



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos

**CARACTERIZACIÓN DE LA OLEORRESINA DE CÚRCUMA
ENCAPSULADA CON FRUCTANOS DE *Agave angustifolia*
Haw: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ABSORCIÓN**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos
Bióticos

PRESENTA

I.B.Q. Silvia Viridiana Vargas Solano

Directoras

Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo

Dra. María Eugenia Jaramillo Flores



Yautepec, Morelos; Diciembre 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Morelos siendo las 11:00 horas del día 01 del mes de Diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CeProBi para examinar la tesis titulada:

CARACTERIZACIÓN DE LA OLEORRESINA DE CÚRCUMA ENCAPSULADA CON FRUCTANOS DE *Agave angustifolia* Haw: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ABSORCIÓN

Presentada por el alumno:

Vargas
Apellido paterno

Solano
Apellido materno

Silvia Viridiana
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	4	0	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo


Dra. María Eugenia Jaramillo Flores


Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio


Dr. Adrián Guillermo Quintero Gutiérrez


Dr. Pablo Emilio Vanegas Espinoza


Dra. Edith Agama Acevedo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio

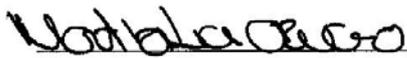
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis **“CARACTERIZACIÓN DE LA OLEORRESINA DE CÚRCUMA ENCAPSULADA CON FRUCTANOS DE *AGAVE ANGUSTIFOLIA* HAW: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ABSORCIÓN”** es responsabilidad de la **Dra. Martha Lucia Arenas Ocampo, Dra. María Eugenia Jaramillo Flores** y de la **I.B.Q. Silvia Viridiana Vargas Solano**, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos, a 07 de Diciembre del 2011

ATENTAMENTE

Directores de Tesis



Dra. Martha Lucia Arenas Ocampo

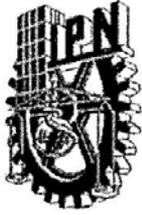


Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

Alumno



I.B.Q. Silvia Viridiana Vargas Solano



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Yauatepec, Morelos siendo el día 07 del mes de Diciembre del año 2011, el que suscribe **I.B.Q. Silvia Viridiana Vargas Solano** alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, con número de registro B091409, adscrito al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo** y **Dra. María Eugenia Jaramillo Flores** y cede los derechos del trabajo intitulado **“CARACTERIZACIÓN DE LA OLEORRESINA DE CÚRCUMA ENCAPSULADA CON FRUCTANOS DE *Agave Angustifolia* Haw: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ABSORCIÓN”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deberán reproducir el contenido textual, gráficas, o datos del trabajo, sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yauatepec-Jojutla, Km 6, Calle Ceprobi número 8; Colonia San Isidro, C.P. 62731 Yauatepec, Morelos, México, Fax: 01-(52Intl.) (735) 394 20 20 ó 01-(55) 57 29 70 00 extensión 82512, e-mail: ceprobi@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

I.B.Q. Silvia Viridiana Vargas Solano

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo. En el laboratorio de Proteínas, y en el Laboratorio de Enzimología, Ingeniería y Farmacología del desarrollo de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN bajo la supervisión de la Dra. María Eugenia Jaramillo, Dra. Liliana Alamilla Beltrán y Dra. Norma Paniagua Castro respectivamente. Para la realización de los estudios se obtuvo el apoyo económico de la beca CONACYT (332352), beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI). La investigación fue realizada con el financiamiento económico de los proyectos de la Secretaría de investigación y Posgrado SIP 20113780 y FOMIX MOR-2007-CO1-80576.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo por la oportunidad brindada en mi desarrollo profesional, por la dirección de esta tesis, por seguir enseñándome a buscar las herramientas de trabajo y que cualquier resultado depende de uno mismo, por su confianza, paciencia y apoyo en mi vida.

A la Dra. María Eugenia Jaramillo Flores por la oportunidad a mi formación profesional, por la dirección de esta tesis, por compartir sus conocimientos, por la confianza en mí, por tomarse el tiempo y la paciencia para explicar mis dudas.

A la comisión revisora de la tesis Dr. Antonio R. Jiménez Aparicio, Dr. Adrián G. Quintero Gutiérrez, Dra. Martha L. Arenas, Dra. María Eugenia Jaramillo Flores, Dr. Pablo E. Vanegas Espinoza y Dra. Edith Agama Acevedo por todos sus cuestionamientos y sugerencias realizadas para mejorar esta tesis.

A la Dra. Liliana Alamilla Beltrán y Dra. Norma Paniagua Castro por compartir parte de sus tiempos y espacios para la realización de este trabajo de investigación, y principalmente por brindarme su amistad.

A la I.Q. Rita Martínez Velarde y Bióloga María Luisa Corona Rangel por compartir sus conocimientos y sugerencias para mejorar el desarrollo de la tesis, pero muy en especial por brindarme su amistad, compañía, comprensión y por estar ahí en los momentos difíciles y también en los momentos agradables.

Al Dr. Roberto Campos Mendiola y M. en C. Lino Sánchez Segura por sus aportaciones y sugerencias realizadas para mejorar esta tesis y por su amistad.

A mis amigos de este Centro de Investigación Rubén Puga Díaz, Aide E. Corona y J. Ricardo Chávez Garibay por el apoyo y comprensión que necesitaba en los momentos difíciles y en los momentos de alegría.

