



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

**EXTRACCIÓN, MODIFICACIÓN QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA  
DE LAS ANTOCIANINAS PRESENTES EN EL *DAUCUS CAROTA SSP. SATIVUS*  
*VAR. ATRORUBENS ALEF***

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

**PRESENTA**  
M. en C. GUILLERMO ESPINOSA ACOSTA

**TUTOR**

DRA. MIRIAM ROCÍO ESTÉVEZ GONZÁLEZ  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

**COMITÉ TUTOR**

DRA. MARTHA ELENA CRUZ SOTO  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO

DR. JOSÉ ROGELIO RODRIGUEZ TALAVERA  
CENTRO DE FÍSICA AVANZADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

CIUDAD DE MÉXICO CTUBRE 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

*A DIOS que en su infinito amor me ha dado la vida,  
y es la razón y el gran amor de mi vida.*

*A mi Esposa Carla por su amor, amistad,  
apoyo y ánimo que me brinda día con día  
para alcanzar nuevas metas, en todas las  
áreas de nuestras vidas. Y además por que  
estás siempre conmigo incluso en los  
momentos más difíciles.*

*A mis Padres María Isabel y Guillermo  
por ser pilares fundamentales en todo lo que soy  
y por su amor e incondicional apoyo  
perfectamente mantenido a través del tiempo.*

*A mis Hijos Emmanuel, David Israel y  
(el/ la/ los) que venga(n), a quien amo y  
siempre cuidaré, además de ser mi motor  
e impulso para caminar y seguir adelante.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Miriam Rocío Estévez González por la dirección de este trabajo, por su apoyo, paciencia y soporte brindados en la realización de esta tesis, pero sobre todo porque es una excelente persona y una gran amiga.

Agradezco a la Dra. Martha Elena Cruz Soto por sus ideas, comentarios, sugerencias, colaboración académica, apoyo en el proyecto de tesis y por su amistad.

Agradezco al Dr. Rogelio Rodríguez Talavera por sus ideas, comentarios, sugerencias, respaldo que formaron parte para la realización de este proyecto de tesis.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber financiado la realización de este proyecto de tesis.

Agradezco al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) por haberme permitido realizar mi proyecto de investigación, en especial a: M. en C. Gerardo Antonio Fonseca Hernández, M. en C. Gustavo Molina Labastida, Lic. Itari Sánchez González.

# I.- ÍNDICE

i.- Índice.....	3
ii.- Índice de figuras.....	8
iii.- Índice de tablas.....	12
1.- Introducción.....	15
2.- Planteamiento del problema.....	17
3.- Justificación.....	18
4.- Antecedentes.....	19
4.1.- Zanahoria negra ( <i>Daucus carota L</i> ).....	19
4.2.- Las Antocianinas.....	21
4.2.1.- Estructura química.....	21
4.2.2.- Biosíntesis de las antocianinas.....	23
4.2.3.- Factores químicos que determinan el color y la estabilidad de las antocianinas.....	25
4.2.3.1.- Efecto del ph.....	25
4.2.3.2.- Efecto de la temperatura.....	26
4.2.3.3.- Efecto del oxígeno y el ácido ascórbico.....	27
4.2.3.4.- Efecto de la luz.....	28
4.2.3.5.- Efecto de la concentración.....	28
4.2.3.6.- Efecto del agua.....	28
4.2.4.- Actividad antioxidante de las antocianinas.....	28
4.2.5.- Extracción de las antocianinas.....	30
4.3.- Nanopartículas de oro (AuNPs).....	31
4.3.1.- Síntesis de AuNPs.....	32

5.- Análisis de los antecedentes.....	35
6.- Hipótesis.....	37
7.- Objetivos.....	37
7.1.- Objetivo general.....	37
7.2.- Objetivos específicos.....	38
8.- Metodología.....	39
8.1.- Diseño del experimento.....	39
8.2.- Materiales y métodos para la extracción de antocianinas.....	40
8.2.1.- Extracción de las antocianinas.....	40
8.2.2.- Caracterización y cuantificación de las antocianinas totales por espectroscopía uv- vis, utilizando el método de pH diferencial.....	42
8.2.3.- Pruebas de capacidad antioxidante con DPPH.....	44
8.2.4.- Prueba de capacidad antioxidante reductora del cobre (CUPRAC)...	44
8.2.5.- Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR).....	45
8.2.6.- Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).....	46
8.2.7.- Determinación de color de extractos y modelos alimenticios.....	46
8.3.- Materiales y métodos para la síntesis verde de nanopartículas de oro (AuNPs).....	47
8.3.1.- Metodología para la extracción acuosa de la zanahoria negra.....	47
8.3.2.- Síntesis de Nanopartículas de oro por el método de Turkevich.....	49
8.3.3.- Síntesis verde de nanopartículas de oro a partir del extracto acuoso de la zanahoria negra.....	49
8.3.4.- Espectroscopía Uv- Vis.....	50
8.3.5.- Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR).....	51
8.3.6.- Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	51

8.3.7.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	51
8.3.8.- Dispersión de luz.....	52
8.3.9.- Potencial Z.....	52
9.- Resultados.....	53
9.1.- Resultados de Espectroscopía Uv-Vis.....	53
9.2.- Método de pH diferencial.....	58
9.2.1.- Determinación de la concentración de antocianinas de cada uno de los métodos de extracción, con y sin TEOS.....	58
9.2.2.- Determinación del contenido de antocianinas (mg/L) obtenidas por cuatro distintas formas de extracción, con y sin TEOS, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días, por el método de pH diferencial.....	60
9.2.2.1.- Antocianinas etanol- ácido cítrico 85:15 v/v.....	60
9.2.2.2.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7)....	61
9.2.2.3.- Antocianinas extraídas usando etanol- ácido acético 85:15 v/v.....	62
9.2.2.4.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7)...	63
9.2.2.5.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y modificadas con TEOS.....	64
9.2.2.6.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v, purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7) y modificadas con TEOS.....	65
9.2.2.7.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y modificadas con TEOS.....	66
9.2.2.8.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v, purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7) y modificadas con TEOS.....	67
9.2.3.- Determinación del contenido de antocianinas (mg/L) obtenidas por cuatro distintas formas de extracción, con y sin TEOS, expuestas a 40,	

60 y 80°C y medidas durante 20, 40, 60, 80, 100 y 120 minutos, por el método pH diferencial.....	68
9.2.3.1.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v, con y sin TEOS.....	69
9.2.3.2.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), con y sin TEOS.....	71
9.2.3.3.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v, con y sin TEOS.....	73
9.2.3.4.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), con y sin TEOS.....	75
9.2.4.- Determinación del contenido de antocianinas (mg/L) obtenidas por cuatro distintas formas de extracción, con y sin TEOS, con exposición a la luz ultravioleta y medidas a 0, 40, 80, 120 y 160 minutos, por el método pH diferencial.....	77
9.2.4.1.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v, con y sin TEOS.....	78
9.2.4.2.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), con y sin TEOS.....	78
9.2.4.3.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v, con y sin TEOS.....	79
9.2.4.4.- Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), con y sin TEOS.....	80
9.3.- Resultados de las pruebas de contenido antioxidante con DPPH y CUPRAC electroquímico.....	81
9.4.- Resultados de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR).....	86
9.5.- Resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).....	89



9.6.- Resultados de la determinación de color de extractos y modelos alimenticios.....	91
9.7.- Resultados de espectroscopía Uv- vis en la biosíntesis de las nanopartículas de oro.....	94
9.8.- Resultados de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR) de las biosíntesis de nanopartículas de oro AuNPs.....	96
9.9.- Resultados de Microscopía electrónica de barrido para las AuNPs.....	98
9.10.- Resultados de Microscopía electrónica de transmisión para las AuNPs...	102
9.11.- Resultado de dispersión de luz (DLS) para las AuNPs.....	106
9.12.- Resultados de potencial zeta para AuNPs.....	110
10.- Conclusiones.....	111
11.- Bibliografía.....	113

## ii.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1.- Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas.....	22
Figura 4.2.- Ruta general de biosíntesis de las antocianinas.....	24
Figura 4.3.- Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH.....	26
Figura 4.4.- Síntesis verde de nanopartículas de oro, a partir de un extracto de plantas acuoso, utilizado con agente reductor.....	34
Figura 8.1.- Diagrama de flujo de procesos experimentales para obtención de muestras. Muestras extraídas con etanol / ácido cítrico (BCS) y etanol / ácido acético (BCA), muestras después de la columna de resina (BCSR y BCAR) y muestras microencapsuladas utilizando TEOS (TBCS, TBCA, TBCSR, TBCA).....	41
Figura 8.2.- Procedimiento de extracción acuosa de la zanahoria negra, utilizado para la síntesis verde de AuNPs.....	48
Figura 8.3.- Esquema de la síntesis verde de las nanopartículas de oro a partir del extracto acuoso rico en antocianinas de la zanahoria negra.....	50
Figura 9.1: Espectros Uv-Vis de las antocianinas extraídas por los métodos BCS y BCSR.....	54
Figura 9.2: Espectros Uv-Vis de las antocianinas extraídas por los métodos BCA y BCAR.....	55
Figura 9.3: Espectros Uv-Vis de las antocianinas extraídas por los métodos TBCS Y TBCSR.....	56

Figura 9.4: Espectros Uv-Vis de las antocianinas extraídas por los métodos TBCA Y TBCAR.....57

Figura 9.5. (a) Actividad antirradical de extractos de zanahoria negra utilizando el ensayo DPPH a diferentes concentraciones. (b) Voltamogramas cíclicos para los cuatro extractos (400  $\mu\text{M}$ ) en una solución CUPRAC. La exploración comenzó en el potencial de circuito abierto (OCP) con una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . (c) Actividad antioxidante electroquímica y comparada con la actividad de Trolox en la misma concentración. Muestras extraídas con etanol / ácido cítrico (BCS) y etanol / ácido acético (BCA), muestras después de la columna de resina (BCSR y BCAR).....84

Figura 9.6. (a) Espectros FTIR experimentales de extractos de zanahoria negra; muestras extraídas con etanol / ácido cítrico (BCS) y etanol / ácido acético (BCA), (b) Espectros FTIR simulados utilizando el cálculo de B3LYP y la molécula de cianidina 3-O-glucósido.....88

Figura 9.7. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de extractos de zanahoria negra: (a) muestra BCS (extraída con etanol / ácido cítrico). (b) muestra BCA (extraída con etanol / ácido acético).....90

Figura 9.8. (a, c) Diagrama seccional polar y (b, d) cartesiano del color para los extractos de zanahoria negra y el FD&C rojo en modelos de alimentos (yogur y gelatina) a los 0 y 25 días de almacenamiento.....92

Figura 9.9. Espectros UV-vis de las soluciones de AuNp's preparadas por el método químico de Turkevich y a diferentes concentraciones con extracto de la zanahoria negra: (A) AuNp's sintetizadas por el método químico de Turkevich, (B) (C) y (D) AuNp's sintetizadas con extracto de zanahoria negra y ácido cloroaurico en las siguientes concentraciones respectivamente: 1:10, 1:5 y 2:5 (v/v).....95

Figura 9.10. Comparativo entre espectros FT-IR de las AuNPs obtenidas de las 3 biosíntesis en las concentraciones 1:10, 1:5, 2:5 v/v reductor-precursor respectivamente y por el método de Turkevich utilizando citrato de sodio.....	96
Figura 9.11 a, b, c y d: Imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich.....	98
Figura 9.12 a, b, c y d: Imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 1:10 v/v reductor- precursor, respectivamente.....	99
Figura 9.13 a, b, c y d: Imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 1:5 v/v reductor- precursor, respectivamente.....	100
Figura 9.14 a, b, c y d: Imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 1:5 v/v reductor- precursor, respectivamente.....	101
Figura 9.15 a y b: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich.....	102
Figura 9.16 a y b: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 1:10 v/v reductor- precursor, respectivamente.....	103

Figura 9.17 a y b: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 1:5 v/v reductor- precursor, respectivamente.....	104
Figura 9.18 a y b: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 2:5 v/v reductor- precursor, respectivamente.....	106
Figura: 9.19 Análisis de la distribución de tamaños de partícula por DLS para el extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas.....	106
Figura: 9.20 Análisis de la distribución de tamaños de partícula por DLS para la síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich.....	107
Figura 9.21 Análisis de la distribución de tamaños de partícula por DLS para la biosíntesis de nanopartículas de oro con la formulación 1:10 v/v (reductor-precursor).....	107
Figura 9.22 Análisis de la distribución de tamaños de partícula por DLS para la biosíntesis de nanopartículas de oro con la formulación 1:5 v/v (reductor-precursor).....	108
Figura 9.23 Análisis de la distribución de tamaños de partícula por DLS para la biosíntesis de nanopartículas de oro con la formulación 2:5 v/v (reductor-precursor).....	109

### iii.- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentración de las antocianinas expresadas en miligramos por litro, según el método de extracción.....	59
Tabla 2: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.....	61
Tabla 3: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.....	61
Tabla 4: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencia extraídas usando etanol- ácido acético 85:15 v/v, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días....	62
Tabla 5: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.....	63
Tabla 6: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y modificadas con TEOS, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.....	64
Tabla 7: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v, purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7) y modificadas con TEOS, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.....	65
Tabla 8: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido acético 85:15v/v y modificadas con TEOS, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.....	66

Tabla 9: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v, purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7) y modificadas con TEOS, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.....	67
Tabla 10: Prueba a 40°C.....	69
Tabla 11: Prueba a 60°C.....	70
Tabla 12: Prueba a 80°C.....	70
Tabla 13: Pruebas a 40°C.....	71
Tabla 14: Pruebas a 60°C.....	72
Tabla 15: Pruebas a 80°C.....	72
Tabla 16: Pruebas a 40°C.....	73
Tabla 17: Pruebas a 60°C.....	74
Tabla 18: Pruebas a 80°C.....	74
Tabla 19: Pruebas a 40°C.....	75
Tabla 20: Pruebas a 60°C.....	76
Tabla 21: Pruebas a 80°C.....	76

Tabla 22: Concentración de antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico, con y sin TEOS, con exposición a la luz ultravioleta y medidas durante 160 minutos en intervalos de 40 minutos.....	78
Tabla 23: Concentración de antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico, purificados con resina XAD7, con y sin TEOS, exposición a la luz ultravioleta y medidas durante 160 minutos en intervalos de 40 minutos.....	79
Tabla 24: Concentración de antocianinas extraídas con etanol- ácido acético, con y sin TEOS, exposición a la luz ultravioleta y medidas durante 160 minutos en intervalos de 40 minutos.....	80
Tabla 25: Concentración de antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con resina XAD7, con y sin TEOS, exposición a la luz ultravioleta y medidas durante 160 minutos en intervalos de 40 minutos.....	80
Tabla 26. Tiempo de retención e identificación de antocianinas a partir de extractos de zanahoria negra BCS (extraídas con etanol / ácido cítrico) y BCA (extraídas con etanol / ácido acético).....	91
Tabla 27. Comparación de color entre los modelos de alimentos (yogur y gelatina) utilizando extractos de zanahoria negra después de 25 días de almacenamiento.....	93
Tabla 28: Resultados de las mediciones de potencial zeta, sintetizadas por el método químico y las biosintetizadas.....	110



**EXTRACCIÓN, MODIFICACIÓN QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA  
DE LAS ANTOCIANINAS PRESENTES EN EL *DAUCUS CAROTA SSP. SATIVUS*  
*VAR. ATRORUBENS ALEF***

## **1.- INTRODUCCIÓN**

El presente trabajo de investigación está orientado a la obtención, purificación y modificación química del extracto rico en antocianinas presentes en la zanahoria negra (*Daucus carota L.*), así como el estudio de sus posibles aplicaciones como agente reductor en la síntesis verde de nano partículas de oro y aditivo de alimentos.

El interés en los extractos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos las antocianinas permanecen intactas (Miyasawa T 1999) y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y de la actividad cognitiva. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante (Garzón 2008).

Recientemente el estudio de la zanahoria negra (*Daucus carota L.*) ha sido de mucho interés, debido a su alta cantidad de antocianinas (1750mg/kg) y sus extraordinarios parámetros de calidad (Kirca 2006). El extracto de la zanahoria negra provee un excelente color rojo a valores de pH=2 y es útil como colorante en jugos y néctares, conservas, mermeladas, confitería, cosméticos y productos farmacéuticos (Vishwanath Khandare 2011).

Para desarrollar esta investigación fue necesario diseñar un método óptimo para la obtención de extractos ricos en antocianinas, sin incluir reactivos que sean nocivos para el ser humano. Adicionalmente se planteó la propuesta de modificar el extracto rico en antocianinas ya que a pesar, de que la zanahoria negra provee antocianinas con una buena estabilidad en comparación con otras frutas y vegetales que contienen este antioxidante (Kirca Aysegul 2006), existen algunos factores que afectan su estabilidad (Arrazola G. 2014), por lo que resultó necesario establecer una alternativa que nos permitiera aumentar su estabilidad frente a la radiación UV, cambios de pH, temperatura, entre otros.

Teniendo en cuenta esos factores, se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la estabilidad de las antocianinas. La acilación de antocianinas es el método más comúnmente usado, ya que se ha informado que los derivados de cianidina acilados son más estables durante el almacenamiento prolongado en comparación con los correspondientes no acilados (Lee, Koo y Min 2004; Valko, y otros 2007; Gandomi, y otros 2016), Stintzing et al. (Stintzing FC 2002) también confirmó que hay un aumento en la intensidad del color a través de la acilación. Por otro lado, la microencapsulación se ha utilizado para aumentar la estabilidad de los colorantes naturales (antocianina y derivados de betalaina) (García-Tejeda, y otros 2015; Mahdavi, y otros 2014). Luego, considerando estas condiciones, se han realizado algunos esfuerzos para preservar los extractos naturales y los colorantes utilizando diferentes técnicas, como la eliminación de compuestos a través de columnas de resina y la microencapsulación con tetraetil ortosilicato.

En la primera parte de este trabajo, estudiamos la estabilidad de los extractos de zanahoria negra mientras modificamos las condiciones experimentales, incluidos los solventes de extracción, y estudiamos la viabilidad de la microencapsulación con tetraetil ortosilicato y la repercusión de este procedimiento en la estabilidad de los extractos.

En la segunda parte de este trabajo, se realizó una síntesis verde de nanopartículas de oro, utilizando el extracto acuoso rico en antocianinas como agente reductor y se estudiaron sus propiedades, como el tamaño de partícula y su capacidad antioxidante. Las nanopartículas de oro (AuNPs) tienen ventajas sobre otras nanopartículas metálicas, debido a su biocompatibilidad y no citotoxicidad (A. Tomar 2013; Gil Felicísimo S. Cabrera 2017).

## **2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Una de las dificultades que se presenta en nuestro país es el aumento alarmante de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y tumores malignos, debido a que la población mexicana ha optado por cambiar la dieta tradicional basada en cereales y leguminosas, por comidas rápidas (hamburguesas, pizzas y bebidas gaseosas, con grasa saturada, azúcares refinados y baja en fibra, vitaminas y minerales; además, del aumento del sedentarismo (Cuevas 2011).

En el organismo del ser humano, se producen procesos oxidativos que dan lugar a radicales libres, moléculas que pueden lesionar las células y que ayudan al envejecimiento celular. El organismo de las personas están expuestas a agentes externos e internos que producen radicales libres como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio. La formación de radicales libres por procesos naturales conduce a la oxidación de biomoléculas. La oxidación da lugar a diversos daños en el organismo (Reuter S. 2010).

Recientemente se ha sugerido el papel del estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo I y II y cáncer, esto es objeto de investigaciones extensivas. El estrés oxidativo se define como un desbalance, entre la producción de radicales libres y metabolitos reactivos, también llamados especies reactivas de oxígeno, los antioxidantes permiten que no se produzcan las especies reactivas

oxigenadas, de forma que se impide su actividad. (Reuter S. 2010; Serrano J 2009; Cuerda C. 2011; Tristan F. 2008).

Las antocianinas son compuestos de gran interés en la actualidad por sus benéficas implicaciones para la salud humana; desarrollo tecnológico y comercial de alimentos funcionales, como los jugos, mermeladas, alimentos elaborados con plantas y frutas ricas en antocianinas (debido a su poder anti radical) agregando un valor importante en cada producto, sin embargo a pesar de las ventajas que ofrecen los extractos ricos en antocianinas por sus efectos terapéuticos, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento. Se ha estudiado que factores como su estructura química, pH, concentración, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad de las antocianinas (Garzón 2008; Tristan F 2008).

### **3.- JUSTIFICACIÓN**

El estudio de las bioaplicaciones de las antocianinas obtenidas a partir de la zanahoria negra, es de gran importancia, ya que hoy en día en nuestro país y en el mundo entero, la incorporación de antioxidantes en la dieta de una persona es imprescindible por que estos aportan múltiples beneficios para la salud. Las antocianinas ejercen efectos terapéuticos, los cuales están reportados en la literatura, como la reducción de la enfermedad coronaria, efectos antitumorales, antiinflamatorios, antidiabéticos, mejoramiento de la agudeza visual y la actividad cognitiva (Garzón 2008; Hernández-Ávila Mauricio 2013).

A través de este proyecto, se analizaron y medieron las propiedades de los extractos ricos en antocianinas, para poder realizar modificaciones químicas que ayuden a potencializar la actividad antioxidante y mejorar la estabilidad de las mismas, además

de la síntesis verde de nanopartículas de oro por medio del extracto acuoso rico en antocianinas, utilizado como agente reductor.

Por las características de las antocianinas, estas podrían ser utilizadas como colorantes naturales, ya que ellas ofrecen una amplia gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul, sustituyendo colorantes artificiales como el rojo 40, el cual tiene grados importantes de toxicidad (Kirca Aysegul 2006); además las antocianinas tienen el potencial de poder incorporarse en distintas matrices alimenticias (Hurtado N. H. 2014).

La pertinencia con la ciencia e ingeniería de materiales viene directamente relacionada con la obtención, purificación, la modificación química de la molécula de las antocianinas y la síntesis verde de nanopartículas de oro por medio del extracto acuoso rico en antocianinas; además del empleo de las técnicas de caracterización para el estudio de la morfología, estructura química, tamaño de partícula y su comportamiento electroquímico.

## **4.- ANTECEDENTES**

### **4.1.- Zanahoria Negra (*Daucus carota L.*)**

Las zanahorias son los vegetales más populares después de la papa, aunque las variedades de zanahoria naranja son más comunes, el consumo de la zanahoria negra o morada (*Daucus carota L.*) va en aumento en el oeste de Europa (Algarra Manuel 2014). Las zanahorias negras se cultivan principalmente en Turquía, Afganistán, Egipto y la India. Actualmente, Konya, un municipio metropolitano de Turquía, es el área de mayor producción de zanahoria negra. La zanahoria negra tiene un atractivo color rojo- púrpura y contiene gran cantidad de antocianinas (Meltem Türkyilmaz 2012).

Está reportado en la literatura que el contenido de antocianinas en la zanahoria negra es de 1,750mg/kg. Hoy en día los extractos de la zanahoria negra son comúnmente usados en jugos, dulces, confitería, helados, cremas, refrescos, y otras bebidas fermentadas, como una alternativa saludable a los colorante como el rojo 40 (Cuevas Montilla Elyana 2011).

Las antocianinas de la zanahoria negra tienen una mayor estabilidad de color a cierto pH en los alimentos, en comparación con las antocianinas de otras plantas, ellas proveen un brillante color rojo a pH bajo y tonos azules a pH neutro; además contiene bajos niveles de polifenoles, los cuales pueden causar problemas de precipitación en las antocianinas (Downham Alison 2000).

La alta estabilidad de las antocianinas de la zanahoria negra se debe a la presencia de grupos acilados, se ha demostrado que las antocianinas aciladas son más estables a los cambios de pH y temperatura que las no aciladas. La proporción de antocianinas aciladas en la zanahoria negra varía del 55% al 99% y en la mayoría de los casos excede el 80% (Aysegul Kirca 2007).

Las zanahorias negras están compuestas principalmente en pigmentos base cianidina, y el perfil de antocianinas se ha analizado por varios investigadores; contiene la estructura de los dos antocianinas no aciladas cianidina 3-xilosilo (glucosil) galactosido y cianidina 3-xilosilo galactosido, así como tres antocianinas monoaciladas cianidina 3-xilosilo (sinapoilglucosil) galactosido, cianidina 3-xilosilo (feruloil glucosil) galactosido, y cianidina 3-xilosilo (coumaroilglucosil) galactosido, todas ellas se caracterizaron por análisis de resonancia magnética nuclear. (Aysegul Kirca 2007) (Cuevas Montilla Elyana 2011).

## **4.2.- Las Antocianinas**

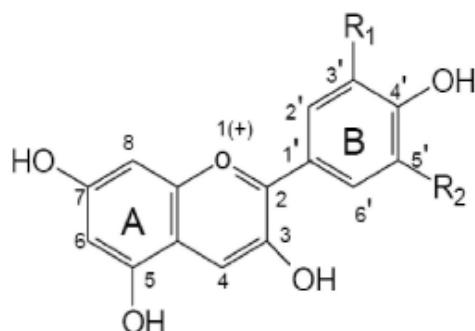
Las antocianinas están presentes en la zanahoria negra. Estos compuestos son colorantes naturales que han suscitado interés debido a su carácter no tóxico y porque al ser hidrosolubles, se pueden utilizar como colorantes en productos alimenticios. Además, debido a sus propiedades antioxidantes, se pueden encontrar numerosas publicaciones que les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud, como la prevención de enfermedades (Zapata 2014).

El interés en estos pigmentos se ha intensificado gracias a sus posibles efectos terapéuticos y farmacológicos, dentro de los cuales se encuentran la reducción de la enfermedad coronaria, los efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además el mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo (Wrolstad 2000). Las propiedades bioactivas de las antocianinas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano. A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja estabilidad y la falta de disponibilidad de material vegetal limitan su aplicación comercial (Cevallos-Casals BA 2004).

### **4.2.1.- Estructura química**

Las antocianinas son los compuestos químicos responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta. (Wang WD 2007) Estos compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides. Son glucósidos de antocianidinas, es decir, que están constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio, que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); ambos unidos por una cadena de tres átomos

de carbono (Aguilera Ortíz M 2011). Variaciones estructurales del anillo B producen las seis antocianidinas conocidas (Figura 4.1) (Garzón 2008).



Aglicona	Substitución		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	508 (azul-rojo)
Malvinidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510 (azul-rojo)

Figura 4.1.- Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas (Garzón 2008).

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como:



malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico (Garzón 2008). También se ha demostrado que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación produce efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura (Stintzing FC 2002).

#### **4.2.2.- Biosíntesis de las antocianinas**

Los precursores de las antocianinas son bien conocidos. Se ha establecido experimentalmente que al anillo A de las antocianinas se sintetiza por la ruta del ácido malónico con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, mientras que el anillo B se sintetiza por la ruta de ácido shikímico. El ácido shikímico da paso a la fenilalanina que por acción de una fenilalanina amonía liasa (PAL), y después de una pérdida de  $\text{NH}_3$  se convierte en ácido p-coumárico. El p-coumaril-CoA luego participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil-CoA para formar una chalcona de 15 C, reacción propiciada por una chalcona sintetasa. Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa.

Finalmente, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación (Figura 4.2). La molécula de antocianidina se estabiliza por glicosilación del heterociclo; reacción en la que interviene una glicosil transferasa y posterior posibles reacciones de metilación de los hidroxilos seguidas de acilaciones (Delgado-Vargas F 2000).

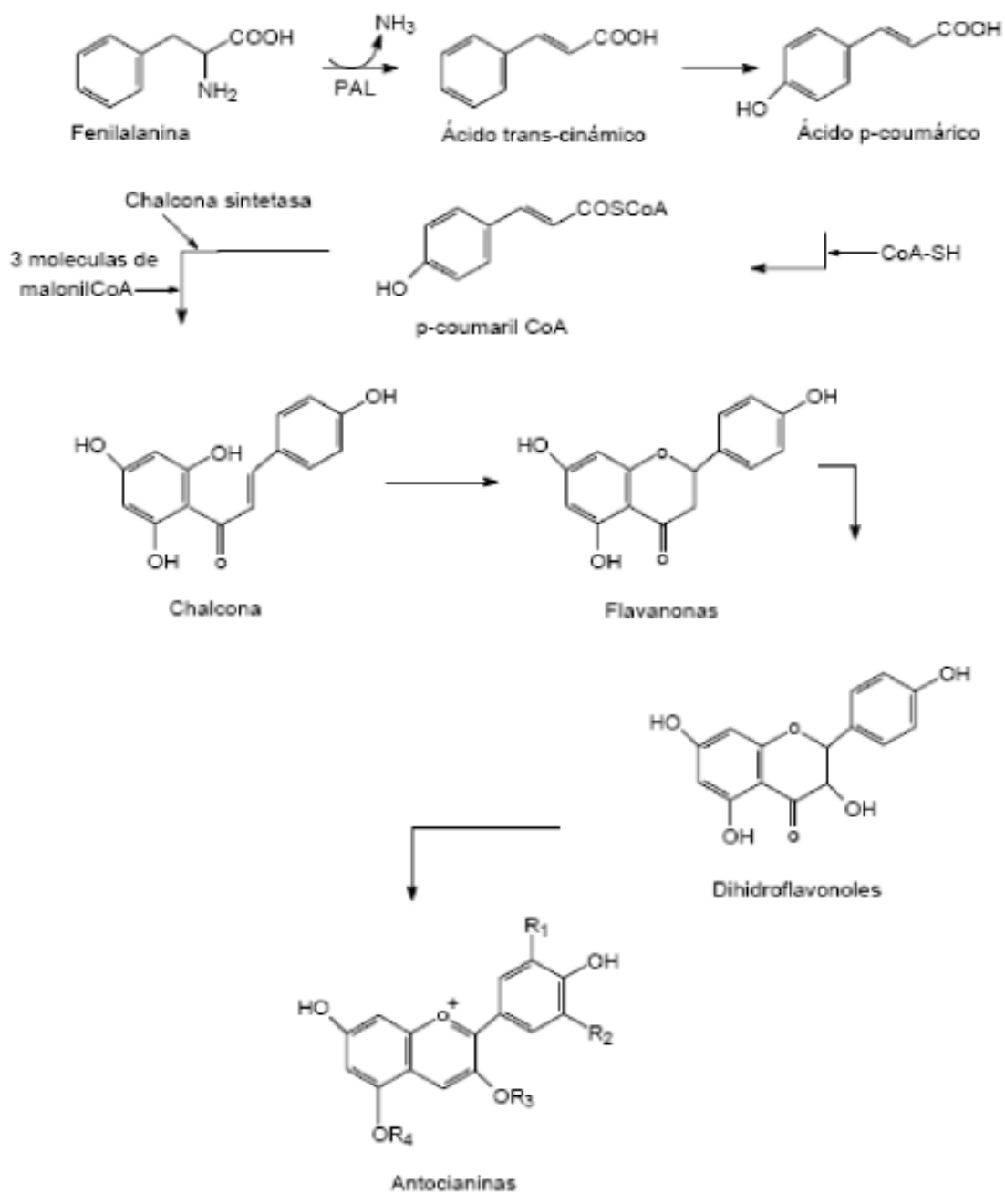


Figura 4.2.- Ruta general de biosíntesis de las antocianinas (Delgado-Vargas F 2000).

