se pueden llegar a formular diferentes tipos de matriz, dependiendo de las características de molécula la estabilizar (Serra y Fernández-Francos, 2016).

Finalmente, es destacable que el método está libre de desechos y la pureza del material es altamente controlable (Serra y Fernández-Francos, 2016), por lo que se puede considerar una tecnología *verde*.

2.2.1 Sol-gel

El término sol-gel implica la generación de una suspensión coloidal (llamada sol) por medio de un precursor alcóxido, agua, un co-solvente, un catalizador y la molécula a encapsular. Al avanzar la reacción entre ellos, se convierte en un gel debido a la extensa conectividad a nivel molecular. Si la reacción continúa, se puede generar un material sólido (Gupta y Chaudhury, 2007; Serra y Fernández-Francos, 2016).

Los alcóxidos, precursores inorgánicos, pueden ser alcóxidos de aluminio (Al), titanio (Ti), estaño (Sn), silicio (Si) y derivados, entre otros (Serra y Fernández-Francos, 2016). Se han reportado encapsulaciones con el vidrio de sílice, en proteínas (Dunn *et al.*, 1998; Jin y Brennan, 2002), fluoróforos (Gulcev *et al.*, 2002), terpenos y aceites esenciales (Ashraf *et al.*, 2015), etc., con buenos resultados ya que el método generó un ambiente estable tanto químico como físico y una excelente claridad óptica (Ismail *et al.*, 2002). La Figura 4 muestra el ejemplo de un alcóxido de silicio, tetraetil ortosilicato (TEOS).

2. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

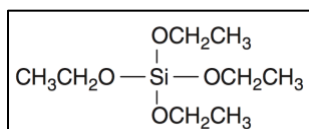


Figura 4. Estructura de alcóxido tetraetil ortosilicato (TEOS) (Kandimalla *et al.*, 2008)

En la síntesis sol-gel, dicho alcóxido sufre dos reacciones diferentes: hidrólisis y condensación. Puede ocurrir en soluciones acuosas o en soluciones orgánicas cuando el precursor no es miscible con el agua (Ciriminna *et al.*, 2012; Serra y Fernández-Francos, 2016).

En la primera etapa, los alcóxidos metálicos reaccionan con el agua y generan una hidrólisis (Figura 5), que puede ser completa o parcial (dependiendo de la proporción agua : alcóxido (R)), y ello definirá la vía de condensación (Gupta y Chaudhury, 2007; Serra y Fernández-Francos, 2016).

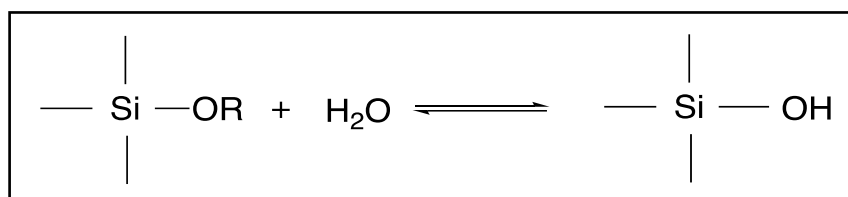


Figura 5. Hidrólisis de alcóxido metálico en síntesis sol-gel (Serra y Fernández-Francos, 2016)

A menores valores de R ($R < 2$) la hidrólisis será parcial y en la etapa de condensación se formará un puente de oxígeno entre dos moléculas del precursor, llamada estructura siloxano, y una molécula de alcohol (Figura 6). El tipo de alcohol dependerá de la parte orgánica del alcóxido. Así, en el caso de tetraetil ortosilicato (TEOS) el alcohol será etanol, y en el caso de tetrametil ortosilicato (TMOS) será metanol (Avnir *et al.*, 2005; Kandimalla *et al.*, 2008; Serra y Fernández-Francos, 2016).

2. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

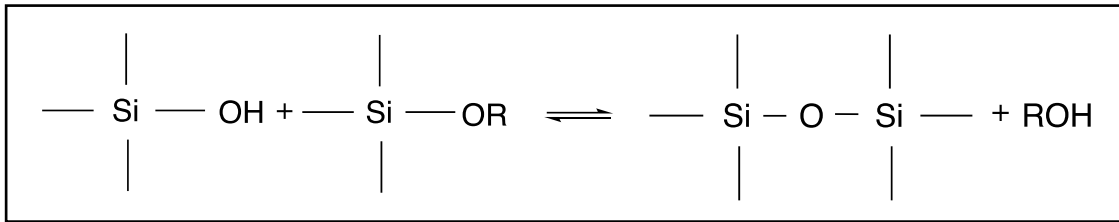


Figura 6. Condensación en síntesis sol-gel con alcohol como producto (Serra y Fernández-Francos, 2016)

En cambio, a mayores valores de R ($R \geq 2$), se generará una hidrólisis más completa y en la etapa de condensación se generará una molécula de agua a la par de la estructura siloxano (

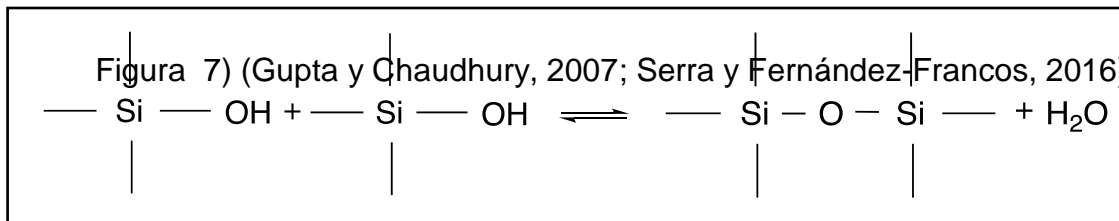


Figura 7. Condensación en síntesis sol-gel con agua como producto (Serra y Fernández-Francos, 2016)

En general, el proceso de condensación es lento debido a la baja polaridad del enlace Si-O de los alcóxidos de sílice, por lo que un catalizador es esencial. Se pueden utilizar temperaturas altas, pero es preferible utilizar catalizadores como ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) con el fin de tener más control sobre la reacción (Ciriminna *et al.*, 2012; Serra y Fernández-Francos, 2016).

Una vez que se ha formado el gel por la condensación, se pasa a una etapa de almacenamiento. En ella, incrementa el entrecruzamiento de la red y como consecuencia es expulsado el solvente interno de la matriz (Gupta y

2. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

Chaudhury, 2007). En esta etapa también se definirá la forma que tenga el material; es decir, se podrán obtener diferentes formas dependiendo de su posterior utilización. Por ejemplo, monolitos, películas delgadas, fibras, polvos, etc. (Ismail *et al.*, 2002; Gupta y Chaudhury, 2007; Ciriminna *et al.*, 2012).

El encapsulamiento se basa en que las moléculas, agregadas en la etapa precursora, son encerradas por las cadenas poliméricas de siloxano que crecerán alrededor de la molécula, generando una matriz; es decir, quedarán dentro de la estructura mientras se está formando y, en consecuencia, se estabilizarán (Lobnik *et al.*, 2011). La Figura 8 muestra el ejemplo de una matriz sol-gel. Las estrellas simulan las moléculas encapsuladas (Ismail *et al.*, 2002; Gupta y Chaudhury, 2007; Marr y Marr, 2011).

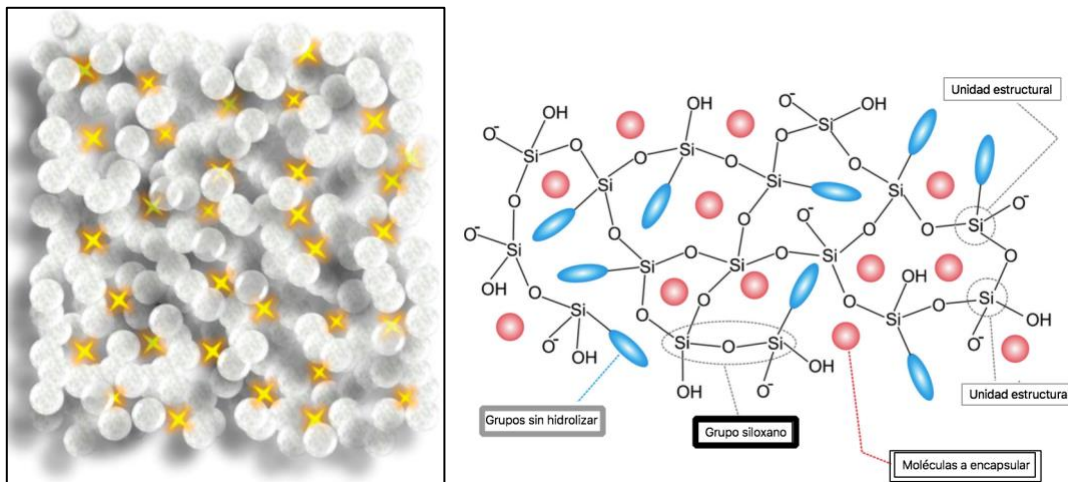


Figura 8. Ejemplo de una matriz sol-gel encapsulando una molécula (Barczak *et al.*, 2016)

De todo lo anterior se desprende que, si bien las antocianinas son inestables ante factores como el pH, la metodología sol-gel ofrece la formación de una matriz donde éstas pueden quedar encapsuladas y, por ende, estables. Si el propósito se logra, la industria alimentaria podrá hacer uso de las antocianinas sin las limitaciones ya mencionadas.

3 OBJETIVOS

GENERAL

Encapsular antocianinas presentes en extracto de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) en una matriz sol-gel para su estabilización ante cambios de pH.

ESPECÍFICOS

1. Obtener un encapsulado de antocianinas de arándano (*Vaccinium corymbosum*) con tamaño de poro que evite su lixiviación.
2. Caracterizar colorimétricamente los encapsulados obtenidos e identificar el tratamiento con el color más intenso.
3. Estudiar la estabilidad de los encapsulados ante cambios de pH del medio.
4. Analizar la interacción de las antocianinas con la matriz sol-gel formada.

4 MÉTODOS

4.1 Extracción con etanol

Se obtuvieron arándanos frescos de tres lugares comerciales distintos (Walmart, Comercial Mexicana y COSTCO). Las bayas (100 g) se congelaron con nitrógeno líquido, posteriormente se molieron en molino de aspas (Moulinex, Francia) con el fin de disminuir el tamaño de partícula, obtener una muestra de polvo uniforme y con ello incrementar su recuperación (Guisti y Wrolstad, 2001; Hashim *et al.*, 2012).

Posteriormente, se homogeneizaron en 600 mL de etanol (85%) con ~0.2% de ácido acético (pH 4.5 ± 0.2) a 1000 rpm durante una hora a 30-35 °C en oscuridad. Al finalizar, el extracto se filtró con manta de cielo previamente lavada, después se filtró con papel filtro Whatman #1. Se concentró a 35-37 °C bajo presión reducida (Rotavapor R-124, Buchi, Suiza) a 40 rpm, hasta que la recuperación del solvente fue casi nula. La extracción se realizó en tres lotes distintos.

4.2 pH diferencial

La concentración de antocianinas monoméricas se determinó usando el método de pH diferencial de Giusti y Wrolstad (2001).

Se determinó el factor de dilución de cada extracto agregando una alícuota de éste en solución amortiguadora de cloruro de potasio de pH 1 hasta que la absorbancia a 520 nm estuviera en el rango lineal del espectrofotómetro (0.2 – 1.5). Se dividió el volumen final de la solución entre el volumen del extracto para obtener dicho factor.

4. MÉTODOS

La muestra del paso anterior, se diluyó una muestra de cada extracto en solución amortiguadora de pH 1 y pH 4.5 (acetato de sodio) e inmediatamente se leyó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro de rango UV-Visible (Thermo Scientific, Estados Unidos) con una celda de cuarzo de 1 cm, en longitudes de onda de 520 y 700 nm, por triplicado. Se calentó el equipo 30 minutos antes de hacer las mediciones y se utilizó agua destilada como blanco.

Se calculó la absorbancia de la muestra diluida con la Ecuación 1:

Ecuación 1
$$A = (A_{\lambda 520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda 520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

Finalmente, se calculó la concentración de antocianinas monoméricas en la muestra original usando la Ecuación 2:

Ecuación 2
$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / (\epsilon \times L)$$

Donde A es la absorbancia de la muestra a los diferentes valores de pH; PM es el peso molecular de la antocianina predominante en la muestra (449.2 g mol⁻¹ para 3-O glucósido de Cianidina); FD es el factor de dilución; ϵ es el coeficiente de absortividad molar (26900 cm⁻¹ mg⁻¹), y L es la longitud de la celda de cuarzo (1 cm) (Routray y Orsat, 2011).

4.3 Encapsulamiento

La síntesis sol-gel se llevó a cabo según la metodología descrita por (Shamsipur y Azimi, 2001), con modificaciones. Se mezclaron los precursores de la reacción en caja de guantes con circulación de gas nitrógeno.

En tubos falcon (50mL) se mezclaron: 10 mL de tetraetil ortosilicato (TEOS) (Sigma, Pureza 98%), utilizado como alcóxido metálico; 3 mL de etanol

4. MÉTODOS

(Merck Millipore, Pureza $\geq 99.9\%$), utilizado como co-solvente; ácido clorhídrico (HCl) (Sigma, 1 N), como catalizador², la cantidad y molaridad estuvo de acuerdo con el nivel estudiado en cada experimento; y extracto de antocianinas de arándano también considerando el nivel en estudio (Tabla 2). La solución formada también es llamada sol.

Posteriormente, se llevaron a una incubadora (Felisa, Estados Unidos) a 30 °C, con agitación a 150 rpm y oscuridad por el tiempo de reacción definido para el experimento.

La Tabla 2 muestra el resumen de los factores y niveles de los experimentos realizados:

Tabla 2. Resumen de experimentos realizados

# Experimento	Factor	Nivel
1	R ³	5 / 7
	HCl (molar)	0.37 / 0.5 / 1
	HCl (mL)	4 / 6
	Tiempo de reacción (horas)	2 / 4
	Lote de extracto	1 / 2
2	Cantidad de extracto (mg)	5.29 / 6.61 / 7.93
3	Cantidad de extracto (mg)	10.81 / 13.08 / 15.31

² La cantidad de HCl agregada se consideró como el agua en el factor R

³ Relación molar agua: alcóxico

4. MÉTODOS

Finalmente, se depositaron entre 7 mL y 10 mL de la solución en cajas Petri (90 x 15 mm), con la finalidad de que el secado fuera homogéneo entre tratamientos, y se dejaron a temperatura ambiente (~25 °C) en oscuridad.

Una vez que el solvente se evaporó, el material obtenido (gel) se molió en mortero de ágata, se pesó y se llevó a un desecador en oscuridad el tiempo necesario, hasta que se obtuvo peso constante. Los polvos resultantes se guardaron en bolsas de plástico con sello hermético a temperatura ambiente (~25 °C) y en oscuridad.

Todos los tratamientos fueron realizados con tres replicaciones.

4.3.1 Prueba de lixiviación / lavados

Los polvos obtenidos de la síntesis se sumergieron en solución amortiguadora de pH 2 (1:1) en tubos Falcon, se agitaron durante 30 segundos, se centrifugaron, se separó el sobrenadante y se secaron en un desecador hasta peso constante. El filtrado se leyó en espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Estados Unidos) a 520 nm.

Por otro lado, se observó si la solución amortiguadora tenía color a simple vista, siendo binaria la respuesta: sí / no.

4.3.2 Prueba de color

El color de los polvos obtenidos se midió utilizando un colorímetro (Konica Minolta CM2002, Japón). Los resultados se dieron con parámetros del sistema CIE $L^* a^* b^*$, croma [$C^*=(a^{*2}-b^{*2})^{1/2}$] y ángulo hue [$h=\tan^{-1} b^*/a^*$]. Se usó una celda de vidrio óptico con una longitud de trayectoria de 10 mm, un iluminador D65 en un ángulo observador de 2°.

Para tener una idea clara de los colores obtenidos en algunos tratamientos, se utilizó un programa en línea llamado *Delta-E Calculator* (<http://colormine.org/delta-e-calculator/>) de la empresa Colormine, en el cual se

4. MÉTODOS

introducen los parámetros CIE L^* a^* b^* y como resultado se muestra un recuadro del color que se obtiene.

4.3.3 Estabilidad en pH

Los polvos se sumergieron en soluciones amortiguadoras de pH 2 y 6, se dejaron en reposo durante ocho horas a temperatura ambiente (~ 25 °C) y en oscuridad. Posteriormente se decantó la solución y los polvos se secaron en desecador, hasta peso constante. Una vez secos, se midió su color en colorímetro.

En ninguno de los casos el filtrado mostró coloración, por lo que se omitió medir su absorbancia.

4.3.4 Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Los polvos obtenidos de los tratamientos 27 (7.92 mg de 3-O glucósido de Cianidina) y 28 (10.81 mg de 3-O glucósido de Cianidina), así como polvos del blanco (sin extracto agregado) se molieron con bromuro de potasio (KBr) previamente desecado. El polvo obtenido se prensó para obtener una pastilla con forma cilíndrica, la cual se analizó bajo condiciones ambientales.

La absorbancia del espectro infrarrojo de las muestras se midió en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} usando un espectrofotómetro Perkin Elmer 680.

4.3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete JMP versión 13.2 (SAS Institute, Estados Unidos).