A mis amigos de la generación Yadira, Isaí, Lupita, Fernando, Sandra, Israel, Vicky, Víctor, Verito y Mario por brindarme su amistad, apoyo y por los momentos divertidos que reducían el estrés de la maestría.

A mis amigos y compañeros de la ENCB Miriam, Abril, Andrea, Claudia, Janeth, Víctor, Ivonne e Iván por apoyarme en la realización de mi tesis, compartir sus tiempos y conocimientos, pero principalmente por su amistad y hacerme sentir como en casa.

A mis amigos Ana, Iván, Cristóbal, Jesús, Balfre y Edson por compartir parte de sus vidas conmigo y por su amistad.

A Josué por el apoyo, confianza, compartir parte de tu vida y principalmente por tu amistad.

DEDICATORIAS

A mi papá Gildardo gracias por ser mi ángel en donde estés y a mi mami Silvia gracias por ser mi amiga, por las enseñanzas, sacrificios y la fortaleza que una persona debe tener ante cualquier situación y que sin importar que ocurra hay que seguir adelante.

A mis hermanos Ariel, Carlos y Víctor gracias por la confianza, apoyar mis decisiones y creer en mí, pero principalmente por los momentos que hemos tenido juntos, los cuales me ayudan a decirles que no importa dónde nos estemos siempre seremos una sola familia.

A mis sobrinos Arielito, Vanesita, Dante, Shanti y Pablo solo les puedo decir que les agradezco sus juegos, sonrisas, abrazos, besos y alegrías que me dan cuando estoy con ustedes, pero en especial por ser la unión de mi familia.

Angélica gracias por ser una amiga y parte de mi familia durante este tiempo.

A Eduardo por el apoyo, la confianza y las aportaciones realizadas a mi trabajo, por la amistad y cariño que siempre me has brindado, por la motivación en mi vida, pero especialmente por ser parte de mi familia.

A la Familia Navarrete por apoyarme a estar en estos momentos aquí, por las alegrías y tristezas que hemos pasado juntos, por el cariño que cada uno me ha demostrado, pero principalmente por permitirme ser parte de su familia.

ÍNDICE

	pag
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Agave	2
2.2 Fructanos	4
2.3 Encapsulación	5
2.4 Cúrcumina	8
2.4.1 Efecto biológico	10
2.5 Capacidad antioxidante	12
2.5.1 Métodos de evaluación	13
2.6 Biodisponibilidad	14
2.6.1 Modelos de estudio	16
2.6.1.1 Modelos <i>in vitro</i>	16
2.6.1.2 Modelos <i>in vivo</i>	17
2.6.1.2.1 Modelos animales	17
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivo específicos	19
5. HIPÓTESIS	20
6. MATERIALES Y METODOS	21
6.1 Material biológico	21
6.2 Desarrollo experimental	21
6.3 Metodología	23
6.3.1 Extracción de los fructanos	23
6.3.2. Caracterización de los fructanos	23
6.3.2.1 Composición química proximal	23
6.3.2.2 Determinación de azúcares	24

6.3.2.2.1 Preparación de la solución madre	24
6.3.2.2.2 Azúcares reductores	24
6.3.2.2.3 Azúcares totales	25
6.3.2.2.4 Fructosa	25
6.3.3 Elaboración de emulsiones	27
6.3.4 Caracterización de las emulsiones	28
6.3.4.1 Determinación de color	28
6.3.4.2 Determinación de sólidos totales	29
6.3.4.3 Obtención de fotomicrografías y su análisis	29
6.3.5 Elaboración de encapsulados	29
6.3.6 Caracterización de los encapsulados	30
6.3.6.1 Determinación de color	30
6.3.6.2 Composición química de los encapsulados	30
6.3.7. Determinación de la eficiencia del encapsulado	30
6.3.7.1 Obtención de fotomicrografías y su análisis	30
6.3.7.2 Extracción de la cúrcuma de los encapsulados	30
6.3.7.2.1 Cuantificación de la cúrcuma por HPLC	31
6.3.7.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante de cúrcuma por el método por Scartezzini y col., (2006)	31
6.3.8 Evaluación de la absorción de curcumina en ratas	33
6.3.9 Análisis estadístico	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 Obtención de fructanos	35
7.2 Emulsiones	38
7.2.1 Sólidos totales y estabilidad	38
7.2.2 Determinación de color	40
7.2.3 Análisis de imágenes de las emulsiones	40
7.3 Encapsulados	42
7.3.1 Análisis de color	43
7.3.2 Análisis químicos	43
7.3.3 Eficiencia del encapsulado	45

7.3.3.1 Análisis de imágenes obtenidas por microscopía óptica de epifluorescencia	45
7.3.3.2 Cuantificación de cúrcumina por HPLC	48
7.3.4 Análisis de la capacidad antioxidante	51
7.3.5 Análisis de la absorción de cúrcumina <i>in vivo</i>	52
8. CONCLUSIONES	56
9. PERSPECTIVAS	57
10. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE CUADROS