### **4.2.3.- Factores químicos que determinan el color y la estabilidad de las antocianinas**

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento. Factores como su misma estructura química, pH, concentración, temperatura, luz, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento (Wrolstad 2000) (Cevallos-Casals BA 2004).

#### **4.2.3.1 Efecto del pH**

Las antocianinas pueden encontrarse en diferentes formas químicas dependiendo del pH, es decir que este factor influye en su estructura y por lo tanto en su estabilidad (Figura 4.3). A pH 1 predomina el catión flavilio que es de color rojo y es la forma más estable de las antocianinas (Figura 4.3.A), a valores de pH entre 2 y 4 ocurre la pérdida de un protón y adición de agua, encontrándose las antocianinas preferentemente bajo la formas quinodales (Figura 4.3.B. C y D) de color azul. A pH entre 5 y 6 se observan las especies pseudobase carbinol, que es incolora (Figura 4.3.E), y chalcona, de color amarillo (Figura 4.3.F), ambas bastante inestables. A pH superiores a 7 se produce la degradación rápida de las antocianinas por oxidación con el aire. Esta reacción se ve afectada, además del pH, por la presencia de sustituyentes presentes en el anillo B (Moldovan B. 2012).

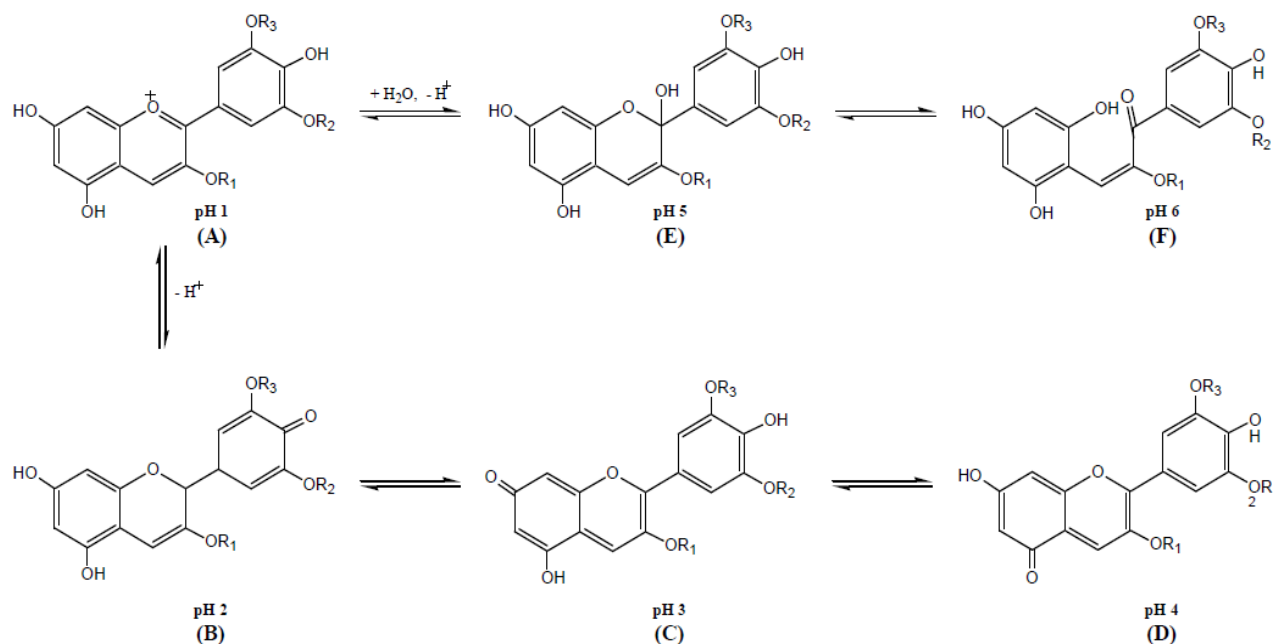


Figura 4.3.- Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH. Dónde R<sub>1</sub>= H o glúcido, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>= H o metilo (Moldovan B. 2012).

Finalmente, según lo que se menciona con anterioridad, se sabe que la acidez tiene un efecto protector sobre la estructura de las antocianinas, ya que cuanto más elevado es el pH, aparecen estructuras inestables que se degradan con mayor rapidez. Es por esto que las aplicaciones de las antocianinas en los sistemas alimenticios son preferentemente usadas en alimentos de acidez intermedia para que predomine el catión flavilio (Aguilera Ortíz M 2011).

#### 4.2.3.2 Efecto de la temperatura

Otro factor que influye en la degradación de las antocianinas es la temperatura, ya que cuando esta incrementa provoca pérdidas del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo, con la consecuente producción de chalconas incoloras

(Garzón 2008). Sin embargo se ha reportado en la literatura que durante la extracción de antocianinas de maíz morado a temperaturas entre 25 y 90°C, obtuvieron que el mayor rendimiento de extracción se produjo a temperaturas entre 75°C y 90°C (Gorriti Gutierrez A. 2009).

Con esto se puede decir que las temperaturas más elevadas provocan un efecto adverso sobre la estructura de las antocianinas, especialmente durante un tratamiento térmico o el almacenamiento. Sin embargo, los mejores rendimientos de extracción de antocianinas de algunos productos son a temperaturas altas. Probablemente, este último efecto se deba a la mayor transferencia de antocianinas desde la matriz que lo contiene hacia el seno de la disolución extractiva (Zapata 2014).

#### **4.2.3.3 Efecto del oxígeno y el ácido ascórbico**

El efecto degradativo del oxígeno y el ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas está relacionado.

Se ha reportado que las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico en jugo de fresa y en sistemas modelo que contenían pelargonidina 3-glucósido proveniente de la fresa causaban grandes pérdidas de antocianinas, pero cuando el oxígeno era excluido del sistema no se observaba deterioro del color. De igual manera, existe un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el oxígeno sobre la degradación de la pelargonidina 3-glucósido en solución (Garzón 2008). En investigaciones más recientes, se ha confirmado la aceleración de la destrucción de antocianinas de fresa cuando el ácido ascórbico está presente tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo (Garzón G.A. 2002).

#### **4.2.3.4 Efecto de la luz**

La luz es un factor que acelera la degradación de las antocianinas. Se ha observado que la sustitución del hidroxilo en el C-5 hace que la antocianina sea más susceptible a la fotodegradación cuando ésta se presenta con flavonas polihidroxiladas, isoflavonas y auronas sulfonadas (Zapata 2014).

#### **4.2.3.5 Efecto de la concentración**

Se ha demostrado que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemiacetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilio y protegiendo la molécula de antocianina (Garzón 2008).

#### **4.2.3.6 Efecto del agua**

Por otro lado, incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de las antocianinas probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable (Garzon G.A. 2001).

### **4.2.4 Actividad antioxidante de las antocianinas**

La actividad antioxidante de las antocianinas radica en el hecho de que pueden reaccionar con radicales libres. Estos últimos, entre los que se encuentran los radicales  $\text{OH}\cdot$  (hidroxilo) y  $\text{O}_2\cdot$  (superóxido), son capaces de atacar a proteínas, carbohidratos, grasas y ADN del cuerpo, ejerciendo un efecto oxidativo que daña las células. Así, cuando un radical reacciona con una molécula, la molécula resultante de esta reacción se convierte en un nuevo radical libre, originándose una reacción en cadena, que

provoca un daño en los tejidos, que a su vez, derivan en enfermedades degenerativas disminuyendo la calidad de vida (Zapata 2014). Esta acción oxidante de los radicales libres puede ser controlada, o incluso prevenida, por una serie de sustancias denominadas antioxidantes. Se llama "antioxidante" a "cualquier sustancia que retarda, previene o elimina el daño oxidativo hacia una molécula" o bien, "a la capacidad que tienen determinados compuestos para neutralizar los radicales libres" (López-Alarcón C. 2013).

Las antocianinas se caracterizan por tener una deficiencia de electrones, debido a su particular estructura química, que las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo, por consiguiente, pueden ser potentes antioxidantes naturales (Bridgers EN 2010).

Las propiedades atribuidas a las antocianinas para mejorar la salud están asociadas a esta capacidad de actuar como antioxidantes y secuestrar radicales libres en sistemas biológicos, pueden donar hidrógenos, electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática. Se ha demostrado que los frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y contra radicales peróxido, ( $ROO\bullet$ ), superóxido ( $O_2\bullet$ ), hidroxilo ( $\bullet OH$ ) y oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) (Zapata 2014).

Estudios clínicos realizados en Italia revelaron que 79% de los pacientes diabéticos consumidores de extracto de bayas rojas (160 mg dos veces al día durante un mes) mostraron alivio en los síntomas de retinopatía diabética (Garzón 2008). También está reportado que antocianinas provenientes de cuatro especies de arándanos silvestres: *Amelanchier alnifolia*, *Viburnum trilobum*, *Prunus virginian* y *Shepherdia argentea*, muestran propiedades hypoglicémicas. Tales frutos, con alto contenido de sustancias fitoquímicas, han sido consumidos tradicionalmente por tribus norteamericanas para la protección de enfermedades crónicas como diabetes (Tristan F 2008).

#### 4.2.5.- Extracción de las antocianinas

Las antocianinas se pueden extraer de diferentes tejidos vegetales (Wrolstad 2000). En la actualidad existe la tendencia de utilizar los extractos antociánicos sin necesidad de realizar la separación de los distintos componentes, debido a que todos ellos, no sólo los colorantes, presentan propiedades antioxidantes (Zapata 2014). Se han reportado condiciones de extracción de antocianinas a partir del maíz morado. Ensayaron extracciones con soluciones etanólicas al 20 % y pH 2. Los resultados obtenidos indicaron que las mejores condiciones de extracción correspondieron a una temperatura de 75°C y un tiempo de extracción de entre 120 y 240 minutos, mientras que las condiciones más desfavorables fueron 25°C y 30 minutos. También estudiaron la influencia de otras variables de proceso como el solvente, el pH, la temperatura y el tiempo de extracción (Gorriti Gutierrez A. 2009).

En la literatura se han reportado distintas formas de extracción de las antocianinas a partir de la zanahoria negra. Una de las metodologías de extracción más efectivas es por medio de la maceración de la zanahoria negra en una solución de etanol y ácido clorhídrico (1.5N) en una proporción 85:15 v/v, inmediatamente después pasa por un proceso de extracción del solvente en un rota vapor (Seda Ersus 2007).

Las antocianinas son compuestos solubles en solventes polares y comúnmente se extraen de sus fuentes naturales usando metanol o etanol con pocas cantidades de algunos ácidos como ácido clorhídrico, acético y fórmico, ya que el ácido mantiene el pH ácido lo que previene el desplazamiento de los equilibrios químicos de hidratación y formación de chalconas. Adicionalmente el uso de ácidos débiles previene la degradación de las antocianinas no aciladas las cuales presentan mayor labilidad. Sin embargo, durante el proceso de evaporación del solvente acidificado puede ocurrir degradación de las antocianinas aciladas, por la hidrólisis parcial o total de los ácidos enlazados a los azúcares, especialmente en antocianinas aciladas con ácidos dicarboxílicos como el ácido malónico. Por lo anterior se recomienda para la extracción



de estos pigmentos el uso de ácidos débiles como el trifluoroacético, tartárico o cítrico (Revilla E. 1998).

En la mayoría de los casos, para la extracción de las antocianinas se aprovecha la afinidad que tiene este tipo de compuestos por materiales adsorbentes como la Amberlita XAD-7. A diferencia de las resinas XAD-2 y XAD-4 formadas bajo una matriz de estireno y divinilbenceno con diferente grado de entrecruzamiento, la Amberlita XAD-7 tiene una estructura tipo acrilato (área superficial 450 m<sup>2</sup>/g, radio de poro 45 Å, porosidad 1.14 mL/g, tamaño de partícula 0.25-0.84 mm, densidad 1.24 g/mL). Este tipo de resina posee el código de regulación del consejo de Europa, sobre resinas de intercambio iónico y adsorbentes usados en el procesamiento de alimentos, adoptado por el Comité de Ministros el 30 de septiembre de 1997, polivinilpirrolidona (PVP), octadecilsilano, Sephadex G-25, Sephadex LH-20, poliamidas, resinas de intercambio iónico, alúmina ácida, entre otras (Lee H. S. 1992).

La complejidad de los extractos naturales enriquecidos en antocianinas hace necesario realizar su fraccionamiento mediante el uso de técnicas cromatográficas que permitan la obtención de fracciones más simples sin degradación del material. Para esto se han usado múltiples técnicas como la cromatografía en papel (CP), la cromatografía en capa delgada (CCD) en alúmina, la cromatografía en columna (CC) y la cromatografía en contracorriente (CCC). El fraccionamiento de este tipo de compuestos por CC, se puede realizar mediante el uso de resinas de exclusión por tamaño (Frøytlog C. 1998; Dilip Ghosh 2007).

#### **4.3.- Nanopartículas de oro (AuNPs)**

Debido a su biocompatibilidad y no citotoxicidad, las AuNPs tienen ventajas sobre otras nanopartículas metálicas (H.N. Verma 2014), ya que ofrecen algunas propiedades únicas por ejemplo: más compatibles con los tejidos / sistemas vivos, proporcionan una

mayor reactividad de la superficie, un tamaño muy pequeño, una amplia gama de formas y se oponen fácilmente a la oxidación (S.K. Ghosh 2007; M. Shah 2015).

#### **4.3.1.- Síntesis de AuNPs**

Los AuNPs se producen en varios tamaños, desde 2 a 100 nm, pero el rango de tamaño de partículas de 20 a 50 nm muestra la captación celular más eficiente (A. Tomar 2013). Dependiendo del tamaño, las AuNPs exhiben colores que van desde el amarillo claro hasta el rojo rubí en la síntesis. El color se debe a la resonancia del plasmón superficial de las AuNPs. Los AuNPs se sintetizan de diversas formas a través de métodos químicos y físicos (M. Sharma 2016).

El método de Turkevich, es el método químico más utilizado para la síntesis de AuNPs utiliza citrato de trisodio para reducir y estabilizar el  $Au^{3+}$ , en forma de ácido tetracloroáurico (III) ( $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ ), para obtener oro elemental (A. Moores 2006; A. Tabrizi 2009). Por otro lado, los métodos físicos incluyen el método de precipitación por deposición (H. Yazid 2009), la electrosíntesis (N. Cioffi 2011), la pirólisis por rociado ultrasónico (S. Stopic 2013) y el uso de jaulas moleculares a través de la síntesis de plantillas (R. Mccaffrey 2014).

Sin embargo, se informó que estos métodos físicos son costosos y emplean el uso de reactivos tóxicos y estabilizadores que pueden no ser adecuados para aplicaciones biológicas (T. Ahmad 2016).

La biocompatibilidad de las AuNPs sintetizadas ha ganado atención, ya que la nanotecnología ha sido ampliamente aplicada en diferentes campos de investigación en los últimos años. Un método llamado "síntesis verde" utiliza agentes reductores baratos, fáciles de conseguir y ecológicos en la síntesis de AuNPs (S. Wu 2015).

Este método emplea el uso de aminoácidos (S. Mandal 2002; A. Akbarzadeh 2009), aminas aromáticas (C. Subramaniam 2005), glicerol (P. Nalawade 2013), ácidos fenólicos (M.J. Lerma-Garcia 2014) y extractos de plantas (A. Yasmin 2014; U.K. Parida 2011; Y. Li 2012; P. Kumar 2011) para generar AuNPs.

Sin embargo, el método de “síntesis verde” requiere un agente reductor que satisfaga el rango de tamaño y la morfología de los AuNP y los agentes estabilizadores y de cobertura para la pasivación de la superficie de las nanopartículas (S. Wu 2015).

La síntesis de AuNPs mediante el uso de plantas como agentes reductores y al mismo tiempo fuente natural, ha proporcionado un mejor enfoque respetuoso con el medio ambiente. Por ejemplo, el extracto de planta de Aloe vera se ha utilizado para obtener nanotriángulos de oro de rangos de tamaño de 20 a 50 nm (S.P. Chandran 2006).

De forma similar, el extracto de flor de *Nyctanthes arbortristis* se ha utilizado para sintetizar AuNPs esféricas de diámetro aproximadamente 20 nm (R.K. Das 2011).

La síntesis de AuNPs que utilizan extractos acuosos o alcohólicos de plantas es una reacción de reducción de un solo paso (Fig. 4.4). La síntesis verde de AuNPs es un procedimiento eficiente, económico, respetuoso con el medio ambiente, no tóxico y estable. Por lo tanto, los investigadores de todo el mundo están interesados en fabricar AuNPs y en explorar sus aplicaciones potenciales (U.K. Parida 2011; Bashir Ahmada 2017)

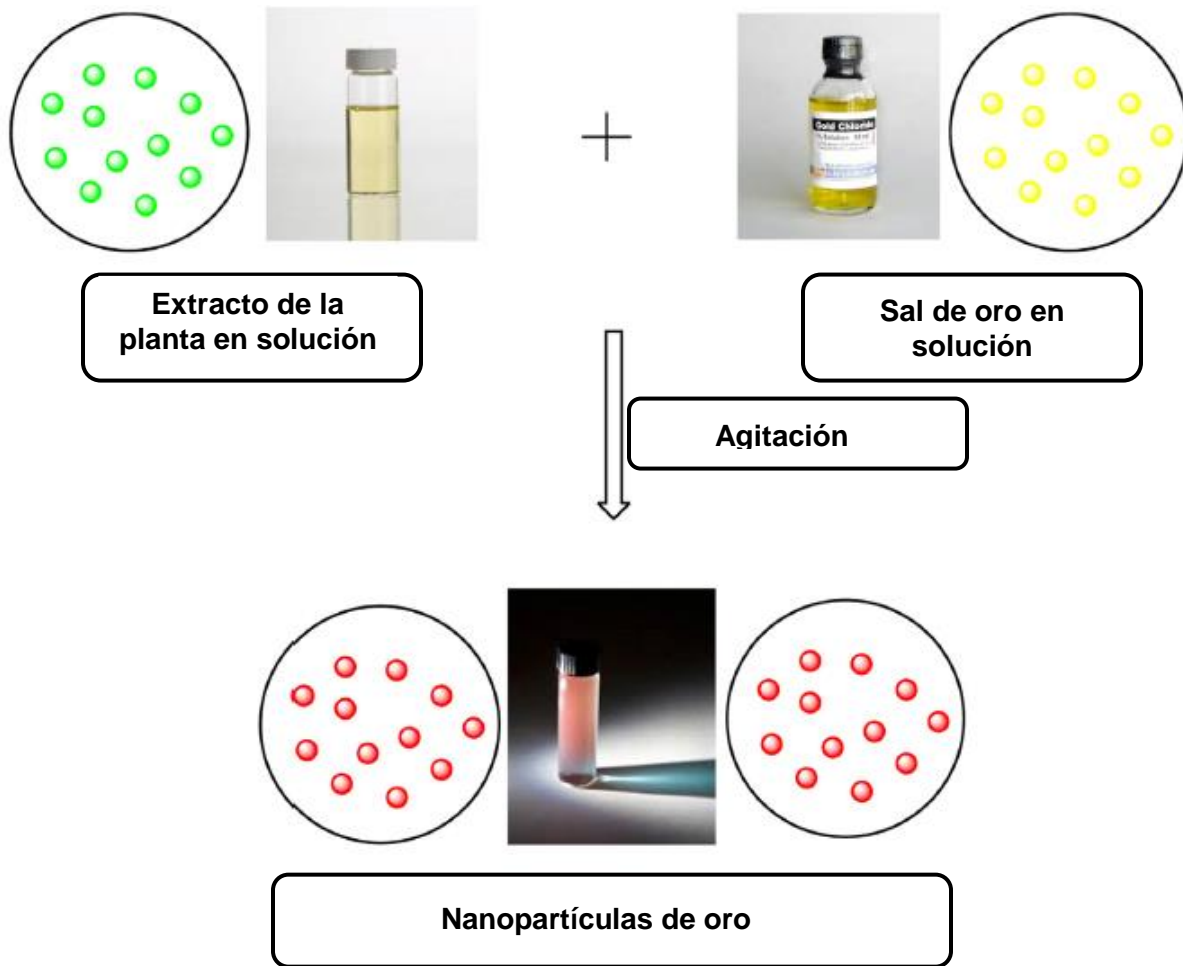


Figura 4.4.- Síntesis verde de nanopartículas de oro, a partir de un extracto de plantas acuoso, utilizado con agente reductor (Bashir Ahmada 2017).

Se han reportado síntesis de varias formas de AuNPs (como, esférica, triangular, cuasi esférica, hexagonal cúbica, decaédrica, isosaédrica y en forma de bastón) utilizando una variedad de fuentes vegetales como *Anacardium occidentale* (D.S. Shenoy 2011), *Camelia sinesis* (A.R. Vilchis-Nestor 2008), *Cymbopogon sp* (A. R. S.S. Shankar 2005), *Geranium* (A. A. S.S. Shankar 2003), *Vitex negundo* (M. Zargar 2011), *Memecylon edule* (T. Elavazhagan 2011) y *Cinnamomum alcanfor* (X. Yang 2010).

Por lo tanto, los avances en las aplicaciones de las AuNPs se pueden lograr ajustando tanto la forma, como el tamaño de las nanopartículas a nanoescala. Estas propiedades

dependientes de la forma y el tamaño son las áreas principales a explotar para los investigadores en la actualidad. Estos rasgos característicos han ayudado a los científicos a desarrollar nuevas formulaciones antimicrobianas, biosensores para el diagnóstico clínico e investigación biológica (G. Doria 2012), protocolos de administración de fármacos, imágenes médicas, tratamiento de tumores, nanocompuestos y filtros, procedimientos catalíticos, transistores informáticos, electrómetros, sensores químicos, memorias electrónicas inalámbricas y esquemas lógicos (M. Tan 2003; D. Pissuwan 2006; S. Panigrahi 2004; Bashir Ahmada 2017).

## **5.- ANÁLISIS DE LOS ANTECEDENTES**

Actualmente, los avances en la tecnología de alimentos, han permitido la extracción eficiente, procesamiento e identificación de compuestos de antocianinas de varias frutas, vegetales y granos para ser incorporados a la industria de alimentos y bebidas, ya sea como colorantes naturales, alimentos funcionales y suplementos alimenticios. Sin embargo, solamente un pequeño porcentaje de frutas, vegetales y granos conteniendo antocianinas está siendo integrado en la industria de alimentos y bebidas.

La zanahoria negra es una excelente fuente de antocianinas según lo que está reportado en la literatura, ya que posee mayor cantidad de ellas que las frutas y otros vegetales. Entre las fuentes de antocianinas, la zanahoria negra es la que provee dicho antioxidante con una mayor estabilidad. Las antocianinas son interesantes por dos razones. La primera por su impacto sobre las características que puede aportar a los alimentos, las cuales pueden influenciar su comportamiento tecnológico durante el procesamiento de alimentos, y la segunda, por su implicación en la salud humana a través de diferentes vías.

Diversos estudios presentan evidencia científica que los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la agudeza visual, mostrar actividad antioxidante, atrapar radicales y

actuar como agentes quimioprotectores. Las antocianinas también juegan un papel en las propiedades antidiabéticas.

Sin embargo, cuando llevamos a cabo un proceso de extracción las antocianinas aisladas son altamente inestables y muy susceptibles a la degradación durante el almacenamiento y el procesamiento. Su estabilidad se ve afectada por varios factores tales como pH, temperatura, estructura química, concentración, luz, oxígeno y presencia de ácido ascórbico, entre otros; de esta forma su inestabilidad es una limitante para su aplicación en productos farmacéuticos, cosméticos o en alimentos.

En la actualidad existen métodos confiables para la extracción de antocianinas, en la mayoría de los casos el más usado es la extracción sólido- líquido, el cual, es una operación básica cuya finalidad es la separación de uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de una fase líquida o disolvente. Este método es el más conveniente ya que se logra extraer la máxima cantidad de antocianinas en comparación con otros métodos.

Una vez que se logra la extracción, viene la purificación de la cual también se ha reportado, que se aprovecha de la afinidad de las antocianinas por algunos materiales adsorbentes, para poder separar la mezcla de antocianinas, de los azúcares y otros compuestos. Sin embargo para aislar las antocianinas particularmente se han usado múltiples técnicas de cromatografía.

Estos pigmentos representan un potencial para el reemplazo competitivo de colorantes sintéticos en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos y para la obtención de productos con valor agregado dirigidos al consumo humano. Sin embargo, mucho hay por aprender en cuanto a su estabilidad en matrices específicas y a la relación entre su estructura, los efectos sinérgicos al modificarlas químicamente y las dosis efectivas. Estos temas son objeto de investigaciones para este proyecto, pero también para investigaciones futuras.

## **6.- HIPÓTESIS**

A partir de la extracción óptima y purificación de las antocianinas presentes en la zanahoria negra seguido de una modificación química, a base de tetraetilortosilicato (TEOS), se podrán obtener antocianinas más resistentes a cambios de pH, temperatura y radiación UV. Además, la capacidad antioxidante de las antocianinas presentes en el extracto de zanahoria negra permitirá que éstas, sean usadas como agentes reductores en la síntesis verde de nanopartículas metálicas.

## **7.- OBJETIVOS**

### **7.1.- Objetivo general**

Obtención, purificación y modificación química del extracto rico en antocianinas presentes en la zanahoria negra para evaluar su capacidad antioxidante, resistencia a cambios de pH, temperatura y radiación UV; además de estudiar su viabilidad como agente reductor en la biosíntesis de nanopartículas de oro.

## **7.2.- Objetivos específicos**

- 1.- Establecer un método eficaz de extracción que maximice la recuperación de las antocianinas de la zanahoria negra, utilizando tecnología de adsorción (Resina Amberlite XAD-7).
- 2.- Realizar la modificación química al extracto de antocianinas con tetraetilortosilicato (TEOS)
- 3.- Caracterizar el extracto de antocianinas antes y después de la modificación química, para comprobar la presencia de las mismas, además de medir su capacidad antioxidante.
4. Obtención de las nanopartículas de oro por medio de una síntesis verde, utilizando el extracto de la zanahoria negra como agente reductor.
- 5.- Caracterización fisicoquímica del composito (nanopartículas de oro- extracto de la zanahoria negra).



## **8.- METODOLOGÍA**

### **8.1.- Diseño del experimento**

1.- Se realizó extracción sólido- líquido de las antocianinas de la zanahoria negra, utilizando tecnología de adsorción (Resina Amberlite XAD-7).

2.- Se modificó químicamente el extracto de antocianinas adicionando directamente el tetraetilortosilicato (TEOS).

3.- Se caracterizaron muestras de los extractos de antocianinas puros y modificados por UV-Vis, para comprobar la presencia de las antocianinas, pH diferencial para medir la estabilidad de las antocianinas frente a factores que la afectan, infrarrojo para ver si la interacción es física o química, HPLC para observar los tipos de antocianinas en el extracto y se evaluaron las muestras en un modelo alimenticio.

4.- Se determinó la capacidad antioxidante por medio de la técnica de CUPRAC y DPPH a los extractos de antocianinas puros y modificados químicamente.

5.- Se realizó una síntesis verde de nanopartículas de oro utilizando distintas formulaciones del extracto acuoso de la zanahoria negra.

6.- Se caracterizaron las nanopartículas de oro, por uv- vis que nos muestra el plasmón superficial de las AuNPs, dispersión de luz, espectroscopía infrarroja, potencial z , microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.