Los resultados se reportaron como la media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

4. MÉTODOS

En el caso de comparaciones entre tratamientos se utilizó la prueba de Tukey con una significancia de $\alpha = 0.05$.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Extracción con etanol

Para la extracción de estos metabolitos, el método debe procurar su máxima recuperación y mínima degradación, por lo que el más usado ha sido el que involucra solventes polares. Éste consiste en desnaturalizar la membrana del tejido celular y provocar la disolución de los pigmentos (Guisti y Wrolstad, 2001). Asimismo, para optimizar el rendimiento de extracción existen factores que pueden modificarse (Cacace y Mazza, 2003; Cerón *et al.*, 2011; Heras *et al.*, 2013; Puertas-Mejía *et al.*, 2013).

En el presente trabajo, para evitar la degradación de las antocianinas, la extracción duró una hora, en la bibliografía está reportado que es el tiempo suficiente para obtener buen rendimiento (Guisti y Wrolstad, 2001).

Con respecto a la temperatura, los valores altos en el proceso mejoran el rendimiento, sin embargo, esto degrada a las antocianinas (Guisti *et al.*, 2003), por ello, se utilizó como solvente etanol al 85%. Este solvente se prefiere para uso en alimentos, ya que no es tóxico, y la concentración se debe a que Cacace y Mazza (2003) comprobaron que con una alta cantidad de solvente se genera una mayor temperatura crítica, pudiendo así trabajar en temperaturas relativamente altas sin degradar a la molécula o afectar el buen rendimiento.

La extracción fue seguida de la evaporación del solvente. Éste es un paso crítico en la obtención de un extracto no degradado, por lo que se usó vacío a temperaturas bajas (30-40 °C) que han mostrado no causar degradación (Guisti y Wrolstad, 2001). Finalmente, se cuidó que el extracto no llegara a sequedad, para no afectar la integridad de los metabolitos (Cacace y Mazza, 2003). La cantidad de extracto obtenido en cada lote se muestra en la Tabla 3.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3. Cantidad de extracto obtenido

LOTE	mL de extracto/ 100 g peso fresco
1	96
2	109
3	98

5.2 pH diferencial

Para encontrar la concentración de antocianinas monoméricas en el extracto obtenido, se siguió la metodología de pH diferencial. Éste método se basa en los cambios de estructura que presentan las antocianinas en función del pH. Dicha transformación puede ser medida por espectroscopia óptica (Routray y Orsat, 2011).

La forma de oxonio coloreado predomina en pH 1 y la forma pseudobase carbinol sin color en pH 4.5; así, midiendo la absorbancia en la máxima longitud de onda y a 700 nm (para corrección de posibles interferentes) en ambos valores de pH, se podrá obtener una medición adecuada y rápida de las antocianinas monoméricas, aun en presencia de pigmentos degradados polimerizados y otros compuestos interferentes (Guisti y Wrolstad, 2001). Este método es el más usado, independientemente del tipo de muestra (jugo, extracto de fruta u otro) (Routray y Orsat, 2011).

En general, las antocianinas tienen una banda de absorción en la región del espectro visible de 490 nm a 550 nm, debido a que la banda de absorción es ancha, medir unos pocos nanómetros fuera de la longitud de onda máxima no alterará significativamente la estimación de los valores finales. Por ello, utilizar una longitud de onda de 520 nm para los derivados de cianidina permitió obtener una estimación adecuada del contenido total (Guisti y Wrolstad, 2001).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a las fórmulas descritas en la parte de metodología, la Tabla 4 muestra la absorbancia obtenida de cada extracto de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) y la concentración total de antocianinas monoméricas (mg/L) calculada como equivalente de 3-O glucósido de Cianidina:

Tabla 4 Concentración de antocianinas monoméricas de arándano azul*

LOTE	Absorbancia	mg de 3-O glucósido de cianidina /L	mg de 3-O glucósido de cianidina /100 g peso fresco
1	0.83 ± 0.11	1380.33	132.51
2	0.70 ± 0.02	1762.78	192.14
3	0.86 ± 0.003	3602.78	353.07

*Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar

La Tabla 4 también muestra la cantidad de antocianinas en 100g de peso fresco calculadas como equivalentes de 3-O glucósido de Cianidina, lo cual fue calculado considerando la cantidad de extracto obtenido en el punto 5.1. Dichos datos son congruentes con los reportados por Mazza y Miniati (1993) para arándano azul de 25 a 495 mg de 3-O glucósido de Cianidina /100g peso fresco.

5.3 Encapsulamiento

El proceso sol-gel produce una matriz sencilla de sílice cuando se utiliza TEOS como alcóxido precursor, tal fue el caso del presente proyecto. La hidrólisis y subsecuente condensación del alcóxido a bajas temperaturas causa su polimerización y permite la encapsulación de las moléculas orgánicas de interés (Rottman *et al.*, 1992; Ismail *et al.*, 2002; Gupta y Chaudhury, 2007; Serra y Fernández-Francos, 2016).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La más simple de las matrices de vidrio de sílice es un polímero de enlaces de silicato (-Si-O-Si), los cuales terminan en grupos silano (Si-OH). Estos últimos son capaces de aceptar o donar protones y formar una superficie altamente activa (Ismail *et al.*, 2002), lo que se comprobó con diferentes estudios (Chuang y Maciel, 1997). Se encontraron tres tipos de grupos silano; el 19% de ellos está aislado y no forma enlaces de hidrógeno con sus vecinos (I), el 35% se enlaza con sus vecinos por medio de una molécula de agua (II) y el 46% forma enlaces de hidrógeno con sus vecinos directamente (III) (Figura 9) (Ismail *et al.*, 2002).

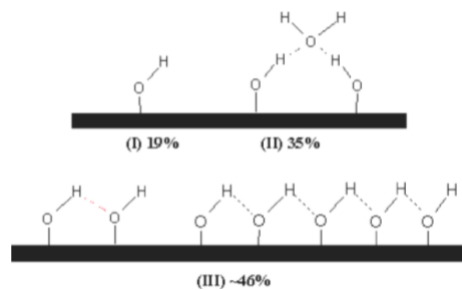


Figura 9. Esquema de los tres tipos de grupos silano en la superficie de la matriz sol-gel (Ismail *et al.*, 2002)

Debido a las reacciones involucradas, la matriz sol-gel tiene una naturaleza porosa y, de acuerdo con lo anterior, la superficie dentro de los poros también tiene cargas y enlaces de hidrógeno asociados (Ismail *et al.*, 2011), por lo que puede interactuar con la molécula encapsulada, sobre todo porque la matriz se va formando alrededor de la molécula, así que está muy cerca de ella.

Por la naturaleza porosa, especies químicas o analitos pueden entrar por difusión al sitio donde están encapsuladas las moléculas y generar una reacción selectiva (Gupta y Chaudhury, 2007; Ciriminna *et al.*, 2012; Kassal *et al.*, 2014). Por ello, la técnica sol-gel ha servido para encapsular: anticuerpos y otras proteínas, enzimas, iones metálicos, agentes colorimétricos, entre otros (Ciriminna *et al.*, 2012; Kandimalla *et al.*, 2006).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ejemplo de los agentes colorimétricos fue de interés para esta investigación. Se han utilizado como indicadores en sensores químicos de los cuales los más estudiados son los de pH (Rottman *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2003; Shamsipur *et al.*, 2008; Rovati *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015). Algunos colorantes sintéticos usados en los sensores de pH han sido: verde de bromocresol (Kassal *et al.*, 2014), rojo fenol (Wang *et al.*, 2003), rojo metilo (Jurmanović *et al.*, 2010), entre otros.

En el diseño de dichos sensores químicos se observaron algunos problemas, los principales fueron altos tiempos de respuesta y lixiviación de las moléculas colorimétricas (Avnir *et al.* 2005; Kassal *et al.*, 2014). Sin embargo, una de las ventajas del método sol-gel es que modulando las condiciones del proceso se puede obtener una encapsulación con propiedades ajustadas a lo que se requiera (Gupta y Chaudhury, 2007; Ciriminna *et al.*, 2012).

De tal modo, esta investigación se centró en buscar los niveles de los factores que lograrán una encapsulación de las antocianinas del extracto sin que se lixiviaran de la matriz sol-gel ni tuvieran respuesta ante cambios de pH del medio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Experimento 1

En el primer experimento se estudiaron cuatro factores: concentración del catalizador (ácido clorhídrico, HCl), relación molar agua: alcóxido (R), tiempo de reacción de la síntesis y lote de extracto (Tabla 5 y Tabla 6).

La cantidad de extracto añadida se fijó en 2 mL para elucidar el comportamiento de la matriz con los niveles fijados. El color de la solución era rojo intenso (ANEXO 1)

Tabla 5. Tratamientos de experimento 1 (Lote de extracto 1)

Tratamiento	HCl (M)	R	Reacción (h)	mg Extracto Lote 1
1	0.37	5	2	2.76
2	0.5			
3	1			
4	0.37	7		
5	0.5			
6	1			
7	0.37	5	4	
8	0.5			
9	1			
10	0.37	7		
11	0.5			
12	1			

El contenido de antocianinas monoméricas del lote 1 fue de 1380.33 mg de 3-O glucósido de Cianidina /L de extracto y del lote 2 fue de 1762.78 mg de 3-O glucósido de Cianidina /L de extracto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Tratamientos de experimento 1 (Lote de extracto 2)

Tratamiento	HCl (M)	R	Reacción (h)	mg Extracto Lote 2
13	0.37	5	2	3.53
14	0.5			
15	1			
16	0.37	7		
17	0.5			
18	1			
19	0.37	5	4	
20	0.5			
21	1			
22	0.37	7		
23	0.5			
24	1			

A continuación se hablará de cada uno de los factores y los niveles escogidos para el experimento.

CATALIZADOR

La síntesis del proceso de polimerización se considera ácida cuando el pH es menor a 2 y básica cuando el pH es mayor a 2 (Brinker, 1990). En el experimento se utilizó la ácida debido a que, como ya se mencionó, el grado de hidrólisis es mayor que el de condensación, por lo que tiende a dar geles de sílica ramificados con mejores propiedades estructurales (Shamsipur y Azimi, 2001) y un tamaño de poro más pequeño, contrario a lo que sucede en el proceso en condiciones básicas, donde se aceleran las reacciones de condensación sobre las reacciones de hidrólisis, y en las cuales se generan estructuras con tamaño de poro mayor (Dunn y Zink, 1991; Ciriminna *et al.*, 2012).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, las antocianinas, cuando están en un ambiente ácido tienen estructura de catión flavilio, muy estable (Guisti *et al.*, 2003), por lo que una síntesis ácida fue preferible. El gel formado tenía una coloración rojo intenso, debido a la estructura mencionada.

RELACIÓN MOLAR AGUA: ALCÓXIDO (R)

Una relación molar de 2 es teóricamente suficiente para completar las reacciones de hidrólisis y condensación; sin embargo, la reacción no se completa, pues se forman especies intermedias (Brinker, 1990; Ciriminna *et al.*, 2012).

Shamsipur y Azimi (2001) reportaron un estudio con TEOS modificando distintos factores donde encontraron que con $R=3$ y un ambiente ácido la lixiviación del colorante propuesto era evidente. Se dedujo que el valor de R bajo causó una hidrólisis incompleta y a su vez menor condensación, lo que generó una matriz con una estructura más abierta.

En el presente estudio los valores propuestos fueron mayores (5 y 7), ya que se ha reportado que, a cualquier valor de pH, si la relación molar incrementa, el grado de hidrólisis también incrementa (McDonagh *et al.*, 1996). Además, con $R > 2$ se genera agua como producto en vez de alcohol, lo cual es preferible porque el alcohol podría afectar la estructura de las antocianinas. Se esperaba encontrar un nivel donde el tamaño de poro no permitiera la lixiviación de la molécula y la estabilizara por completo.

TIEMPO DE REACCIÓN Y SECADO

La etapa de reacción se mantuvo a 30 °C para estandarizar el proceso, y se sabe que las antocianinas resisten esta temperatura, sobre todo si se mantienen en un ambiente ácido. Sin embargo, es posible que se presente cierto grado de degradación, por lo que se estudiaron dos tiempos para analizar hasta qué punto las moléculas son resistentes al proceso.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Otra razón por la que se estudió el tiempo de reacción fue que la literatura menciona que el factor R determina la cantidad de moléculas hidrolizadas y a su vez las moléculas que tienen capacidad de condensarse. Sin embargo, aun en valores altos de R puede haber moléculas sin hidrolizar (McDonagh *et al.*, 1996).

En la etapa de secado, una vez que el sol se depositó en el contenedor que determinaría su forma (caja Petri), el co-solvente y el agua comenzaron a evaporarse. En esta etapa las reacciones de condensación fueron más evidentes, pues hubo más interacción entre las moléculas (Wang *et al.*, 2003; Gupta y Chaudhury, 2007). Esta etapa no tuvo un tiempo determinado, a pesar de que es en esta última donde el tamaño de poro se define (Wang *et al.*, 2003). Pero debido a que la forma buscada era un polvo, era necesario que todo el solvente saliera de la matriz, sin importar qué tanto se tardara, es por eso que se mantuvo el polvo en desecador hasta peso constante.

La matriz formada en esta última etapa tuvo un grosor de aproximadamente 1 mm. El material tuvo una forma similar a hojuelas. Éstas se molieron en un mortero de ágata para minimizar el tamaño de partícula a lo mínimo posible, tratando de que fuera homogéneo.

LOTE DE EXTRACTO

Finalmente, para que no existiera alta degradación de las antocianinas, se cuidaron las condiciones de extracción. Sin embargo, está claro que la temperatura, los solventes usados, la luz y otros factores causan diferentes reacciones en la molécula, como copigmentación, autoasociación, complejación, etc. (Guisti *et al.*, 2003; Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán, 2015; Trouillas *et al.*, 2016). Es por ello que se estudió el lote de extracto en dos niveles. El objetivo fue analizar si las diferentes condiciones en que se encontraban las moléculas podían afectar su comportamiento en la matriz sol-gel y por ende los resultados de color, además de saber si existía reproducibilidad en el método.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1.1 Prueba de lixiviación

Los polvos obtenidos se sumergieron en solución amortiguadora de pH 2 y luego se secaron. Se midió la absorbancia de la solución para investigar si el tamaño de poro formado fue suficiente para mantener a la molécula encapsulada, es decir, para que no se lixiviera. El fundamento de lo anterior es que, como ya se mencionó, las antocianinas tienen una banda de absorción en la región del espectro visible de 490 nm a 550 nm (Guisti y Wrolstad, 2001).

La solución se midió a 520 nm. Los resultados de los tratamientos del experimento 1 (Lote 1) se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Absorbancia obtenida de la prueba de lixiviación. Experimento 1 (Lote 1)*

Tratamiento	HCl (M)	R	Reacción (h)	Absorbancia (520 nm)	Color en solución
1	0.37	5	2	0 ^a	no
2	0.5			0 ^a	no
3	1			0 ^a	sí
4	0.37	7		0 ^a	sí
5	0.5			0.698 ± 0.11	sí
6	1			0.213 ± 0.02	sí
7	0.37	5	4	0 ^a	no
8	0.5			0 ^a	no
9	1			0 ^a	no
10	0.37	7		0 ^a	no
11	0.5			0 ^a	no
12	1			0 ^a	no

* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar

^a Indica que la absorbancia medida a 520 nm no estuvo dentro del límite de detección del equipo (0.2-1.2)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tratamientos 1, 2, 7 – 12, no presentaron ni coloración en la solución ni absorbancia dentro del límite de detección del equipo (0.2 – 1.2). Esto sugirió que la matriz formada en estos tratamientos era adecuada para que las antocianinas no tuvieran posibilidad de salir.

Los tratamientos 3 – 6 mostraron coloración en la solución, lo que sugirió que la estructura formada no era adecuada, pues permitía que las antocianinas salieran de la matriz a la solución. A pesar de que sólo los tratamientos 5 y 6 fueron los que mostraron absorbancia dentro del límite de detección del equipo, el color de la solución fue decisivo para que se descartaran todos estos tratamientos, pues el color es indicativo de presencia de moléculas de antocianina.

Tabla 8. Absorbancia obtenida de la prueba de lixiviación. Experimento 1 (Lote 2)*

Tratamiento	HCl (M)	R	Reacción (h)	Absorbancia (520 nm)	Color en solución
13	0.37	5	2	0 ^a	no
14	0.5			0 ^a	no
15	1			0 ^a	sí
16	0.37	7		0 ^a	sí
17	0.5			0 ^a	sí
18	1			0 ^a	sí
19	0.37	5	4	0 ^a	no
20	0.5			0 ^a	no
21	1			0 ^a	no
22	0.37	7		0 ^a	no
23	0.5			0 ^a	no
24	1			0 ^a	no

* Los datos son la media de tres réplicas \pm la desviación estándar

^a Indica que la absorbancia medida a 520 nm no estuvo dentro del límite de detección del equipo (0.2-1.2)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto al lote 2 (Tabla 8), los tratamientos 13,14, 19 – 24, no presentaron ni coloración en la solución ni absorbancia dentro del límite de detección del equipo (0.2 – 1.2). En cambio, los tratamientos 15 – 18 sí mostraron coloración en la solución, y aunque ninguno de ellos presentó absorbancia dentro del límite de detección del equipo (0.2 – 1.2), el color de la solución en este caso también fue decisivo para descartar todos estos tratamientos.