Número	Descripción	Página
Cuadro 1.	Composición de las emulsiones utilizadas para encapsulación	27
Cuadro 2.	Análisis químico de los fructanos de <i>A. angustifolia</i>	36
Cuadro 3.	Contenido de azúcares en fructanos de <i>A. angustifolia</i>	37
Cuadro 4.	Cantidad de sólidos totales y estabilidad en las emulsiones elaboradas con oleorresina de cúrcuma y fructanos de agave	39
Cuadro 5.	Análisis químicos de los encapsulados B y C	44
Cuadro 6.	Contenido de azúcares en encapsulados B y C	45
Cuadro 7.	Eficiencia de retención de cúrcumina después del proceso de encapsulación	51
Cuadro 8.	Capacidad antioxidante de la oleorresina de cúrcuma encapsulada	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Descripción	Página
Figura 1.	Distribución del <i>Agave angustifolia</i> Haw en México	3
Figura 2.	Estructura de los fructanos de agave	4
Figura 3.	Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas	6
Figura 4.	Estructura química del complejo curcuminoide	8
Figura 5.	Proceso de absorción, transporte y eliminación de los polifenoles a través de los diferentes órganos corporales implicados	16
Figura 6.	Diagrama de flujo del desarrollo del trabajo	22
Figura 7.	Secador por aspersión Niro MOBILE MINOR TM	24
Figura 8.	Fructanos de <i>Agave angustifolia</i> Haw secados por aspersión	35
Figura 9.	Curva de calibración de azúcares	36
Figura 10.	Emulsiones elaboradas con oleorresina de cúrcuma y diferentes proporciones de fructanos de agave	38
Figura 11.	Índice de color (IC*) de las emulsiones con fructanos	40
Figura 12.	Imágenes de los glóbulos presentes en las emulsiones con fructanos	41
Figura 13.	Frecuencia del tamaño de los glóbulos en las emulsiones	42
Figura 14.	Oleorresina de cúrcuma encapsulada con fructanos de <i>A. angustifolia</i>	42
Figura 15.	Índice de color (IC*) de los encapsulados	43
Figura 16.	Fotomicrografías a 20 X de los encapsulados B antes y después de lavarse con disolventes	47
Figura 17.	Curva de calibración del estándar de cúrcumina	48
Figura 18.	Cromatograma de cúrcumina de la oleorresina de cúrcuma por HPLC	49

Figura 19. Cromatograma de cúrcumina del encapsulado B por HPLC	49
Figura 20. Cromatograma de cúrcumina del encapsulado C	50
Figura 21. Curva de calibración de trolox	51
Figura 22. Cromatogramas de la cúrcumina presente en plasma sanguíneo de ratas	53
Figura 23. Contenido de cúrcumina en plasma sanguíneo	54

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
CAA	Actividad antioxidantes celular
ABTS	ácido 2,2', azino-bis (3- etilbenzotiazolil)-6- sulfónico
α	Alfa
AACC	American Association of Cereal Chemists
β	Beta
Cm	Centímetro
CCF	Cromatografía en capa fina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
D	Día
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
Δ Abs	Diferencia de las absorbancias
Ec	Ecuación
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FOS	Fructooligosacáridos
° C	Grado Centígrado
DP	Grado de polimerización
G	Gramo
g/100 mL	Gramo por cien mililitros
g/mol	Gramo por mol
NaOH ₂	Hidróxido de sodio
H	Hora
IC*	Índice de color
Kg	Kilogramo
Kg/cm ²	Kilogramo por centímetro cuadrado
L	Litro
L/h	Litro por hora
m	Metro

μL	Microlitro
μM	Micromolar
mm	Milímetro
μm	Micrómetro
μmol trolox/g	Micromol de trolox por gramo
mg / mL	Microgramo por mililitro
mg	Miligramo
mg/kg	Miligramo por kilogramo
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
min	Minuto
nm	Nanómetro
N	Normal
PO	Parental oral
pH	Potencial de hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
TPTZ	2,3,5-tripfenil-1,3,4- triaza-2- azoniaciclopenta-1,4-dieno cloruro
mAU	Unidades de absorbancia de masa
mAU .min	Unidades de absorbancia de masa sobre minuto
v/v	Volumen por volumen