## 8.2 Materiales y métodos para la extracción de antocianinas

La zanahoria negra fresca (*Daucus Carota* var. *L. ssp. Sativus* var. *Atrorubens* Alef.), se cultivó en Tlaxcala, México y se donó por un agricultor local. Luego se lavaron con agua del grifo, se almacenaron en bolsas de plástico perforadas de 3 kg y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta nuevo uso.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Etanol 99.5%, ácido cítrico 99.5%, resina Amberlite XAD7, tetraetil ortosilicato (TEOS) 98%, cloruro de potasio, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), Sigma Aldrich (Toluca, México) suministró 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (99%), neocuproina y acetato de amonio (98,0%). J.T. suministró ácido acético, acetato de sodio, ácido clorhídrico, soluciones tampón (pH: 4, 7 y 10) e hidróxido de potasio. Panadero (Ciudad de México). El metanol fue suministrado por Macron (Hamilton, PA, EE. UU.). Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando agua destilada obtenida de un Sistema de purificación de agua Elix Advantage (Querétaro, México).

### 8.2.1 Extracción de las antocianinas

Se utilizó etanol acidificado como disolvente de extracción para todas las muestras. Las antocianinas se obtuvieron mezclando 150 mL de etanol acidificado (solución de ácido cítrico / ácido acético 85:15 v / v) (Ersus Seda 2007) y 150 g de zanahorias congeladas cortadas (sin descongelar) con un mezclador Grinder 6807 Oster (México) durante 20 minutos. Los sólidos se eliminaron por filtración utilizando un filtro de tamiz de malla 100.

La fase líquida (extracto) se marcó como BCS (acidificada con ácido cítrico) y BCA (acidificada con ácido acético). Los extractos BCS y BCA se introdujeron, por separado, en una columna de resina que contiene resina Amberlite XAD7 para eliminar los compuestos no aromáticos del extracto. (Cuevas Montilla E 2011).

La velocidad de flujo fue de 32 mL / min (20 BV / h) y se utilizó una solución de 95 mL de etanol y 5 mL de agua ácida (pH = 1.4) como eluyente. Finalmente, el exceso de solvente se evaporó a 40 ° C usando vacío (R-100, Büchi, México). Las muestras obtenidas después de este procedimiento fueron etiquetadas como BCSR y BCAR. Todas las muestras se almacenaron en viales de vidrio color ámbar sellados y almacenados a 4 ° C hasta su uso posterior. Las muestras fueron modificadas adicionando 20 µl de TEOS en cada muestra por cada 5mL de extracto de zanahoria negra rico en antocianinas (microencapsulación). El procedimiento está descrito por Hernández-Martínez, y otros 2017; Molina G.A. 2014. Las muestras después de la microencapsulación se etiquetaron como TBCS, TBCA, TBCSR y TBCAR. En la figura 8.1 se muestra el diagrama de flujo del procedimiento:

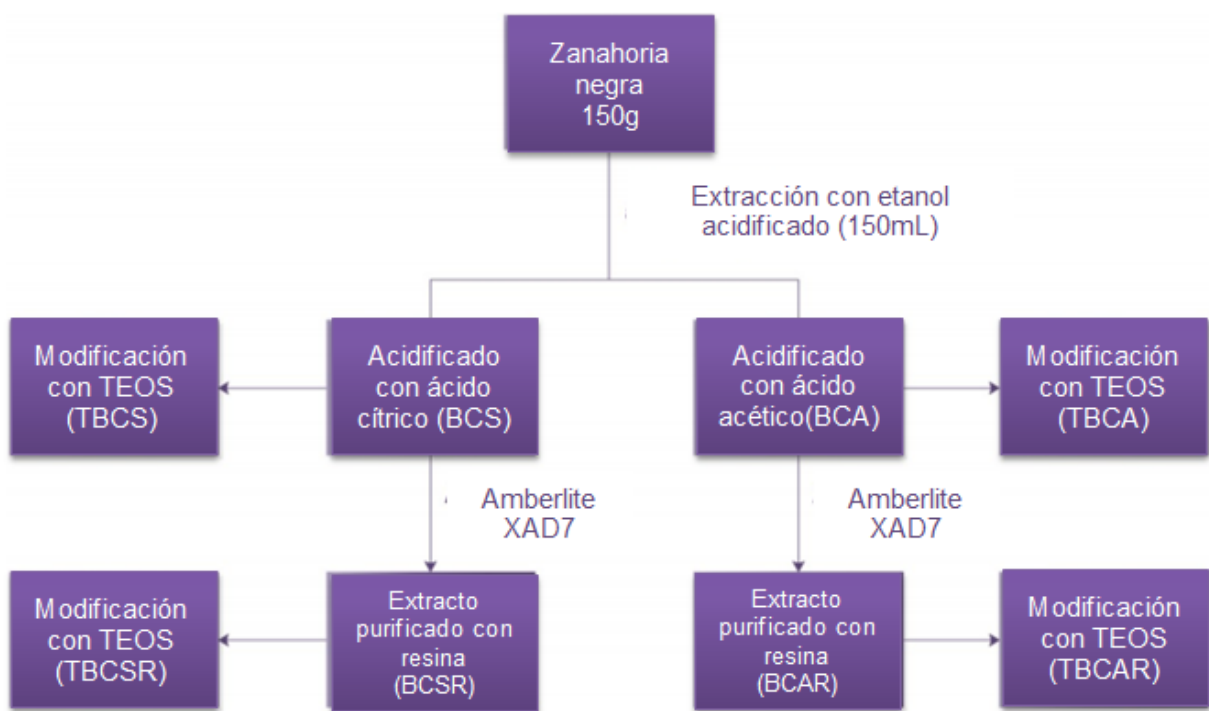


Figura 8.1.- Diagrama de flujo de procesos experimentales para obtención de muestras. Muestras extraídas con etanol / ácido cítrico (BCS) y etanol / ácido acético (BCA), muestras después de la columna de resina (BCSR y BCAR) y muestras microencapsuladas utilizando TEOS (TBCS, TBCA, TBCSR, TBCA)

### **8.2.2 Caracterización y cuantificación de las antocianinas totales por espectroscopía uv- vis, utilizando el método de pH diferencial.**

Actualmente el método de pH diferencial es utilizado para la determinación cuantitativa de antocianinas (Awika J. M. 2004). Las antocianinas experimentan una transformación reversible con los cambios de pH, manifestado por un llamativo cambio en la absorbancia. La forma oxonium predomina a pH=1 y el hemiacetal a pH= 4.5. El método pH diferencial es un método basado en esta reacción y permite una rápida y exacta medida de la concentración de las antocianinas totales (Fulecki 1968).

En el presente trabajo, por medio del método de pH diferencial, se determinaron las concentraciones de antocianinas, cuando son expuestas a diversos factores que afectan su estabilidad. Cada prueba se realizó a cada uno de los métodos de extracción de antocianinas descritos con anterioridad, con y sin TEOS. A continuación se describen las pruebas de estabilidad que se realizaron, analizando el comportamiento de la concentración de antocianinas:

- 1.- Concentración de antocianinas por cada método de extracción, con y sin TEOS.
- 2.- Determinación de la concentración de antocianinas expuestas a medios con pH= 4, 7 y 10, durante 5 días, realizando la medición cada 24 horas.
- 3.- Determinación de la concentración de antocianinas expuestas a 40, 60 Y 80°C durante 120 minutos, realizando la medición cada 20 minutos.
- 4.- Determinación de la concentración de antocianinas con exposición a la luz ultravioleta durante 160 minutos, realizando la medición cada 40 minutos.

La concentración de antocianinas para cada medición se realizó conforme a la siguiente expresión:

$$A = (A_{\lambda \text{ VIS-MAX}} - A_{\lambda 700})_{\text{pH } 1} - (A_{\lambda \text{ VIS-MAX}} - A_{\lambda 700})_{\text{pH } 4.5}$$

Donde  $A_{\lambda \text{ VIS-MAX}}$  es la lectura de absorbancia del pico más alto a pH= 1 y 4.5, y  $A_{\lambda 700}$  es la lectura de la absorbancia a 700nm.

Para calcular la concentración de antocianinas en las muestras a medir, se utilizan la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = (A * \text{Peso molecular} * \text{FD} * 1000) / (\epsilon * 1)$$

(Fulecki 1968)

Donde:

A : es la absorbancia antes calculadas.

FD: es el factor de dilución, en el presente trabajo se utilizó un factor de dilución igual a 15

$\epsilon$ : es el coeficiente de extinción molar (para las cianidinas 3- glicosiladas corresponde a  $26900\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Giusti M. M. 2001)

PM: Peso molecular (se obtuvo el peso molecular promedio ponderado de las antocianinas que contiene la zanahoria negra según lo reportado en la literatura  $756.87\text{g/mol}$ ) (Cuevas Montilla E 2011)

Para llevar a la práctica este método se preparó una solución buffer pH1 de cloruro de potasio 0.025M y una solución buffer de acetato de sodio 0.4M, ambas soluciones ajustaron el pH deseado con la adición de ácido clorhídrico. Finalmente se diluyeron 0.2mL de antocianinas en 2.8mL de cada solución buffer para cada una de las pruebas. Las mediciones se realizaron en un espectrómetro de Uv-Vis de la marca VWR 1600 PC.

### **8.2.3 Pruebas de capacidad antioxidante con DPPH**

La prueba de DPPH se realizó con algunas modificaciones del método de Brand-Williams (Brand-Williams 1995; Sharma y Bhat 2009; Thaipong, y otros 2006; Molyneux 2004). Se preparó una solución base de 40mL de ácido acético (0.1M) en 60mL de metanol (pH= 5) y se adicionó una solución 50 $\mu$ M de DPPH. Después, en un espectrofotómetro de Uv-Vis marca VWR 1600 PC, se realizó una medición de la absorbancia a 516nm que corresponde al pico característico del DPPH, se graficó una curva estándar con la solución base y adicionando distintas concentraciones de trolox (0, 100, 200, 400, 600 y 800 $\mu$ M) y  $r^2= 0.9657$

Una vez que obtuvo la gráfica de estándar de trolox entre 0 y 800 $\mu$ M, se adicionaron 150 $\mu$ L de cada uno de los extractos en 2850 $\mu$ L de la solución del DPPH. Los resultados se compararon con la gráfica del estándar de trolox y se obtuvieron en equivalentes de trolox por gramo de muestra ( $\mu$ M eT/ g muestra).

### **8.2.4 Prueba de capacidad antioxidante reductora del cobre (CUPRAC)**

Se preparó una solución cúprica de capacidad antioxidante reductora (CUPRAC) (Castañeda-Ovando, y otros 2009; Cárdenas, Gómez y Frontana 2014) para determinar la capacidad antioxidante mediante pruebas electroquímicas utilizando  $\text{CuCl}_2$  con una concentración de 3 mM en agua destilada. Además, se preparó una solución de neocuproina a 6 mM en etanol. Para controlar el pH de la solución principal, se preparó una solución tampón de acetato de amonio 1,2 M (pH = 7), luego el pH fue ajustado agregando HCl 1.2 M y NaOH 1.2 M según fuera necesario. Las concentraciones de Trolox fueron variadas de 1 a 800  $\mu$ M en etanol para obtener una curva estándar de Trolox. Se prepararon 2 mL de cada solución ( $\text{CuCl}_2$ , neocuproina, tampón de acetato de amonio, Trolox y agua destilada) y se mezclaron. La solución de 10 mL se agitó durante 15 minutos y se burbujeó  $\text{N}_2$  en ella durante 5 minutos.

Se siguió el mismo procedimiento para evaluar la capacidad antioxidante agregando extractos de antocianinas en lugar de solución de Trolox y los valores se reportan como una comparación entre la gráfica de la respuesta analítica frente a la concentración durante la cuantificación del antioxidante ya que la pendiente depende de la relación estequiométrica entre las especies antioxidantes-oxidantes involucradas, que está relacionada con la transferencia de electrones por par de moléculas.

Las pruebas electroquímicas se realizaron usando una celda electroquímica de tres electrodos; uno de calomel  $\text{Hg} / \text{Hg}_2\text{Cl}_2$  (saturado con  $\text{KCl}$ ) como electrodo de referencia, una barra de grafito como contraelectrodo y un electrodo de carbono vítreo (3 mm) como electrodo de trabajo.

Antes de cada medición electroquímica, el electrodo de trabajo se pulió con alumina en polvo seguido de agitación ultrasónica durante 10 minutos; este proceso se repitió 3 veces. Los voltamperogramas se obtuvieron en un potenciostato Bio-LogicVP-50 (Bio-Logic Science Instruments, Seyssinet-Pariset, Francia) con una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , las pruebas iniciaron desde el potencial de circuito abierto (OCP), que se determinó cuando el potencial no mostró una variación superior a 1 mV por segundo.

### **8.2.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR)**

Se sabe que la zanahoria negra contiene diferentes antocianinas monoméricas con diferentes restos de azúcar, como peonidina, pelargonidina y cianidina, siendo la cianidina 3-O-R el principal compuesto en el contenido total de antocianinas (Türkyılmaz, Yemi,s y Özkan 2012; Montilla, y otros 2011; Algarra Manuel 2014; Kammerer, Carle y Schieber 2003). Para confirmar esto y justificar el uso de cianidina 3-O-glucósido para mediciones analíticas, se caracterizó la muestra por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR) mediante un espectrómetro Frontier MIR / NIR (Perkin Elmer,

Waltham, MA, Estados Unidos), para muestras secas de BCA y BCS y luego se comparó con un cálculo químico cuántico de frecuencia de la misma molécula. Para el cálculo de la frecuencia de la molécula de cianidina 3-O-glucósido se usó una computadora personal que funciona con Gaussian 98W (Gaussian 09, revision A. 02 2009). La geometría se optimizó completamente asumiendo el grupo puntual de simetría Cs utilizando el Becke 3-Lee-Yang-Parr (B3LYP), complementado con los conjuntos de bases estándar 6-31 + G.

Los espectros de IR simulados se representaron gráficamente utilizando el visor molecular Avogadro (Hanwell, y otros 2012) y los modos de vibración se analizaron y compararon con los datos experimentales ya mencionados.

### **8.2.6 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)**

La caracterización se realizó en un sistema Flexar LC (Perkin Elmer) utilizando un C18 de 250 mm × 4,6 mm, la columna de fase inversa y las muestras BCS y BCA se midieron de acuerdo con las condiciones reportadas en la literatura (Alasalvar, y otros 2005; Dai, y otros 2016); utilizando un caudal de 1,0 mL / min y los cromatógrafos se registraron a 520 nm utilizando el detector PDA Plus junto con el equipo.

### **8.2.7 Determinación de color de extractos y modelos alimenticios**

Se utilizó un script MATLAB personalizado (Mathworks Inc., Natick, MA, EE. UU.) para medir la luminosidad y las coordenadas de cromaticidad en el espacio de color  $L^* a^* b^*$  (CIELAB) de acuerdo con el iluminante A estándar CIE (típico, doméstico, filamento de tungsteno Iluminación con temperatura de color correlacionada de 2856 K).  $L^*$  indica luminosidad,  $a^*$  y  $b^*$  son coordenadas de cromaticidad, h (tono), c (chroma) y  $\Delta E$  (cambio de color) se calcularon a partir de los valores  $a^*$  y  $b^*$ . Las imágenes digitales de las muestras se tomaron utilizando una cámara digital Sony  $\alpha 99II$  junto con



una lente Vario Sonnar T \* 24–70 mm (Sony Corporation, Tokio, Japón) en las mismas condiciones de luz; Las imágenes se recortaron a 1024 × 1024 píxeles y luego se procesaron con el script mencionado anteriormente.

Además, las muestras se midieron en dos modelos de alimentos de diferentes colores: yogur y gelatina. Para el modelo de alimento de yogur, se colorearon 10 g de yogur comercial (yogur natural Yoplait, Sigma Alimentos Lácteos México, Querétaro, México) usando 10 mg de antocianinas de cada extracto. Además se preparó la gelatina usando gelatina en polvo (Coloidales Duche, Ciudad de México, México) disuelto en agua hirviendo (proporción 1: 3) y 10 g de la mezcla se colorearon usando la misma cantidad calculada de antocianinas de cada extracto. Las muestras se midieron al comienzo del experimento y después de 25 días, y se compararon con un yogur / gelatina de color con 10 mg de FD&C rojo (grosella roja 12.5%, Colores Duche, Ciudad de México, México) en las mismas condiciones.

### **8.3 Materiales y métodos para la síntesis verde de nanopartículas de oro (AuNPs)**

Se utilizaron los siguientes productos químicos de grado analítico: como precursor de oro se empleó ácido tetracloroáurico (III) ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) comprado de Sigma Aldrich, se utilizaron dos tipos de agentes reductores; para la síntesis de nanopartículas por el método de Turkevich (J. Kimling 2006) se utilizó citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) suministrado por Sigma Aldrich, y para las síntesis verde de AuNPs se utilizó extracto acuoso de zanahoria negra en un buffer de fosfato salino 0.1M (pH=8).

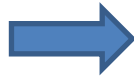
#### **8.3.1 Metodología para la extracción acuosa de la zanahoria negra**

El extracto del reductor utilizado para la síntesis verde en medio acuoso, se obtuvo realizando una disolución de buffer de fosfato salino 0.1M (pH=8) en agua tridestilada; la cual se calentó a 120°C y se esperó hasta alcanzar el punto de ebullición.

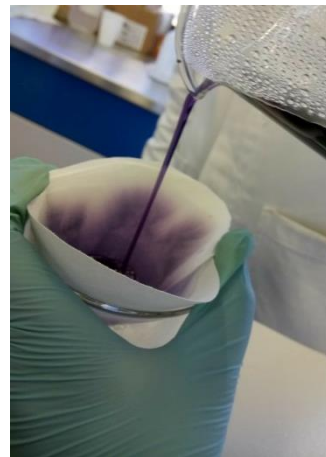
Posteriormente, se añadieron 10 gramos de zanahoria negra y se dejó en agitación de 1600 rpm durante 5 minutos. Consecuentemente, se filtró la solución con papel filtro de 1 micra. En la figura 8.2 podemos observar el procedimiento de extracción acuosa de la zanahoria negra:



Buffer de fosfato salino  
0.1M (pH=8) a 120°C



10 g Zanahoria negra



Agitación (5 min) y  
Filtrado (1 micra)

Figura 8.2.- Procedimiento de extracción acuosa de la zanahoria negra, utilizado para la síntesis verde de AuNPs.

### **8.3.2 Síntesis de Nanopartículas de oro por el método de Turkevich**

El método de Turkevich generalmente, es utilizado para producir nanopartículas de oro esféricas monodispersas, suspendidas en agua, de diámetros alrededor de 10-20nm. La síntesis se realizó utilizando como agente reductor citrato de sodio 38.8 mM y como agente precursor ácido cloroáurico 1 mM. La síntesis se llevó a cabo en una relación 1:5 v/v reductor-precursor respectivamente. Posteriormente, la solución de  $\text{HAuCl}_4$  se llevo a punto de ebullición aproximadamente a 230°C. Al hervir la solución, se adicionó el citrato de sodio y se dejó calentando a 40°C durante 10 minutos. (J. Kimling 2006).

### **8.3.3 Síntesis verde de nanopartículas de oro a partir del extracto acuoso de la zanahoria negra**

La síntesis verde se realizó mediante una adaptación del método de Turkevich (J. Kimling 2006), utilizando el extracto acuoso de zanahoria negra descrito en la sección 8.3.1 como agente reductor y ácido cloroáurico como agente precursor de oro. Se sintetizaron tres formulaciones en concentraciones de 1:10, 1:5, 2:5 (v/v) reductor-precursor respectivamente.

Para cada una de las formulaciones se añadió el extracto acuoso de la zanahoria negra en el ácido cloroáurico, y se dejó en agitación a 1600rpm durante 4 horas a una temperatura de 35°C. En la figura 8.3 podemos observar el esquema de la síntesis verde de las nanopartículas de oro a partir del extracto acuoso de la zanahoria negra.

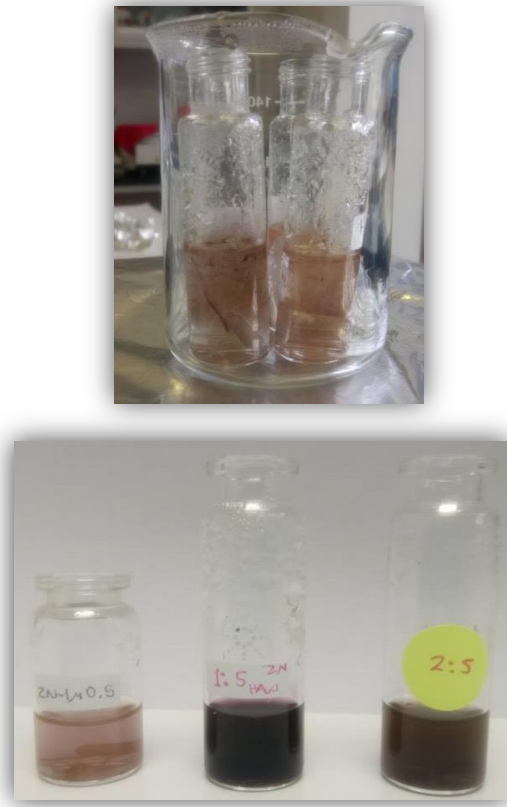
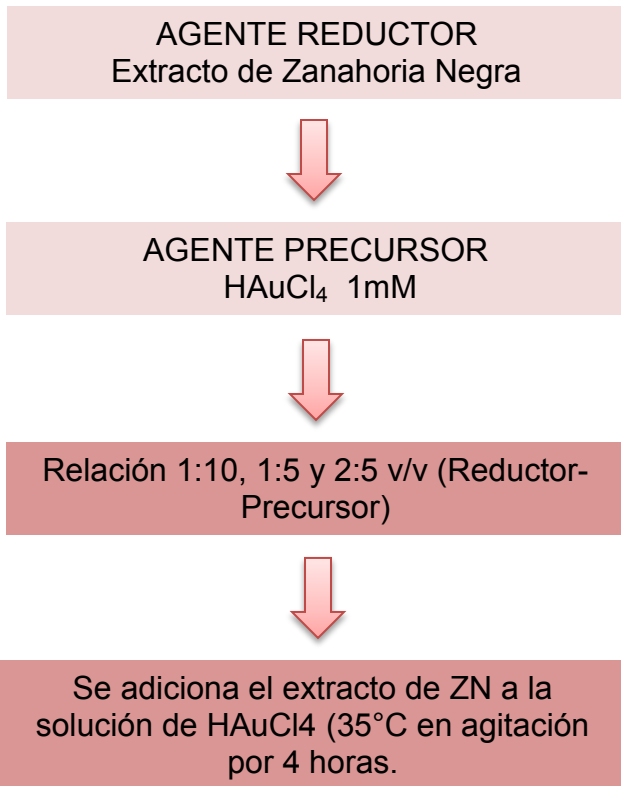


Figura 8.3.- Esquema de la síntesis verde de las nanopartículas de oro a partir del extracto acuoso rico en antocianinas de la zanahoria negra.

### 8.3.4 Espectroscopía Uv- Vis

La formación de nanopartículas de oro por reducción del ácido cloroaúrico usando extracto acuoso de zanahoria negra rico en antocianinas como agente reductor puede ser fácilmente observada por espectroscopía Uv-Vis. Las mediciones se realizaron en un espectrómetro de Uv-Vis de la marca VWR 1600 PC, operado a una resolución de 1 nm en un rango de 210 a 1100nm para demostrar la generación de nanopartículas de oro (Jili Zhaa 2017).

### **8.3.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR)**

Las mediciones de FTIR ayudaron a identificar los enlaces y vibraciones probables que pueden ser responsables de los límites que conducen a una estabilización eficiente de las nanopartículas de oro (Soumya Menon 2017). La medición de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR) se realizó mediante un espectrómetro Frontier MIR / NIR (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos).

### **8.3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Para las muestras observadas por microscopía electrónica de barrido, se utilizaron electrones secundarios y de alta resolución (3kV), se colocaron 10 microlitros diluidos en 2 mL de agua tridestilada para una mejor dispersión de partículas. El análisis se realizó en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6060 LV.

### **8.3.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Para la obtención de las imágenes por TEM se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL, modelo JEM-1010, con un voltaje de aceleración de 80 kV. Las muestras de TEM se obtuvieron dejando caer una pequeña cantidad de coloides de oro sobre rejillas.

### **8.3.8 Dispersión de luz**

La distribución de tamaño de las nanopartículas de oro preparadas con los extractos de zanahoria negra, se midieron mediante dispersión de luz (DLS) utilizando un Litesizer 500.

### **8.3.8 Potencial Z**

Se utilizó un equipo de medición de potencial zeta y determinación de la distribución del tamaño de partículas, Litesizer 500. Se observó el potencial zeta de cada una de las formulaciones sintetizadas.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Resultados de Espectroscopía Uv-Vis

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la caracterización por Uv-Vis de cada uno de los extractos obtenidos con y sin adición de TEOS descritos en la sección de metodología.

En la figura 9.1 se muestra la comparación entre los espectros UV-vis correspondientes a los compuestos extraídos usando etanol acidificado BCS (etanol- ácido cítrico 85:15 v/v) y también con etanol acidificado pero usando además resina amberlite XAD7 (BCSR).

En ambos espectros se observó la presencia de un pico característico a 522nm, que corresponde a las cianidinas 3- glicosiladas, que son el tipo de antocianinas de la zanahoria negra (Sonia de Pascual-Teresa 2002) y a 285nm se presenta un pico que corresponde a los grupos acilos unidos a las antocianinas (Giusti M. M. 2001).

La diferencia en absorbancia va directamente relacionada con la concentración de antocianinas en cada muestra.

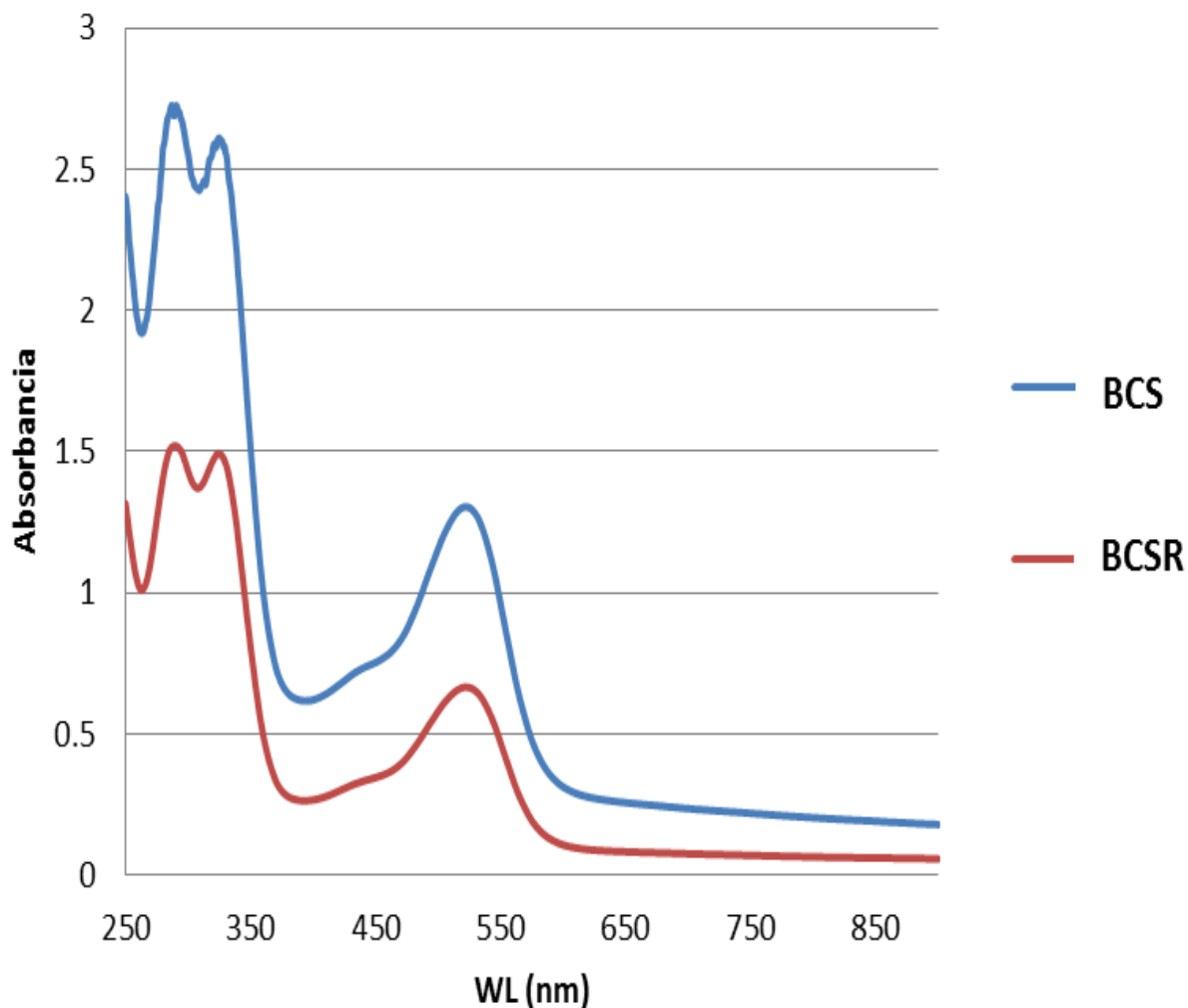


Figura 9.1: Espectros Uv-Vis de las antocianinas extraídas por los métodos BCS y BCSR

De la misma forma en la figura 9.2, se compararon los espectros correspondientes a las antocianinas extraídas usando etanol acidificado con ácido acético (BCA) y las extraídas con etanol acidificado con ácido acético + resina amberlite XAD7 (BCAR). En ellos se observó la presencia de los picos característicos de las antocianinas aciladas características de la zanahoria negra a 522nm y 285nm.