El comportamiento de la matriz fue similar, independientemente del lote de extracto usado, por lo que se pudo concluir que el comportamiento de las antocianinas dentro de la matriz no fue afectado por posibles variaciones en su estructura.

Finalmente, por lo discutido, los tratamientos que formaron una estructura adecuada de la matriz para poder encapsular a las antocianinas fueron 1, 2, 7 – 12. En cuanto a niveles de los factores esto significa: a dos horas de reacción, concentración de HCl 0.37 y 0.5, y factor R de 5. A 4 horas de reacción, todos los niveles fueron adecuados (Tabla 9).

Tabla 9. Niveles adecuados para la encapsulación de antocianinas*

Tratamiento	HCl (M)	R	Reacción (h)	Absorbancia (520 nm)	Color en solución
1	0.37	5	2	0 ^a	no
2	0.5			0 ^a	no
7	0.37	5	4	0 ^a	no
8	0.5			0 ^a	no
9	1			0 ^a	no
10	0.37	7		0 ^a	no
11	0.5			0 ^a	no
12	1			0 ^a	no

* Los datos son la media de tres réplicas \pm la desviación estándar

^a Indica que la absorbancia medida a 520nm no estuvo dentro del límite de detección del equipo (0.2-1.2)

5.3.1.2 Prueba de color

Se realizó una prueba de color de los polvos obtenidos para investigar más detalladamente el comportamiento de las antocianinas en la matriz.

El sistema de color usado, CIE $L^* a^* b^*$, está diseñado para comunicar un color de manera objetiva. Utiliza un espacio tridimensional con 3 ejes, L , a y b (Figura 10). El eje vertical central representa la luminosidad (L^*) y puede tomar valores de 0 (negro) a 100 (blanco). Los parámetros a y b son conocidos como capas de cromaticidad; la capa a^* se indica como el eje de verde ($-a$) a rojo ($+a$), y la capa b^* se indica como el eje de azul ($-b$) a amarillo ($+b$). El cero indica gris neutral.

El fundamento del sistema es que un color no puede ser verde y rojo al mismo tiempo, así como tampoco azul y amarillo. Es decir, los colores son contrastantes (Bora *et al.*, 2015).

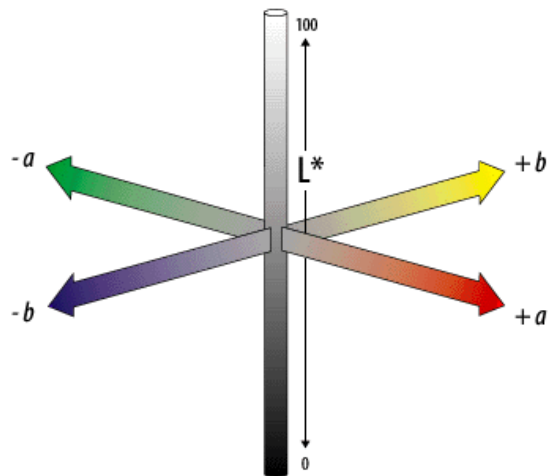


Figura 10 Parámetros CIE $L^* a^* b^*$ (Bora *et al.*, 2015)

La Tabla 10 muestra los parámetros CIE $L^* a^* b^*$ de los polvos obtenidos con el experimento 1 (Lote 1). Los datos se graficaron para facilitar el análisis.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 10. Parámetros de color Experimento 1 (Lote 1)*

T ¹	HCl (M)	R	Reacción (h)	L*	a*	b*
1	0.37	5	2	70.20 ± 0.29 ^e	11.41 ± 0.14 ^e	7.32 ± 0.10 ^f
2	0.5			67.78 ± 0.26 ^g	13.45 ± 0.32 ^c	7.35 ± 0.20 ^f
3	1			66.97 ± 0.11 ^h	10.71 ± 0.10 ^f	7.88 ± 0.09 ^e
4	0.37	7		64.24 ± 0.41 ^j	15.18 ± 0.22 ^a	6.33 ± 0.06 ^g
5	0.5			65.93 ± 0.14 ⁱ	14.69 ± 0.23 ^b	6.29 ± 0.13 ^g
6	1			68.77 ± 0.04 ^f	12.39 ± 0.09 ^d	6.24 ± 0.07 ^g
7	0.37	5	4	70.16 ± 0.36 ^e	9.63 ± 0.21 ^g	10.82 ± 0.13 ^c
8	0.5			75.95 ± 0.07 ^a	6.14 ± 0.04 ^k	12.29 ± 0.07 ^b
9	1			71.51 ± 0.10 ^d	9.10 ± 0.02 ^h	10.90 ± 0.04 ^c
10	0.37	7		73.82 ± 0.08 ^b	7.87 ± 0.06 ⁱ	12.46 ± 0.15 ^b
11	0.5			73.31 ± 0.14 ^b	6.78 ± 0.07 ^j	13.79 ± 0.10 ^a
12	1			72.29 ± 0.15 ^c	9.06 ± 0.08 ^h	10.48 ± 0.10 ^d

¹Tratamiento

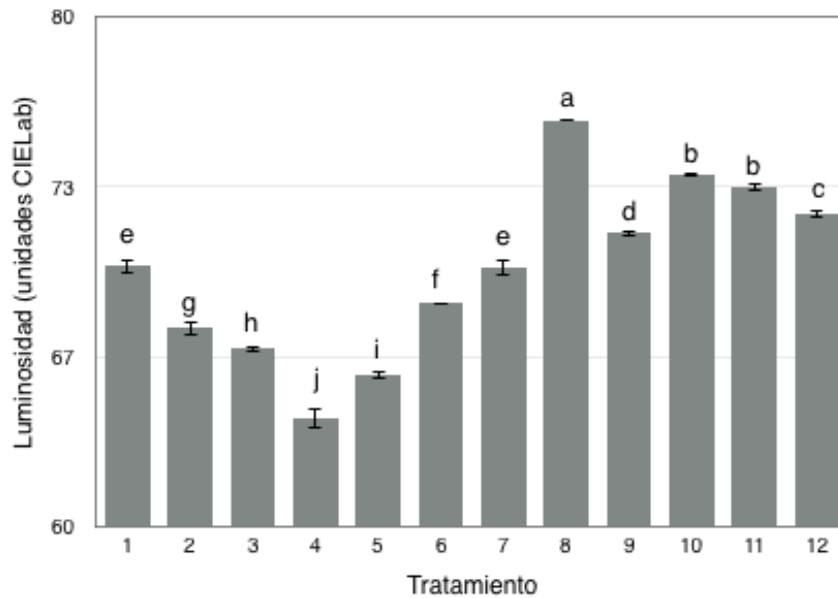
*Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

En la Gráfica 1 se observan los resultados del parámetro CIE L*. Los tratamientos de dos horas de reacción (1 – 6) muestran valores estadísticamente menores a los tratamientos de cuatro horas (7 – 12), lo que indicó que a dos horas, las muestras fueron más opacas, y a cuatro horas, fueron más brillantes.

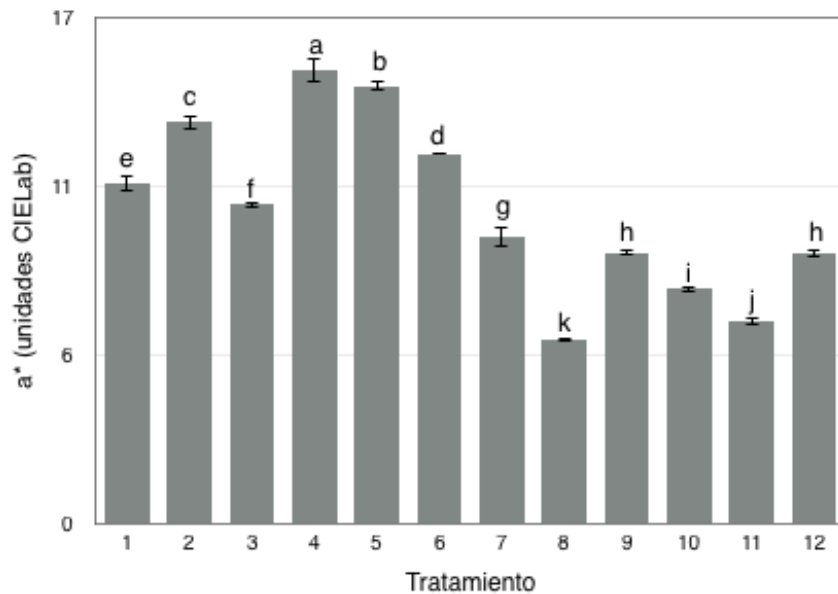
La Gráfica 2 muestra los resultados del parámetro CIE a*. Los tratamientos a dos horas (1 – 6) mostraron valores estadísticamente mayores a los valores de los tratamientos a cuatro horas (7 – 12). Esto sugirió que los polvos de dos horas tendían a tener una coloración más roja que la de los polvos con cuatro horas de reacción.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Gráfica 1. Parámetro CIE L* experimento 1 (Lote 1)

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

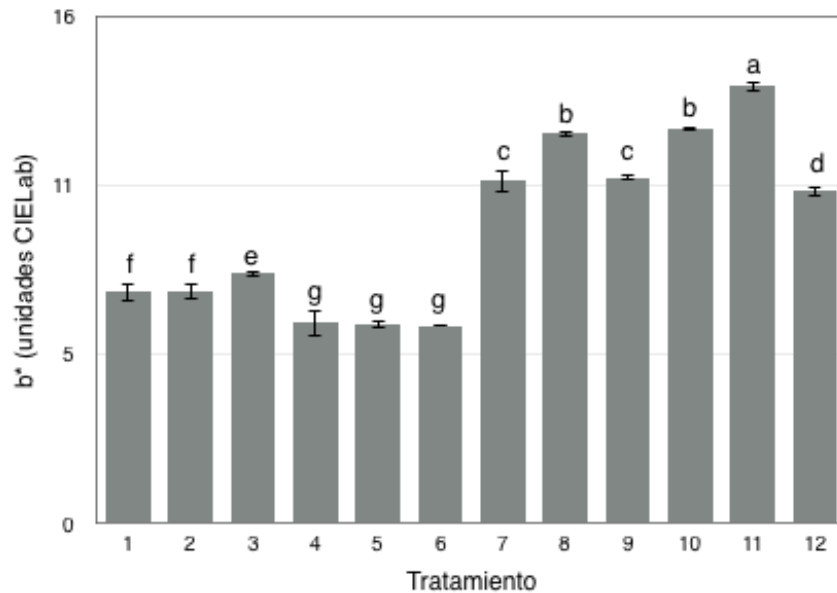


Gráfica 2. Parámetro CIE a* experimento 1 (Lote 1)

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cambio, los resultados del parámetro CIE b^* (Gráfica 3) mostraron valores más altos en los tratamientos a cuatro horas de reacción (7 – 12), diferentes estadísticamente de los de dos horas (1 – 6), indicando que con mayor tiempo de reacción el color de los polvos tendió a amarillo.



Gráfica 3. Parámetro CIE b^* experimento 1 (Lote 1)

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

La Tabla 11 muestra los parámetros croma y ángulo hue de los polvos obtenidos con el experimento 1 (Lote 1), los cuales son usados para analizar el color de una forma más sencilla.

El parámetro de cromaticidad indica la saturación de color, los valores van de 0 (menos saturado) a 100 (más saturado) (Figura 11). El ángulo hue, también llamado matiz, indica el tono del color. Los valores van de 0° a 360° (Figura 12) (Bora *et al.*, 2015).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11. Parámetros de color Experimento 1 (Lote 1)*

T ¹	HCl (M)	R	Reacción (h)	Croma	Ángulo hue
1	0.37	5	2	13.56 ± 0.17 ^{ef}	32.68 ± 0.14 ^g
2	0.5			15.33 ± 0.38 ^b	28.66 ± 0.10 ^h
3	1			13.30 ± 0.14 ^f	36.35 ± 0.04 ^f
4	0.37	7		16.45 ± 0.23 ^a	22.63 ± 0.10 ^k
5	0.5			15.98 ± 0.26 ^a	23.17 ± 0.13 ^j
6	1			13.87 ± 0.11 ^{de}	26.73 ± 0.18 ⁱ
7	0.37	5	4	14.48 ± 0.24 ^c	48.35 ± 0.29 ^e
8	0.5			13.74 ± 0.07 ^{def}	63.46 ± 0.06 ^a
9	1			14.20 ± 0.04 ^{cd}	50.14 ± 0.12 ^c
10	0.37	7		14.74 ± 0.16 ^c	57.72 ± 0.13 ^b
11	0.5			15.37 ± 0.12 ^b	63.82 ± 0.06 ^a
12	1			13.86 ± 0.12 ^{def}	49.15 ± 0.12 ^d

¹ Tratamiento

* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

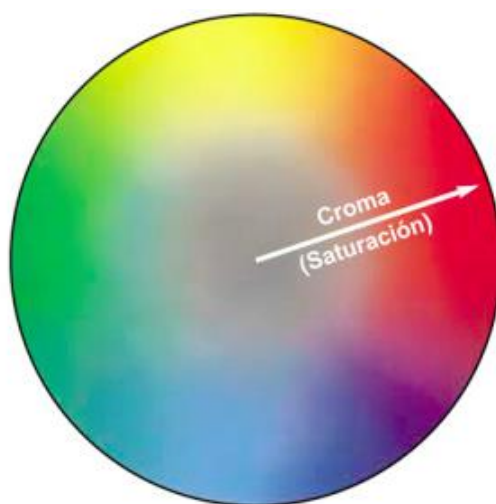


Figura 11. Parámetro cromaticidad (<http://bit.ly/2xdaOAI>)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

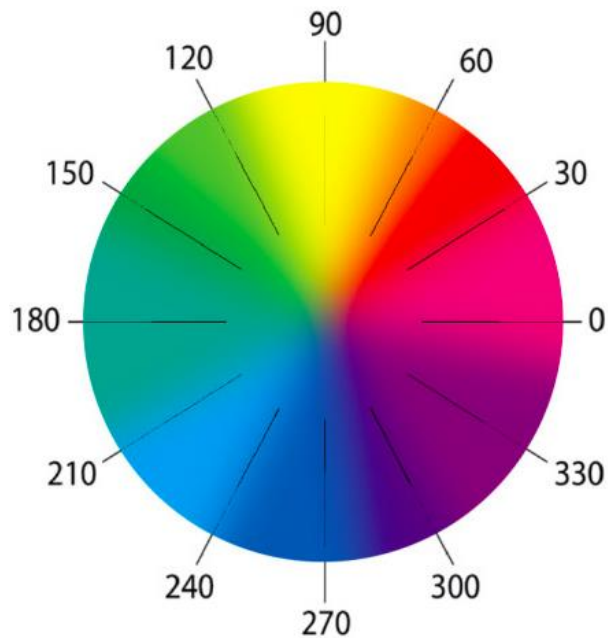
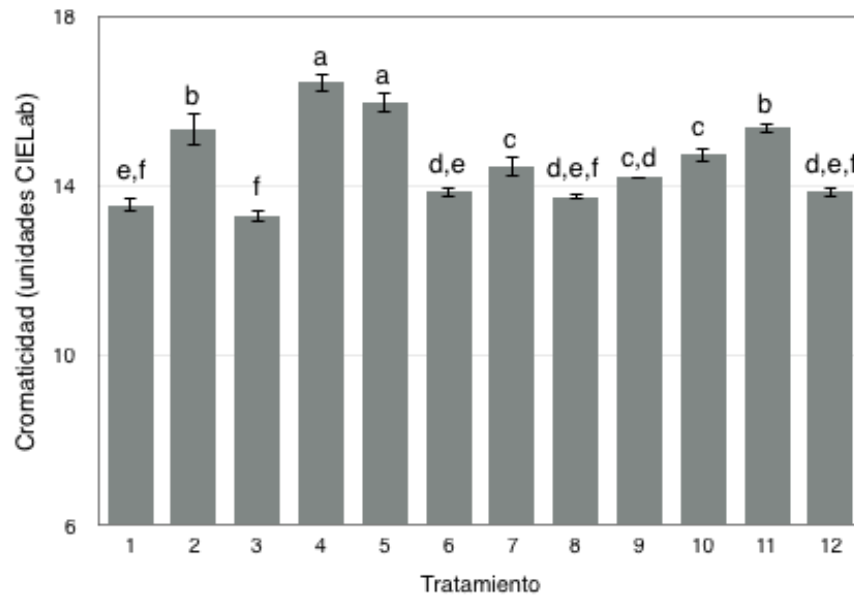


Figura 12. Parámetro ángulo hue (<http://bit.ly/2xdaOAi>)

Los datos obtenidos se graficaron para facilitar el análisis. La Gráfica 4 muestra los datos de cromaticidad. Todos los valores estuvieron dentro del rango 12 – 16, y considerando la Figura 11, se pudo observar que la diferencia no era significativa pues la saturación del color de los polvos era similar en todos los tratamientos.