RESUMEN

La cúrcuma es un compuesto con actividad antiinflamatoria, antitumoral, anticancerígena y antioxidante, caracterizada por una alta susceptibilidad a la oxidación, por causa del pH y la luz. Una alternativa para disminuir estos efectos es la encapsulación, mediante la cual, se podría evitar la degradación del compuesto. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante y la absorción in vivo de la oleorresina de cúrcuma encapsulada con fructanos de *Agave angustifolia* Haw. Para ello se extrajeron fructanos de *A. angustifolia*, los cuales se caracterizaron mediante análisis químicos y se elaboraron emulsiones; de éstas, las de mejor estabilidad se usaron en el encapsulamiento de la oleorresina de cúrcuma con fructanos de *A. angustifolia* como material pared, en una proporción de 2:1, 3:1 y 4:1 (fructanos:oleorresina). Los encapsulados fueron caracterizados mediante análisis químicos, colorimetría, microscopía óptica de epifluorescencia y contenido de cúrcuma por HPLC. El encapsulado que presentó mejores resultados en cuanto a mantener la concentración del compuesto se le determinó la capacidad antioxidante por el método ABTS y un bioensayo por el cual se determinó la absorción de la cúrcuma. Con relación a los fructanos extraídos, éstos presentaron un alto contenido en azúcares y un contenido mínimo de cenizas, humedad, proteínas y lípidos. Con respecto a las emulsiones se observó que las relaciones 2:1, 3:1 y 4:1 mantuvieron su estabilidad durante 5 min, 21 h y 24 d respectivamente. De igual manera en los encapsulados B Y C se obtuvo contenido bajo de cenizas, proteínas y humedad. El contenido de azúcares totales fue mayor en los encapsulados B que en los C, y con respecto al contenido fructosa y glucosa se encontró que entre el 80 y 85% fue fructosa y entre el 15 y 20% fue glucosa. El índice de color no se modificó de manera significativa pero mostró una tendencia al color amarillo pálido. El análisis que se realizó mediante microscopía, mostró que los encapsulados B retuvieron una mayor proporción de la cúrcuma que los encapsulados C, y mediante la cuantificación de ésta también se observó una mayor cantidad en los encapsulados B que en los C (5109.8 y 3981.4 μg de cúrcuma/g de encapsulado respectivamente). De igual manera el encapsulado B tuvo una capacidad antioxidante de 189.77 μmol trolox/g de encapsulado. Los resultados del bioensayo mostraron que 2 h después suministrada la oleorresina de cúrcuma (165164.4 μg de cúrcuma) se obtuvo un nivel de cúrcuma en plasma de 10.23 μg de cúrcuma/mL de plasma, mientras que en el encapsulado B presento un nivel de 4.75 μg de cúrcuma/mL de plasma después de 4 h de la ingesta de 510986. μg de curcumina. Se concluyó que la absorción de la cúrcuma fue mejor para la oleorresina de cúrcuma encapsulada que para la oleorresina de cúrcuma sin encapsular.

ABSTRACT

Curcumin is a compound with anti-inflammatory, antitumor, anticancer and antioxidant activity, characterized by a high susceptibility to oxidation, pH and light. And an alternative to reduce these effects is encapsulation, whereby, it could prevent the degradation, which is a factor, among others, that may affect their bioavailability. The aim of this study was to evaluate the antioxidant capacity and in vivo absorption of turmeric oleoresin encapsulated fructans *Agave angustifolia* Haw. This is extracted fructans from *A. angustifolia* and characterized by chemical analysis, then produced better emulsions and stability were used in the encapsulation of turmeric oleoresin fructans *A. angustifolia* as wall material in a ratio of 2:1, 3:1 and 4:1 (fructans: oleoresin). The encapsulated were characterized by chemical analysis, colorimetry, optical microscopy and epifluorescence curcumin content by HPLC. When encapsulated presented better protection of curcumin, underwent determination of antioxidant capacity by ABTS method and a bioassay which determined the absorption of curcumin. With respect to the fructans extracted, has a high sugar content and a minimum content of ash, moisture, protein and lipids. With respect to emulsions, the results showed that the ratio of 2:1, 3:1 and 4:1 remained stable for 5 min, 21 h and 24 d respectively. The total sugar content was higher in B than in C encapsulated. With respect to fructose and glucose, the content was between 80 and 85% of fructose and between 15 and 20% was glucose. The color index did not change significantly but showed a tendency to pale yellow. The analysis performed by microscopy showed that the encapsulated B retained a greater proportion of the curcumin than in C, and by quantifying, it also was a higher in the B encapsulated C (5109.8 g curcumin / g of encapsulated) than in C (3981.4 g curcumin / g of encapsulated). Similarly, the B encapsulated had an antioxidant capacity of 189.77 $\mu\text{mol trolox / g}$ of encapsulated. Bioassay results showed, that 2 h after the turmeric oleoresin was supplied (165164.4 $\mu\text{g de cúrcumina}$) the plasma level of curcumin was 10.2 $\mu\text{g / mL}$ of plasma, while the encapsulated B presents a level of 4.7 $\mu\text{g of curcumin / mL}$ of plasma after 4 h of ingestion (5109.8 $\mu\text{g of curcumin}$). It is concluded that the absorption of curcumin was better for encapsulated turmeric oleoresin than in unencapsulated turmeric oleoresin.

1. INTRODUCCIÓN

Algunas enfermedades crónicas se derivan de las reacciones de oxidación que ocurren en el organismo, las cuales generan especies reactivas de oxígeno (ERO) caracterizadas por la presencia de radicales hidroxilo, superóxido, oxígeno singulete, dióxido de nitrógeno y óxido nítrico. En este sentido, los compuestos bioactivos provenientes de plantas capaces de reducir estas reacciones de oxidación, ejercen una función que beneficia la salud, como es el caso de la cúrcuma. La cual es extraída de los rizomas de la planta *Cúrcuma longa* L. y que además se ha observado que disminuye la peroxidación lipídica en células hepáticas ocasionada por estrés oxidativo, lo cual está relacionado con el metabolismo de la grasas. Sin embargo se ha reportado que el suministro de la cúrcuma por vía oral presenta una baja biodisponibilidad.

La encapsulación representa una opción útil para proteger los compuestos bioactivos de reacciones de oxidación, sin embargo para que ésta sea exitosa es necesario elegir cuidadosamente la matriz encapsulante que favorece el proceso dependiendo del material a encapsular. En este sentido, se han usado diferentes materiales como polisacáridos, gomas y proteínas y más recientemente se ha considerado el empleo de los fructanos como material encapsulante.