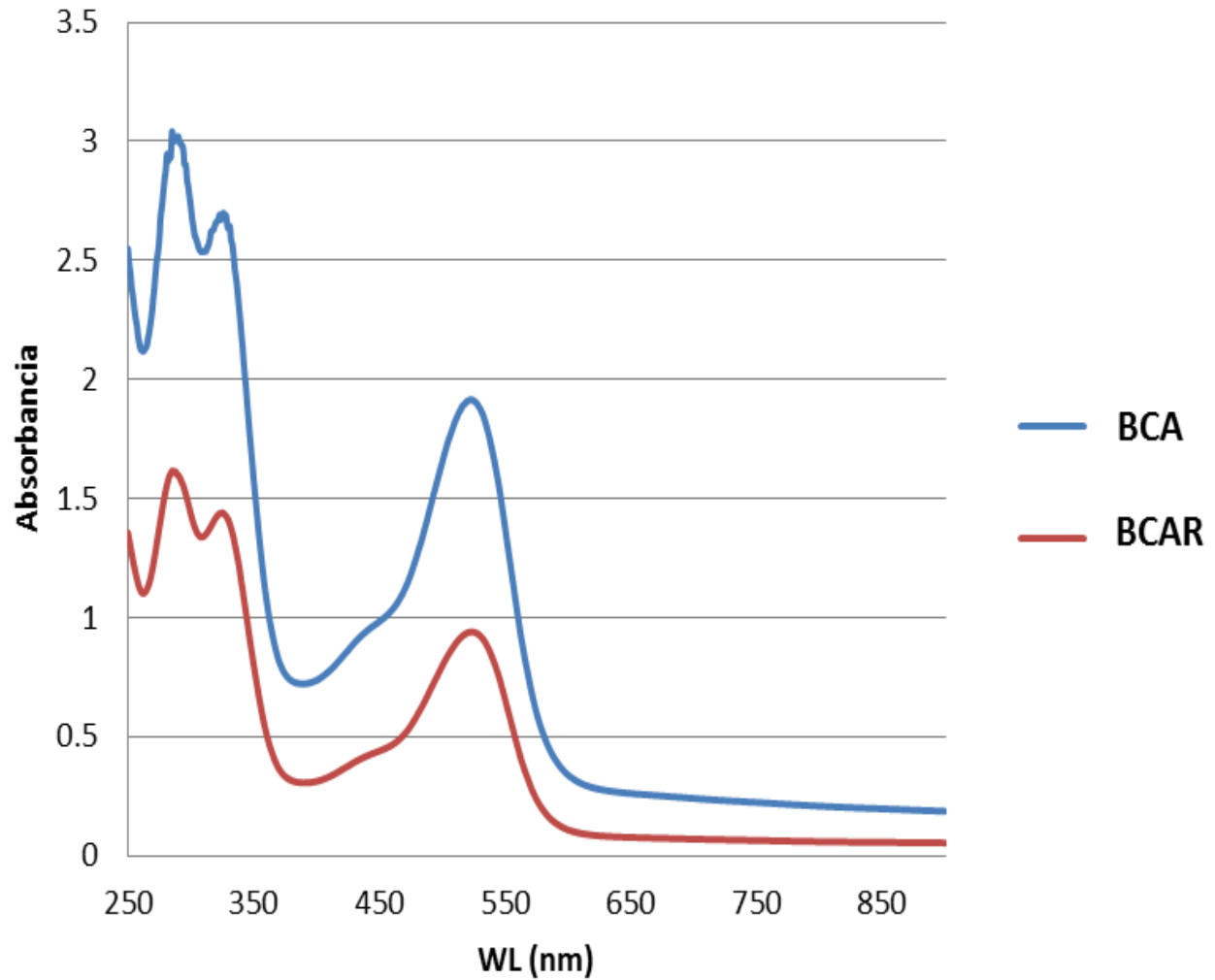


Figura 9.2: Espectros Uv-Vis de las antocianinas extraídas por los métodos BCA y BCAR

La figura 9.3 corresponde a los espectros Uv-Vis de las antocianinas extraídas con etanol acidificado con ácido cítrico 85/15 v/v, modificadas con TEOS, con y sin purificación con resina amberlite XAD7 (TBCS y TBCSR) y de la misma forma se nota la presencia de las antocianinas características de la zanahoria negra a 522nm y 285nm.

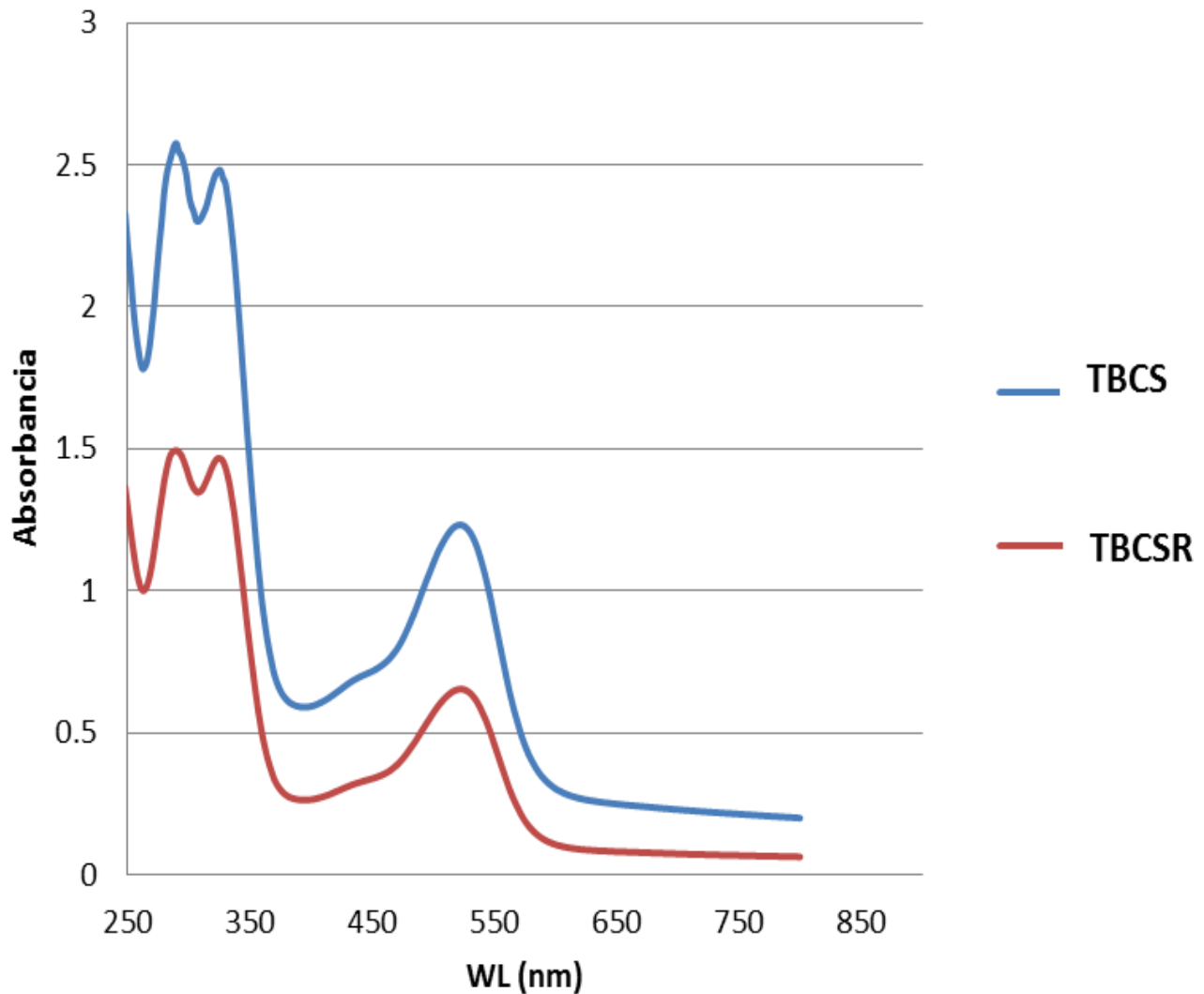


Figura 9.3: Espectros Uv-Vis de las antocianinas extraídas por los métodos TBCS Y TBCSR

En la figura 9.4 se analizaron los espectros característicos de las antocianinas de la zanahoria negra que corresponden a las antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v, modificadas con TEOS, con y sin purificación a través de la resina XAD7 (TBCA Y TBCAR). De la misma forma se observan los picos a 522nm y 285nm, correspondientes a las antocianinas de la zanahoria negra.

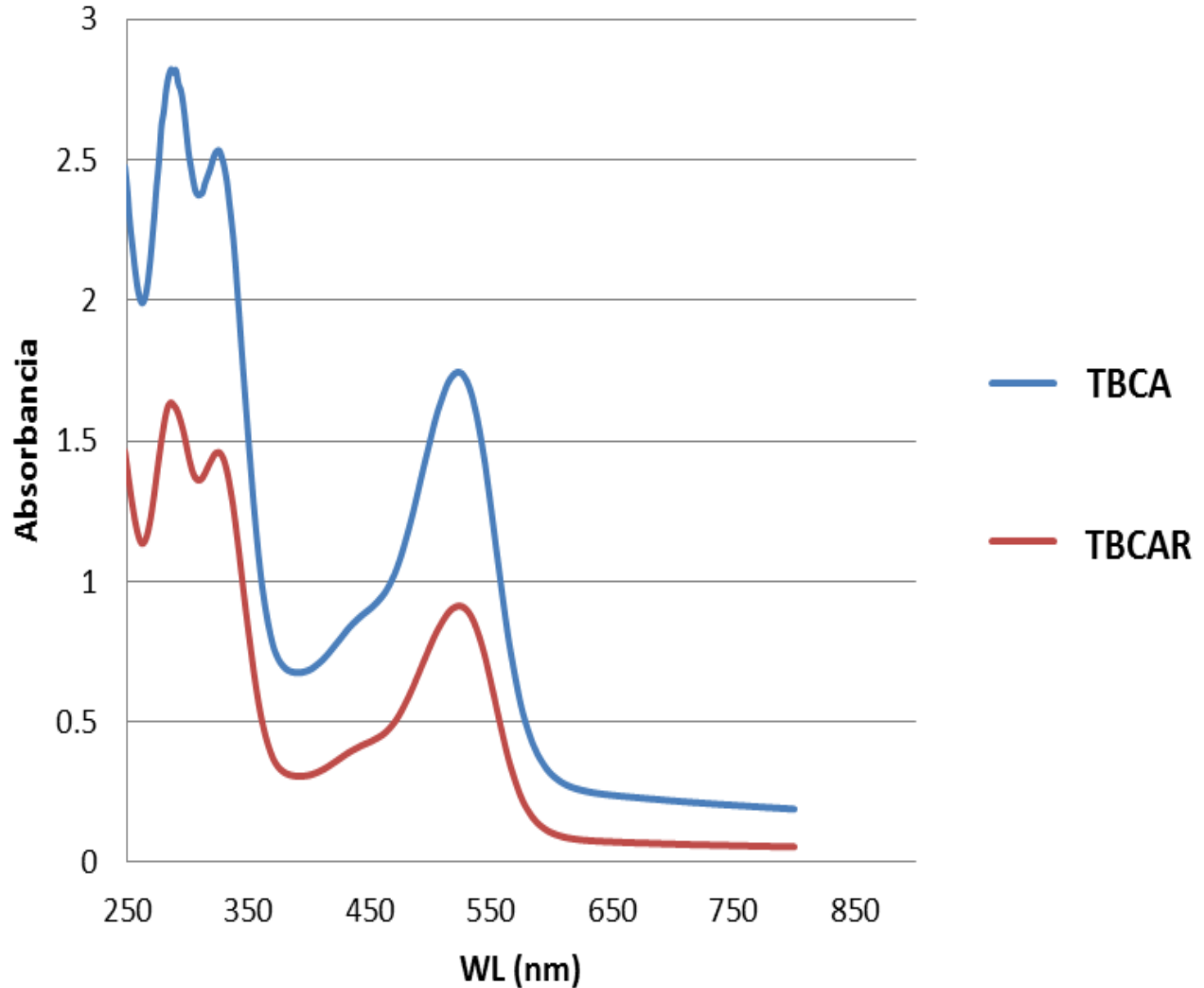


Figura 9.4: Espectros Uv-Vis de las antocianinas extraídas por los métodos TBCA Y TBCAR

Por medio de la espectroscopia Uv-Vis, se observó que a través de los cuatro métodos de extracción y sus respectivas modificaciones químicas con TEOS, se obtienen los picos característicos correspondientes a las antocianinas de la zanahoria negra. Sin embargo las antocianinas que han sido purificadas con resina amberlite XAD7 muestran una menor absorbancia en comparación con las que no pasaron por dicho proceso, lo cual va directamente relacionado con la concentración de las antocianinas en cada una de las muestras.

## **9.2 Método de pH diferencial**

### **9.2.1 Determinación de la concentración de antocianinas de cada uno de los extractos obtenidos, con y sin TEOS.**

Se determinó la concentración total de antocianinas para cada uno de los métodos de extracción con y sin TEOS, utilizando el método pH diferencial. En la tabla 9.1 se observó que el método que tiene el mejor rendimiento en extracción de antocianinas es cuando se extraen con etanol- ácido acético 85:15 v/v respectivamente, ya que se obtuvo una concentración de 706.85 mg/L, a diferencia de las antocianinas extraídas usando etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con resina amberlite XAD7 con y sin TEOS, cuyas concentraciones oscilan entre 249.12 y 244.90 mg/L respectivamente.

Así mismo se puede observar que las concentraciones obtenidas en las otras muestras también presentan buenos rendimientos, sin embargo hay otros factores que afectan la estabilidad de las antocianinas como: cambios de pH, temperatura y luz ultravioleta.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS (mg/L)
Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v <b>(BCS)</b>	<b>451.08</b>
Antocianinas extraídas etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con resina XAD7 <b>(BCSR)</b>	<b>249.12</b>
Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v <b>(BCA)</b>	<b>706.85</b>
Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con resina XAD7 <b>(BCAR)</b>	<b>367.49</b>
Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v + TEOS <b>(TBCS)</b>	<b>422.74</b>
Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con resina XAD7 + TEOS <b>(TBCSR)</b>	<b>244.90</b>
Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v + TEOS <b>(TBCA)</b>	<b>643.48</b>
Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v purificadas con resina XAD7 + TEOS <b>(TBCAR)</b>	<b>357.48</b>

Tabla 1: Concentración de las antocianinas expresadas en miligramos por litro, según el método de extracción.

### **9.2.2 Determinación del contenido de antocianinas (mg/L) obtenidas por cuatro distintas formas de extracción, con y sin TEOS, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días, por el método de pH diferencial.**

Se realizó la medición de la concentración de antocianinas (mg/L) por el método de pH diferencial de cada uno de los métodos de extracción utilizados en el presente trabajo, con y sin modificación química realizada con TEOS, expuestas a distintos pH.

Para esta prueba, se diluyeron 500 $\mu$ L de cada uno de los extractos de antocianinas en 3mL de cada una de las soluciones buffer que se utilizaron, los pH probados fueron: 4, 7 y 10. Las mediciones fueron realizadas cada 24 horas durante 5 días para cada una de las muestras. A continuación se muestran los resultados numéricos y gráficos para cada una de las 8 muestras evaluadas por el método de pH diferencial descrito previamente.

#### **9.2.2.1. Antocianinas etanol- ácido cítrico 85:15 v/v**

En la tabla 2 podemos observar las diferencias en la disminución de la concentración de las antocianinas extraídas etanol- ácido cítrico y encontramos que cuando se encuentran en un medio con un pH= 4 durante cinco días, tienen una disminución del 4.98% con respecto a la concentración total de antocianinas, en pH=7 hay un decremento del 13.75% y en pH=10 observamos que desciende un 83.38%, con esto se percibe la estabilidad de las antocianinas a pH bajos, ya que este mismo fenómeno se repite en las 8 muestras analizadas.

DÍA	pH= 4 (mg/L)	pH= 7 (mg/L)	pH= 10 (mg/L)
1	64.39	61.75	55.08
2	63.26	61.16	24.98
3	63.03	59.99	16.15
4	62.06	57.38	9.36
5	61.18	53.26	9.15

Tabla 2: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.

#### 9.2.2.2. Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7).

En esta muestra podemos observar una mayor estabilidad de las antocianinas en la disminución de la concentración de las antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico y purificadas con resina XAD7, en comparación con la muestra que no es purificada con resina, ya que la muestra expuesta a pH= 4 y 7 hacen notar un decremento del 5.61% de la concentración inicial y la muestra diluida en el buffer pH= 10 tiene una disminución del 15.81%, como se muestra en la tabla 3.

DÍA	pH= 4 (mg/L)	pH= 7 (mg/L)	pH= 10 (mg/L)
1	39.22	39.22	39.21
2	38.36	38.34	38.24
3	38.14	37.99	37.40
4	38.13	37.51	34.40
5	37.03	37.02	33.02

Tabla 3: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días

### 9.2.2.3. Antocianinas extraídas usando etanol- ácido acético 85:15 v/v.

En la tabla 4 podemos observar que la extracción de etanol- ácido acético 85:15 v/v es el método con el que se obtiene la mayor concentración de antocianinas, de todos los usados y analizando su comportamiento a diferentes pH, encontramos una notoria disminución en la concentración de antocianinas expuestas a pH=10 con un 26.98%, a diferencia de las que fueron diluidas a pH=4 con decremento de la concentración en un 3.24% y con pH=7 se observó una reducción del 4.39%.

Sin embargo, comparando la concentración de antocianinas extraídas usando etanol- ácido acético con las que fueron extraídas por etanol-ácido cítrico, podemos distinguir que las primeras tienen una mayor estabilidad y su degradación es menor a valores altos de pH.

DÍA	pH= 4 (mg/L)	pH= 7 (mg/L)	pH= 10 (mg/L)
1	96.73	94.74	94.35
2	96.14	94.05	84.82
3	96.12	92.54	78.30
4	93.99	91.46	72.87
5	93.61	90.58	68.89

Tabla 4: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencia extraídas usando etanol- ácido acético 85:15 v/v, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.



#### 9.2.2.4. Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7).

En la tabla 5 podemos observar la disminución de la concentración de las antocianinas extraídas con etanol- ácido acético purificadas con resina expuestas a pH= 4, 7 y 10 es de: 3.15%, 3.01% y 5.40% respectivamente.

Cabe mencionar que la muestra expuesta por 5 días a pH=10 que tuvo un decremento del 5.40%, corresponde a que solo se degradaron 2.47mg de antocianinas por litro.

DÍA	pH= 4 (mg/L)	pH= 7 (mg/L)	pH= 10 (mg/L)
1	46.94	46.80	45.72
2	46.82	46.77	45.08
3	46.81	46.64	44.48
4	45.81	45.73	43.94
5	45.46	45.40	43.26

Tabla 5: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.

### 9.2.2.5. Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y modificadas con TEOS.

A partir de aquí, iniciamos con el análisis de las antocianinas modificadas con TEOS, en la tabla 6 podemos observar que la diferencia en la disminución de antocianinas es bastante considerable para los  $\text{pH} \geq 7$ , ya que para  $\text{pH}=10$  se distingue un decremento del 86.06% con respecto a la concentración inicial, a  $\text{pH}= 7$  se percibe una disminución del 18.02%.

Sin embargo a  $\text{pH}= 4$  podemos observar una reducción de tan solo el 1.71%, solo en el caso de este  $\text{pH}$ , podemos observar una mejoría con respecto a la misma muestra que no está modificada con TEOS.

DÍA	$\text{pH}= 4$ (mg/L)	$\text{pH}= 7$ (mg/L)	$\text{pH}= 10$ (mg/L)
1	69.55	64.77	54.79
2	69.38	59.41	24.92
3	69.21	59.07	14.38
4	68.62	56.39	9.63
5	68.36	53.09	7.64

Tabla 6: Contenido de antocianinas usando el método de  $\text{pH}$  diferencial extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y modificadas con TEOS, expuestas a  $\text{pH}= 4, 7$  y  $10$ , durante 5 días

### 9.2.2.6. Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v, purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7) y modificadas con TEOS.

En la tabla 7 se puede observar que la adición del TEOS no aportó un beneficio a las antocianinas ya que la estabilidad disminuye con respecto a la mismas muestras pero sin modificar con TEOS. Con respecto a las pruebas de estabilidad a los cambios de pH, se observa que para pH=4 hay un decremento del 13.87%, a diferencia de la muestra expuesta a pH= 7 donde se observa una disminución del 6.30%, así como la muestra correspondiente a pH=10 con un 7.74% de reducción en la concentración de antocianinas.

DÍA	pH= 4 (mg/L)	pH= 7 (mg/L)	pH= 10 (mg/L)
1	41.58	35.54	34.42
2	39.13	35.49	33.96
3	38.90	35.39	33.64
4	36.75	34.91	30.74
5	35.80	33.29	31.74

Tabla 7: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v, purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7) y modificadas con TEOS, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.

### 9.2.2.7. Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y modificadas con TEOS.

En el caso de las antocianinas extraídas con etanol- ácido acético y modificadas con TEOS, también podemos observar que dicha modificación química, no representó ningún beneficio, ya que como se muestra en la tabla 8, las muestras a pH=4 tienen un decremento en la concentración del 2.64%, cuando se encuentra a pH=7 podemos notar que disminuye 7.80% en el transcurso de los cinco días, y por último las muestras expuesta a pH=10 tienen una baja de 33.50% de la concentración de antocianinas iniciales.

DÍA	pH= 4 (mg/L)	pH= 7 (mg/L)	pH= 10 (mg/L)
1	96.44	94.51	94.23
2	95.39	93.66	79.02
3	94.74	93.45	75.67
4	94.25	89.95	67.21
5	93.90	87.13	62.68

Tabla 8: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido acético 85:15v/v y modificadas con TEOS, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.

### 9.2.2.8. Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v, purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7) y modificadas con TEOS.

Finalmente en esta muestra podemos corroborar que el TEOS no aporta ningún beneficio a la estabilidad de las antocianinas frente a la variación del pH y su efecto a través del tiempo.

En esta muestra podemos analizar que aunque son bajos los porcentajes de disminución de la concentración, cuando evaluamos la misma muestra pero sin modificación química los porcentajes son menores. Para este caso la muestra expuesta a pH=4 tiene un decremento del 3.12%, a pH=7 es de 8.41% y a pH=10 la disminución es de 15.03%, como se muestra en la tabla 9.

DÍA	pH= 4 (mg/L)	pH= 7 (mg/L)	pH= 10 (mg/L)
1	48.38	47.91	47.51
2	47.97	47.88	47.06
3	47.06	45.51	45.17
4	46.98	44.58	41.79
5	46.88	43.89	40.37

Tabla 9: Contenido de antocianinas usando el método de pH diferencial extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v, purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7) y modificadas con TEOS, expuestas a pH= 4, 7 y 10, durante 5 días.

A partir de los resultados obtenidos por el método pH diferencial y analizando los distintos métodos de extracción que fueron expuestos a diferentes pH y siendo evaluados a través de tiempo, podemos decir que la muestra que presentó los menores porcentajes de disminución de la concentración y por lo tanto una mejor estabilidad ante los cambios de pH, fue la extracción de las **antocianinas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con resina XAD7**, que aunque no es el método donde se obtiene una mayor cantidad de antocianinas, fue el que presentó una mejor estabilidad frente a cambio de pH.

Todos los métodos de extracción donde las antocianinas fueron purificadas con resina XAD7 mostraron una mejor estabilidad frente a las que no son purificadas. Sin embargo, analizando las ocho muestras podemos observar que las antocianinas son muy estables y presentan poca pérdida de concentración a pHs de 4 y 7.

### **9.2.3 Determinación del contenido de antocianinas (mg/L) obtenidas por cuatro distintas formas de extracción, con y sin TEOS, expuestas a 40, 60 y 80°C y medidas durante 20, 40, 60, 80, 100 y 120 minutos, por el método pH diferencial.**

Para esta prueba, cada uno de los extractos de antocianinas fueron expuestos a 40, 60 y 80°C, las mediciones fueron realizadas cada 20, 40, 60, 80, 100 y 120 minutos. A continuación se muestran los resultados numéricos y gráficos para cada una de las 8 muestras evaluadas por el método de pH diferencial descrito previamente.

### 9.2.3.1. Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v, con y sin TEOS.

En las tablas 10, 11 y 12, podemos observar el comportamiento de la concentración de las antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico con y sin TEOS a través del tiempo, a una temperatura de 40, 60 y 80°C y se realizó el siguiente análisis:

En la tabla 10 que corresponde a la prueba a 40°C podemos observar una disminución de 9.28% y 18.72% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

Tiempo (min)	Antocianinas totales (mg/L)	
	Sin TEOS	Con TEOS
0	451.07	422.74
20	447.31	420.65
40	436.09	393.77
60	432.06	371.30
80	421.38	365.19
100	416.45	350.42
120	409.20	343.57

Tabla 10: Prueba a 40°C

En la tabla 11 que corresponde a la prueba a 60°C podemos observar una disminución de 20.08% y 14.93% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Antocianinas totales (mg/L)</b>	
	<b>Sin TEOS</b>	<b>Con TEOS</b>
<b>0</b>	451.07	422.74
<b>20</b>	437.05	412.37
<b>40</b>	409.04	405.25
<b>60</b>	407.99	394.01
<b>80</b>	405.08	385.20
<b>100</b>	402.96	373.91
<b>120</b>	360.49	359.61

Tabla 11: Prueba a 60°C

En la tabla 12 que corresponde a la prueba a 80°C podemos observar una disminución de 51.69% y 35.91% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Antocianinas totales (mg/L)</b>	
	<b>Sin TEOS</b>	<b>Con TEOS</b>
<b>0</b>	451.07	422.74
<b>20</b>	444.61	352.08
<b>40</b>	417.70	347.09
<b>60</b>	387.11	316.51
<b>80</b>	375.68	300.49
<b>100</b>	364.70	287.43
<b>120</b>	217.87	270.93

Tabla 12: Prueba a 80°C



### 9.2.3.2. Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), con y sin TEOS.

En las tablas 13, 14 y 15, podemos observar el comportamiento de la concentración de las antocianinas extraídas con solventes y purificadas con resina XAD7, con y sin TEOS, a través del tiempo, a una temperatura de 40, 60 y 80°C y se realizó el siguiente análisis:

En la tabla 13 que corresponde a la prueba a 40°C podemos observar una disminución de 4.64% y 8.28% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

Tiempo (min)	Antocianinas totales (mg/L)	
	Sin TEOS	Con TEOS
0	249.11	244.90
20	246.20	242.51
40	241.67	241.13
60	239.09	239.10
80	238.64	230.37
100	238.48	227.87
120	237.54	224.61

Tabla 13: Pruebas a 40°C

En la tabla 14 que corresponde a la prueba a 60°C podemos observar una disminución de 22.25% y 17.05% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

Tiempo (min)	Antocianinas totales (mg/L)	
	Sin TEOS	Con TEOS
0	249.11	244.90
20	228.39	244.23
40	220.07	233.48
60	217.71	223.95
80	206.27	215.96
100	198.05	205.32
120	193.68	203.13

Tabla 14: Pruebas a 60°C

En la tabla 15 que corresponde a la prueba a 80°C podemos observar una disminución de 30.99% y 30.32% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

Tiempo (min)	Antocianinas totales (mg/L)	
	Sin TEOS	Con TEOS
0	249.11	244.90
20	228.10	239.87
40	223.08	233.58
60	219.29	209.28
80	203.29	201.12
100	187.65	190.61
120	171.90	170.64

Tabla 15: Pruebas a 80°C

### 9.2.3.3. Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v, con y sin TEOS.

En las tablas 16, 17 y 18 podemos observar el comportamiento de la concentración de las antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v con y sin TEOS, a través del tiempo, a una temperatura de 40, 60 y 80°C y se realizó el siguiente análisis:

En la tabla 16 que corresponde a la prueba a 40°C podemos observar una disminución de 9.31% y 17.54% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

Tiempo (min)	Antocianinas totales (mg/L)	
	Sin TEOS	Con TEOS
0	706.84	643.48
20	687.77	610.59
40	663.50	593.76
60	658.38	581.97
80	651.06	570.31
100	648.56	554.12
120	640.99	530.60

Tabla 16: Pruebas a 40°C

En la tabla 17 que corresponde a la prueba a 60°C podemos observar una disminución de 23.96% y 14.22% mg/L en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Antocianinas totales (mg/L)</b>	
	<b>Sin TEOS</b>	<b>Con TEOS</b>
<b>0</b>	706.84	643.48
<b>20</b>	653.57	622.08
<b>40</b>	623.64	598.36
<b>60</b>	606.99	593.59
<b>80</b>	598.42	574.98
<b>100</b>	562.19	572.26
<b>120</b>	537.48	551.97

Tabla 17: Pruebas a 60°C

En la tabla 18 que corresponde a la prueba a 80°C podemos observar una disminución de 45.07% y 42.84% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Antocianinas totales (mg/L)</b>	
	<b>Sin TEOS</b>	<b>Con TEOS</b>
<b>0</b>	706.84	643.48
<b>20</b>	585.02	487.97
<b>40</b>	517.71	484.80
<b>60</b>	501.60	472.16
<b>80</b>	471.95	422.78
<b>100</b>	417.30	354.04
<b>120</b>	388.23	275.67

Tabla 18: Pruebas a 80°C

#### 9.2.3.4. Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), con y sin TEOS.

En las tablas 19, 20 y 21, podemos observar el comportamiento de la concentración de las antocianinas extraídas con etanol- ácido acético, purificadas con resina XAD7, con y sin TEOS, a través del tiempo, a una temperatura de 40, 60 y 80°C.