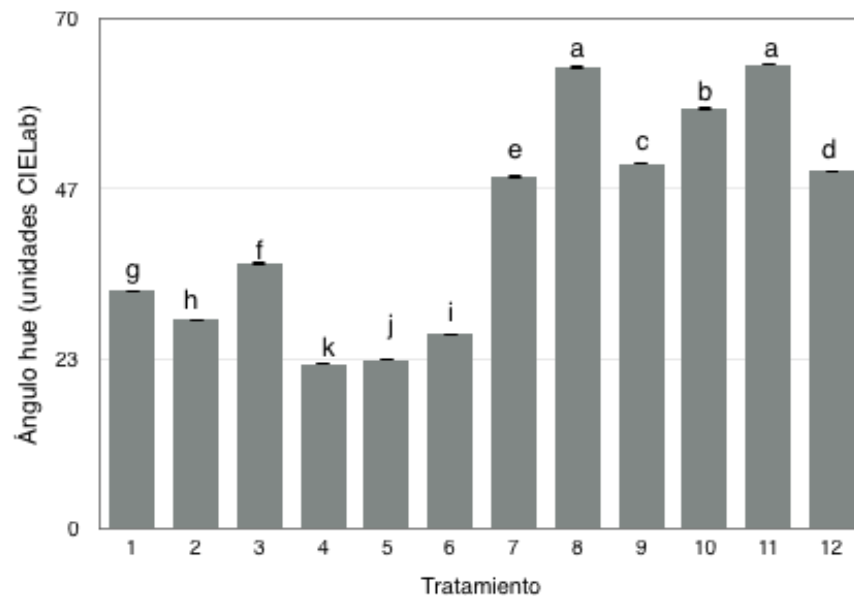
Por otro lado, la Gráfica 5 muestra los valores obtenidos para el ángulo hue. Los tratamientos a dos horas (1 – 6) mostraron valores menores y estadísticamente diferentes a los obtenidos con cuatro horas de reacción (7 – 12). Tomando en cuenta la Figura 12, se pudo observar que los tratamientos 1 – 6 (dos horas) tendían a los tonos rojos, al contrario de los tratamientos 7 – 12 (cuatro horas), que tendían a los amarillos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Gráfica 4. Parámetro croma experimento 1 (Lote 1)

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)



Gráfica 5. Parámetro ángulo hue experimento 1 (Lote 1).

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los resultados del color de los polvos, tanto con los parámetros CIE $L^* a^* b^*$, como con los parámetros de cromaticidad y ángulo hue, se pudo concluir que una reacción de cuatro horas a 30 °C causa degradación de las antocianinas, pues la estructura degradada llamada chalcona es la que presenta coloraciones amarillas (Hashim *et al.*, 2012).

Con el lote 2 se observó un comportamiento similar en todos los tratamientos con los parámetros estudiados (ANEXO 2).

De esta manera, el nivel fijado para el factor tiempo de reacción fue de 2 horas. Y, debido a que los tratamientos 1 y 2 fueron los que presentaron una estructura adecuada, según la prueba en el punto anterior, y que los colores entre estos dos tratamientos no fueron significativamente diferentes, los niveles del tratamiento 1 se consideraron para seguir con los experimentos (Tabla 12).

Tabla 12. Niveles de factores para una encapsulación adecuada

Tratamiento	HCl (M)	R	Reacción (h)
1	0.37	5	2

5.3.2 Experimento 2

Con el experimento 1 se fijaron los niveles de los factores, con los cuales se formó una matriz que no permitió la lixiviación de las antocianinas del extracto de arándano. Los polvos obtenidos mostraron una coloración rojiza, sin embargo, los valores mostrados por los parámetros de color indican un tono bajo.

Para obtener un aditivo que proporcionara un color más intenso, se propuso un experimento en donde el factor estudiado fuera la cantidad agregada de extracto de antocianina.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 13 muestra los tratamientos del experimento 2. El contenido de antocianinas monoméricas del lote 2 fue de 1762.78 mg de 3-O glucósido de Cianidina /L de extracto.

Tabla 13. Tratamientos de experimento 2

Tratamiento	HCl (M)	R	Reacción (h)	mL Extracto	mg Extracto
25	0.37	5	2	3.00	5.29
26				3.75	6.61
27				4.50	7.93

5.3.2.1 Lavado de polvos

Los polvos obtenidos se sumergieron en una solución amortiguadora (pH 2), se secaron, y se midió la absorbancia de la solución por espectrofotometría UV-Vis. El objetivo de esta etapa no era averiguar si las antocianinas estaban lixiviándose de la matriz, pues los niveles de los factores escogidos ya habían mostrado que la encapsulación era adecuada. Lo que se buscaba era saber si la totalidad de las antocianinas había quedado encapsulada o si había algunas moléculas entre los poros o fuera de la matriz, ya que la cantidad era mayor y era posible que las jaulas formadas no fueran suficientes para encapsularlas a todas.

La Tabla 14 muestra los resultados de la prueba de lavado. Las soluciones del lavado de los polvos de los tratamientos 25 (5.29 mg) y 26 (6.61 mg) no presentaron color ni absorbancia dentro del límite de detección del equipo (0.2 – 1.2). En cambio, la solución del tratamiento 27 (7.93 mg) sí presentó coloración y una absorbancia dentro del límite de detección (0.59).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14. Absorbancia obtenida del lavado de los polvos Experimento 2*

Tratamiento	mg Extracto	Absorbancia (520 nm)	Color en solución	Número de lavado
25	5.29	0 ^a	no	1
26	6.61	0 ^a	no	1
27	7.93	0.59 ± 0.10	sí	1
		0.37 ± 0.11	sí	2
		0 ^a	no	3

* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar

^a Indica que la absorbancia medida a 520nm no estuvo dentro del límite de detección del equipo (0.2-1.2)

Para averiguar si las antocianinas en efecto no se estaban lixiviando de la jaula de silicio en el tratamiento 27 (7.93 mg), y que sólo estaban fuera de la matriz, el lavado se repitió. Se encontró que en el segundo lavado la absorbancia disminuyó de 0.59 a 0.37, sin embargo, la solución de lavado seguía mostrando coloración, evidenciando la presencia de antocianinas. No obstante, en el tercer lavado la absorbancia de la solución no pudo medirse pues no estuvo dentro del límite de detección del equipo (0.2 – 1.2) y no presentó coloración, lo que sugirió que una vez lavadas las antocianinas que no habían podido ser encapsuladas, el resto se mantenía dentro de la matriz. Con esto se pudo corroborar que la matriz formada era adecuada.

5.3.2.2 Prueba de color

La Tabla 15 muestra los parámetros CIE L* a* b*, croma y ángulo hue de los polvos del experimento 2. Los resultados del tratamiento 27 (7.93 mg) se refieren a los polvos después de haber sido lavados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 15. Parámetros de color Experimento 2*

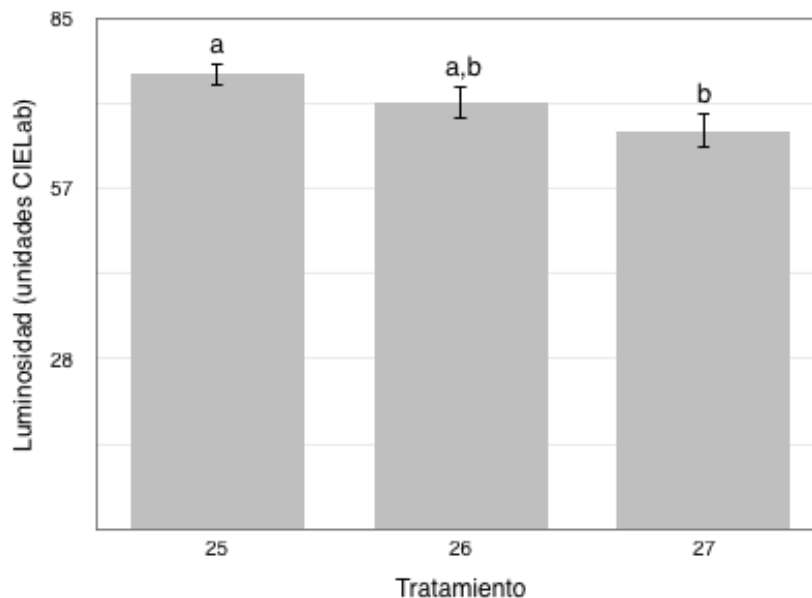
T ¹	mg Extracto	L*	a*	b*	Croma	Ángulo hue
25	5.29	75.87± 1.93 ^a	6.79± 0.90 ^b	10.56± 0.42 ^b	12.57± 0.63 ^b	57.33± 3.52 ^a
26	6.61	71.24± 2.75 ^{ab}	8.71±1.21 ^{ab}	16.05± 1.50 ^a	18.27± 1.84 ^a	61.56± 1.80 ^a
27	7.93	66.35± 2.86 ^b	10.23± 1.29 ^a	7.32± 0.74 ^c	12.41± 1.05 ^b	34.72± 3.69 ^b

¹ Tratamiento

* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Los datos se graficaron para facilitar el análisis. La Gráfica 6 muestra los resultados de luminosidad. Los tres tratamientos presentaron valores altos, considerando que el rango es de 0 – 100, pero fueron disminuyendo conforme el nivel de extracto aumentó, lo que indicó que el color se hizo menos brillante conforme el nivel de antocianinas aumentaba.



Gráfica 6. Parámetro CIE L* Experimento 2.

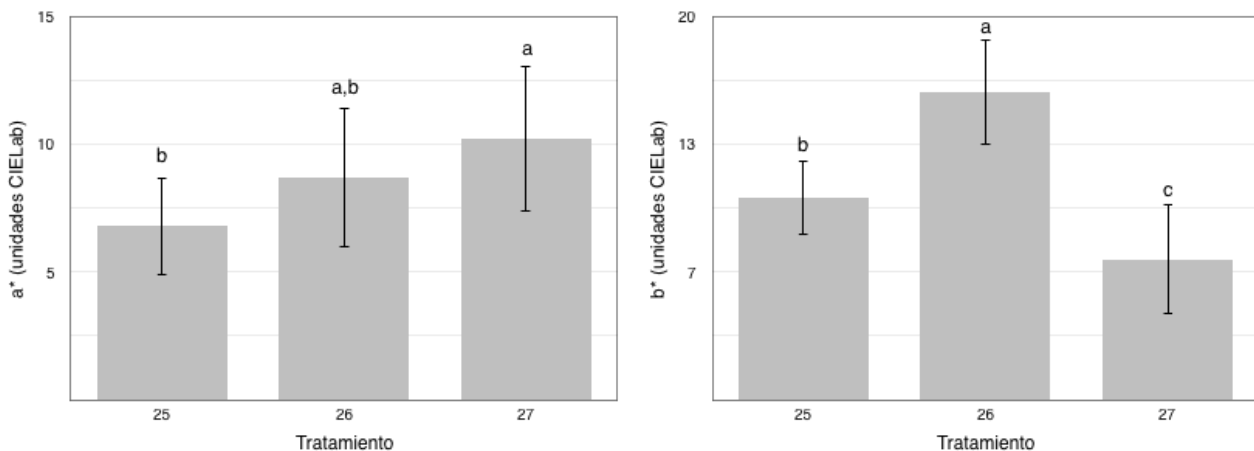
Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Gráfica 7 muestra resultados de parámetros CIE a^* y b^* . De acuerdo con lo descrito anteriormente, valores positivos del parámetro a^* indican tendencia al color rojo. Se observó que el tratamiento 25 (5.29 mg) tenía un valor menor que el tratamiento 26 (6.61 mg) y éste a su vez un valor menor que el tratamiento 27 (7.93 mg), sugiriendo que a mayor cantidad de extracto agregado, el valor del parámetro a^* aumentaba. Es decir, la tonalidad roja aumentaba.

El parámetro b^* mostró en los tratamientos 25 (5.29 mg) y 26 (6.61 mg) valores altos, 10.56 y 16.05, respectivamente, en el tratamiento 27 (7.93 mg) se observó un valor estadísticamente bajo (7.32). Lo anterior sugirió que los polvos de los tratamientos 25 y 26 tendían a amarillo y los del tratamiento 27 tendían a azul.

Analizando estos dos parámetros en conjunto se puede calcular la tonalidad del color de los polvos en cada tratamiento. En los tratamientos 25 (5.29 mg) y 26 (6.61 mg) donde se observó tendencia hacia el rojo y el amarillo se sugiere que el color observado tenía una tonalidad naranja. En cambio, el tratamiento 27 (7.93 mg) mostró tendencia hacia los colores rojo y azul lo que sugiere solamente que los polvos tenían una diferente tonalidad roja.

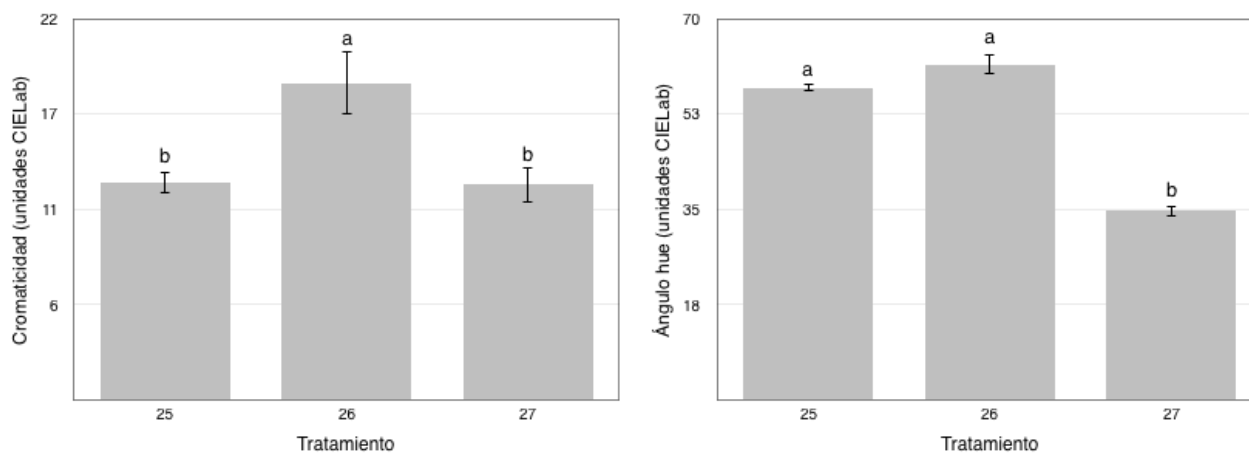


Gráfica 7. Parámetros CIE a^* y b^* Experimento 2

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar con más facilidad los colores de los polvos obtenidos, se consideraron los datos de cromaticidad y ángulo hue.



Gráfica 8. Parámetros croma y ángulo hue Experimento 2

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)




La Gráfica 8 indica que los valores de cromaticidad son bajos (12 – 18), considerando que el rango de este parámetro va de 0 – 100.

El ángulo hue, por su parte, presentó valores altos para los tratamientos 25 (5.29 mg) y 26 (6.61 mg), 57.33 y 61.56, respectivamente. En cuanto al tratamiento 27 (7.93 mg) el valor fue bajo (34.72). Considerando la Figura 12, estos valores nos permitieron corroborar que el color de los polvos de los tratamientos 25 (5.29 mg) y 26 (6.61 mg) tendían hacia una tonalidad naranja, y que los polvos del tratamiento 27 (7.93 mg) tendían hacia una tonalidad roja diferente, en este caso se consideró que la tonalidad era tendente al rosa.

Con este experimento se comprobó que, agregando una mayor cantidad de extracto, el color de los polvos iba incrementando. Para demostrar esto de una manera más gráfica, se utilizó el programa *Delta-E Calculator*. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 16. Color de polvos según el programa *Delta-E Calculator* Experimento 2

Tratamiento	mg Extracto	Color	Tendencia del color
25	5.29		Naranja
26	6.61		Naranja
27	7.93		Rosa

En el caso del tratamiento 27 (7.93 mg), con la mayor cantidad de extracto agregada, el color tendió hacia un tono rosa, por lo que se sugirió hacer otro experimento (Experimento 3) para investigar si se podía obtener un aditivo con un color más intenso.

5.3.2.3 Prueba de pH

Se analizó la estabilidad de los polvos ante variaciones de pH de 2 a 6. Los valores se escogieron debido a que el extracto sin encapsular tiene tonos distintos entre ellos (ANEXO 3).