Estos compuestos están formados principalmente por polímeros de fructosa, unidos a una molécula de glucosa; y una alternativa de obtención de estos compuestos es el Agave, debido a que es su principal fuente de carbohidratos de reserva, además esta planta se encuentra distribuida en gran parte del territorio mexicano. Sin embargo aún es necesario realizar estudios que evidencien y confirmen las propiedades de estas moléculas, con fines de encapsulación.

En este sentido, el presente trabajo tuvo por objeto encapsular oleorresina de cúrcuma utilizando fructanos de *Agave angustifolia* Haw y evaluar su capacidad antioxidante y absorción *in vivo*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Agave

El género *Agave* es endémico de América y se distribuye desde Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluyendo las islas del Caribe (Bahamas, Aruba, Curacao y Trinidad y Tobago). Se conocen aproximadamente 310 especies de *Agave*, de las cuales 272 se encuentran en México (Morales, 2008); por lo cual, se considera el país con mayor número de taxa y le sigue Estados Unidos, Cuba y Guatemala. Por otra parte, se distribuye en más del 75 % dentro del territorio mexicano; sin embargo, hay regiones que presentan más especies que otras, por lo que se considera que tiene una distribución asimétrica (García, 2007). Es común observarlos en sitios soleados, pedregosos, en las laderas de las montañas o barrancas de los ríos y a veces en lugares planos, siempre sobre terrenos con buen drenaje.

En el caso de la especie *Agave angustifolia* Haw (espadín), el mejor desarrollo se da en sitios abiertos, con alta intensidad lumínica, con suelos profundos a medianos, de textura ligeramente arenosa - limosa, nunca arcillosa, de color pardo-oscuro a blanquecino-calcáreo, con cantidades moderadas de materia orgánica (Figura 1). Su presencia en sitios secos es común, sin embargo en climas templados, su distribución se limita a los sitios de humedad intermedia y muy raramente a lugares altamente húmedos (Sistema Producto Maguey-Mezcal 2007).

El agave también ha sido de gran importancia económica y cultural para diversos pueblos indígenas, quienes los utilizan como fuente de alimento: para elaboración de barbacoa, como substrato para cultivo de hongos comestibles, para la alimentación de rumiantes (González y col., 2005); bebidas fermentadas: tequila, pulque, mezcal, bacanora.

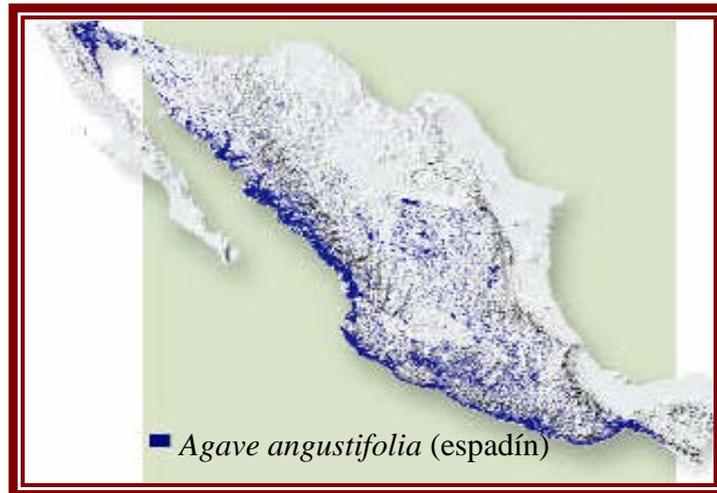


Figura 1. Distribución del *Agave angustifolia* Haw en México (Conabio, 2002)

Adicionalmente, por diferentes medios se ha mencionado el uso del “aguamiel” para curar las inflamaciones, además de que se refiere que las hojas pueden ser usadas para curar la gastritis, diabetes, granos enfermedades del sistema digestivo, endocrino y desordenes del sistema respiratorio y cútaneo; como combustible se ha reportado su uso para la elaboración de bioetanol.

Las fibras duras extraídas de las hojas ó pencas se han usado para elaborar cordeles, canastos, ropa, sandalias y cepillos (García, 2007), además de emplearse para la elaboración de papel (González y col., 2005), en la fabricación de muebles, relleno para colchones, ladrillos y composta (González y col., 2005), para elaborar jabón o para la fabricación de esteroides u otras hormonas sexuales (CONAFOR, 2011).

Los agaves son plantas perennes (García, 2007) y tienen como principal reserva de carbohidratos polímeros de fructosa (fructanos), en lugar de glucosa como los cereales (Bautista y col., 2001) y otras plantas. En el caso del *A. angustifolia* se caracteriza por su roseta surculosa extendida en forma radial, con tallo de 20 a 90 cm de longitud; hojas maduras generalmente de 60 a 120 por 3.5 a 10 cm, lineares o lanceoladas, rígidas, fibrosas, jugosas, de ascendente a horizontal, color verde pálido a gris glauco, planas o cóncavas de arriba, convexas de abajo, angostas y gruesas hacia la base, margen derecho ondulado, algunas veces

cartilaginosos; dientes pequeños de 2 a 5 mm de longitud, de puntas débiles curvadas o variando a flexas; panículas de 3 a 5 m de alto, algunas veces bulbíferas; los pedúnculos más grandes que la panícula. Brácteas triangulares angostas y secas; ramas de la umbela de 10 a 20 cm; flores verdes a amarillas de 50 a 65 mm de longitud (Morales, 2008).