En la tabla 19 que corresponde a la prueba a 40°C podemos observar una disminución de 22.33% y 25.47% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

Tiempo (min)	Antocianinas totales (mg/L)	
	Sin TEOS	Con TEOS
0	367.48	357.47
20	323.14	332.14
40	315.50	320.50
60	310.43	303.43
80	306.01	298.01
100	288.27	280.27
120	285.41	266.41

Tabla 19: Pruebas a 40°C

En la tabla 20 que corresponde a la prueba a 60°C podemos observar una disminución de 24.31% y 24.71% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Antocianinas totales (mg/L)</b>	
	<b>Sin TEOS</b>	<b>Con TEOS</b>
<b>0</b>	367.48	357.47
<b>20</b>	325.11	345.11
<b>40</b>	313.76	332.76
<b>60</b>	309.54	317.54
<b>80</b>	290.28	306.28
<b>100</b>	284.10	280.10
<b>120</b>	278.12	269.12

Tabla 20: Pruebas a 60°C

En la tabla 21 que corresponde a la prueba a 80°C podemos observar una disminución de 44.33% y 42.21% en las pruebas realizadas sin y con TEOS respectivamente.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Antocianinas totales (mg/L)</b>	
	<b>Sin TEOS</b>	<b>Con TEOS</b>
<b>0</b>	367.48	357.47
<b>20</b>	307.12	296.12
<b>40</b>	253.10	230.10
<b>60</b>	231.17	221.17
<b>80</b>	218.70	212.70
<b>100</b>	204.56	206.56

Tabla 21: Pruebas a 80°C

En esta prueba se pudo observar que la muestra más resistente a los cambios de temperatura son las antocianinas extraídas con solventes y purificadas con resina XAD7, ya que si examinamos cada una de las temperaturas a las que fueron sometidas, nos damos cuenta que ninguna de ellas excede una pérdida de 100mg/L, a diferencia de las otras muestras.

Sin embargo, cabe mencionar que la segunda muestra que mejor resiste los cambios de temperatura es el extracto de antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con resina XAD7, dicha muestra fue la que obtuvo mejores resultados en la evaluación de las distintas muestras con respecto a los distintos pH.

#### **9.2.4 Determinación del contenido de antocianinas (mg/L) obtenidas por cuatro distintas formas de extracción, con y sin TEOS, con exposición a la luz ultravioleta y medidas a 0, 40, 80, 120 y 160 minutos, por el método pH diferencial.**

Para esta prueba se expusieron 4mL de cada una de las ocho muestras que se han examinado durante 160 minutos frente una lámpara de luz ultravioleta y cada medición se realizó en intervalos de 40 minutos, ya que este era el tiempo de respuesta mínimo para ver un cambio en la concentración de las antocianinas.

#### 9.2.4.1. Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v, con y sin TEOS.

En esta muestra se pudo observar el porcentaje de disminución en la concentración de antocianinas, cuando la muestra se presentó sin TEOS, la concentración disminuyó un 19.81%, sin embargo, en la muestra modificada con TEOS la reducción fue del 21.63%, como se observa en la tabla 22.

TIEMPO (Min)	SIN TEOS (mg/L)	CON TEOS (mg/L)
0	451.07	422.74
40	403.29	402.68
80	382.80	375.81
120	377.83	351.50
160	361.71	331.29

Tabla 22: Concentración de antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico, con y sin TEOS, con exposición a la luz ultravioleta y medidas durante 160 minutos en intervalos de 40 minutos.

#### 9.2.4.2. Antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), con y sin TEOS.

Analizando los resultados de la presente muestra se pudo observar el mismo patrón que en caso de la muestra analizada con anterioridad, como se observa en la tabla 23, la muestra sin TEOS presentó una disminución en la concentración del 7.06%, sin embargo, la muestra que presenta modificación química con TEOS disminuye 22.68%.



<b>TIEMPO (Min)</b>	<b>SIN TEOS (mg/L)</b>	<b>CON TEOS (mg/L)</b>
<b>0</b>	249.11	244.90
<b>40</b>	242.47	240.77
<b>80</b>	239.01	233.47
<b>120</b>	238.51	196.75
<b>160</b>	231.52	189.33

Tabla 23: Concentración de antocianinas extraídas con etanol- ácido cítrico, purificados con resina XAD7, con y sin TEOS, exposición a la luz ultravioleta y medidas durante 160 minutos en intervalos de 40 minutos.

#### **9.2.4.3. Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v, con y sin TEOS.**

En esta muestra en particular se pudo analizar que el rendimiento de las antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v es mayor. Ya que disminuyó considerablemente la muestra con TEOS.

Las antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v sin modificación presentaron una disminución en la concentración de 17.99% a diferencia de las modificadas con TEOS, que presentaron una reducción del 6.71%, como se muestra en la tabla 24.

<b>TIEMPO (Min)</b>	<b>SIN TEOS</b>	<b>CON TEOS</b>
<b>0</b>	706.84	643.48
<b>40</b>	682.30	632.12
<b>80</b>	646.69	623.95
<b>120</b>	619.11	612.72
<b>160</b>	579.65	600.35

Tabla 24: Concentración de antocianinas extraídas con etanol- ácido acético, con y sin TEOS, exposición a la luz ultravioleta y medidas durante 160 minutos en intervalos de 40 minutos

#### **9.2.4.4. Antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con tecnología de adsorción (resina XAD7), con y sin TEOS.**

En la presente muestra se consideró que no hay una diferencia muy significativa entre la muestra con y sin TEOS, ya que en la mezcla de antocianinas sin TEOS, se reduce la concentración en un 12.56%, mientras que cuando se adiciona el TEOS, la concentración de antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas por resina es de 12.12%.

<b>TIEMPO (Min)</b>	<b>SIN TEOS</b>	<b>CON TEOS</b>
<b>0</b>	367.48	357.47
<b>40</b>	338.16	327.45
<b>80</b>	322.51	323.23
<b>120</b>	322.37	317.25
<b>160</b>	321.34	315.89

Tabla 25: Concentración de antocianinas extraídas con etanol- ácido acético 85:15 v/v y purificadas con resina XAD7, con y sin TEOS, exposición a la luz ultravioleta y medidas durante 160 minutos en intervalos de 40 minutos

Finalmente se observó que las muestras de antocianinas más estables para esta prueba, son las que fueron purificadas con resina y las extraídas con etanol- ácido acético y modificadas con TEOS, sin embargo, en la última muestra obtenida de antocianinas extraídas con etanol- ácido acético, purificadas con y sin TEOS, tienen decrementos en la concentración muy similares además de que la pérdida en la concentración de antocianinas es alrededor del 12% de la concentración total.

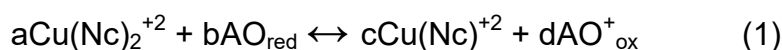
### **9.3 Resultados de las pruebas de contenido antioxidante con DPPH y CUPRAC electroquímico.**

En estas pruebas se utilizaron solo extractos BCS, BCA, BCSR y BCAR, ya que en la prueba anterior se pudo constatar que la modificación con TEOS no aportaba mayor estabilidad ante los efectos del pH, luz ultravioleta y temperatura. Como se observa en la Figura 9.5a, existe una relación directa entre el contenido de antocianinas y la actividad antirradical, cuando el contenido de antocianinas es mayor, el efecto antioxidante aumenta.

A mayor cantidad compuestos fenólicos, como las antocianinas, se espera una mayor actividad antirradical. El extracto obtenido con ácido acético conduce a un mayor rendimiento de actividad antirradical ( $614.52 \mu\text{M TE g fw}^{-1}$ ) que es un 15.5% mayor en comparación con el extracto obtenido con ácido cítrico.

Esto se esperaba porque la naturaleza acilada de la antocianina extraída (Gerardi, y otros 2015) confiere una mayor actividad antirradical que las antocianinas monoméricas; Además, el uso de la resina XAD7 redujo la actividad antirradical en 20.20% y 18.94% para los extractos de BCS y BCA, respectivamente.

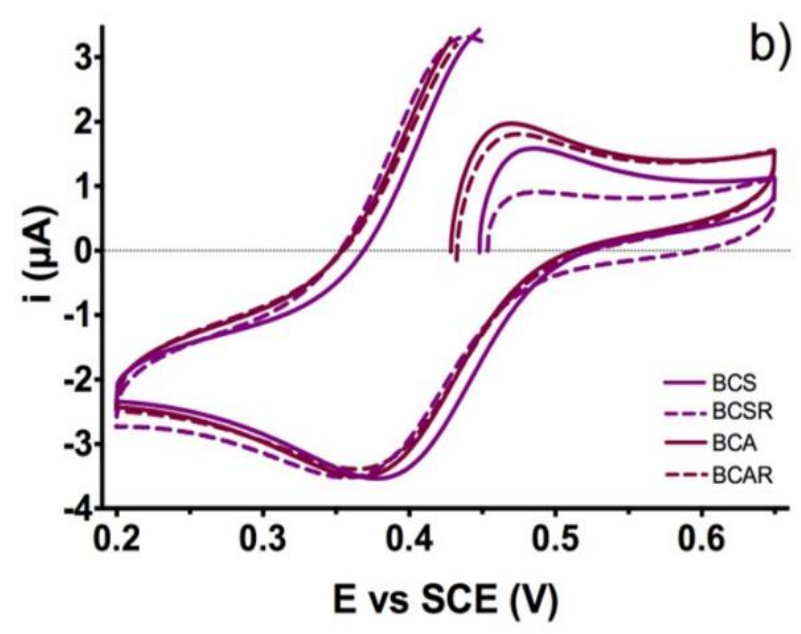
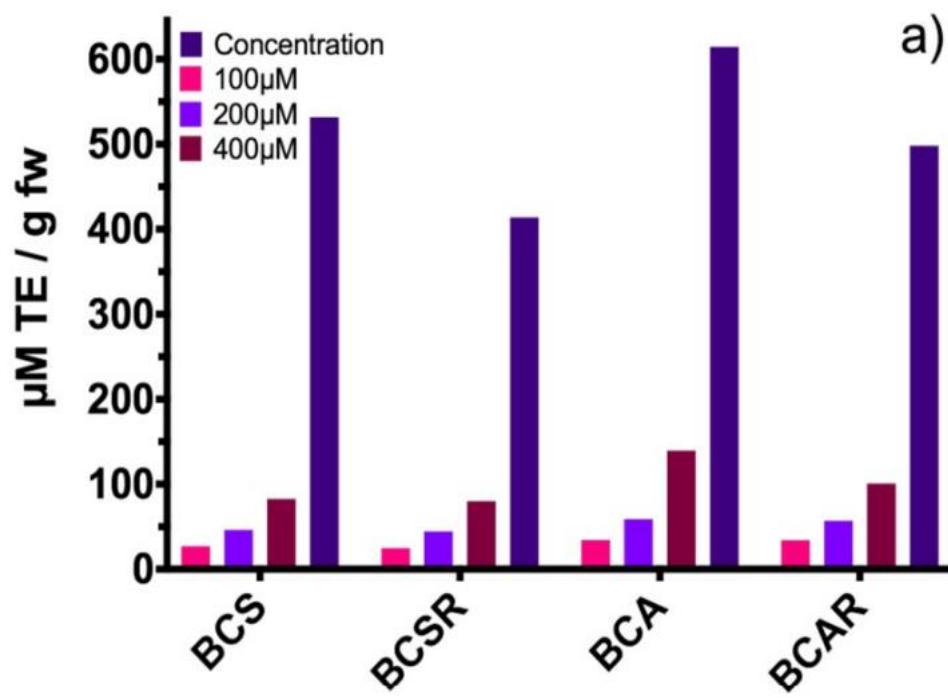
En el caso de la prueba CUPRAC, la Figura 9.5b muestra voltamperogramas cíclicos para los agentes antioxidantes obtenidos con diferentes métodos de extracción. Se puede observar que el potencial inicial para el BCAR y el BCA fue de 0.433 y 0.428 V, respectivamente. Esos valores mostraron un cambio a potenciales negativos en comparación con 0.454 y 0.488 V de BCSR y BCS, respectivamente. Este cambio a valores de potencial negativo están relacionados con un incremento en la cantidad del complejo  $\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$  debido a la capacidad del agente antioxidante para donar un electrón al complejo oxidado  $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{+2}$ . De acuerdo con la siguiente ecuación:



donde  $\text{AO}_{\text{red}}$  es el agente antioxidante reducido y  $\text{AO}_{\text{ox}}^+$  es el agente antioxidante cuando se oxidó. Este comportamiento está directamente relacionado con la capacidad del agente antioxidante de las muestras para promover la reacción de reducción para la molécula que fue oxidada previamente ( $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{+2}$ ). Además, la descripción anterior se basó en la ecuación de Nernst:

$$E = E^0 + (RT/F) \ln (a\text{Cu}(\text{Nc})_2^{+2} / a\text{Cu}(\text{Nc})_2^+) \quad (2)$$

donde el potencial de la reacción en el equilibrio se cambió a valores negativos debido a un aumento en la actividad (concentración de  $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{+2}$ ) de los productos.



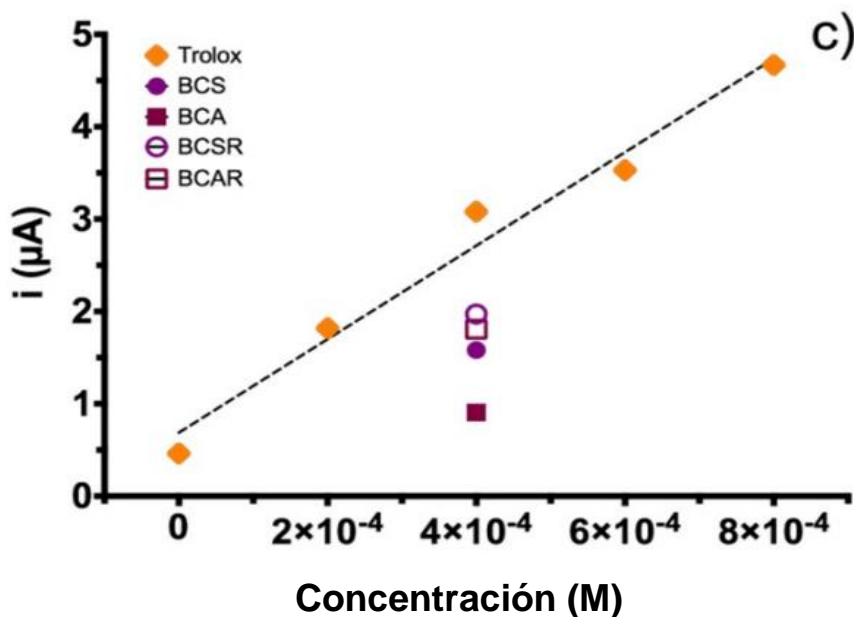


Figura 9.5. **(a)** Actividad antirradical de extractos de zanahoria negra utilizando el ensayo DPPH a diferentes concentraciones. **(b)** Voltamogramas cíclicos para los cuatro extractos (400 µM) en una solución CUPRAC. La exploración comenzó en el potencial de circuito abierto (OCP) con una velocidad de barrido de 100 mV·s<sup>-1</sup>. **(c)** Actividad antioxidante electroquímica y comparada con la actividad de Trolox en la misma concentración. Muestras extraídas con etanol / ácido cítrico (BCS) y etanol / ácido acético (BCA), muestras después de la columna de resina (BCSR y BCAR).

Además, la corriente de pico para el proceso de oxidación en los voltamogramas tiene una relación directa con la concentración de Cu(Nc)<sup>+2</sup> porque si el electrolito tiene una mayor cantidad de Cu(Nc)<sup>+2</sup>, obtenemos una mayor cantidad de moléculas oxidantes (Cu (Nc)<sub>2</sub><sup>+2</sup>) que resulta en un incremento del valor actual. Esto es posible porque la corriente es directamente proporcional a la concentración de la especie en la reacción (Pletcher, y otros 2001).

La curva de calibración de Trolox se obtuvo a partir de la corriente de pico de oxidación y se usó para analizar la actividad antioxidante de los extractos de zanahoria negra obtenidos por los diferentes métodos de extracción ( $r^2 = 0.9768$ ). Se propone que la relación entre el pico actual de la zanahoria negra y el pico actual de Trolox (a la misma concentración, 400  $\mu\text{M}$ ) permite determinar la capacidad antioxidante de cada extracto de zanahoria negra.

Este método es similar al cálculo de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), donde los cálculos se realizaron mediante la relación de la capacidad de absorción molar de las especies problemáticas y Trolox en las condiciones correspondientes (Arts, y otros 2004). Para tener cianidina 3-O-glucósido a una concentración de 400  $\mu\text{M}$ , las muestras se diluyeron y se usó el peso molecular de la antocianina para el método analítico de pH diferencial.

La capacidad de antioxidante electroquímica calculada (EAC) se muestra en la Figura 9.5c, que proporciona los siguientes resultados: 0.684, 0.346, 0.748 y 0.591 para BCS, BCA, BCSR y BCAR, respectivamente.

Estos resultados de EAC mostraron un comportamiento de acuerdo con el método colorimétrico de DPPH. El extracto de BCA tuvo la actividad antirradical más alta de todas las muestras, seguido de BCS, luego BCAR y finalmente BCSR.

Además, al analizar la actividad antioxidante de los extractos de zanahoria negra, los valores de corriente estaban por debajo de los valores de la gráfica de calibración de Trolox. Esta prueba CUPRAC muestra que nuestras muestras podrían tener varios derivados de 3,7 diglucósidos y otros compuestos fenólicos. La actividad antirradical de los extractos de zanahorias negras fue mayor que otros valores informados de varios extractos (Seeram, y otros 2008).

#### 9.4 Resultados de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR)

La Figura 9.6 muestra los espectros infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de muestras extraídas con etanol / ácido cítrico (BCS) y etanol / ácido acético (BCA) y los espectros de IR obtenidos por simulación.

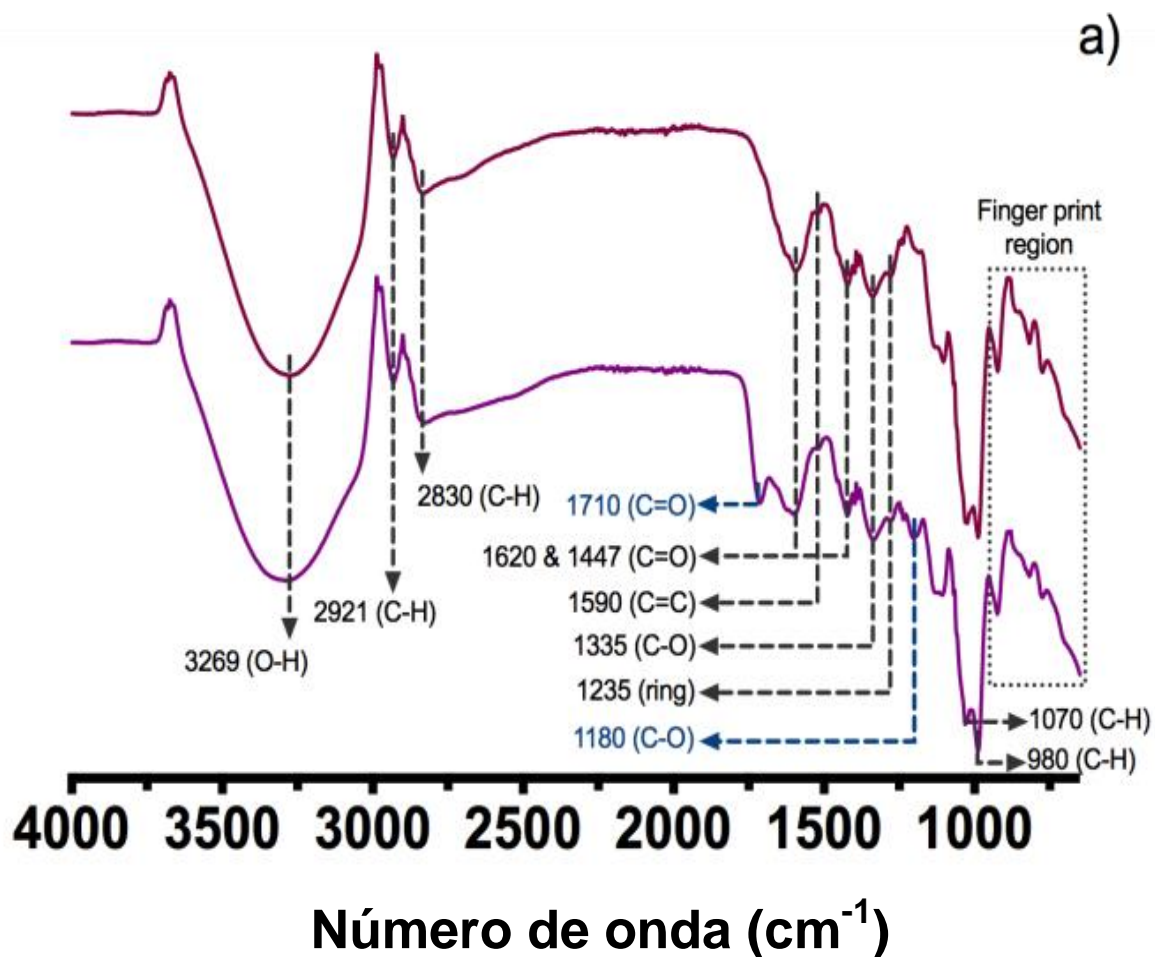
En la Figura 9.6a, las vibraciones obtenidas para ambas muestras mostraron una banda a  $980\text{ cm}^{-1}$  de un CH en deformación plana, el pico que se muestra a  $1070\text{ cm}^{-1}$  corresponde a una deformación CH del anillo aromático, también aparecen bandas a  $1620$  y  $1447\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a Vibración (C=O) del anillo aromático de benzopirano, a  $1590\text{ cm}^{-1}$  se forma un pico a partir de la vibración de estiramiento (C=C) de un anillo aromático, también aparece una banda de  $1235\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento de los anillos de pirano, típico de los compuestos flavonoides, y una banda de  $1335\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a las deformaciones angulares de CO de fenoles, además a  $2830$  y  $2921\text{ cm}^{-1}$  se manifiesta la vibración del CH simétrico y asimétrico, respectivamente, y en  $3269\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento OH.

En las muestras de BCS hay dos picos adicionales, a  $1710\text{ cm}^{-1}$  debido a una vibración de estiramiento C=O y a  $1180\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración simétrica de CO, esto es indicativo de que hay otros compuestos de acilo en el extracto.

Los resultados de la simulación del modelo de Becke 3-Lee-Yang-Parr (B3LYP) se muestran en la Figura 9.6b, considerando la molécula de cianidina 3-O-glucósido. Las bandas obtenidas son  $3370$  y  $3290\text{ cm}^{-1}$  (vibración de estiramiento simétrico OH),  $3220\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento simétrico CH),  $1719$  y  $1689\text{ cm}^{-1}$  (C=C de grupos fenólicos),  $1535\text{ cm}^{-1}$  (Tijera CH),  $1419\text{ cm}^{-1}$  (vibración del anillo asimétrico en el plano),  $1380\text{ cm}^{-1}$  (deformación CH),  $1213\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento de CO),  $1154\text{ cm}^{-1}$  (una vibración del plano de tijera del anillo de fenol),  $959\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento asimétrico del anillo de fenol CH),



861  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento simétrico del anillo de fenol CH) y 738  $\text{cm}^{-1}$  (deformación del anillo de fenol CH).



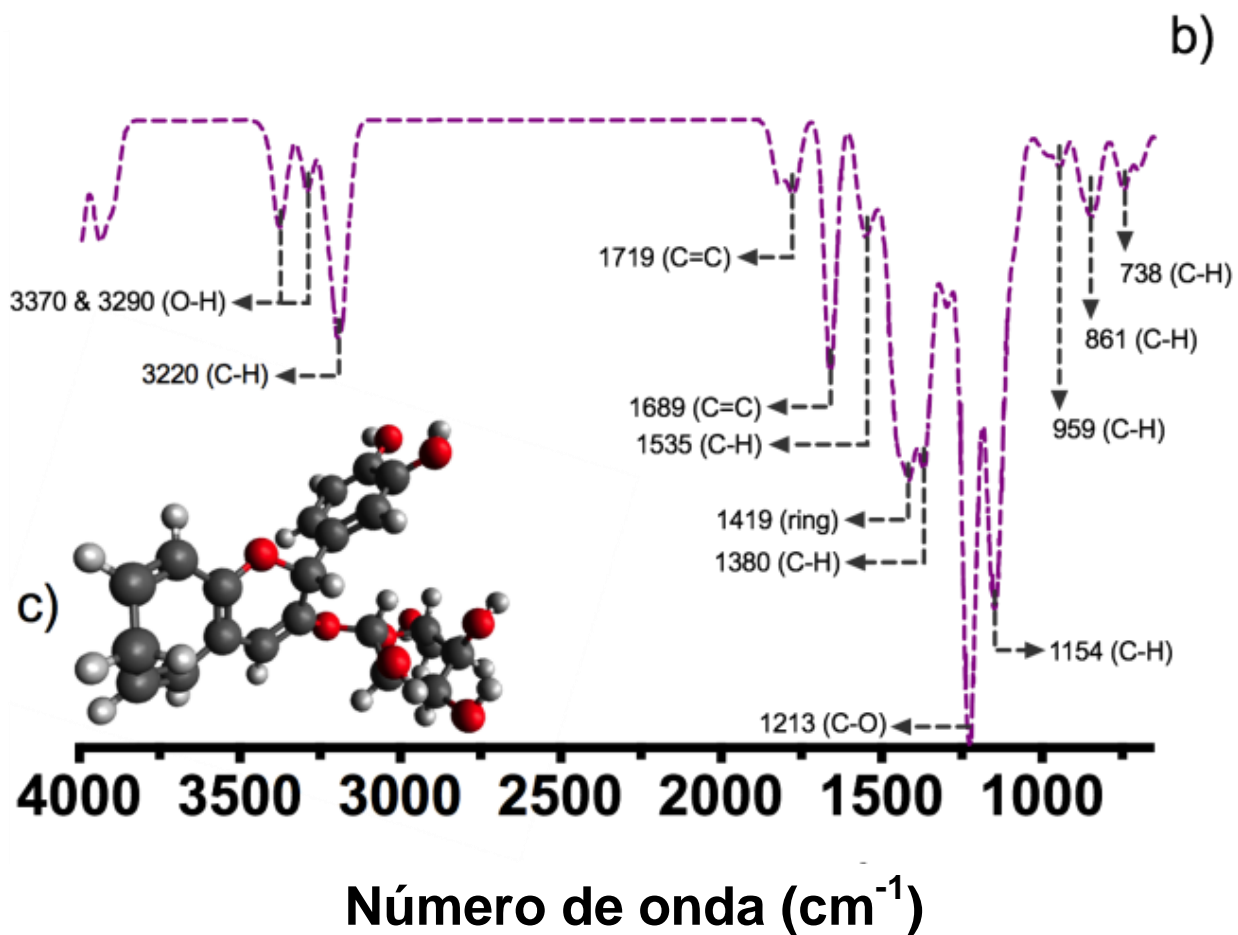
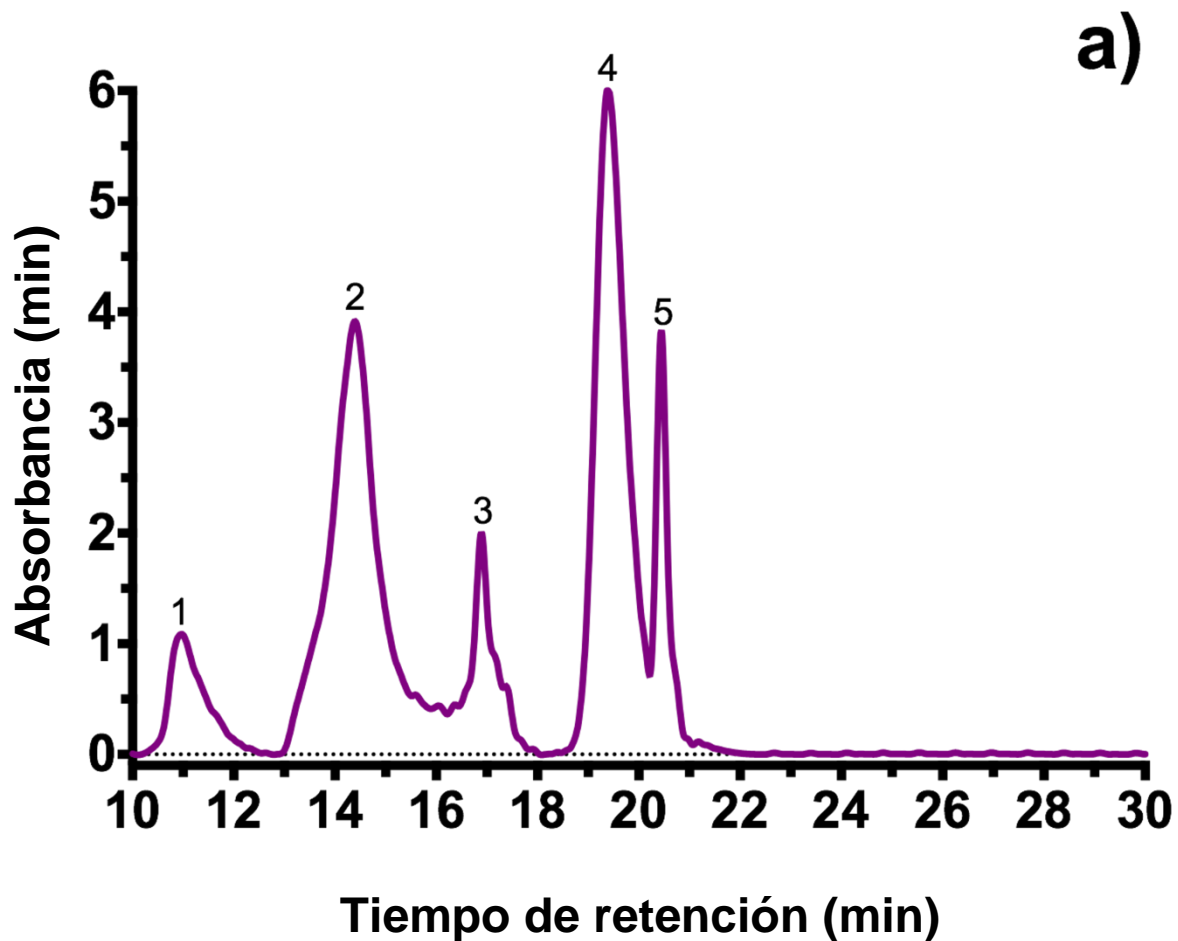


Figura 9.6. **(a)** Espectros FTIR experimentales de extractos de zanahoria negra; muestras extraídas con etanol / ácido cítrico (BCS) y etanol / ácido acético (BCA), **(b)** Espectros FTIR simulados utilizando el cálculo de B3LYP y la molécula de cianidina 3-O-glucósido (utilizada para simulación)

Estos resultados sugieren que la cianidina 3-O-glucósido es el componente principal de la antocianina en la zanahoria negra, ya que comparten frecuencias vibracionales similares y los mismos grupos funcionales, como los valores informados previamente para la zanahoria negra (Türkyılmaz, Yemiş y Özkan 2012; Montilla, y otros 2011).