Los resultados de los parámetros CIE L* a* b* de los polvos después de la prueba de pH se muestran en la Tabla 17, y los resultados de los parámetros croma y ángulo hue de los polvos después de la prueba de pH se muestran en la Tabla 18. Los datos se graficaron para facilitar el análisis.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 17. Parámetros de color de prueba de pH Experimento 2*

T ¹	mg Extracto	pH	L*	a*	b*
25	5.29	2	70.51 ± 0.11 ^c	8.43 ± 0.12 ^b	13.05 ± 0.17 ^a
		6	71.02 ± 0.15 ^b	6.87 ± 0.09 ^c	12.56 ± 0.16 ^a
26	6.61	2	78.74 ± 0.24 ^a	4.97 ± 0.21 ^d	9.89 ± 0.34 ^b
		6	78.98 ± 0.13 ^a	4.16 ± 0.08 ^e	9.91 ± 0.13 ^b
27	7.93	2	69.18 ± 0.09 ^d	9.95 ± 0.23 ^a	7.40 ± 0.18 ^d
		6	67.56 ± 0.20 ^e	6.97 ± 0.01 ^c	8.09 ± 0.04 ^c

¹ Tratamiento

* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Tabla 18. Parámetros de color de prueba de pH Experimento 2*

Tratamiento	mg Extracto	pH	Croma	Ángulo hue
25	5.29	2	15.53 ± 0.20 ^a	57.13 ± 0.09 ^d
		6	14.31 ± 0.18 ^b	61.32 ± 0.16 ^c
26	6.61	2	11.07 ± 0.40 ^d	63.33 ± 0.20 ^b
		6	10.75 ± 0.15 ^d	67.21 ± 0.15 ^a
27	7.92	2	12.40 ± 0.29 ^c	36.64 ± 0.06 ^f
		6	10.68 ± 0.02 ^d	49.23 ± 0.18 ^e

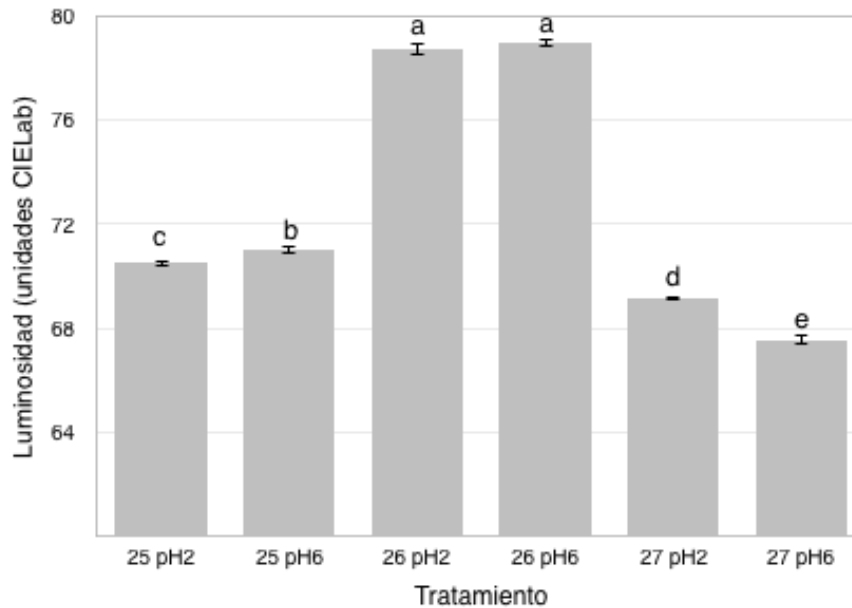
* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

La Gráfica 9 muestra los resultados del parámetro CIE L*. Considerando que el rango de medición de este parámetro va de 0 a 100, los valores se

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

consideraron similares, a pesar de la variación del pH, en cada uno de los tratamientos. Las diferencias estadísticas se descartaron por esta razón. Lo anterior sugirió que la luminosidad de los polvos no varió al modificar el pH.

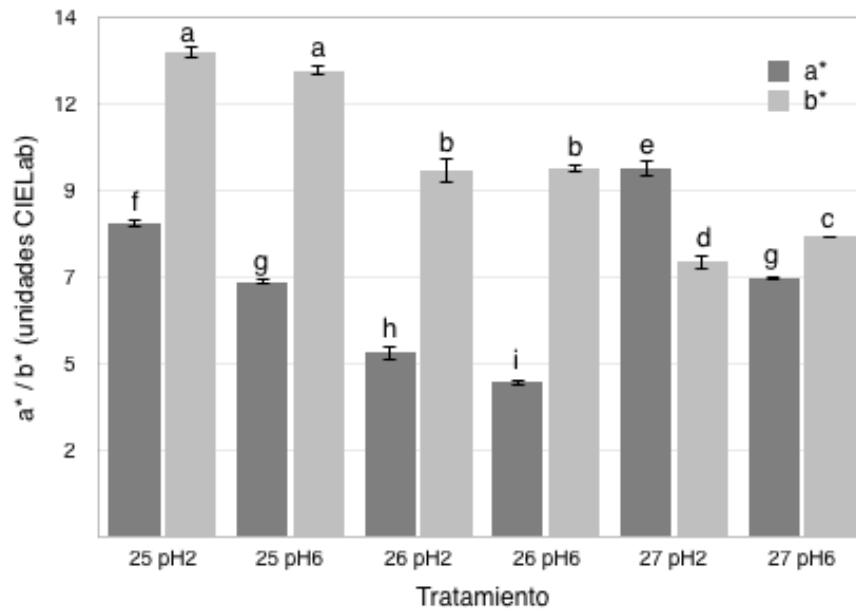


Gráfica 9. Parámetro CIE L* de prueba de pH Experimento 2

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

En cuanto al parámetro a^* (Gráfica 10) se observó que, en cada tratamiento, al pasar de pH 2 a pH 6 el valor disminuía y la diferencia era estadísticamente significativa. Esto sugería que al variar el pH de la solución, el color tendía a un tono rojo distinto (hacia el tono azul). Sin embargo, se analizaron los valores obtenidos en pH 2 y pH 6 del tratamiento 25 (5.29 mg) fueron 8.43 - 6.87, los del tratamiento 26 (6.61 mg) fueron 4.97 - 4.16 y los del tratamiento 27 (7.93 mg) fueron 9.95 - 6.97, respectivamente, y se concluyó que los valores eran similares y que podían ser descartadas las diferencias marcadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Gráfica 10. Parámetros CIE a^* y b^* de prueba de pH Experimento 2







Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

La Gráfica 10 también muestra los resultados del parámetro b^* . Los polvos de los tratamiento 25 (5.29 mg) y 26 (6.61 mg) mostraron valores sin diferencias significativas estadísticamente, independientemente del pH de la solución en la que se sumergieron. En cambio, los valores del tratamiento 27 (7.92 mg) eran diferentes estadísticamente, sin embargo, eran similares (7.40 – 8.09) por lo que se decidió no tomar en cuenta las diferencias estadísticas marcadas.

Se reporta a continuación el color de los polvos (Tabla 19) obtenidos a partir del programa *Delta-E Calculator*. Esto se llevó a cabo para reportar de una manera más gráfica los resultados antes discutidos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 19. Color de los polvos de prueba de pH de acuerdo a *Delta-E Calculator* Experimento 2

Tratamiento	25	26	27
pH 2			
pH 6			

A pesar de las diferencias discutidas anteriormente, comparando los recuadros, de cada tratamiento, entre pH 2 y pH 6, se pudo evidenciar el hecho de que, en efecto, los polvos no mostraron cambios de color después de la prueba de pH.

Tratando de explicar la estabilización de las antocianinas dentro de la matriz ante las variaciones de pH, se plantearon dos hipótesis.

La primera es que, debido a la búsqueda de un tamaño de poro pequeño, se pudo haber formado un tamaño tal que moléculas como iones $-OH$ no pudieron pasar a través de él para interactuar con las antocianinas, así que la estructura no se pudo modificar y por ende el color no tuvo variaciones (Guisti *et al.*, 2003; Hashim *et al.*, 2012).

Se consideró una segunda hipótesis debido a que el tamaño de poro no fue medido. El poro pudo haber sido pequeño, pero no lo suficiente como para evitar que los iones pasaran a través de él. Además, de ser así, la cantidad de iones que podían atravesar hacia la matriz tenía que haber sido importante, ya que la matriz formada tenía la capacidad de facilitar el paso de los analitos, pues se ha reportado que utilizando como alcóxido a TEOS, la matriz es hidrofílica (Ismail *et al.*, 2002; Kassal *et al.*, 2014).

Considerando entonces que el tamaño de poro no era limitante, se hipotetizó que las antocianinas pudieron interactuar con la superficie de la matriz que, como se mencionó, es altamente activa (Ismail *et al.*, 2011).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estructura de las antocianinas contiene grupos hidroxilo, así también los carbohidratos unidos a ellas. Estos grupos pudieron haber formado puentes de hidrógeno con la matriz sol-gel y con ello, aunque el analito hubiera atravesado el poro, no pudo reaccionar con las antocianinas, pues éstas –debido a la interacción– no tenían la capacidad de moverse libremente, evitando así su degradación o cambios, debido al pH.

Lo anterior se ha observado en otras investigaciones. Ismail *et al.* (2002), al buscar un método para evitar la lixiviación de colorantes sintéticos, encontraron que las interacciones de la molécula con la matriz podían reducir dramáticamente la respuesta hacia el analito, resultando en tiempos de respuesta altos o hasta nulos. Por su parte, Gupta y Chaudhury (2007) señalaron que era una desventaja del método; consideraron que debido al encapsulamiento podían presentarse cambios en las propiedades químicas o biológicas de las especies debido al reducido grado de libertad o a las posibles interacciones con la superficie interna de los poros.

Yip *et al.* (2009) presentaron un diagrama de lo que consideraron que había estabilizado a la molécula de su interés (sulfurodamina B *SRB*) (Figura 13). Sugirieron que los puentes de hidrógeno capaces de formarse entre la molécula y la matriz generaban limitada movilidad y por ende, estabilidad. Además, mencionaron que la dimensión microscópica de la jaula formada podría estar ayudando a dar estabilidad adicional a la red de enlaces de hidrógeno.

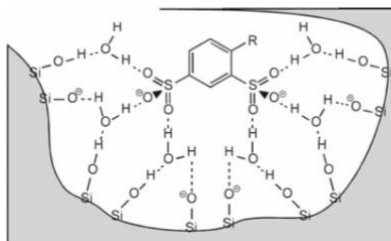


Figura 13. Diagrama de interacción entre SRB y una matriz sol-gel (Yip *et al.*, 2009)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por lo reportado en otras investigaciones, se consideró que las dos hipótesis explicaban por igual lo observado; con lo que medir el tamaño de poro aclararía cuál hipótesis de estabilización de las antocianinas en la matriz era más creíble.

Otra forma que se consideró fue investigar con espectroscopía infrarroja los posibles enlaces formados entre la molécula y la matriz, lo cual se analiza al final de este trabajo.

5.3.3 Experimento 3

Finalmente, el experimento 3 se diseñó para investigar si el color de los polvos podía ser más intenso con respecto al obtenido en el experimento 2. Así, se probaron niveles más altos de extracto de antocianina agregada. La de 3-O glucósido de Cianidina /L de extracto.

Tabla 20 muestra los tratamientos del experimento 3. El contenido de antocianinas monoméricas del lote 3 fue de 3602.78 mg de 3-O glucósido de Cianidina /L de extracto.

Tabla 20. Tratamientos de experimento 3

Tratamiento	[HCl]	R	Reacción (h)	mL Extracto	mg Extracto
28	0.37	5	2	3.00	10.81
29				3.63	13.08
30				4.25	15.31

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.3.1 Lavado de polvos

Los polvos obtenidos también se llevaron a la prueba de lavado para quitar el exceso de extracto no encapsulado. La Tabla 21 muestra la absorbancia de las soluciones de los diferentes lavados.

Se encontró que con cada lavado, la absorbancia mostrada por la solución iba disminuyendo en cada caso. En el supuesto de que no se estaban lixiviando las antocianinas, debido a lo explicado anteriormente, se siguió la prueba hasta que la solución no presentó absorbancia.

Tabla 21. Absorbancia obtenida del lavado de los polvos Experimento 3*

Número de lavado	28 (10.81 mg de extracto)	29 (13.08 mg de extracto)	30 (15.31 mg de extracto)
1	1.761 ± 0.10	1.613 ± 0.00	1.528 ± 0.01
2	1.532 ± 0.00	1.533 ± 0.00	1.469 ± 0.00
3	1.246 ± 0.03	1.466 ± 0.00	1.311 ± 0.00
4	0.849 ± 0.00	1.044 ± 0.02	1.039 ± 0.07
5	0.541 ± 0.02	0.718 ± 0.10	0.643 ± 0.01
6	0.321 ± 0.03	0.421 ± 0.05	0.415 ± 0.04
7	0.197 ± 0.04	0.248 ± 0.03	0.269 ± 0.00
8	0 ^a	0.206 ± 0.01	0.212 ± 0.02

* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar

^a Indica que la absorbancia medida a 520 nm no estuvo dentro del límite de detección del equipo (0.2-1.2)

Se hizo un lavado final de los polvos, se encontró que la solución seguía sin mostrar absorbancia, por lo que se pudo concluir que todas las antocianinas no encapsuladas habían sido lavadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.3.2 Prueba de color

La Tabla 22 muestra los parámetros CIE L* a* b* de los polvos obtenidos con el experimento 3 después de los lavados.

Tabla 22. Parámetros de color Experimento 3*

Tratamiento	mg Extracto	L*	a*	b*
28	10.81	61.77 ± 1.49 ^a	15.39 ± 0.74 ^a	2.70 ± 0.20 ^a
29	13.08	59.88 ± 1.39 ^a	14.59 ± 2.47 ^a	2.05 ± 0.15 ^a
30	15.31	61.12 ± 0.62 ^a	14.14 ± 0.29 ^a	3.10 ± 1.57 ^a

* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar
Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($p < 0.05$)

La Tabla 23 muestra los parámetros croma y ángulo hue de los polvos obtenidos con el experimento 3 después de los lavados.

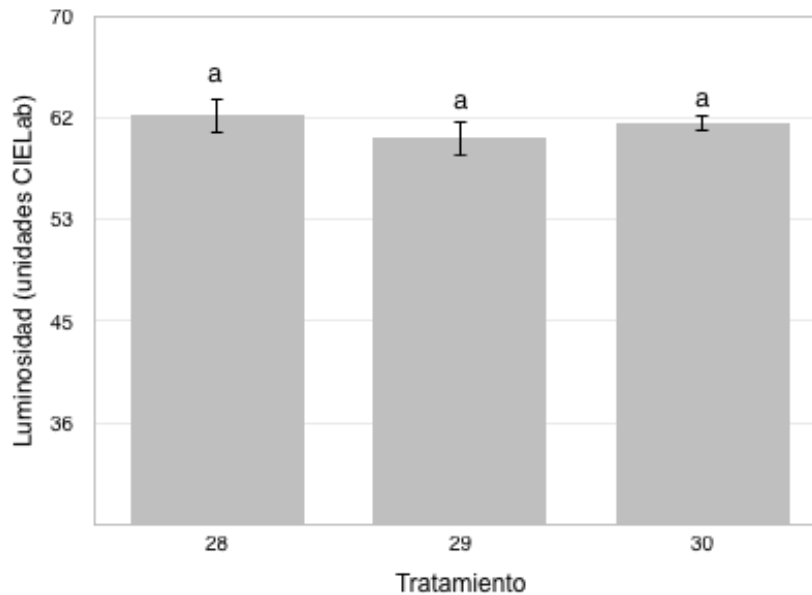
Tabla 23. Parámetros de color Experimento 3*

Tratamiento	mg Extracto	Croma	Ángulo hue
28	10.81	15.63 ± 0.74 ^a	9.97 ± 0.82 ^a
29	13.08	14.74 ± 2.42 ^a	8.21 ± 2.02 ^a
30	15.31	14.23 ± 0.42 ^a	11.08 ± 4.1 ^a

* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar
Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos se graficaron para facilitar el análisis. El parámetro CIE L* (Gráfica 11) mostró que los tres tratamientos tenían la misma cantidad de luminiscencia, considerando que el rango va de 0 – 100 los valores fueron altos (59 - 62).



Gráfica 11. Parámetro CIE L* Experimento 3

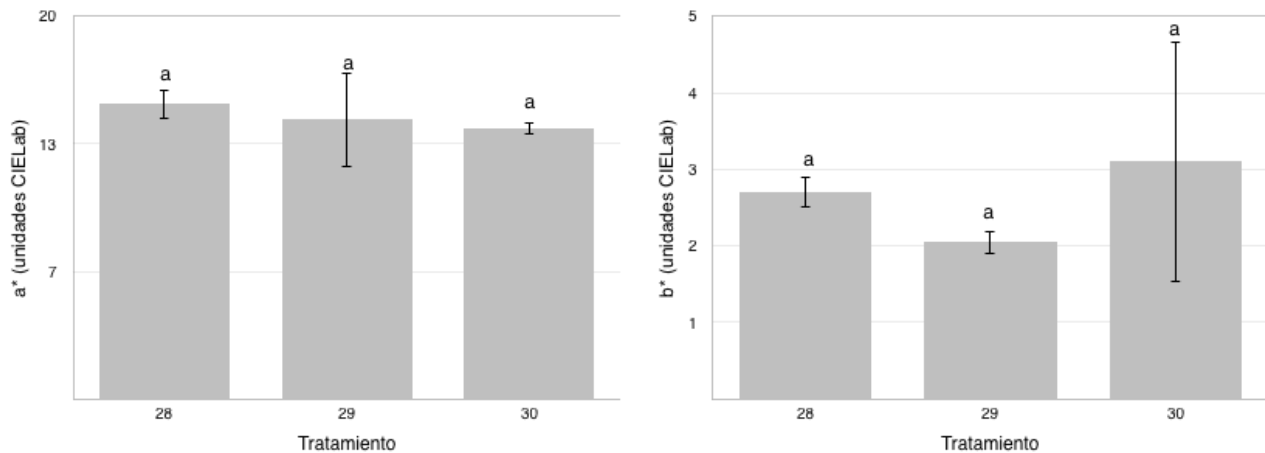
Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

El parámetro CIE a* (Gráfica 12) mostró valores similares en los tres tratamientos: tratamiento 28 (10.81 mg) con 15.39, tratamiento 29 (13.08 mg) con 14.59 y tratamiento 30 (15.31 mg) con 14.14. Estos valores fueron mayores en comparación con los obtenidos en el experimento 2, es decir, los polvos tendían más al color rojo en este experimento; sin embargo, entre ellos tenían el mismo tono.