2.2. Fructanos

Los fructanos son carbohidratos no reductores formados por fructosilpolímeros, con un grado de polimerización que varía entre 2 y 60 unidades (Biedrzycka y Bielecka, 2004), dependiendo de su origen (vegetal o microbiano) pueden ser lineales, ramificados o cíclicos (Roberfroid, 2005) y se les considera carbohidratos de cadena corta (Englyst y Hudson, 1996) o de bajo grado de polimerización (DP) (Roberfroid, 2000).

En el caso de los fructanos de agave están formados por cadenas de D-fructosa unidas con enlaces β -(2-1), (Figura 2) y presentan ramificaciones formadas con enlaces β -(2-6) enlace típico de los levanos, además de que tienen una molécula de glucosa unida por un enlace α -(2-1) y α -(2-6) es decir la glucosa se encuentra de manera interna (tipo neoserie) (López y col. 2003)

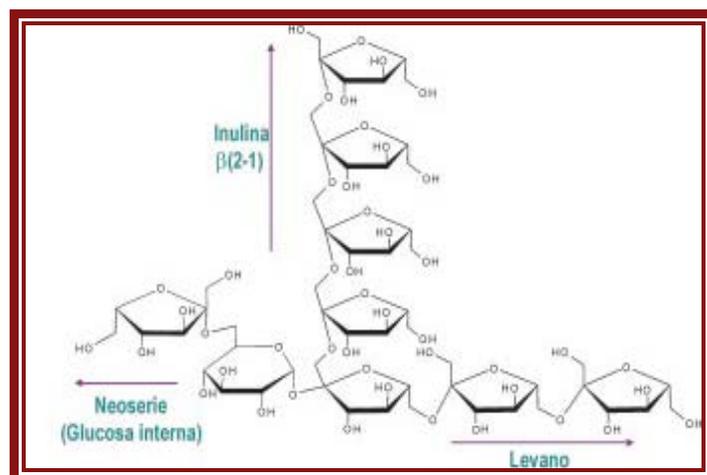


Figura 2. Estructura de los fructanos de agave (López y col., 2003)

Los fructanos más ampliamente estudiados y de mayor uso a nivel industrial son la inulina y los fructooligosacáridos (FOS) (Biedrzycka y Bielecka, 2004).

En una evaluación de *A. angustifolia* procedente de Oaxaca, se identificaron por cromatografía en capa fina (CCF) fructanos de alto y bajo DP, sacarosa, glucosa y fructosa; de este último carbohidrato se obtuvieron 300 mg/ g de muestra. Sin embargo, después de la extracción de los fructanos y al ser deshidratado por aspersion se obtuvo un rendimiento del $20 \pm 4.88\%$ de fructanos de alto DP y $1.4 \pm 0.08\%$ de fructooligosacaridos (FOS); con las siguientes características: polvo blanco; sabor neutro a ligeramente dulce; alta estabilidad física, química y microbiológica; soluble en agua a temperatura ambiente y aumenta su solubilidad al incrementar la temperatura (Sistema Producto Maguey-Mezcal 2007).

Debido a las características que les confiere su estructura química (grado de polimerización), los facultan para su empleo como aditivos en alimentos; ya que tienen la capacidad de formar geles cremosos al ser calentados en medios acuosos y ser estables en intervalos de pH entre 4 - 7 y a temperaturas de 5°C a 140°C aproximadamente; además, como cualquier carbohidrato, los fructanos pueden ser parcialmente hidrolizados con ácidos y los enlaces β -(2-1) los hacen indigeribles cuando son consumidos por los seres humanos y por lo tanto presentan un bajo valor calórico, considerándose como fibra dietética (Chacón, 2006).

2.3. Encapsulación

La encapsulación es un proceso mediante el cual partículas líquidas, sólidas o gaseosas son introducidas en una matriz que puede ser o no homogénea (Gharsallaoui y *col.*, 2007, Lozano, 2009), la cual tiene como función estabilizar el material núcleo y controlar su liberación; separar componentes incompatibles en una formulación; proteger de las reacciones de oxidación los componentes sensibles a la luz, humedad, calor y enmascarar ó preservar sabores y aromas (Dziezak, 1988; Pedroza-Islas, 2002; Yáñez-Fernández y *col.*, 2002; Lozano, 2009).

En el encapsulado, la porción activa es llamada núcleo ó fase interna, el material encapsulante es llamado recubrimiento, material de pared ó matriz encapsulante y puede variar tanto en espesor como en el número de capas. La forma de las cápsulas es generalmente esférica con una pared continua rodeando la fase interna (Shahidi y Han, 1993; Gharsallaoui y *col.*, 2007; Lozano, 2009), que puede ser llena (Figura 3a) o parcialmente llena creando una microcápsula hueca (Figura 3b) ó puede tener la fase interna distribuida en la matriz encapsulante con una estructura en donde el núcleo se encuentre distribuido en la microcápsula (forma de espuma) y la cubierta puede permanecer intacta (Figura 3c) ó con una estructura abierta que pareciera formar una red (Figura 3d).

También se pueden presentar encapsulados con el núcleo disperso en la matriz encapsulante y sirva como recubrimiento, formando una capsula llena (Figura 3e) ó en la periferia de la matriz (Figura 3f). Además de la forma esférica en los encapsulados, también puede presentarse la forma irregular (Figura 3g). Estas características se ven fuertemente influenciadas por la estructura del material original encapsulante (Shahidi y Han, 1993; Gharsallaoui y *col.*, 2007; Lozano, 2009).