## 9.5 Resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

Para confirmar los resultados obtenidos en espectroscopía infrarroja, se realizó una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las muestras BCS y BCA. La Figura 9.7a muestra el cromatograma de HPLC de la muestra BCS y la Figura 9.7b muestra el cromatograma de HPLC para BCA. La identificación de los picos se realizó utilizando informes anteriores (Algarra Manuel 2014; Kammerer, Carle y Schieber 2003; Castañeda-Ovando, y otros 2009). La Tabla 26 muestra los tiempos de retención de los picos y compuestos característicos identificados.



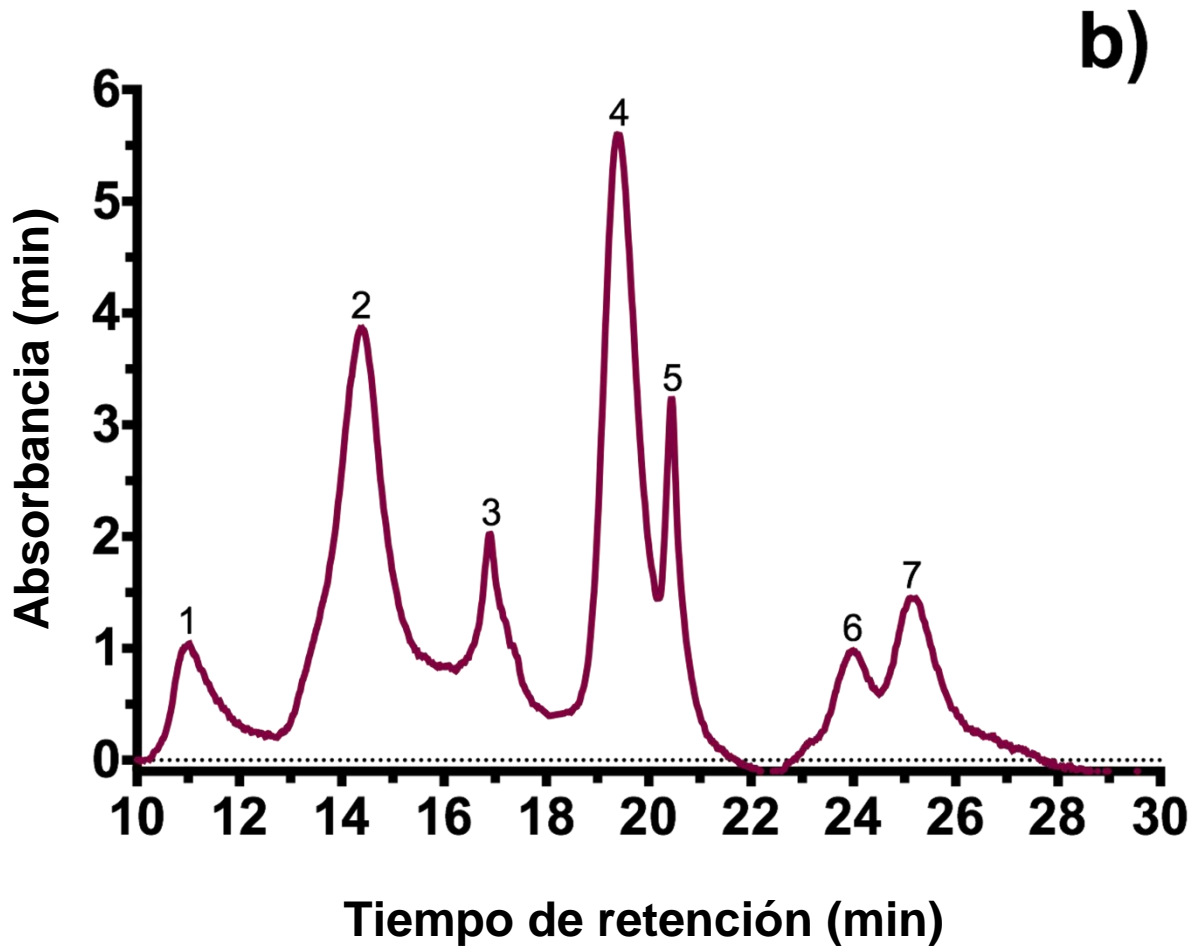


Figura 9.7. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de extractos de zanahoria negra: (a) muestra BCS (extraída con etanol / ácido cítrico). (b) muestra BCA (extraída con etanol / ácido acético). Los picos fueron identificados y se muestran en la Tabla 26.

El cromatograma de la muestra BCS muestra dos picos adicionales (antocianinas reportadas como derivadas del ácido felúrico) en comparación con la muestra BCA. El análisis por HPLC confirmó la presencia de la molécula de cianidina 3-O-glucósido y sus derivados en los extractos de zanahoria negra obtenidos.

Pico	Tiempo de retención (min)		Antocianinas
	BCS	BCA	
1	10.94	10.93	Cianidina-3-xilosil-glucosil-galactosido
2	14.96	14.39	Cianidina-3-xilosil-galactosido
3	16.91	16.88	Ácido sinápico derivado de cianidina-3-xilosil-galactosido
4	19.43	19.42	Ácido ferúlico derivado de cianidina-3-xilosil-galactosido
5	20.45	20.44	Ácido coumárico derivado de cianidina-3-xilosil-galactosido
6	-	23.98	Ácido ferúlico derivado de pelargonina-3-xilosil-galactosido
7	-	25.17	Ácido ferúlico derivado de peonidina-3-xilosil-galactosido

Tabla 26. Tiempo de retención e identificación de antocianinas a partir de extractos de zanahoria negra BCS (extraídas con etanol / ácido cítrico) y BCA (extraídas con etanol / ácido acético).

## 9.6 Resultados de la determinación de color de extractos y modelos alimenticios

La Figura 9.8a-d muestra los resultados promedio del análisis de imágenes para los modelos de alimentos comparando los extractos de zanahoria negra y rojo FD&C. Todas las muestras (en yogur y gelatina) tenían una tendencia de color marrón claro (ángulo de tono inferior a 2) al comienzo del experimento.

La gelatina tiene colores más saturados que el yogur y esto se debe al color base de los modelos de alimentos (blanco vs. amarillo pálido). El rojo FD&C tuvo la mayor luminosidad en yogurt y está más saturada que las muestras BCS y BCA (valor de croma). El rojo FD&C en la gelatina es más oscuro, pero tiene la misma saturación de color que BCS, es decir, en el modelo de alimentos; El rojo FD&C y BCS tienen la misma saturación de color para el ojo humano.

La muestra de BCA está menos saturada en gelatina. En el caso de BCSR y BCAR, en el yogur, el color es menos saturado pero más oscuro; y para la gelatina, tienen casi la misma saturación (ligeramente menos saturada) pero tiene un color mucho más brillante.

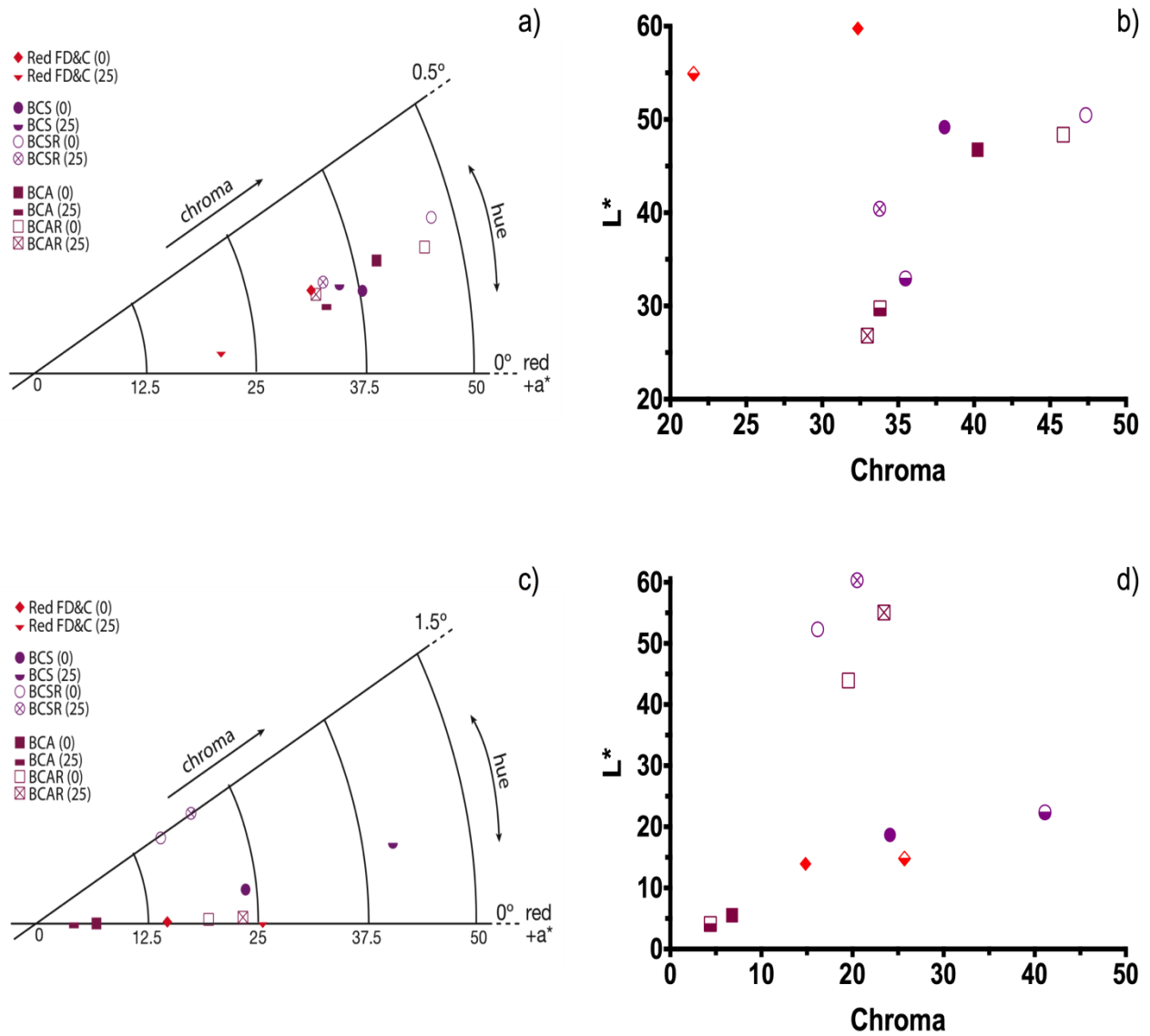


Figura 9.8. (a, c) Diagrama seccional polar y (b, d) cartesiano del color para los extractos de zanahoria negra y el FD&C rojo en modelos de alimentos (yogur y gelatina) a los 0 y 25 días de almacenamiento.

Como se ve en la Tabla 27, después del tiempo de almacenamiento de 25 días, las diferencias de color (DE) en el yogur de todas las muestras, tienen valores superiores a cinco, lo que indica que la diferencia de color al principio y después del tiempo transcurrido es visualmente evidente; también, las muestras tienen una mayor saturación (el valor de croma más bajo) después del almacenamiento y específicamente las muestras de zanahorias negras se oscurecen ya que el valor L \* es más bajo. Las muestras de BCS mostraron una diferencia de color similar después del tiempo de almacenamiento en comparación con el rojo FD&C.

<b>Muestra</b>	<b><math>\Delta E</math> Yogur</b>	<b><math>\Delta E</math> Gelatina</b>
<b>Rojo FD&amp;C</b>	12.62	10.92
<b>BCS</b>	16.45	17.61
<b>BCSR</b>	24.27	9.21
<b>BCA</b>	18.31	2.82
<b>BCAR</b>	25.12	12.71

Tabla 27. Comparación de color entre los modelos de alimentos (yogur y gelatina) utilizando extractos de zanahoria negra después de 25 días de almacenamiento.

Para las muestras de gelatina, solo la muestra de BCA tiene un valor inferior a cinco, lo que indica que la diferencia de color se pudo distinguir, pero no fue tan evidente como el resto de las muestras; además, las muestras de BCA son las únicas con diferentes tendencias de saturación y luminosidad, tienen valores de croma más bajos y son más oscuras. El resto de las muestras son menos saturadas (mayor valor de croma) y más brillantes. Las muestras con purificación de resina (BCSR y BCAR) tuvieron una diferencia de color similar en comparación con el rojo FD&C, excepto el BCA. Para el yogur, las muestras BCSR y BCAR tienen el mayor cambio de color, lo que indica que las antocianinas derivadas de cianidina-3-glucósido no son adecuadas para ser utilizadas en este modelo de alimentos, porque el grupo acetato causó importantes

diferencias de apariencia en estas condiciones; para la gelatina, BCS y BCAR tuvieron los cambios de color más altos, pero BCSR y BCA fueron los más bajos en comparación con el rojo FD&C. La concentración de pigmento de las muestras debe cambiar para el uso comercial específico, por ejemplo, las muestras de yogur de fresa tienen diferentes valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (Molina, y otros 2014).

### **9.7 Resultados de espectroscopía Uv- vis en la biosíntesis de las nanopartículas de oro.**

La formación de AuNp's se confirmó utilizando espectroscopía UV-vis como se muestra en la figura 9.9, ya que en cada uno de los métodos de síntesis de nanopartículas, se muestran bandas de absorción de resonancia de plasmón superficial, características de partículas de oro en escala nanométrica, mismas que se forman por la oscilación de los electrones en la banda de conducción en la superficie de las AuNp's y en resonancia con ondas de luz (C. Umamaheswari 2017; S. H. Lee 2018).

La apariencia de color rojo en cada uno de los métodos de síntesis utilizados en este proyecto, indica la formación de nanopartículas de oro (K. Krishnaswamy 2014); por lo que la resonancia de plasmón superficial máxima de las AuNp's sintetizadas por el método de Turkevich fue de 525nm, para las síntesis obtenidas con extracto de zanahoria negra y ácido cloroaurico en las concentraciones 1:10, 1:5 y 2:5 (v/v) fue de 589, 538 y 539nm, respectivamente.

Es conocido que las bandas de absorción de resonancia de plasmón superficial característicos de oro se encuentran entre 525 y 545nm (J. Zha 2017; P. S. Kumar 2018). Las longitudes de onda de la síntesis realizada por el método de Turkevich, y las obtenidas por la reducción del ácido cloroaurico con el extracto de la zanahoria negra en las concentraciones 1:5 y 2:5 (v/v), son características de las nanopartículas de oro, la variación en la longitud de onda obtenida en la formulación 1:10 (v/v), podría ser resultado de la baja concentración añadida de extracto de la zanahoria negra en el proceso de reducción del ácido cloroaurico.



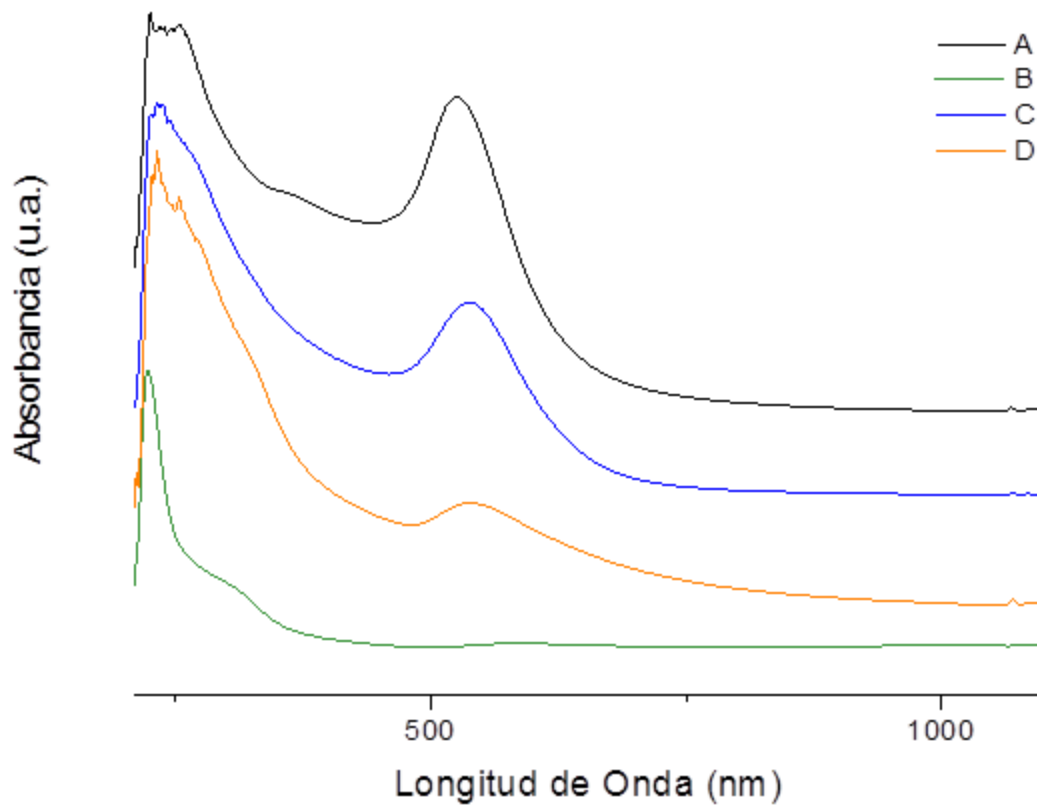


Figura 9.9. Espectros UV-vis de las soluciones de AuNp's preparadas por el método químico de Turkevich y a diferentes concentraciones con extracto de la zanahoria negra: (A) AuNp's sintetizadas por el método químico de Turkevich, (B) (C) y (D) AuNp's sintetizadas con extracto de zanahoria negra y ácido cloroaurico en las siguientes concentraciones respectivamente: 1:10, 1:5 y 2:5 (v/v).

**9.8 Resultados de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR) de las biosíntesis de nanopartículas de oro AuNPs**

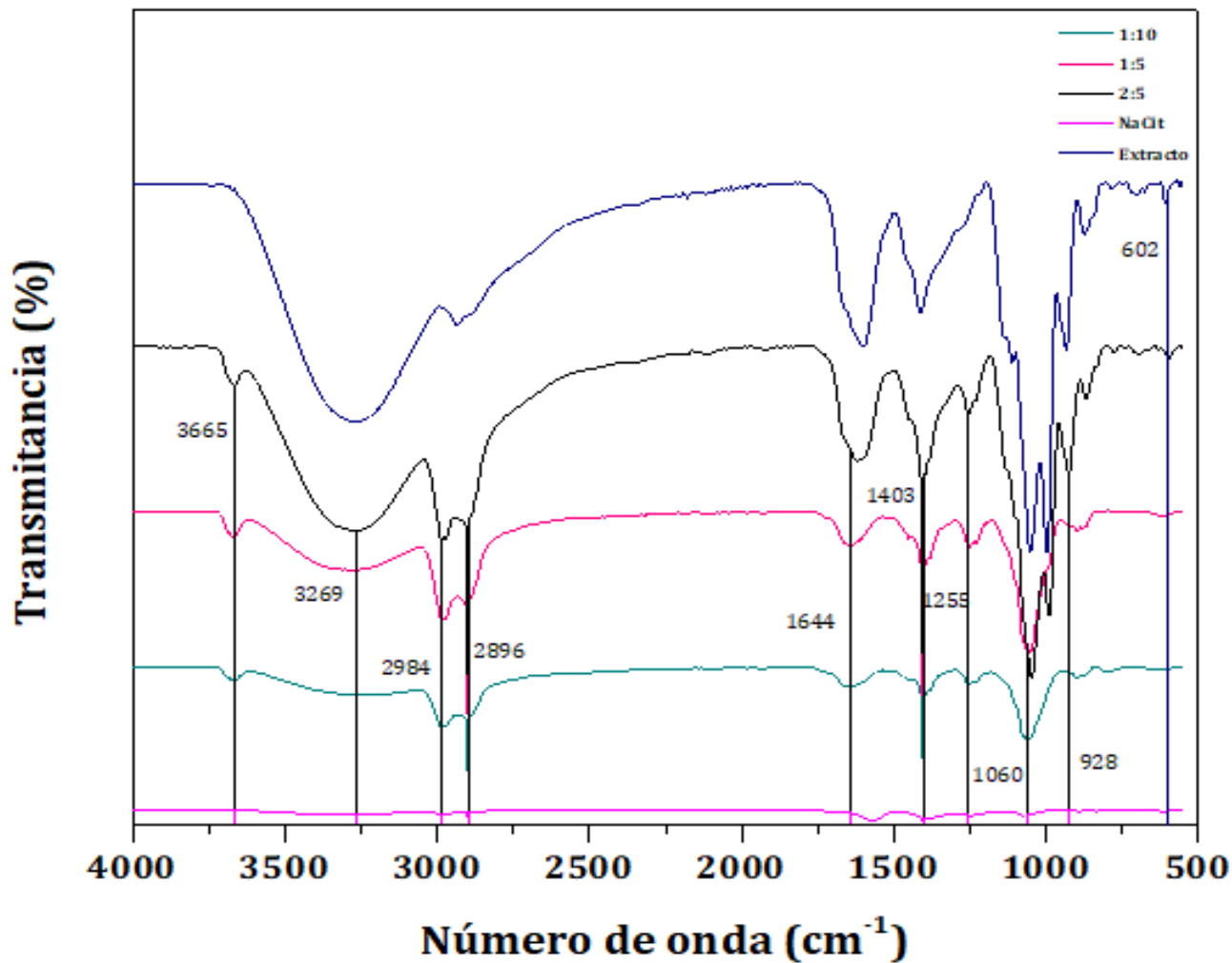


Figura 9.10. Comparativo entre espectros FT-IR de las AuNPs obtenidas de las 3 biosíntesis en las concentraciones 1:10, 1:5, 2:5 v/v reductor-precursor respectivamente y por el método de Turkevich utilizando citrato de sodio.

En la Figura 9.10, se observan las vibraciones obtenidas para cada una de las formulaciones que se utilizaron en la biosíntesis de AuNPs y la síntesis realizada por el método de Turkevich, los espectros generados por las biosíntesis mostraron la presencia de los picos característicos de compuestos fenólicos ya que se observa una banda a  $928\text{ cm}^{-1}$  de un CH en deformación plana, la vibración que se observa a  $1060\text{ cm}^{-1}$  corresponde a una deformación CH del anillo aromático, también aparecen bandas a  $1403\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a la vibración (C=O) del anillo aromático de benzopirano, también aparece una banda de  $1255\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento de los anillos de pirano, típico de los compuestos flavonoides, además a  $2896$  y  $2984\text{ cm}^{-1}$  se manifiesta la vibración del CH simétrico y asimétrico, respectivamente, en  $3269\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento OH, también se muestra un estiramiento de  $\text{NH}_2$  en  $3269\text{ cm}^{-1}$ , estiramiento C=C en  $1644\text{ cm}^{-1}$  la cual podría indicar el acoplamiento del oro al reductor de la superficie. Por lo tanto, la presencia de moléculas orgánicas y grupos funcionales de las moléculas de antocianinas demostró proporcionar estabilidad y evitó la aglomeración de las nanopartículas de oro (Soumya Menon 2017) .

## 9.9 Resultados de Microscopía electrónica de barrido para las AuNPs.

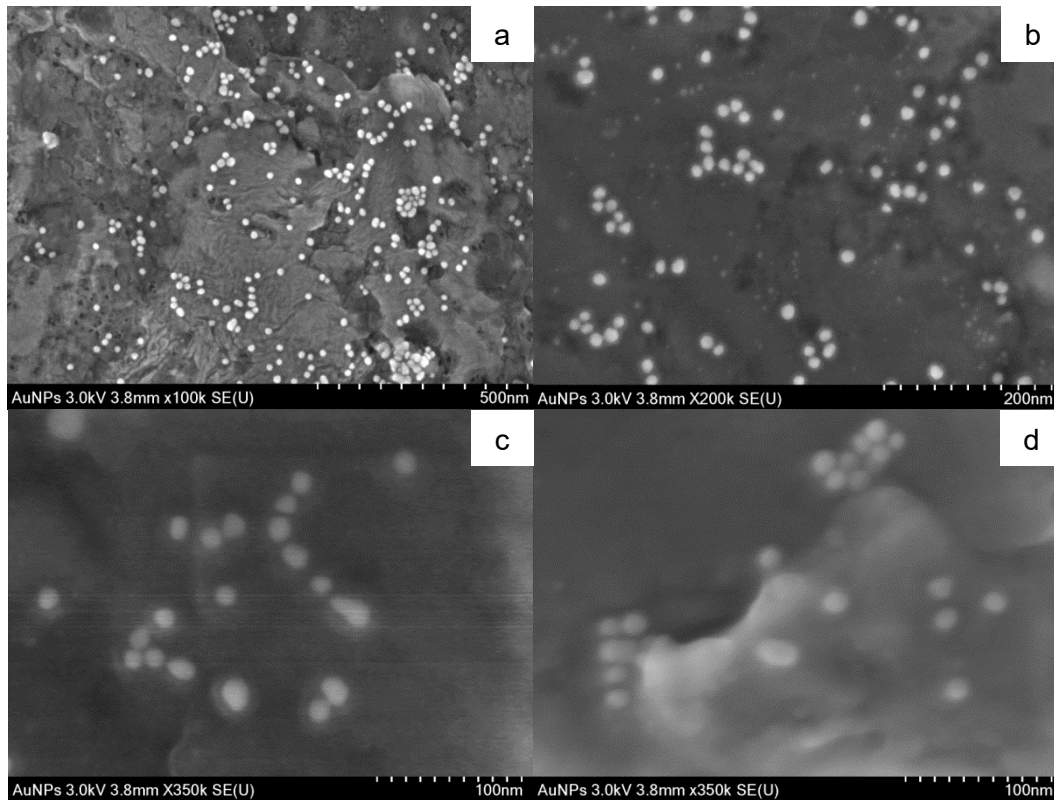


Figura 9.11 a, b, c y d: Imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich.

En la figura 9.11 se puede observar la presencia de nanopartículas de oro en forma esferoidal y dispersas en el área superficial, que presentan tamaños de partícula promedio entre 15 a 20 nm.

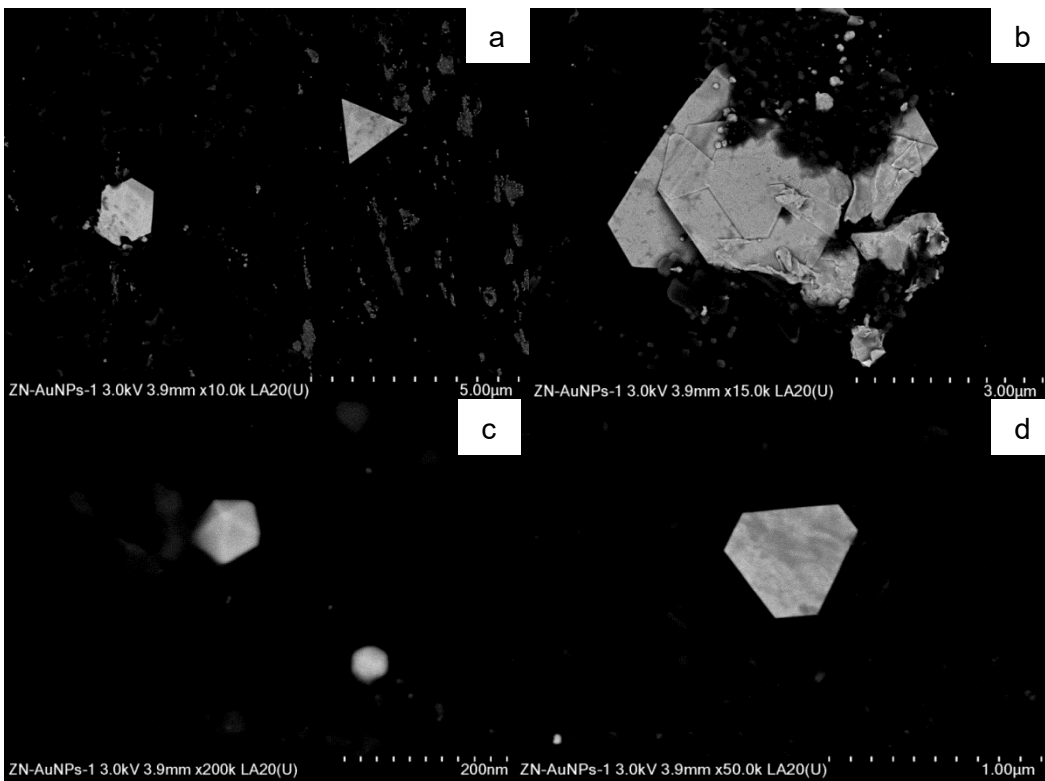


Figura 9.12 a, b, c y d: Imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 1:10 v/v reductor- precursor, respectivamente.