Por otro lado, el parámetro CIE b* (Gráfica 12) mostró valores para el tratamiento 28 (10.81 mg) de 2.70, para el tratamiento 29 (13.08) de 2.05 y para el tratamiento 30 (15.31 mg) de 3.10, los cuales fueron menores en comparación a

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los mostrados por los tratamientos del experimento 2, por lo que el color en este experimento tendía más a azul en lugar de a amarillo como en el experimento 2.



Gráfica 12. Parámetros CIE a* y b* Experimento 3




Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Por lo anterior se consideró que el color mejoró del experimento 2 al experimento 3, es decir, aumentando la cantidad de extracto el color fue más intenso. Logrando con ello el objetivo planteado para este experimento. Sin embargo, los polvos, según los parámetros calculados, no mostraron diferencias entre los niveles de los tratamientos del experimento 3. Para demostrarlo de una manera más gráfica, se utilizó el programa *Delta-E Calculator*. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Color de polvos según el programa Delta-E Calculator Experimento 3

Tratamiento	28	29	30

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracto (mg)	10.81	13.08	15.31
Color			
Tendencia del color	Rosa	Rosa	Rosa

La Tabla 24 muestra que, en efecto, la tonalidad del color no cambió de un tratamiento a otro. Se concluyó que con el nivel de la cantidad de extracto agregada (10.81 mg) era adecuado para obtener un color más intenso, en tonalidad rosa.

5.3.3.3 Prueba de pH

Los polvos se sometieron a la prueba de pH para comprobar que tenían el mismo comportamiento que los tratamientos anteriores.

La Tabla 25 muestra el resultado de los parámetros de color CIE L* a* b* de los polvos después de la prueba de pH.

Tabla 25. Parámetros de color de prueba de pH Experimento 3*

T ¹	pH	mg Extracto	L*	a*	b*
28	2	10.81	66.19 ± 0.08 ^d	13.12 ± 0.05 ^b	3.55 ± 0.02 ^b
	6		67.1 ± 0.11 ^b	6.51 ± 0.02 ^c	3.81 ± 0.01 ^a
29	2	13.08	66.74 ± 0.03 ^c	13.53 ± 0.11 ^a	2.56 ± 0.03 ^e
	6		68.64 ± 0.06 ^a	6.29 ± 0.05 ^d	2.71 ± 0.03 ^d
30	2	15.31	65.93 ± 0.16 ^d	13.04 ± 0.11 ^b	2.54 ± 0.05 ^e

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	6		67.02 ± 0.14 ^{bc}	5.98 ± 0.02 ^e	3.04 ± 0.01 ^c
--	---	--	----------------------------	--------------------------	--------------------------

¹ Tratamiento

* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

La Tabla 26 muestra el resultado de los parámetros de color croma y ángulo hue de los polvos también después de la prueba de pH.

Tabla 26. Parámetros de color de prueba de pH Experimento 3*

Tratamiento	pH	mg Extracto	C*	h*
28	2	10.81	13.59 ± 0.05 ^a	15.14 ± 0.03 ^d
	6		7.54 ± 0.02 ^c	30.36 ± 0.1 ^a
29	2	13.08	13.77 ± 0.11 ^a	10.73 ± 0.04 ^e
	6		6.85 ± 0.05 ^d	23.30 ± 0.24 ^c
30	2	15.31	13.28 ± 0.12 ^b	11.03 ± 0.13 ^e
	6		6.71 ± 0.02 ^d	26.94 ± 0.17 ^b

* Los datos son la media de tres réplicas ± la desviación estándar

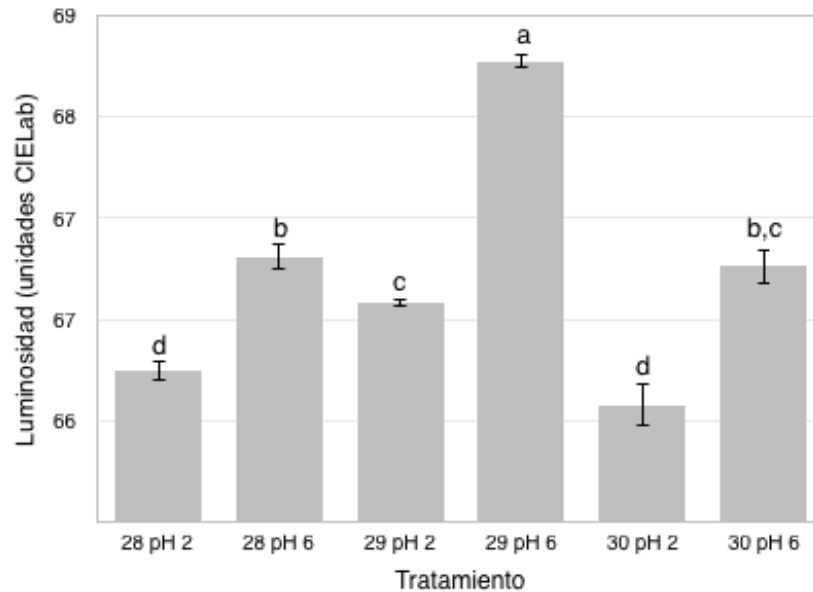
Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

La Gráfica 13 muestra el resultado del parámetro CIE L*. Con el cambio de pH, en cada tratamiento, los valores aumentaron, así, para el tratamiento 28 (10.81 mg) el cambio fue de 66.19 a 67.1, para el tratamiento 29 (13.08 mg) de 66.74 a 68.84 y para el tratamiento 30 (15.31 mg) de 65.93 a 67.02. Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas ante el cambio de pH. Sin

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

embargo, considerando que la escala de este parámetro de 0 a 100, se descartó dicha diferencia ya que los valores obtenidos eran similares.

Con respecto al parámetro CIE a^* (Gráfica 14), los valores disminuyeron con el cambio de pH en cada uno de los tratamientos, mostrando diferencias significativas.



Gráfica 13. Parámetro CIE L^* de prueba de pH Experimento 3

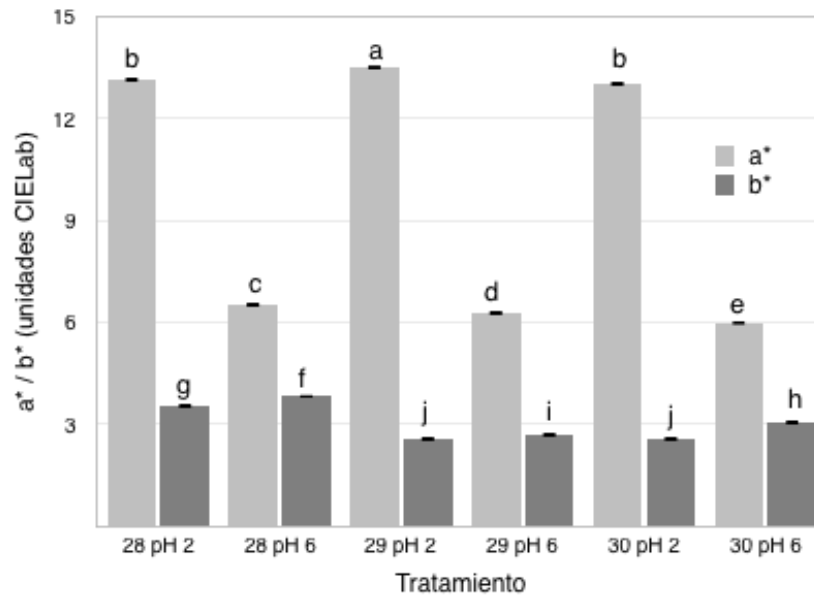
Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

No obstante, los valores obtenidos para el parámetro CIE b^* (Gráfica 14) fueron similares a pesar del cambio de pH, en cada tratamiento. Esto significó que sólo la tonalidad roja era lo que cambiaba por efecto del pH.

Lo anterior se corrobora con los resultados de cromaticidad y ángulo hue (Gráfica 15). Se observó que el ángulo hue aumentaba con el cambio de pH en

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

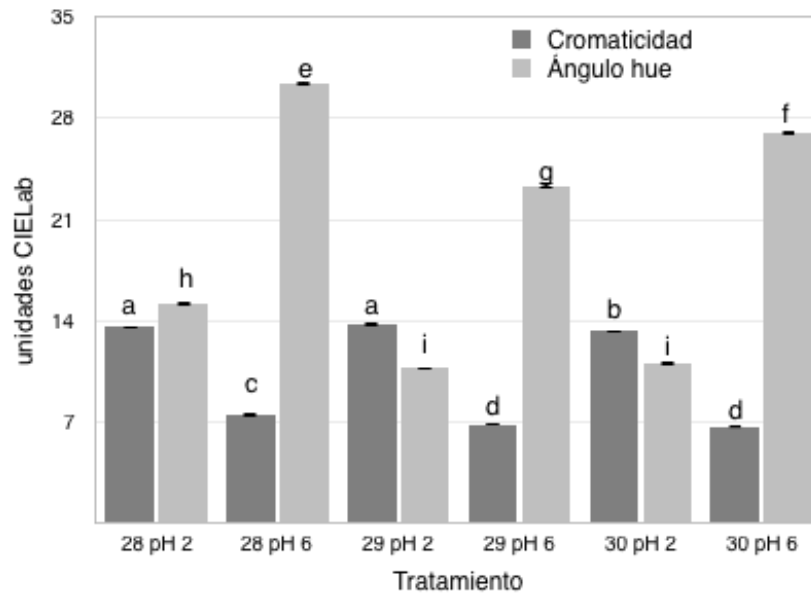
cada uno de los tratamientos, sugiriendo que la tonalidad cambiaba. En cuanto la cromaticidad, el cambio de pH de 2 a 6 causó un aumento de más de diez unidades en cada tratamiento. Esto sugirió que el cambio observable sería el tono, pero también la intensidad de color.



Gráfica 14. Parámetros CIE a* y b* de prueba de pH Experimento 3

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Gráfica 15. Parámetros cromática y ángulo hue de prueba de pH Experimento 3

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Para corroborar lo antes discutido, se analizó el color de los polvos después de la prueba de pH con el programa *Delta e-Calculator* (

Tabla 27). Comparando los recuadros de color, en los tres tratamientos se observó que el tono en efecto había cambiado hacia uno menos rosa. Además, los cambios del parámetro cromática se hicieron evidentes, pues se observó un color más opaco.

Tabla 27. Color de los polvos de prueba de pH de acuerdo a *Delta-E Calculator* Experimento 3

T ¹	28	29	30
pH 2			
pH 6			

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

¹ Tratamiento

El cambio de color con respecto al pH podría deberse a que, cómo se mencionó, la matriz sol gel se va formando alrededor de la molécula (Ismail *et al.*, 2002), por lo que al haber una mayor cantidad de moléculas y considerando que el tiempo estaba delimitado para la condensación, se pudo haber formado una matriz con tamaño de poro más grande (Cirimina *et al.*, 2012). Por otro lado, se pudieron haber quedado moléculas de antocianinas sin capacidad de enlazarse con la matriz, por lo que los analitos pudieron haber interactuado con ellas y causado un leve cambio de color (tonalidad).

Se concluyó con este último experimento que, si bien el agregar una mayor cantidad de extracto ocasionó un tono más rosa, la estabilidad que generaba la matriz formada era menor en comparación con el experimento 2.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.4 FTIR

Finalmente, se seleccionaron los tratamientos 27 (7.92 mg) y 28 (10.81 mg) para llevar a cabo el análisis FTIR. La finalidad era caracterizar la interacción de las antocianinas con la matriz de dióxido de silicio.

La Tabla 28 muestra las bandas encontradas en las muestras analizadas, a pH 2 y a pH 6, así como en el blanco.

Tabla 28. Bandas de los espectros infrarrojo

Muestra		Número de onda (cm ⁻¹)							
Blanco		3446	1873	1630	1083	945	798	568	459
Tratamiento 27	pH 2	3466	1875	1642	1086	952	798	569	462
	pH 6	3470	1875	1642	1086	951	797	568	464
Tratamiento 28	pH 2	3457	1873	1638	1082	952	796	566	463
	pH 6	3460	1874	1637	1083	953	795	566	463

La zona debajo del número de onda de 1500 cm⁻¹ es conocida como zona de huella digital, pues es donde se encuentran las bandas características de cada molécula. En el caso de estudio, la banda localizada alrededor de 460 cm⁻¹ se ha asociado a las vibraciones de las unidades Si-O-Si, es decir, al enlace siloxano (Zareba-Grodz *et al.*, 2006; Dudás *et al.*, 2011), específicamente movimientos “rocking” perpendiculares al plano del enlace del oxígeno con dos átomos de Silicio adyacentes (Innocenzi, 2003) (Figura 14).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

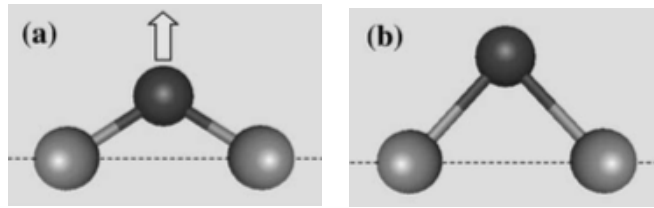


Figura 14. Átomo de oxígeno (negro); Átomo de sílice (gris). Estiramiento simétrico perpendicular al ángulo del enlace Si-O-Si (a) y (b).

Alrededor de 800cm^{-1} una banda débil sugiere el estiramiento asimétrico del átomo de oxígeno en paralelo al enlace Si-O-Si, junto con movimiento simultáneo de los cationes silicio (Innocenzi, 2003) (Figura 15). Sin embargo, los grupos silano (Si-OH) también se han asociado a bandas dentro del rango $800 - 870\text{ cm}^{-1}$ (Dudás *et al.*, 2011), por lo que la banda encontrada en los espectros de las muestras sugiere presencia de ambos enlaces.

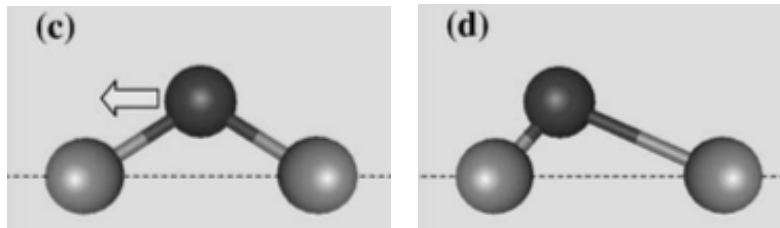


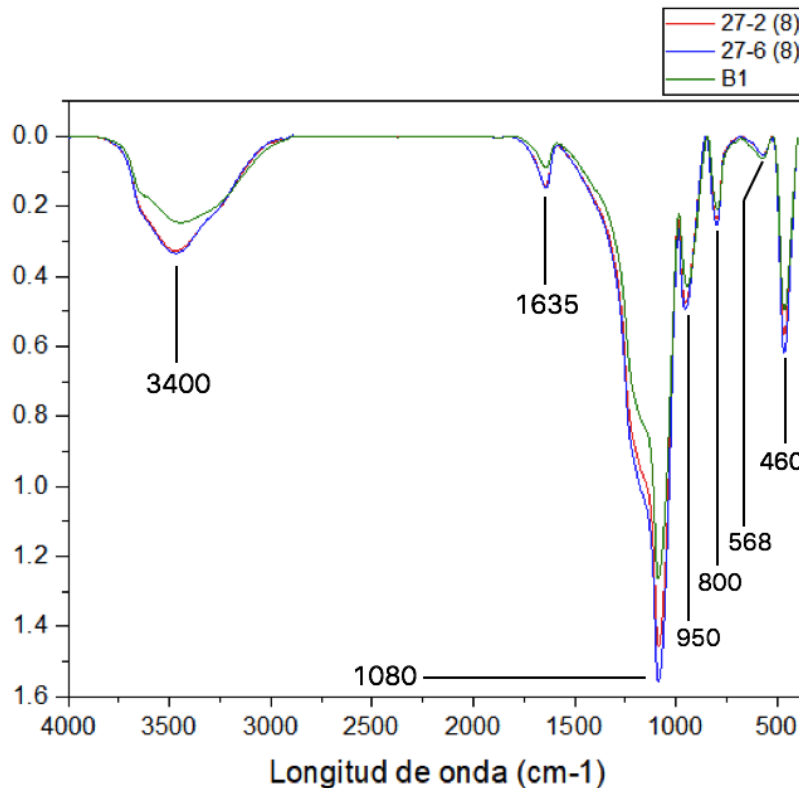
Figura 15. Átomo de oxígeno (negro); Átomo de sílice (gris). Estiramiento asimétrico paralelo a la línea de Si-Si entre los dos cationes enlazados (c) y (d)

La banda a 950 cm^{-1} se encuentra dentro del rango $935- 980\text{ cm}^{-1}$, diversos autores sugieren que se refiere al enlace Si-OH (Innocenzi, 2003; Zareba-Grodz *et al.*, 2006; Ghazzal *et al.*, 2012). En el caso del blanco, la banda se encuentra en 945 cm^{-1} , pero las frecuencias de las bandas de las muestras tienen un ligero desplazamiento hacia la izquierda (más energía) lo cual se puede correlacionar con el nivel de interacciones moleculares específicas como enlaces de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo (Innocenzi, 2003). Con lo anterior, se puede sugerir que los enlaces siloxano (Si-OH) dentro de los poros pueden estar interaccionando con las antocianinas vía puentes de hidrógeno.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, se ha señalado (Innocenzi, 2003) que la banda alrededor de 950cm^{-1} puede también ser debido a vibraciones de estiramiento del enlace Si-O^- , lo que sugiere que existen átomos de oxígeno no enlazados y, por lo tanto, una mayor cantidad de estos enlaces puede correlacionarse con una estructura más porosa.