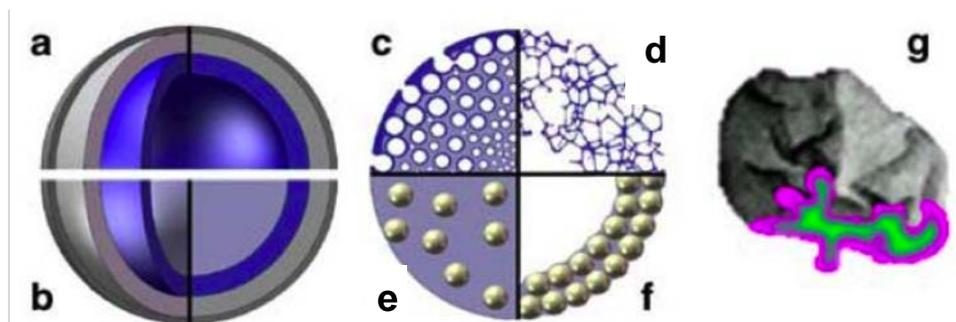


Figura 3. Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas. a: núcleo lleno; b: núcleo parcialmente lleno o hueco; c: núcleo en forma de espuma; d: núcleo en forma de red; e: núcleo disperso en la matriz; f: núcleo disperso en la matriz alojado en la periferia (Vehring, 2008)

Por otra parte existen diversos métodos de encapsulación los cuales se pueden clasificar en: a) Procesos físicos o mecánicos: secado por aspersion y encapsulación por lecho fluidificado. B) Procesos químicos: Coacervación

compleja, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica y atrapamiento en liposomas (Shahidi y Han, 1993; Gibbs y col., 1999; Gouin, 2004). Sin embargo, la selección del método de encapsulación depende de los costos, propiedades del material a encapsular, del tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación y los mecanismos de liberación.

El secado por aspersión es el método más usado para encapsular ingredientes alimenticios y compuestos bioactivos. Esto se debe a que aunque la temperatura del aire caliente introducido oscile entre 100 y 200 ° C, el tiempo de exposición a éste es muy corto (5 a 30 s) y las gotas del líquido atomizado se calientan solo hasta 40 ° C (López, 2010); además este proceso es el más económico y el tamaño de las partículas obtenidas es menor a 100 µm. Sin embargo, esta característica es influenciada por las condiciones del proceso, la preparación de la emulsión y del material encapsulante (Pedroza-Islas, 2002; Gouin, 2004).

Otro factor importante en la encapsulación es el material encapsulante, debido a que influye en las propiedades de flujo y en la vida útil del material deshidratado. Para elegir el material encapsulante adecuado se debe considerar la resistencia, la permeabilidad, la facilidad de aplicación y la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica (Pedroza y col., 1999).

Debido a las características antes mencionadas, las matrices encapsulantes más empleadas son almidón y derivados: maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa; gomas: arábica, mezquite, alginato de sodio; ceras: parafinas, grasas; gelatina: proteína de soya, caseinatos, suero de leche y zeína (Pedroza y col., 1999). Sin embargo, otra alternativa como material encapsulante son los fructanos.

Arenas-Ocampo y col., (2009) reportó en un estudio realizado a encapsulados de carotenoides de cempaxuchil, que los fructanos de agave conservaban aproximadamente un 75% de los carotenoides encapsulados, presentando una protección similar a la observada con la maltodextrina (77%). Este resultado coincide con lo reportado por Saenz y col., (2009), quienes observaron que la raftilina (fructanos de las raíces de la achicoria), al igual que la maltodextrina

disminuyen la degradación de los compuestos bioactivos del nopal (*Opuntia ficus-indica*), durante el almacenamiento a 60 ° C.

2.4. Cúrcumina

La cúrcumina fue aislada por primera vez en 1815; su estructura química fue determinada en 1870 en forma cristalina, posteriormente se identificó como 1,6-heptadieno-3,5-diona-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil) o diferuloilmetano (Aggarwal y Sung, 2009) y en 1910 fue sintetizado su esqueleto (Goel y col., 2008; Aggarwal y Sung, 2009; Anand y col., 2010).

La cúrcumina, demetoxicúrcumina (cúrcumina II), bisdemetoxicúrcumina (cúrcumina III) (Figura 4) forman un complejo llamado curcuminoide y son extraídos del tubérculo de la planta *Cúrcuma longa* L. A este tubérculo se le conoce con diversos nombres como jengibre amarillo, azafrán de la India, raíz amarilla, Kacha haldi y Ukon (Ravindran, 2006).