En la figura 9.12 se puede observar la presencia de nanopartículas de oro tanto en forma esferoidal, como de forma poligonal con un tamaño promedio de partícula entre 35 y 65nm, sin embargo las imágenes muestran que las partículas se encuentran poco dispersas en el área superficial y en menor cantidad con respecto a las AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich, además en las imágenes a, b y d se pueden apreciar partículas con un tamaño promedio entre 0.5 a 3  $\mu\text{m}$ , con formas geométricas poligonales, que muy probablemente corresponden a los cristales de la sal de oro que no alcanzó a reaccionar debido a la formulación utilizada para la biosíntesis de AuNPs 1:10 v/v reductor- precursor, respectivamente.

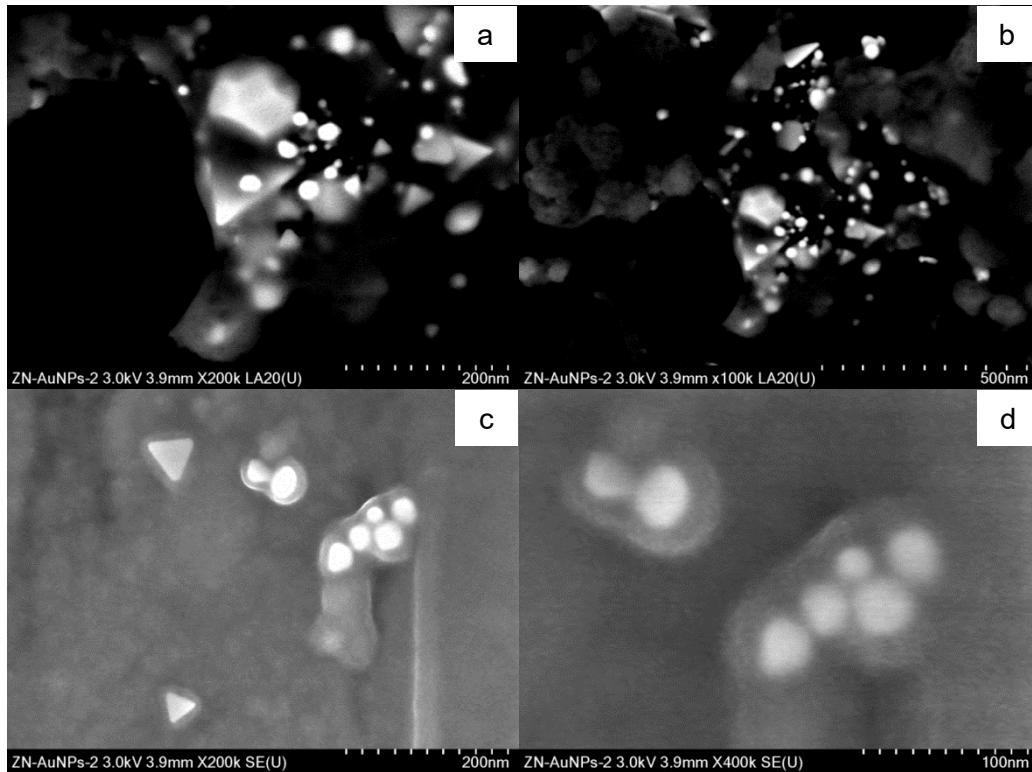


Figura 9.13 a, b, c y d: Imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 1:5 v/v reductor- precursor, respectivamente.

En la figura 9.13 a, b, c y d se puede observar la presencia de nanopartículas de oro tanto en forma esferoidal, como de forma poligonal, con un tamaño promedio de partícula entre 20 y 33nm, además que es notable que las nanopartículas están rodeadas muy probablemente por el extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas, que propicia el aglomeramiento de algunas nanopartículas, en la presente formulación se puede apreciar la formación de un compuesto (AuNPs- extracto de zanahoria negra rico en antocianinas).

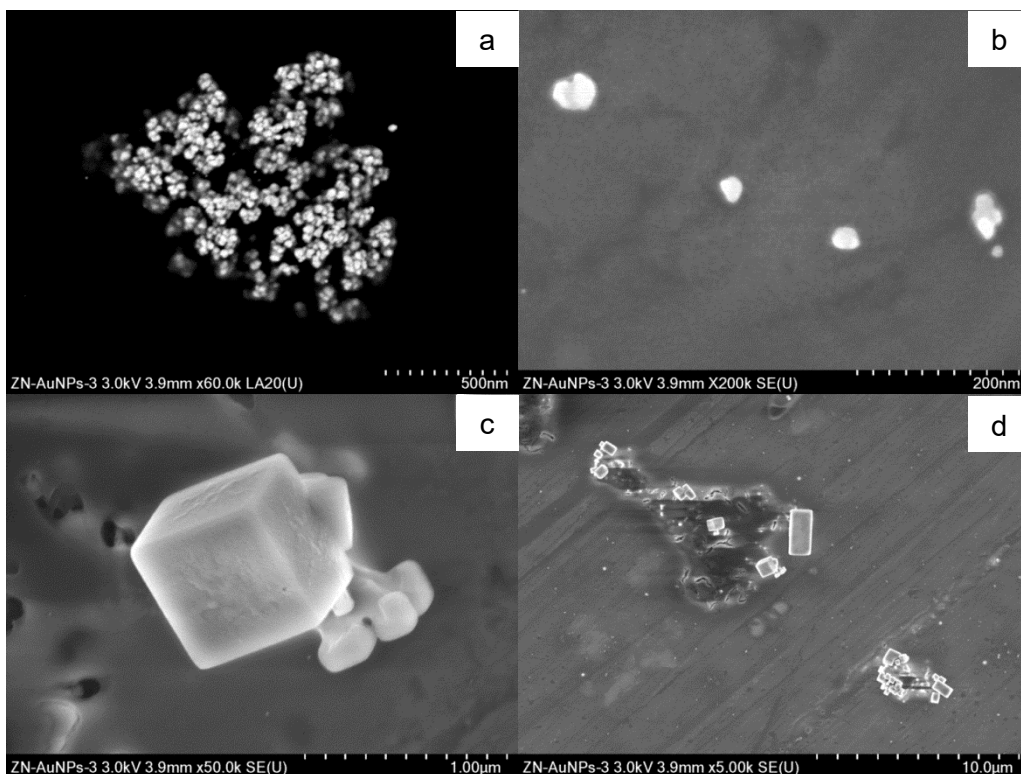


Figura 9.14 a, b, c y d: Imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 1:5 v/v reductor- precursor, respectivamente.

En la figura 9.14 a, b, c y d se puede observar la presencia de nanopartículas de oro en forma esférica, con un tamaño promedio de partícula entre 10 y 20nm, además que es notable que las nanopartículas se encuentran muy aglomeradas debido a que en esta formulación incrementa la cantidad en volumen del agente reductor (extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas), en la presente formulación también se puede apreciar la formación de un compuesto (AuNPs- extracto de zanahoria negra rico en antocianinas).

## 9.10 Resultados de Microscopía electrónica de transmisión para las AuNPs.

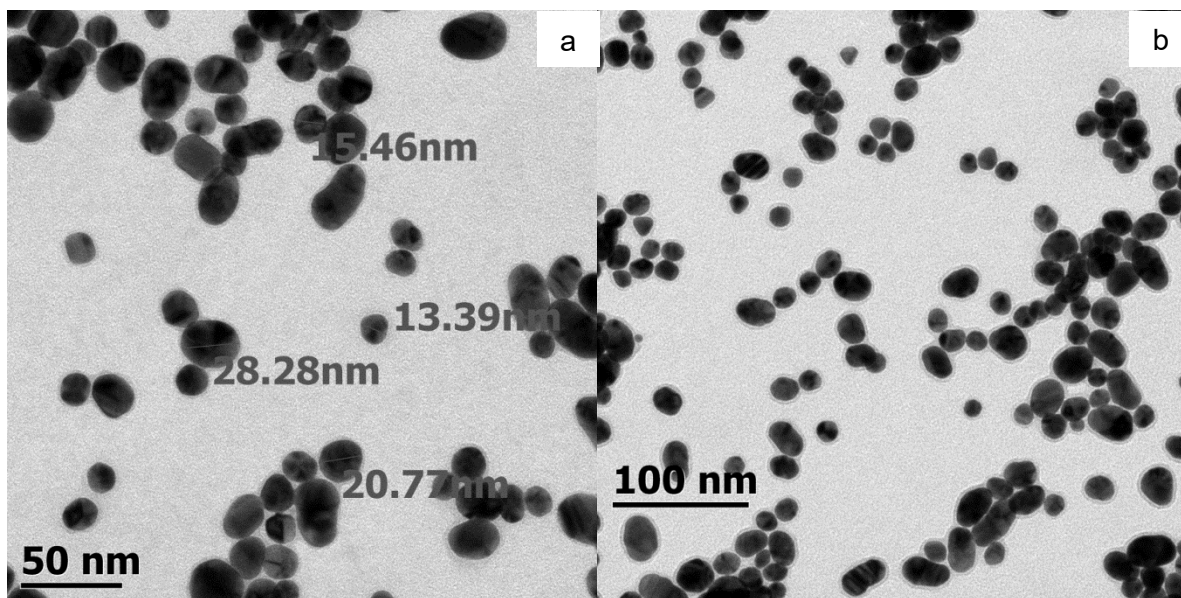


Figura 9.15 a y b: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich.

En la figura 9.15 se puede observar la presencia de nanopartículas de oro en forma esferoidal y dispersas en el área superficial, que presentan tamaños de partícula promedio entre 13 a 30 nm, los cual coincide aproximadamente en rango con las imágenes tomadas en microscopía electrónica de barrido.



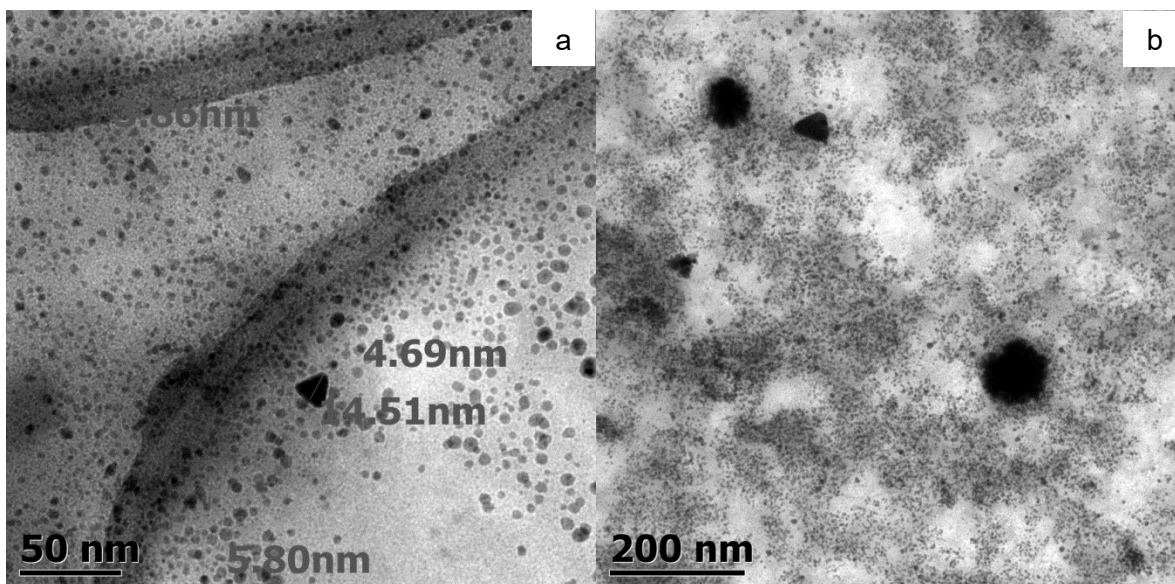


Figura 9.16 a y b: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 1:10 v/v reductor- precursor, respectivamente.

En la figura 9.16 se puede observar la presencia de nanopartículas de oro tanto en forma esferoidal, como de forma poligonal con un tamaño promedio de partícula entre 3 y 15nm, las imágenes muestran que las partículas se encuentran muy dispersas en el área superficial y en mayor cantidad con respecto a las AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich, contrario a lo que pudimos observar en el microscopio electrónico de barrido, en el cual solo se puede observar ces a 35nm. Finalmente, en las imágenes también se pueden distinguir los cristales de la sal de oro que no alcanzó a reaccionar debido a la formulación utilizada para la biosíntesis de AuNPs 1:10 v/v reductor- precursor, respectivamente, donde la cantidad de agente reductor es la mas pequeña de todas las formulaciones realizadas.

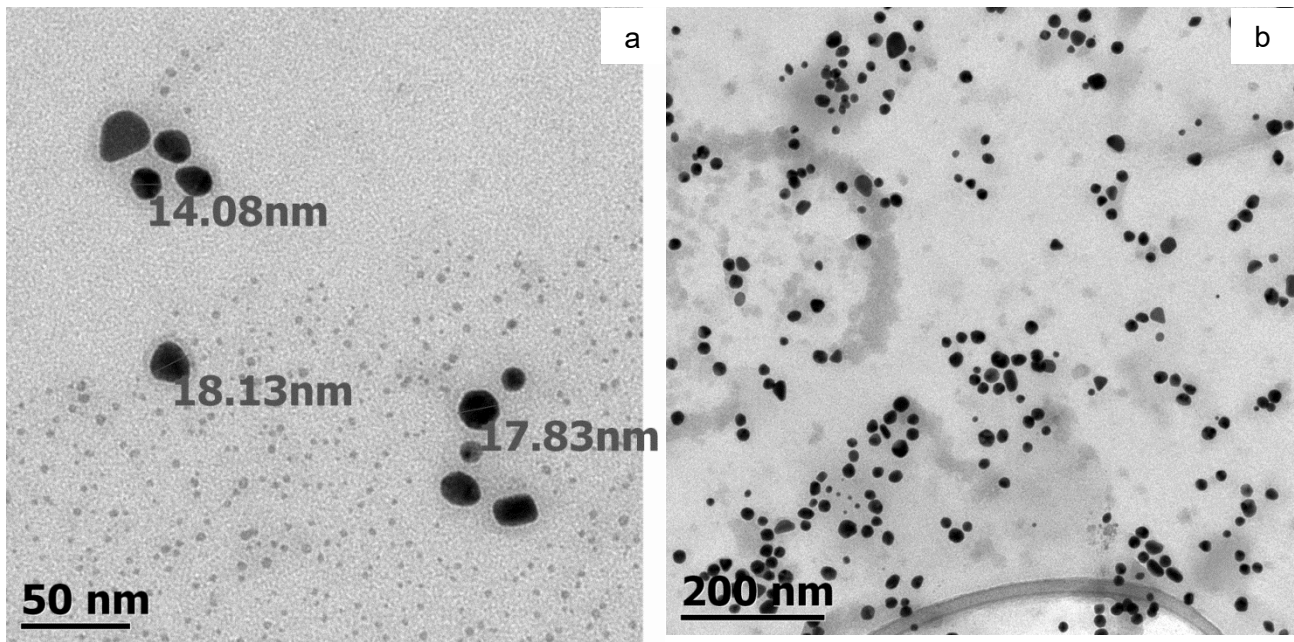


Figura 9.17 a y b: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 1:5 v/v reductor- precursor, respectivamente.

En la figura 9.17 se puede observar la presencia de nanopartículas de oro en forma esférica, con un tamaño promedio de partícula entre 14 y 30nm, cuyas dimensiones coinciden aproximadamente con los datos obtenidos en microscopía electrónica de barrido, además que es notable en la figura 9.17a que las nanopartículas están rodeadas por un halo que probablemente se debe al extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas, que propicia cierta aglomeración de algunas nanopartículas. En la presente formulación se puede apreciar la formación de un compuesto (AuNPs- extracto de zanahoria negra rico en antocianinas).

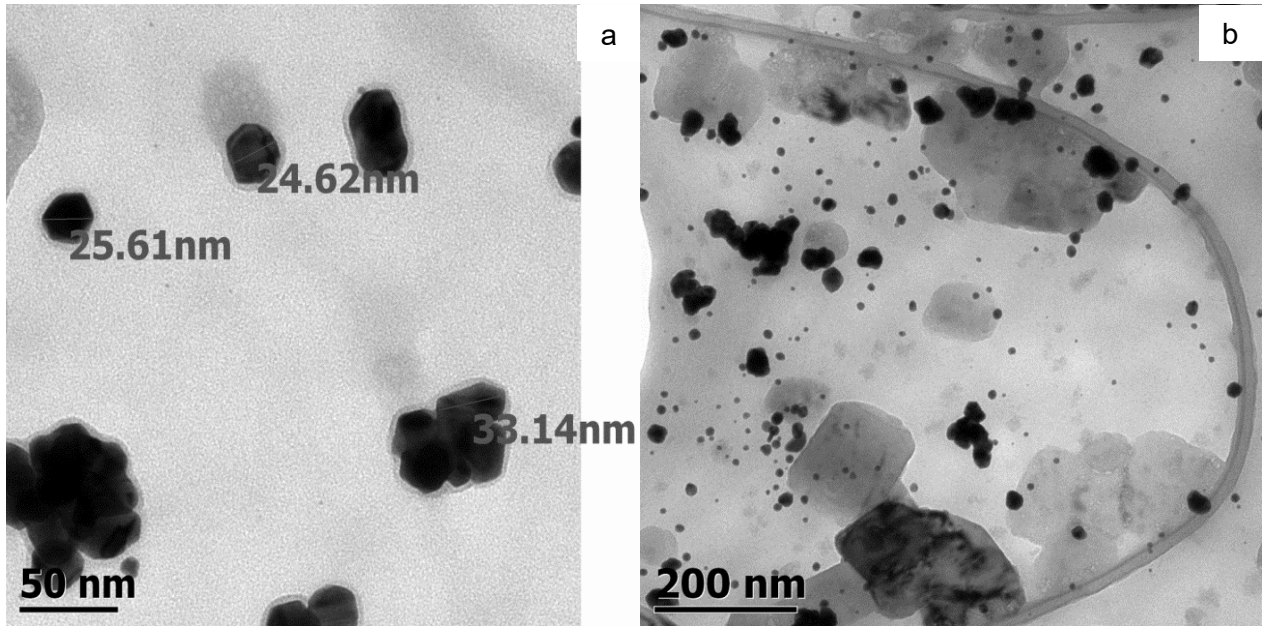


Figura 9.18 a y b: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la biosíntesis de nanopartículas de oro de formulación 2:5 v/v reductor- precursor, respectivamente.

En la figura 9.18 se puede observar la presencia de nanopartículas de oro en forma esférica, con un tamaño promedio de partícula entre 20 y 35nm, además que es notable que las nanopartículas se encuentran muy aglomeradas debido a que en esta formulación incrementa la cantidad en volumen del agente reductor (extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas), en la presente formulación también se puede apreciar la formación de un compuesto (AuNPs- extracto de zanahoria negra rico en antocianinas).

### 9.11 Resultado de dispersión de luz (DLS) para las AuNPs

En las siguientes gráficas se muestran los tamaños de partícula obtenidos mediante la técnica de dispersión de luz aplicada al extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas, a las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich y a las biosíntesis de nanopartículas de oro utilizando extracto de zanahoria negra rico en antocianinas con las formulaciones 1:10, 1:5 y 2:5 v/v (reductor- precursor)

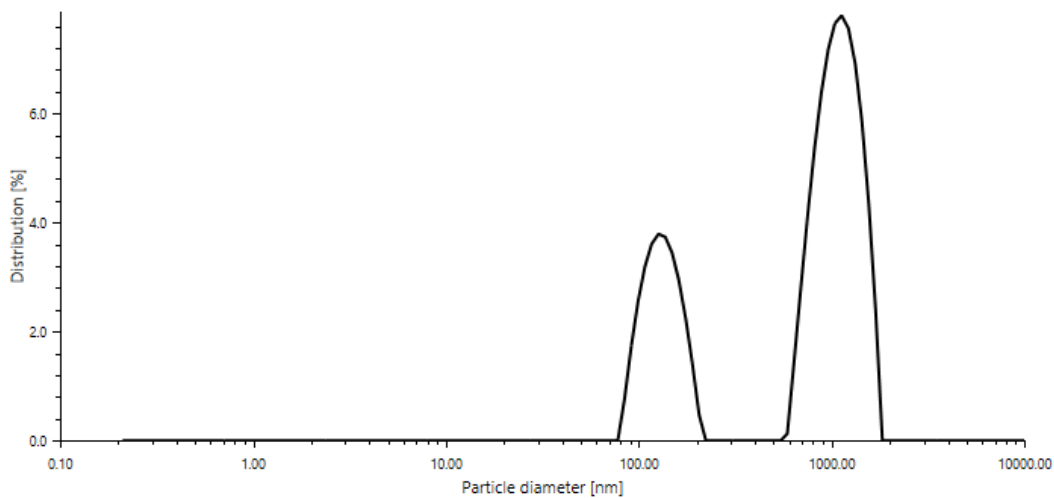


Figura: 9.19 Análisis de la distribución de tamaños de partícula por DLS para el extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas.

La figura 9.19 muestra el análisis de la distribución de tamaños de partículas para el extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas y se pueden observar dos picos a 1099.6 y 132.4nm, el pico de porcentaje de distribución mas grande es a 1099.6nm.

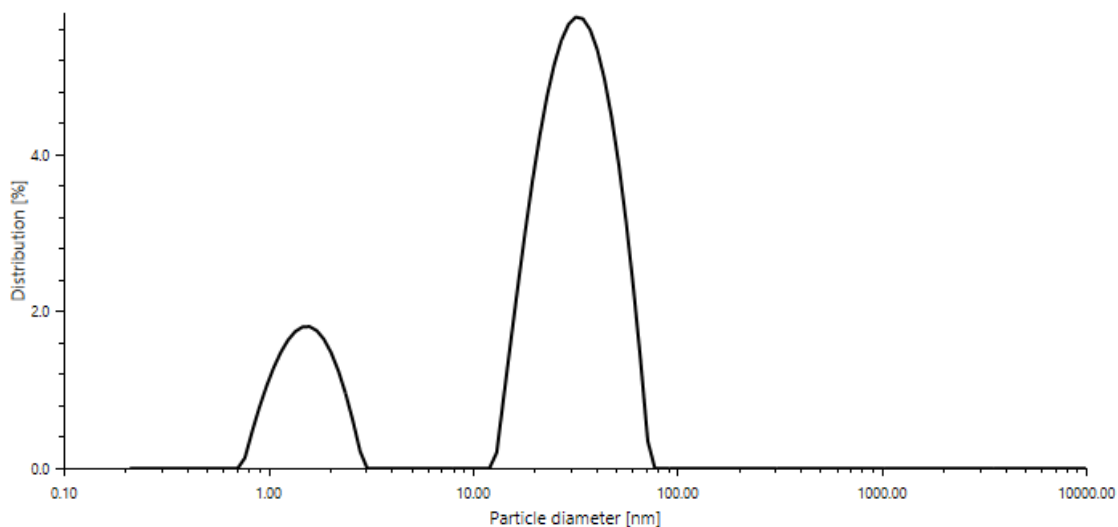


Figura: 9.20 Análisis de la distribución de tamaños de partícula por DLS para la síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich.

En la figura 9.20 se puede observar el análisis de distribución de partículas de las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich, cuyos picos aparecen en 1.97nm y en mayor porcentaje de distribución a 33.95nm, cuyas dimensiones coinciden con los resultados obtenidos en SEM y TEM, ya que se muestran distribuidas de manera uniforme en el área superficial.

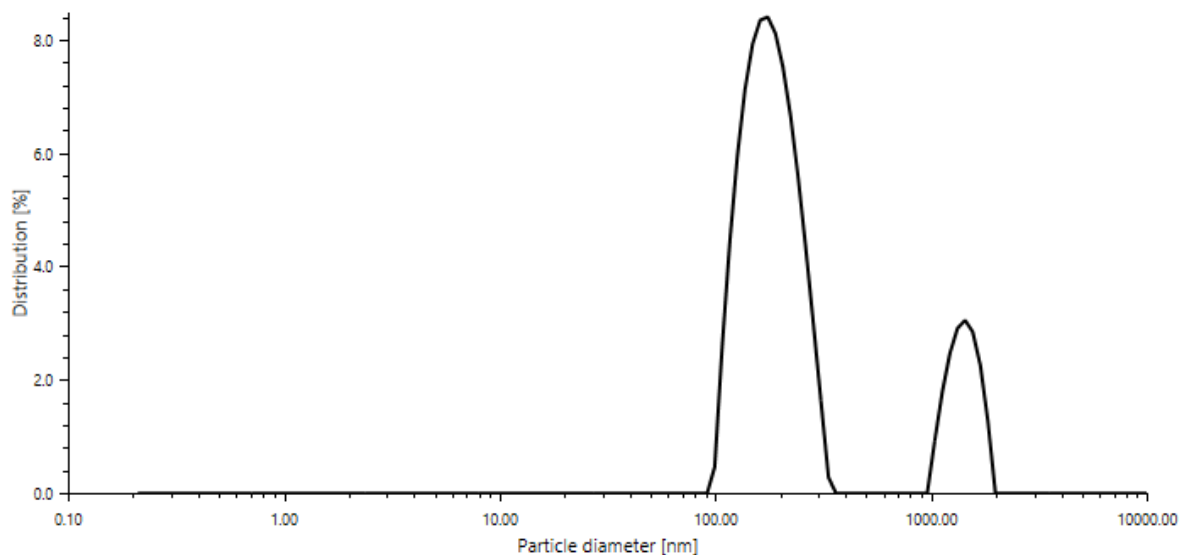


Figura 9.21 Análisis de la distribución de tamaños de partícula por DLS para la biosíntesis de nanopartículas de oro con la formulación 1:10 v/v (reductor- precursor)

La figura 9.21 corresponde a la biosíntesis de nanopartículas de oro con la formulación 1:10 v/v (reductor- precursor) y se puede observar dos picos de distribución de tamaño de partícula a 182.1 y 1409.5nm, siendo el de mayor porcentaje el pico a 182.1nm, cuyos rangos corresponden muy probablemente a los cristales de ácido cloroáurico que se quedaron sin reaccionar y que se pueden visualizar en los resultado obtenidos en las imágenes de SEM.

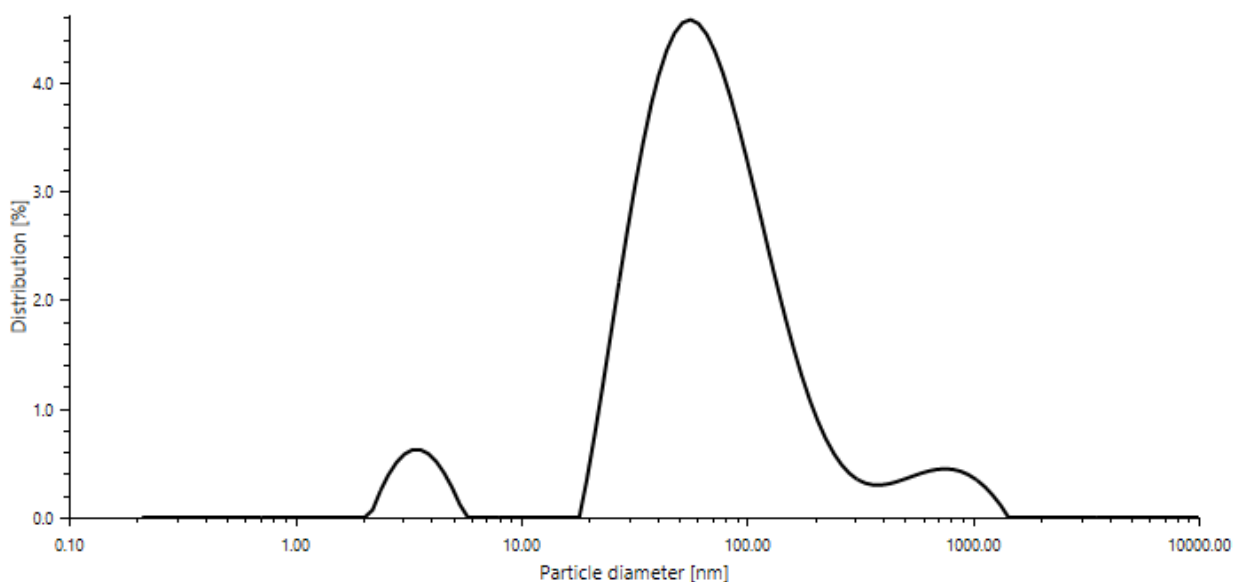


Figura 9.22 Análisis de la distribución de tamaños de partícula por DLS para la biosíntesis de nanopartículas de oro con la formulación 1:5 v/v (reductor- precursor)

La figura 9.22 corresponde a la biosíntesis de nanopartículas de oro con la formulación 1:5 v/v (reductor- precursor) y se pueden observar tres picos de distribución de tamaño de partícula a 3.53, 79.88 y 734.2nm, siendo el de mayor porcentaje el pico a 79.88nm, los datos no coinciden con la información obtenida en las imágenes de SEM y TEM, ya que como se mencionó en los puntos 9.9 y 9.10, la formación de un compuesto (AuNPs-extracto de zanahoria negra rico en antocianinas), propició la aglomeración de las mismas, es por ello que la técnica de DLS nos registra tamaños de partícula superiores a los obtenidos en SEM y TEM.