La Gráfica 16 presenta los espectros del tratamiento 27 (7.93 mg) a pH 2 (línea roja), a pH 6 (línea azul) y el blanco (línea verde). El eje x corresponde al número de onda (cm^{-1}) y el eje y corresponde a la absorbancia de la muestra analizada. Para la banda alrededor de 950cm^{-1} , las absorbancias de las muestras son similares y mayores que la del blanco, lo que sugiere, por lo mencionado anteriormente, que la estructura que presenta es más porosa que la del blanco.

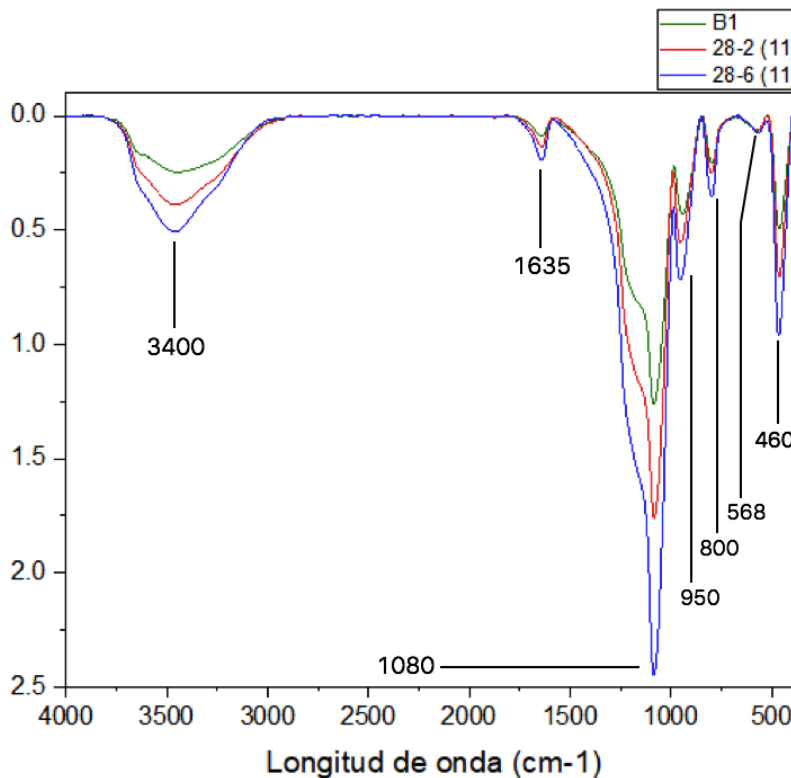


Gráfica 16. Espectro IR de tratamiento 27¹

¹ Las bandas corresponden a la absorbancia de la muestra medida una sola vez para cada pH.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sin embargo, en la Gráfica 17, que presenta los espectros del tratamiento 28 (10.81) a pH 2 (línea roja), a pH 6 (línea azul) y el blanco (sol sin antocianinas) (línea verde), se observa que la banda a 950cm^{-1} tiene mucho mayor absorbancia en el caso de las muestras con respecto al blanco, lo que sugiere que con 10.81mg de extracto, la estructura formada fue más porosa que la del blanco e incluso más que la del nivel 7.93mg de extracto.



Gráfica 17. Espectro IR de tratamiento 28¹

¹ Las bandas corresponden a la absorbancia de la muestra medida una sola vez para cada pH.

La siguiente banda mostrada en el espectro es la que se encuentra aproximadamente a 1080 cm^{-1} , según Pereira *et al.* (2015) esto sugiere la presencia de grupos C-O. En el caso de los tratamientos se considera que se debe a los polisacáridos y glicósidos ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) (Liu *et al.*, 2012), y, comparando ambos espectros, la absorbancia es mayor para el tratamiento 28 debido a que la cantidad de extracto agregado también es mayor.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La banda a 1080 cm^{-1} , también ha sido asociada al movimiento hacia delante y hacia atrás del oxígeno en paralelo al eje del enlace Si- Si (Figura 16). Es por ello que se observa esta banda en el espectro del blanco (Innocenzi, 2003; Ghazzal *et al.*, 2012).

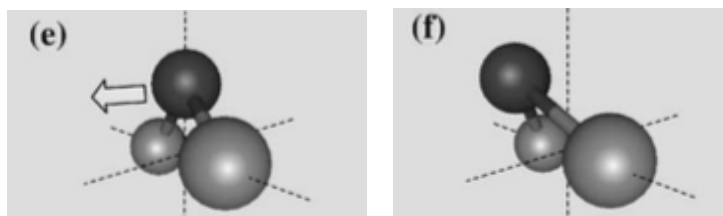


Figura 16. Átomo de oxígeno (negro); Átomo de sílice (gris). Movimiento “rocking” paralelo al eje del enlace Si- Si (e) y (f)

La vibración de estiramiento de grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) tiene un rango de número de onda de 1710 a 1720 cm^{-1} , pero si el carbonilo es parte de un anillo, puede existir un desplazamiento de la banda a menor energía a medida que disminuye su tensión, a su vez, a mayor conjugación del anillo la energía será menor. Por lo anterior, se sugiere que la banda en los espectros de las muestras a 1635 cm^{-1} se refiere a la presencia de estructuras aromáticas como las encontradas en el esqueleto de las antocianinas (Liu *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2016). Además, es evidente la mayor absorción de esta banda en el espectro de la muestra con 10.81 mg de extracto (Gráfica 17) con respecto a la muestra con 7.93mg de extracto (Gráfica 16).

Por otro lado, esta banda también está asociada a presencia de agua molecular debido a la deformación del enlace $-\text{OH}$ (Ou y Seddon, 1997; Ghazzal *et al.*, 2012), así que la banda mostrada en el espectro del blanco, sugiere que hubo moléculas de agua de la síntesis que quedaron dentro de la matriz.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Finalmente, la banda alrededor de 3400cm^{-1} se encuentra dentro del rango $3000\text{-}3800\text{cm}^{-1}$ que se asocia con el estiramiento del enlace O-H (Ismail *et al.*, 2002; Hashim *et al.*, 2012). La forma del pico presente en los espectros es ancha lo cual resulta de grupos OH presentes en diferentes ambientes (Dudás *et al.*, 2011). Por ejemplo, puede deberse a grupos hidroxilo de las antocianinas, grupos silano (Si-OH) de la matriz o puentes de hidrógeno, entre otros (Innocenzi, 2003).

Por otro lado, también se observa que las bandas alrededor de 3400cm^{-1} de las muestras tienen un desplazamiento hacia mayores energías (izquierda), esto se ha relacionado con interacciones moleculares presentes (Innocenzi, 2003) y por ello genera evidencia de que existen puentes de hidrógeno dentro de la matriz lo que corrobora la hipótesis planteada de que las antocianinas interactúan con la matriz y por ello fueron estabilizadas.

6 CONCLUSIONES

Se obtuvieron los niveles de los factores que lograban la formación de una matriz sol - gel con un tamaño de poro adecuado, es decir, que no permitía que las antocianinas salieran del encapsulado.

Se encontró que las características estructurales de las antocianinas, a pesar de que podían ser diferentes en cada lote debido al manejo en el punto de compra o a las condiciones de extracción, no causaban cambios en el comportamiento de la matriz sol-gel formada.

Por otro lado, los diferentes experimentos planteados sirvieron para obtener polvos con coloraciones más intensas, lo que servirá para que, al incorporar dichos polvos a algún alimento, puedan impartir tonalidades rojas sin necesidad de agregar en demasía.

La prueba de pH demostró que las antocianinas encapsuladas se estabilizaban. Y que el tratamiento con el nivel de extracto agregado de 7.92 mg fue el que presentó mejor coloración (tono rosa) junto con estabilidad ante el cambio de pH.

El análisis de espectroscopia infrarroja generó datos para corroborar que las antocianinas tenían la capacidad de interaccionar con la matriz sol-gel por medio de puentes de hidrógeno, por lo que, al variar las condiciones de pH del ambiente, las moléculas se mantuvieron estables.

7 ANEXO 1

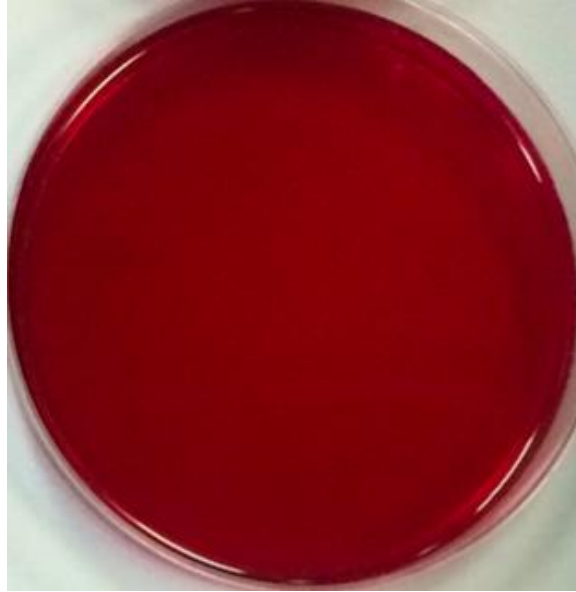


Figura 17. Sol formado

8 ANEXO 2

Tabla 29. Parámetros de color Experimento 1 (Lote 2)

Tratamiento	L*	d.e. ¹	a*	d.e. ¹	b*	d.e. ¹
13	73.06	0.16	10.06	0.21	9.06	0.15
14	71.34	0.07	11.32	0.14	8.96	0.14
15	72.01	0.21	8.34	0.08	9.12	0.09
16	73.32	0.12	10.91	0.06	7.72	0.04
17	72.66	0.09	10.69	0.12	7.73	0.09
18	70.54	0.46	9.89	0.29	6.88	0.19
19	75.92	0.01	6.31	0.04	13.85	0.13
20	73.50	0.17	7.60	0.13	13.15	0.07
21	74.85	0.13	7.20	0.08	11.22	0.11
22	76.92	0.35	5.93	0.23	13.83	0.35
23	74.61	0.38	6.98	0.24	14.17	0.35
24	74.78	0.21	7.94	0.00	10.52	0.01

¹ Desviación estándar

* Los datos son la media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

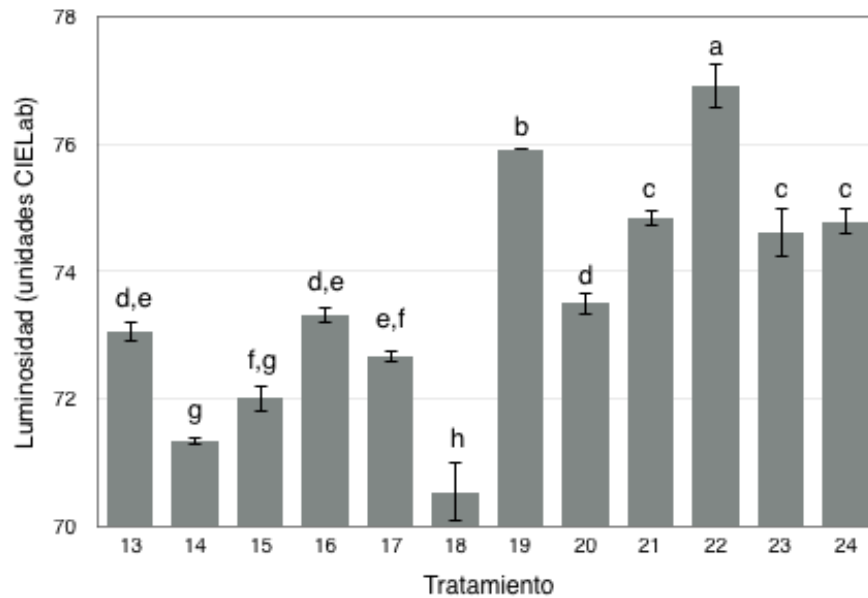
Tabla 30. Parámetros de color Experimento 1 (Lote 2)

Tratamiento	Croma	d.e. ¹	Ángulo hue	d.e. ¹
13	13.54	0.26	42.00	0.13
14	14.43	0.20	38.36	0.11
15	12.36	0.12	47.57	0.09
16	13.36	0.07	35.28	0.02
17	13.19	0.15	35.84	0.02
18	12.04	0.34	34.82	0.04
19	15.22	0.13	65.51	0.10
20	15.19	0.11	59.99	0.32
21	13.33	0.13	57.33	0.03
22	15.04	0.41	66.78	0.27
23	15.80	0.42	63.78	0.23
24	13.18	0.01	52.96	0.02

¹ Desviación estándar

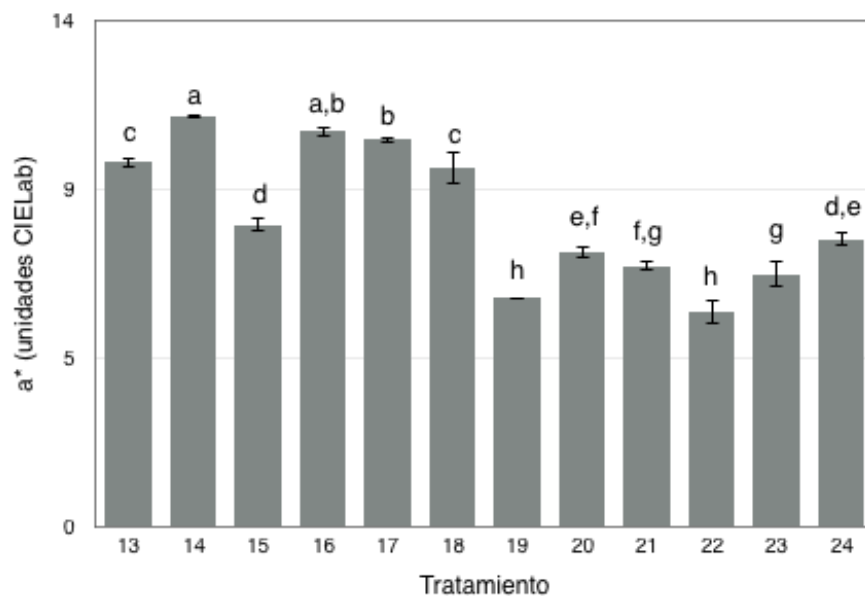
* Los datos son la media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)



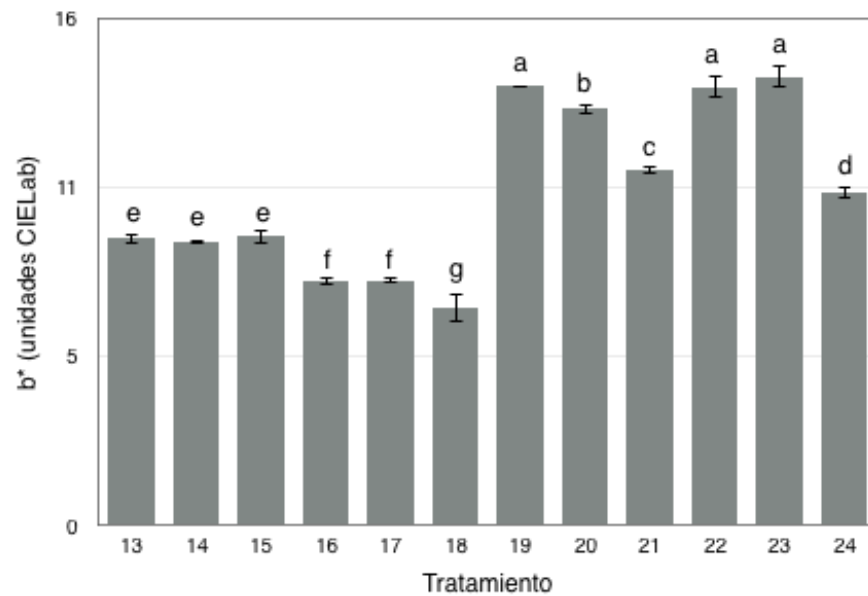
Gráfica 18. Parámetro CIE L* Experimento 1 (Lote 2)

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)



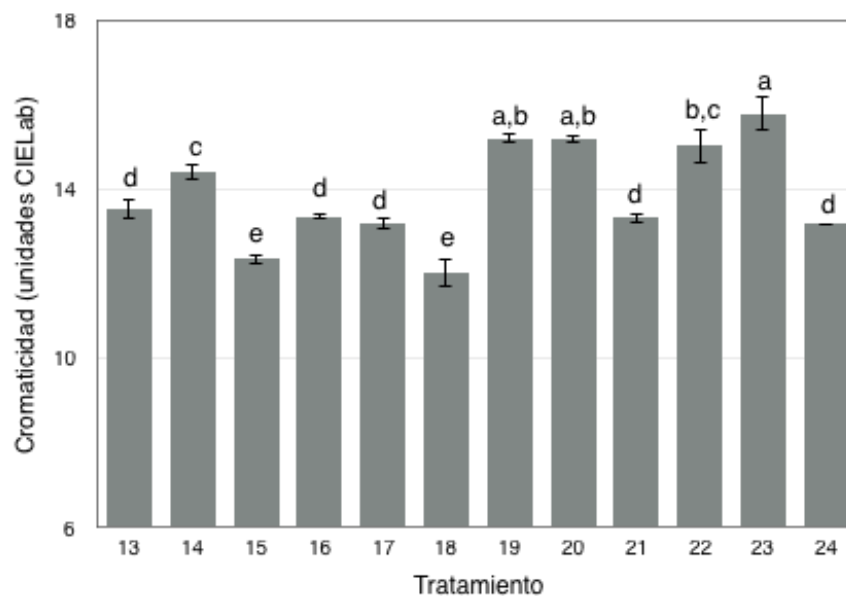
Gráfica 19. Parámetro CIE a* Experimento 1 (Lote 2)