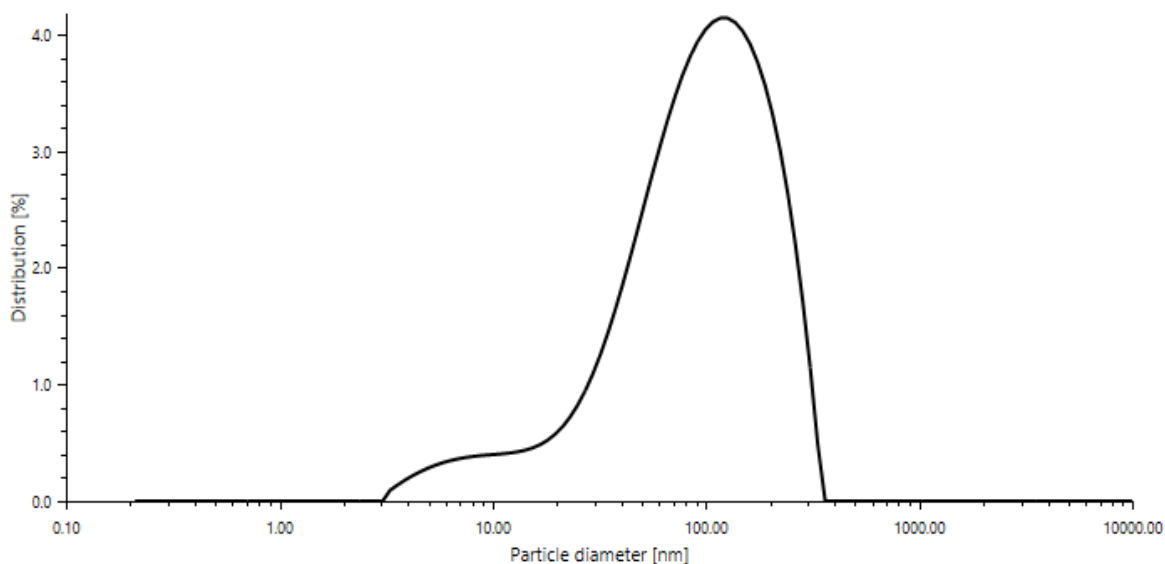


Figura 9.23 Análisis de la distribución de tamaños de partícula por DLS para la biosíntesis de nanopartículas de oro con la formulación 2:5 v/v (reductor- precursor)

La figura 9.23 corresponde a la biosíntesis de nanopartículas de oro con la formulación 2:5 v/v (reductor- precursor) y se puede observar un pico de distribución de tamaño de partícula a 110.48nm, el cual no coincide con la información obtenida en las imágenes de SEM y TEM, ya que como se mencionó en los puntos 9.9 y 9.10, la formación de un compuesto (AuNPs- extracto de zanahoria negra rico en antocianinas), propició la aglomeración de las mismas, es por ello que la técnica de DLS nos registra tamaños de partícula superiores a los obtenidos en SEM y TEM, como ocurrió en la formulación 1:5 v/v.

## 9.12 Resultados de potencial zeta para AuNPs

La obtención de los valores de potencial zeta de cada una de las muestras permitió determinar las cargas eléctricas presentes en la superficie de las nanopartículas; cuanto mas negativo el valor de potencial zeta, tanto mayor es la estabilidad de las mismas en disolución (Casals 2010).

Las mediciones de potencial zeta otorgaron los resultados mostrados en la tabla \_\_\_\_ . En los resultados se puede observar una disminución del potencial zeta en la medida en que aumenta la concentración del agente reductor orgánico (extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas).

Muestra	Potencial zeta
<b>AuNPs (Método de Turkevich)</b>	36.4mV
<b>AuNPs (1:10 v/v)</b>	-17mV
<b>AuNPs (1:5 v/v)</b>	-18.6mV
<b>AuNPs (2:5 v/v)</b>	-24.5mV

Tabla 28: Resultados de las mediciones de potencial zeta, sintetizadas por el método químico y las biosintetizadas

Las nanopartículas de oro obtenidas por biosíntesis resultaron ser estables en disolución acuosa, esto implica que efectivamente que las nanopartículas deben tener una capa de cierto grosor de extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas y que sirve también para su estabilidad en solución.



## 10. CONCLUSIONES

1. Las antocianinas se extrajeron de la zanahoria negra con etanol / ácido cítrico y etanol / ácido acético para comparar el contenido total de antocianinas, y se observó la estabilidad frente a los cambios que la afectan (pH, temperatura y exposición a luz Uv, en distintos tiempos), y la capacidad antioxidante para analizar las muestras en modelos de alimentos. Los extractos tuvieron la mayor degradación en el pH alcalino, y BCAR fue la muestra más estable a los cambios de pH.
2. La microencapsulación con TEOS se realizó con el objetivo de mejorar la estabilidad de las antocianina. Los resultados de la radiación UV y las pruebas de estabilidad térmica indican que la microencapsulación TEOS proporciona una mejora insignificante en la estabilidad de las antocianinas.
3. La extracción con etanol / ácido acético es el tratamiento más conveniente y estable contra los cambios de pH. En conclusión, la purificación con resina y la microencapsulación TEOS no aumentaron la estabilidad de los extractos de zanahoria negra.
4. La actividad antirradical de los extractos de zanahorias negras fue mayor que en otros valores reportados en la literatura, y cuando el contenido de antocianinas es mayor, el efecto antioxidante aumenta.
5. Si bien las antocianinas ya se utilizan en la industria alimentaria en bebidas, nuestras muestras no fueron adecuadas para el modelo de yogur o gelatina seleccionado, excepto la muestra de BCA en jalea que tiene la mayor actividad antioxidante, esto le da potencial para ser un colorante natural funcional en este modelo alimenticio específico.

6. Se describió un método eficaz para la biosíntesis de nanopartículas de oro utilizando extracto acuoso de la zanahoria negra rico en antocianinas como agente reductor.
7. Los resultados obtenidos indican que las nanopartículas se forman dentro del extracto en las primeras 4 horas de reacción a 35°C, comparado con la síntesis del método de Turkevich, donde se utilizan 230°C para la formación de nanopartículas.
8. El análisis Uv- Vis permitió la identificación de las nanopartículas de oro mediante la presencia del plasmón superficial del oro, y a través de técnicas de caracterización como SEM, TEM y dispersión de luz, podemos corroborar los tamaños de partícula obtenidos a distintas formulaciones, y además de confirmar la formación de un composito (AuNPs- extracto de la zanahoria negra rico en antocianinas), cuyas características tienen posibles aplicaciones biológicas.

## 11.- BIBLIOGRAFÍA

- A. Akbarzadeh, D. Zare, A. Farhangi, M.R. Mehrabi, D. Norouzian, S. Tangestaninejad, M. Moghadam, N. Bararpour. «Synthesis and characterization of gold nanoparticles by tryptophane.» *Am. J. Appl. Sci.* 6 (2009): 691-695.
- A. Moores, F. Goettmann. «The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications.» *New J. Chem.* 30 (2006): 1121-1132.
- A. Tabrizi, F. Ayhan, H. Ayhan. «Gold nanoparticle synthesis and characterization.» *Hacet. J. Biol. Chem.* 37 (2009): 217-226.
- A. Tomar, G. Garg. «Short review on application of gold nanoparticles.» *Global J. Pharmacol.* 7 (2013): 34-38.
- A. Yasmin, K. Ramesh, S. Rajsekhkumar. «Optimization and stabilization of gold nanoparticles by using herbal plant extract with microwave heating.» *Nano Converg.* 1 (2014): 12.
- A.R. Vilchis-Nestor, V. Sánchez-Mendieta, M.A. Camacho-López, R.M. Gómez-Espinosa. «Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract.» *Mat. Lett.* 62 (17) (2008): 3103–3105.
- Aguilera Ortíz M, Reza Vargas MC, Chew Madinaveitia RG, Meza Velázquez JA. «Propiedades funcionales de las antocianinas.» *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* 13 (2011): 16-22.
- Alasalvar, C., M. Al-Farsi, P.C. Quantick, F. Shahidi, y R. Wiktorowicz. «Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots.» *Food Chem.* 2005 89 (2005): 69-76.
- Algarra Manuel, Fernandes Ana, Mateus Nuno, De Freitas Victor, C.G. Esteves da Silva Joaquim, Casado Juan. «Anthocyanin profile and antioxidant capacity of black carrots (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) from Cuevas Bajas, Spain.» *Journal of Food Composition and Analysis* 33 (2014): 71-76.
- Arrazola G., Herazo I., Alvis A. «Obtención y Evaluación de la Estabilidad de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) en Bebidas.» *Información Tecnológica* 25, nº 3 (2014): 43-52.
- Arts, M.J.T.J., G.R.M.M. Haenen, H.-P. Voss, y A. Bast. «Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay.» *Food Chem. Toxicol* 42 (2004): 45-49.

- Awika J. M., Rooney L.I. W., Waniska R. D. «Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties.» *Food Chemistry* 90 (2004): 293–301.
- Aysegul Kirca, Mehmet Ozkan, Bekir Cemeroglu. «Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins.» *Food Chemistry* 101 (2007): 212-218.
- Bashir Ahmada, Nabia Hafeeza, Shumaila Bashirb, Abdur Raufc, Mujeeb-ur-Rehmand. «Phytofabricated gold nanoparticles and their biomedical applications.» *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89 (2017) 89 (2017): 414-425.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. «Use of free radical method to evaluate antioxidant activity.» *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28 (1995): 25-30.
- Bridgers EN, Chinn MS, Truong VD. «Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars.» *Industrial. Crops and Products* 32 (2010): 613-620.
- C. Subramaniam, R.T. Tom, T. Pradeep. «On the formation of protected gold nanoparticles from AuCl<sub>4</sub> by the reduction using aromatic amines .» *J. Nanopart.Res.* 7 (2005): 209-217.
- C. Umamaheswari, A. Lakshmanan, and N. S. Nagarajan. «Green synthesis, characterization and catalytic degradation studies of gold nanoparticles against congo red and methyl orange.» *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 178 (2017): 33-39.
- Cárdenas, A., M. Gómez, y C. Frontana. «Relationship between the chemical structures of antioxidants and the differences in their cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) by electrochemical methods.» *J. Electroanal. Chem.* 729 (2014): 116-120.
- Casals, E., 2010. «Time evolution of the nanoparticle protein corona.» *ACS nano* 4 (2010): 3623- 3632.
- Castañeda-Ovando, A., M.d.L. Pacheco-Hernández, M.E. Páez-Hernández, J.A. Rodríguez, y C.A. Galán-Vidal. «Chemical studies of anthocyanins: A review.» *Food Chem.* 113 (2009): 859–871.
- Cevallos-Casals BA, Cisneros-Zeballos L. «Stability of Anthocyanin-based Aqueous Extract of Andean Purple Corn and Red Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants.» *Food Chem.* 86 (2004): 69-77.
- Cuerda C., Luengo L.M., Valero M.A., Vidal A.,. «Antioxidants and diabetes mellitus: review of the evidence.» *Nutrición Hospitalaria* 26, nº 1 (2011).

- Cuevas Montilla E, Arzaba MR, Hillebrand S, Winterhalter P. Montilla EC, Arzaba MR, Hillebrand S, Winterhalter P. «Anthocyanin Composition of Black Carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) Cultivars Antonina, Beta Sweet, Deep Purple, and Purple Haze.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (2011): 3385–3390.
- Cuevas Montilla Elyana, Rodríguez Arzaba Miriam, Hillebrand Silke, Winterhalter Peter. «Anthocyanin Composition of Black Carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) Cultivars Antonina, Beta Sweet, Deep Purple, and Purple Haze.» *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011): 3385–3390.
- Cuevas, Rodríguez Edith Olivia. *Evaluación del Potencial Nutacéutico de Zorzamos Silvestres y Mejoradas*. Querétaro: Tesis Doctoral- Universidad Autónoma de Querétaro, 2011.
- D. Pissuwan, S.M. Valenzuela, M.B. Cortie. «Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles.» *Trends Biotech.* 24 (2) (2006): 62-67.
- D.S. Shen, J. Mathew, D. Philip. «Phytosynthesis of Au, Ag and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*, Spectrochim.» *Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 79 (1) (2011): 254- 262.
- Dai, Y., E. Rozema, R. Verpoorte, y Y.H. Choi. «Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents.» *J. Chromatogr. A* 2016 1434 (2016): 50-56.
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. «Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability.» *Crit Rev Food Sci Nutr.* 40, n° 3 (2000): 173-289.
- Dilip Ghosh, Tetsuya Konishi. «Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function.» *Asia Pac J Clin Nutr* 16, n° 2 (2007): 200-208.
- Downham Alison, Collins Paul. «Colouring our foods in the last and next millennium.» *International Journal of Food Science and Technology* 35 (2000): 5-22.
- Ersus Seda, Yurdagel Unal. «Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier.» *Journal of Food Engineering* 80 (2007): 805–812.
- Frøytlog C., Slimestad R., Andersen Ø. M. «Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*).» *J. Chrom.* 825 (1998): 89-95.

- Fulecki, T., Francis, F. J. «Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries.» *Journal of Food Science* 33 (1968): 72-77.
- G. Doria, J. Conde, B. Veigas, L. Giestas, C. Almeida, M. Assunç~ao, J. Rosa, P.V. Baptista. «Noble metal nanoparticles for biosensing applications.» *Sensors* 12 (2012): 1657-1687.
- Gandomi, H., S. Abbaszadeh, A. Misaghi, S. Bokaie, y N. Noori. «Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions.» *LWT Food Sci. Technol.* 69 (2016): 365–371.
- García-Tejeda, Y.V., Y. Salinas-Moreno, Á.R. Hernández-Martínez, y F. Martínez-Bustos. «Encapsulation of purple maize anthocyanins in phosphorylated starch by spray drying.» *Cereal Chem. J.* 93 (2015): 130–137.
- Garzon G.A., Wrolstad R.E. «The stability of pelargonidin-based anthocyanins at varying water activity.» *Food Chemistry* 75, nº 2 (2001): 185-196.
- Garzón G.A., Wrolstad Ronald E. «Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate.» *Journal of Food Science* 67, nº 4 (2002): 1288-99.
- Garzón, Gloria Astrid. «Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds. A Review.» *Acta Biol. Colomb* 13, nº 3 (2008): 27-36.
- «Gaussian 09, revision A. 02.» *Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA*, 2009.
- Gerardi, C., y otros. «Prunus mahaleb L. Fruit extracts: A novel source for natural food pigments.» *Eur. Food Res. Technol.* 241 (2015): 683-695.
- Gil Felicísimo S. Cabrera, Michelle M. Balbin , Paul John G. Eugenio. «Green synthesis of gold nanoparticles reduced and stabilized by sodium glutamate and sodium dodecyl sulfate.» *Biochemical and Biophysical Research Communications* 484 (2017): 774-780.
- Giusti M. M., Wrolstad R.E. «Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy.» *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001: Unit F1.2.1–13.
- Gorriti Gutierrez A., Arroyo Acevedo J., Negron Ballarte L., Jurado Teixeira B., Purizaca Llajaruna H., Santiago Aquise I., Taype Espinoza E., Quispe Jacobo F. «Anthocyanins, total phenolic compounds and antioxidant activity of purple corn (*Zea mays* L.) cobs: extraction method.» *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8, nº 6 (2009): 509-518.

- Gustavo A. Molina, Angel Ramon Hernández-Martínez, Manuel Cortez-Valadez, Fernando García-Hernández, Miriam Estevez. «Effects of Tetraethyl Orthosilicate (TEOS) on the Light and Temperature Stability of a Pigment from *Beta vulgaris* and Its Potential Food Industry Applications.» *Molecules* 19 (2014): 17985-18002.
- H. Yazid, R. Adnan, S.A. Hamid, M.A. Farrukh. «Synthesis and characterization of gold nanoparticles supported on zinc oxide via the deposition-precipitation method.» *J. Chem.* 34 (2009): 639-650.
- H.N. Verma, P. Singh, R.M. Chavan. «Gold nanoparticle: synthesis and characterization.» *Vet. World* 7 (2014): 72-77.
- Hanwell, M.D., D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, y G.R. Hutchison. «Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform.» *J. Cheminform.* 4 (2012): 17.
- Hernández-Ávila Mauricio, Gutiérrez Juan Pablo, Reynoso-Noverón Nancy. «Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia.» *Salud Publica Mex* 55, nº 2 (2013): 129-136.
- Hernández-Martínez, A.R., y otros. «Stability comparison between microencapsulated red-glycosidic pigments and commercial fd&c red 40 dye for food coloring. .» *J. Mater. Sci.* 52 (2017): 5014–5026.
- Hurtado N. H., Pérez M. «Identification, Stability and Antioxidant Activity of Anthocyanins Isolated from Fruit peel of Capulí (*Prunus serotina capuli* spp (Cav) Mc. Vaug Cav.)» *Información Tecnológica* 25, nº 4 (2014): 131-140.
- J. KimLing, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and A. Plech. «Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited.» *J. Phys. Chem. B* 110 (2006): 15700-15707.
- J. Zha, C. Dong, X. Wang, X. Zhang, and X. Xiao. «Optik Green synthesis and characterization of monodisperse gold nanoparticles using Ginkgo Biloba leaf extract.» *Opt. - Int. J. Light Electron Opt* 144 (2017): 511-521.
- Jili Zhaa, Chunfa Dong, Xiangjie Wang, Xianglin Zhang, Xinhua Xiao, Xiuzhi Yang. «Green synthesis and characterization of monodisperse gold nanoparticles using Ginkgo Biloba leaf extract.» *Optik* 144 (2017): 511-521.
- K. Krishnaswamy, H. Vali, and V. Orsat. « Value-adding to grape waste : Green synthesis of gold nanoparticles.» 142 (2014): 210-220.
- Kammerer, D., R. Carle, y A. Schieber. «Detection of peonidin and pelargonidin glycosides in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by

- high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry.» *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003): 2407-2412.
- Kırca Aysegul, Mehmet Ozkan, Bekir Cemeroglu. «Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars.» *Food Chemistry* 97 (2006): 598-605.
- Kırca, A., Ozkan, M., Cemeroglu, B. «Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars.» *Food Chem* 97 (2006): 598-605.
- Lee H. S., Hong V. «Chromatographic analysis of anthocyanins.» *J. Chrom. A.* 624 (1992): 221-234.
- Lee, J., N. Koo, y D.B. Min. «Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals.» *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf* 3 (2004): 21–33.
- Lee, S. H. « Facile method for the synthesis of gold nanoparticles using an ion coater.» 434 (2018): 1001-1006.
- López-Alarcón C., Denicola A. «Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays.» *Anal Chim Acta.* 763 (2013): 1-10.
- M. Shah, D. Fawcett, S. Sharma, S.K. Tripathy, G.E. Poinern. «Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities.» *Materials* 29 (11) (2015): 7278–7308.
- M. Sharma, M. Pathak, B. Roy, A. Chand, G. Dhanda, N. Abbasi, G. Panchal. «Green synthesis of gold nanoparticles and their characterization.» *J. Mater. Nanosci.* 3 (2016): 8-10.
- M. Tan, G. Wang, Z. Ye, J. Yuan. «Synthesis and characterization of Titaniabased monodisperse fluorescent europium nanoparticles for bio-labeling.» *J. Luminesc* 117 (2003): 20-28.
- M. Zargar, A.A. Hamid, F.A. Bakar, M.N. Shamsudin, K. Shameli, F. Jahanshiri, F. Farahani. *Molecules* 16 (2011): 6667–6676.
- M.J. Lerma-Garcia, M. Avila, E.F. Simo-Alfonso, A. Rios, M. Zougagh. «Synthesis of gold nanoparticles using phenolic acids and its application in catalysis.» *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (2014): 1919-1926.
- Mahdavi, S.A., S.M. Jafari, M. Ghorbani, y E. Assadpoor. «Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review.» *Dry. Technol.* 32 (2014): 509–518.



- Mauricio Hernández-Ávila, DSc, Juan Pablo Gutiérrez, PhD, Nancy Reynoso-Noverón, DSc. «Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia.» *Salud Publica Mex* 55, nº 2 (2013): 129-136.
- Meltem Türkyilmaz, Oktay Yemis, Mehmet Özkan. «Clarification and pasteurisation effects on monomeric anthocyanins and percent polymeric colour of black carrot (*Daucus carota* L.) juice.» *Food Chemistry* 134 (2012): 1052–1058.
- Miyasawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. «Direct Intestinal Absorption Of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-Glucoside and Cyanidin-3,5-Diglucoside, Into Rats And Humans.» *J Agric Food Chem* 47 (1999): 1083-1091.
- Moldovan B., David L., Chişbora C., Cimpoi C. «Degradation kinetics of anthocyanins from European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent.» *Molecules* 17, nº 10 (2012): 11655-66.
- Molina G.A., Angel Ramon Hernández-Martínez, Manuel Cortez-Valadez, Fernando García-Hernández, Miriam Estevez. «Effects of Tetraethyl Orthosilicate (TEOS) on the Light and Temperature Stability of a Pigment from *Beta vulgaris* and Its Potential Food Industry Applications.» *Molecules* 19 (2014): 17985-18002.
- Molina, A.G., R.A. Hernández-Martínez, M. Cortez-Valadez, F. García-Hernández, y M. Estevez. «Effects of tetraethyl orthosilicate (teos) on the light and temperature stability of a pigment from *Beta vulgaris* and its potential food industry applications.» *Molecules* 2014 19 (2014).
- Molyneux, P. «The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.» *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2004): 211-219.
- Montilla, E.C., M.R. Arzaba, S. Hillebrand, y P. Winterhalter. «Anthocyanin composition of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) cultivars antonina, beta sweet, deep purple, and purple haze.» *J. Agric.Food Chem.* 59 (2011): 3385-3390.
- N. Cioffi, L. Colaianni, E. Ieva, R. Pilolli, N. Ditaranto, M.A. Angione, S. Cotrone, K. Buchholt, A.L. Spetz, L. Sabbatini, L. Torsi. «Electrosynthesis and characterization of gold nanoparticles for electronic capacitance sensing of pollutants.» *Electrochim.* 56 (2011): 3713-3720.
- P. Kumar, P. Singh, K. Kumari, S. Mozumdar, R. Chandra. «A green approach for the synthesis of gold nanotriangles using aqueous leaf extract of *Callistemon viminalis*.» *Mater. Lett.* 65 (2011): 595-597.
- P. Nalawade, T. Mukherjee, S. Kapoor. «Green synthesis of gold nanoparticles using glycerol as a reducing agent.» *Adv. Nanopart* 2 (2013): 78-86.

- P. S. Kumar, M. V. Jeyalatha, J. Malathi, and S. Ignacimuthu. «Anticancer effects of one-pot synthesized biogenic gold nanoparticles (Mc-AuNps) against laryngeal carcinoma.» *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 44 (2018): 118-128.
- Pletcher, D., R. Greff, R. Peat, L.M. Peter, y J. Robinson. «Instrumental Methods in Electrochemistry.» *Woodhead Publishing: Cambridge, UK.*, 2001.
- R. Mccaffrey, H. Long, Y. Jin, A. Sanders, W. Park, W. Zhang. «Template synthesis of gold nanoparticles with an organic molecular cage.» *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014): 1782-1785.
- R.K. Das, N. Gogoi, U. Bora. «Green synthesis of gold nanoparticles using *Nyctanthes arbortristis*.» *Biosys. Eng.* 34 (5) (2011): 615–619.
- Reuter S., Gupta SC., Chaturvedi MM., Aggarwal BB. «Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?» *Free Radical Biology and Medicine* 49 (2010): 1603-1616.
- Revilla E., Ryan J.M., Ortega M.G. «Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes.» *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998): 4592-97.
- S. Mandal, P.R. Selvakannan, S. Phadtare, R. Pasricha, M. Sastry. «Synthesis of a stable gold hydrosol by the reduction of chloroaurate ions by the amino acid, aspartic acid.» *J. Chem. Sci.* 11 (2002): 513-520.
- S. Panigrahi, S. Kundu, S. Ghosh, S. Nath, T. Pal. «General Method of synthesis for metal nanoparticles.» *J. Nanopar. Res* 6 (4) (2004): 411–414.
- S. Stopic, R. Rudolf, J. Bogovic, P. Majerić, M. Ćolić, S. Tomić, M. Jenko, B. Friedrich. «Synthesis of au nanoparticles prepared with ultrasonic spray pyrolysis and hydrogen reduction.» *Mater. Tehnol.* 47 (2013): 577-583.
- S. Wu, S. Yan, W. Qi, R. Huang, J. Cui, R. So, Z. He. «Green synthesis of gold nanoparticles using aspartame and their catalytic activity for p-nitrophenol reduction.» *Nanoscale Res. Lett.* 10 (2015): 213.
- S.K. Ghosh, T. Pal. «The effect of the interaction between particles on the surface of the nano-particles.» *Chem. Rev.* 107 (11) (2007): 4797–4862.
- S.P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha. «Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloevera* plant extract .» *Biotech. Progr.* 22 (2) (2006): 577–583.
- S.S. Shankar, A. Ahmad, M. Sastry. «Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles.» *Biotechnol. Prog.* 19 (2003): 1627–1631.

- S.S. Shankar, A. Rai, A. Ahmad, M. Sastry. «Controlling the optical properties of lemongrass extract synthesized gold nanotriangles and potential application in infrared-absorbing optical coatings .» *Chem. Mater.* 17 (2005): 566–572.
- Seda Ersus, Unal Yurdagel. «Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray drier.» *Journal of Food Engineering* 80 (2007): 805–812.
- Seeram, N.P., y otros. «Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the united states.» *J. Agric.Food Chem.* 56 (2008): 1415–1422.
- Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. «Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects.» *Mol Nutr Food Res* 53 (2009): 310-329.
- Sharma, O.P., y T.K. Bhat. «DPPH antioxidant assay revisited.» *Food Chem.* 113 (2009): 1202–1205.
- Sonia de Pascual-Teresa, Celestino Santos-Buelga, Julian C Rivas-Gonzalo. «LC–MS analysis of anthocyanins from purple corn cob.» *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82 (2002): 1003-1006.
- Soumya Menon, Rajeshkumar S., VenkatKumar S. «A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications.» *Resource-Efficient Technologies* , 2017: 1-12.
- Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE. «Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments.» *J Agric Food Chem.* 50, nº 21 (2002): 6172-81.
- T. Ahmad, M. Irfan, M.A. Bustam, S.B. Hacharjee. «Effect of reaction time on green synthesis of gold nanoparticles by using aqueous extract of *Elaise guineensis* (oil palm leaves).» *Procedia Eng.* 148 (2016): 467-472.
- T. Elavazhagan, K.D. Arunachalam. «Memecylon edule leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles.» *Int. J. Nanomed.* 6 (2011): 1265–1278.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, y D. Hawkins Byrne. «Comparison of abts, dpvh, frap, and orac assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts.» *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006): 669–675.
- Tristan F, Moul D, Rogers RBD, Ribnicky DM, Gipp WT, Cefalou. «Phytochemical Composition and Metabolic Performance-Enhancing Activity of Dietary Berries.» *J Agric Food Chem.* 56, nº 3 (2008): 654-660.

- Tristan F., Moul D., Rogers R.B.D., Ribnicky D.M., Gipp W.T., Cefaluo. «Phytochemical Composition and Metabolic Performance-Enhancing Activity of Dietary Berries.» *J Agric Food Chem.* 56, nº 3 (2008): 654-660.
- Türkyılmaz, M., O. Yemiş, y M. Özkan. «Clarification and pasteurisation effects on monomeric anthocyanins and percent polymeric colour of black carrot (*Daucus carota* L.) juice.» *Food Chem.* 134 (2012): 1052-1058.
- U.K. Parida, B.K. Bindhani, P. Nayak. «Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using onion (*Allium cepa*) extract.» *World J. Nano Sci. Eng.* 1 (2011): 93-98.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, y J. Telser. «Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.» *Int. J. Biochem. Cell Biol* 39 (2007): 44–84.
- Vishwanath Khandare, Shweta Walia, Meenakshi Singh, Charanjit Kaurb. «Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing.» *Food and Bioproducts Processing* 89 (2011): 482-486.
- Wang WD, Xu SY. «Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry.» *Journal of Food Engineering* 82 (2007): 271-275.
- Wrolstad, R.E. *Natural Food Colorants. Anthocyanins.* New York, N.Y.: Lauro GJ, Francis FJ, editors, 2000.
- X. Yang, Q. Li, H. Wang, J. Huang, L. Lin, W. Wang, D. Sun, Y. Su, J.B. Opiyo, L. Hong. «Green synthesis of palladium nanoparticles using broth of *Cinnamomum camphora* leaf.» *J. Nanopart. Res.* 12 (2010): 1589–1598.
- Y. Li, T.Y. Wu, S.M. Chen, M.A. Ali, F.M.A. Alhemaid. «Green synthesis and electrochemical characterizations of gold nanoparticles using leaf extract of *Magnolia kobus*.» *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012): 12742-12751.
- Zapata, Luz Marina. *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arandanos para se utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria.* Valencia: Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, 2014.