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)



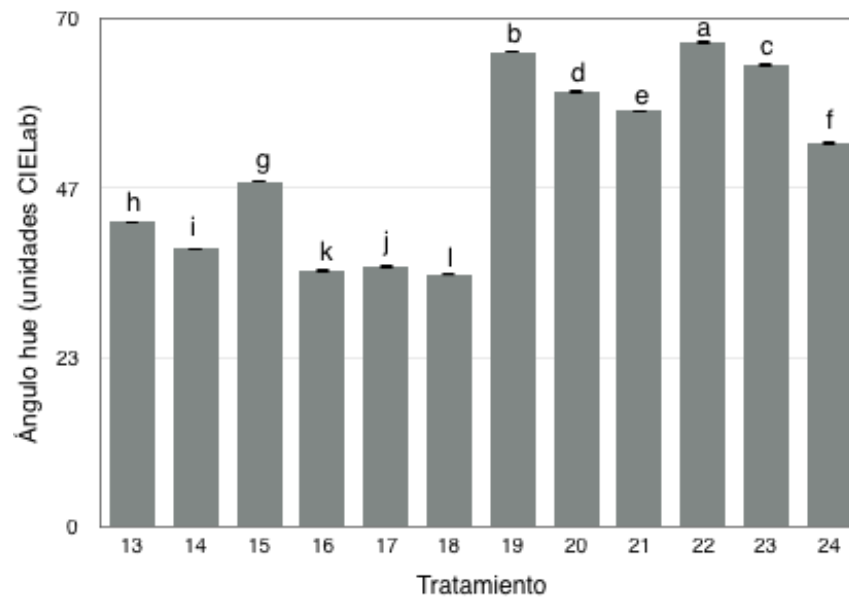
Gráfica 20. Parámetro CIE b* Experimento 1 (Lote 2)

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)



Gráfica 21. Parámetro cromancia Experimento 1 (Lote 2)

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)



Gráfica 22. Parámetro ángulo hue Experimento 1 (Lote 2)

Las columnas corresponden a la media de tres réplicas, las barras a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

9 ANEXO 3

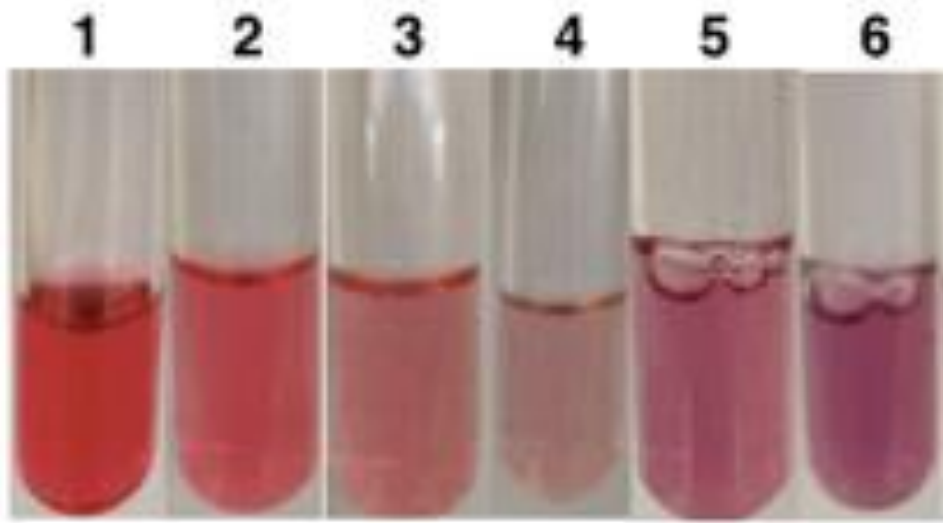


Figura 18. Variación de color de extracto de arándano en valores de pH de 1 – 6

10 REFERENCIAS

- Ananga, A., Georgiev, V., Ochieng, J., Phills, B., y Tsolova, V. (2013). Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. En *The Mediterranean Genetic Code-Grapevine and Olive*. InTech. ISBN 978-953-51-1067-5
- Arrazola, G., Herazo, I., y Alvis, A. (2014). Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante Secado por Aspersión y Evaluación de la Estabilidad de su Color y Capacidad Antioxidante. *Información tecnológica*, 25(3), 31-42.
- Ashraf, M. A., Khan, A. M., Ahmad, M., y Sarfraz, M. (2015). Effectiveness of silica based sol-gel microencapsulation method for odorants and flavors leading to sustainable environment. *Frontiers in Chemistry*, 3.
- Avnir D., Thibaud C., Ovadia L. y Jacques L. (2005). Recent bio-applications of sol-gel materials. *Journal of Materials Chemistry*, 16, 1013–1030
- Barczak, M., McDonagh, C., y Wencel, D. (2016). Micro-and nanostructured sol-gel-based materials for optical chemical sensing (2005–2015). *Microchimica Acta*, 183(7), 2085-2109.
- Bora, D. J., Gupta, A. K., y Khan, F. A. (2015). An efficient approach toward color image segmentation with combined effort of soft clustering and region based techniques using L channel of lab color space. *International Journal of Computer Applications*, 128(12).
- Brinker, C. J., Scherer, G. W. (1990). The physics and chemistry of sol-gel processing (pp 54-86) En *Sol-gel science*. Amsterdam, Elsevier Inc.
- Cacace, J. E., y Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68(1), 240-248.
- Castañeda-Sánchez, A., y Guerrero-Beltrán, J. A. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 9, 25-33.
- Cerón, I., Higuera, J., y Cardona, C. (2011). Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector* 5, 5(1909-7891), 17–26.
- Chuang, I. S., y Maciel, G. E. (1997). A detailed model of local structure and silanol hydrogen bonding of silica gel surfaces. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(16), 3052-3064.

10. REFERENCIAS

- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Pandarus, V., Béland, F., Ilharco, L. M., y Pagliaro, M. (2012). The sol–gel route to advanced silica-based materials and recent applications. *Chemical Reviews*, 113(8), 6592-6620.
- Del Rio, D., Borges, G., y Crozier, A. (2010). Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 104(S3), S67-S90.
- Dudás, Z. I., Chiriac, A., y Preda, G. (2011). Simple entrapment of alcalase in different silica xerogels using the two steps sol-gel method. *Series of Chemistry*, 20(4), 97-104.
- Dunn, B., y Zink, J. I. (1991). Optical properties of sol–gel glasses doped with organic molecules. *Journal of Materials Chemistry*, 1(6), 903-913.
- Dunn, B., Miller, J. M., Dave, B. C., Valentine, J. S., y Zink, J. I. (1998). Strategies for encapsulating biomolecules in sol–gel matrices. *Acta Materialia*, 46(3), 737-741.
- Durst, R. W., y Wrolstad, R. E. (2001). Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. En: Handbook of Food Analytical Chemistry. pp. F1.3.1-F1.3.13. New Jersey: John Wiley & Sons
- Espino, O.G. (2014). UBUScientia. Recuperado de: <http://bit.ly/2l9Qtu7>. Consulta: Marzo, 2017
- FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, (2017). Recuperado de: <http://bit.ly/2x4H2OC> Consulta: Marzo, 2017
- Gonzalez, M. E., Vermont, P. D., West, L., West, M., Singh, V., Wang, Z., y Allen, C. (2015). Temperature dependency of shelf and thermal stabilities of anthocyanins from corn distillers' dried grains with solubles in different ethanol extracts and a commercially available beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), 10032–10041.
- Giusti, M. M., y Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in Food Analytical Chemistry*. En: Handbook of Food Analytical Chemistry. pp. F1.2.1-F1.2.13. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Giusti, M. M., y Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217-225.
- Gould, K., Davies, K. M., y Winefield, C. (2008). *Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications*. Philadelphia: Springer Science & Business Media.

10. REFERENCIAS

- Guinot, P., Rogé, A., Gargadennec, A., Garcia, M., Dupont, D., Lecoeur, E., y Andary, C. (2006). Dyeing plants screening: An approach to combine past heritage and present development. *Coloration Technology*, 122(2), 93–101.
- Gulcev, M. D., Goring, G. L., Rakic, M., y Brennan, J. D. (2002). Reagentless pH-based biosensing using a fluorescently-labelled dextran co-entrapped with a hydrolytic enzyme in sol-gel derived nanocomposite films. *Analytica Chimica Acta*, 457(1), 47-59.
- Gupta, R., y Chaudhury, N. K. (2007). Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11), 2387-2399.
- Hashim, H., Abdul Aziz, N. M. A. N., y Isnin, A. (2012). Investigation of optical properties of anthocyanin doped into sol-gel based matrix. En: *AIP Conference Proceedings 2nd*. 1455(1), 242-247.
- He, J., y Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 163–187.
- Heras, I., Alvis, A., y Arrazola, G. (2013). Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.). *Información Tecnológica*, 24(5), 93–102.
- Insuasty-Obando, B. (2016). Las chalconas y su uso como precursores en la síntesis de compuestos heterocíclicos nitrogenados. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), 234-243.
- Innocenzi, P. (2003). Infrared spectroscopy of sol-gel derived silica-based films: a spectra-microstructure overview. *Journal of non-crystalline solids*, 316, 309-319
- Ismail, F., Malins, C., y Goddard, N. J. (2002). Alkali treatment of dye-doped sol-gel glass films for rapid optical pH sensing. *Analyst*, 127(2), 253-257.
- Ismail, F., Schoenleber, M., Mansour, R., Bastani, B., Fielden, P., y Goddard, N. J. (2011). Strength of interactions between immobilized dye molecules and sol-gel matrices. *Analyst*, 136(4), 807-815.
- Jayaprakasha, G. K. y Patil B. S. (2015) Nutraceuticals and functional foods: Chemistry and health promoting properties of fruits and beverages involved in prevention of chronic diseases. *Eolss Publeshers / UNESCO*. Recuperado de: <http://bit.ly/2xb4jhL>. Consulta: Agosto, 2017
- Jin, W., y Brennan, J. D. (2002). Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Analytica Chimica Acta*, 461(1), 1-36.
- Jurmanović, S., Kordić, Š., Steinberg, M. D., y Steinberg, I. M. (2010). Organically modified silicate thin films doped with colourimetric pH indicators methyl red and

10. REFERENCIAS

- bromocresol green as pH responsive sol-gel hybrid materials. *Thin Solid Films*, 518(8), 2234-2240.
- Kandimalla, V. B., Tripathi, V. S., y Ju, H. (2006). Immobilization of biomolecules in sol-gels: biological and analytical applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36(2), 73-106.
- Kandimalla, V. B., Tripathi, V. S., y Ju, H. (2008). Biosensors based on immobilization of biomolecules in sol-gel matrices (244-292). En: *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*. Amsterdam, Elsevier Inc.
- Kassal, P., Šurina, R., Vrsaljko, D., y Steinberg, I. M. (2014). Hybrid sol-gel thin films doped with a pH indicator: effect of organic modification on optical pH response and film surface hydrophilicity. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 69(3), 586-595.
- Liu, X. H., Xu, H. J., Sun, S. Q., Huang, J., Li, G. Y., Zhu, Y., y Wang, J. H. (2012). Analysis and identification of Chinese drugs by three-step infrared spectroscopy—A case study of Danshen. *Analytical Methods*, 4(10), 3344-3350.
- Lobnik, A., Urek, Š. K., Turel, M., y Frančič, N. (2011). Sol-gel based optical chemical sensors (80730V-80730V). En: *SPIE Optics and Optoelectronics*. International Society for Optics and Photonics.
- Loypimai, P., Moongngarm, A., y Chottanom, P. (2016). Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 461-470.
- Marr, A. C., y Marr, P. C. (2011). Entrapping homogeneous catalysts by sol-gel methods: the bottom-up synthesis of catalysts that recycle and cascade. *Dalton Transactions*, 40(1), 20-26.
- Mazza, G., y Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. London U. K.: CRC press.
- McDonagh, C., Sheridan, F., Butler, T., y MacCraith, B. D. (1996). Characterisation of sol-gel-derived silica films. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 194(1-2), 72-77.
- Munin, A., y Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829.
- Ou, D. L., y Seddon, A. B. (1997). Near-and mid-infrared spectroscopy of sol-gel derived ormosils: vinyl and phenyl silicates. *Journal of Non-crystalline Solids*, 210(2), 187-203.
- Pereira, V. A., de Arruda, I. N. Q., y Stefani, R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as time-temperature indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 180-188.

10. REFERENCIAS

- Puertas-Mejía, M. A., Ríos-Yepes, Y., y Alberto Rojano, C. B. (2013). Determinación de antocianinas mediante extracción asistida por radiación de microondas en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de alto consumo en Antioquia-Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 288–297.
- Restrepo, G. M. (2007). Sustitución de colorantes en alimentos. *Lasallista de Investigación*, 4(1), 35–39.
- Reynoso, R., Garcia, F. A., Morales, D., y Gonzalez de Mejia, E. (1997). Stability of betalain pigments from a cactacea fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2884-2889.
- Rodriguez-Saona, L. E., y Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current protocols in Food Analytical Chemistry*. En: Handbook of Food Analytical Chemistry. pp. F1.1.1- F1.1.11. New Jersey: John Wiley & Sons
- Rottman, C., Ottolenghi, M., Zusman, R., Lev, O., Smith, M., Gong, G., y Avnir, D. (1992). Doped sol-gel glasses as pH sensors. *Materials Letters*, 13(6), 293-298.
- Routray, W., y Orsat, V. (2011). Blueberries and their anthocyanins: factors affecting biosynthesis and properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(6), 303-320.
- Rovati, L., Fabbri, P., Ferrari, L., y Pilati, F. (2012). Plastic optical fiber pH sensor using a sol-gel sensing matrix. En *Fiber Optic Sensors*. InTech. DOI: 10.5772/26517
- Serna-Cock, L., Torres-León, C., y Ayala-Aponte, A. (2015). Evaluación de polvos alimentarios obtenidos de cáscaras de mango (*Mangifera indica*) como fuente de ingredientes funcionales. *Información Tecnológica*, 26(2), 41–50.
- Serra, A., Ramis, X., y Fernández-Francos, X. (2016). Epoxy sol-gel hybrid thermosets. *Coatings*, 6(1), 8-12.
- Shahid, M., y Mohammad, F. (2013). Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 310-331.
- Shamsipur, M., y Azimi, G. (2001). High-acidity optical sensors based on sol-gel-derived thin films. *Analytical Letters*, 34(10), 1603-1616.
- Shamsipur, M., Abbasitabar, F., Zare-Shahabadi, V., Shahabadi, y Akhond, M. (2008). Broad-range optical pH sensor based on binary mixed-indicator doped sol-gel film and application of artificial neural network. *Analytical Letters*, 41(17), 3113-3123.
- Sun, W., Li, H., Wang, H., Xiao, S., Wang, J., y Feng, L. (2015). Sensitivity enhancement of pH indicator and its application in the evaluation of fish freshness. *Talanta*, 143, 127–131.
- Trouillas P., Sancho-García J.C., De Freitas V., Gierschner J., Otyepka M., y Dangles O. (2016) Stabilizing and modulating color by copigmentation: insights from theory and experiment. *Chemical Reviews*, 116(9), 4937-4982.

10. REFERENCIAS

- Urias-Lugo, D. A., Heredia, J. B., Serna-Saldivar, S. O., Muy-Rangel, M. D., y Valdez-Torres, J. B. (2015). Total phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity of native and elite blue maize hybrids (*Zea mays* L.). *Journal of Food*, 13(3), 336–339.
- Wang, E., Chow, K. F., Kwan, V., Chin, T., Wong, C., y Bocarsly, A. (2003). Fast and long term optical sensors for pH based on sol–gels. *Analytica chimica acta*, 495(1), 45-50.
- Yip, W. T., Zhou, Y., Martyn, T. A., y Gillil, J. W. (2009). Silica Sol–Gel Biocomposite Materials for Sensor Development. En *Hybrid Nanocomposites for Nanotechnology*. Springer US.
- Yousuf B., Gul K., Wani A. A., Singh P., (2016) Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(13), 2223-2230.
- Zaidel, D. N. A., Sahat, N. S., Jusoh, Y. M. M., y Muhamad, I. I. (2014). Encapsulation of Anthocyanin from Roselle and Red Cabbage for Stabilization of Water-in-Oil Emulsion. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 82-89.
- Zareba-Grodz, I., Pazik, R., Hermanowicz, K., Strek, W., y Maruszewski, K. (2006). Preparation and optical properties of hybrid coatings based on epoxy-modified silane and rhodamine B. *Journal of Luminescence*, 119, 148-152.