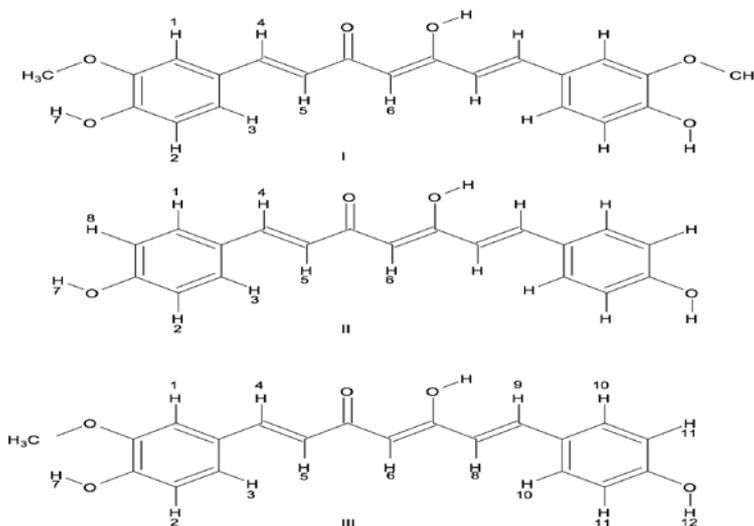


Figura 4. Estructura química del complejo curcuminoide. I: Curcumina; II: Bisdemetoxicúrcumina; III: Demetoxicúrcumina (Scotter, 2009)

La cúrcumina comercial tiene un contenido total de 77% de curcumina, seguida por la demetoxicúrcumina (17%) y en menor proporción bisdemetoxicúrcumina (3%) (Aggarwal y col., 2003; Ravindran, 2006). El extracto tumérico de cúrcuma

tiene la característica de presentar coloración café a un pH ácido, de color amarillo a pH neutro y de color naranja a rojizo a un pH alcalino; además, es insoluble en agua y éter, pero soluble en metanol, etanol, dimetilsulfóxido y acetona (Goel y *col.*, 2008).

La cúrcumina derivada de los extractos de cúrcuma pueden estar en forma β -dicetónica y enólica, esta última se presenta principalmente en solución, con la capacidad de detectar radicales (Shen y Ji, 2007).

Tradicionalmente, el extracto de cúrcuma se presenta como una emulsión de aceite de aspecto lechoso, tal vez debido a la naturaleza hidrofóbica de sus componentes bioactivos (curcuminoides), por su facilidad de interactuar con los fosfolípidos (Began y *col.*, 1999; Marczylo y *col.*, 2007), surfactantes (Tonnesen, 2002), proteínas (Kumar y *col.*, 2002) y ciclodextrina (Salmaso y *col.*, 2007).

Debido a que no presenta efectos tóxicos en la salud, se emplea en la industria alimentaria como colorante natural, en productos como quesos y mostaza. De esta manera, incorporada en los alimentos se pueden consumir aproximadamente 0.1 mg/kg de peso corporal diario, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo, la dosis recomendada del extracto de cúrcuma es de 0.44 a 2.2 Kg con un contenido de aproximadamente 38 a 180 mg de cúrcumina, durante un periodo de 4 meses. Y para aumentar las concentraciones biliares en pacientes sanos, se requiere una dosis de 20-40 mg, aunque no hay evidencia de que pacientes con enfermedades hepáticas tengan alguna alteración (Ramos y *col.*, 2008).

La cúrcumina después de ser suministrada oralmente en el organismo, se transforma a dihidrocúrcumina y tetrahidrocúrcumina. Este último tiene actividad antioxidante y es estable a pH neutro y básico. Ambos compuestos *in vivo* son convertidos en monoglucuronidos de la cúrcumina, siendo sus principales metabolitos (Pan y *col.*, 1999).

Por otra parte en un estudio realizado por Mesa y *col.*, (2000), describen que después de suministrar 50 mg/kg de cúrcumina intravenosa a ratas; observaron

en bilis que 5 h después de la dosis, se excretó el 50 y 60% de esta. Además de que se identificaron metabolitos biliares de la cúrcumina por espectrometría de masas: 52% glucurónidos de la tetracúrcumina, 42% glucurónidos de la hexahidrocúrcumina y 6% de ácido dihidroferúlico.

De igual manera mediante métodos que simulan las condiciones del estómago (pH 1-2) y del intestino delgado (pH 6.5), se ha observado una degradación lenta (Tonnesen y Karlsen, 1985), mientras que Wang y *col.*, (1997) han mostrado una degradación del 90% incubando la cúrcumina a pH 7.2 y 37 °C con regulador de fosfatos, comprobando con esto que la modificación química es pH dependiente. Considerándose que la degradación de la curcumina parece ser que ocurre por un mecanismo oxidativo, ya que la presencia de ácido ascórbico, N-acetilesteína o glutatión previene completamente su degradación a pH 7.4 (Oetari y *col.*, 1995; Wang y *col.*, 1997).

Con relación a su disponibilidad metabólica, Mesa y *col.*, (2000) reportaron la absorción gastrointestinal de la cúrcumina por difusión pasiva, en ratas que recibieron dosis orales de entre 2.5 a 1000 mg/kg y que 48 h después habían absorbido el 65% y excretado el 35%; resultados similares se obtuvieron con la administración intraperitoneal de cúrcumina. Por otra parte Anand y *col.*, (2010) reportaron que la biodisponibilidad *in vivo* de la cúrcumina suministrada oralmente, es degradada si no está encapsulada.

2.4.1 Efecto biológico

La cúrcumina ha demostrado tener actividad antiinflamatoria en modelos animales (rata y ratón), con inflamación aguda y crónica, en los cuales se inhibió la fosfolipasa-2 (para impedir su fosforilación), la ciclooxigenasa-2 y la lipooxigenasa-5 (para alterar su mecanismo de transcripción), promoviendo una disminución de la respuesta inflamatoria y parte de la respuesta inmune generada por el organismo pero sin irritar el tracto gastrointestinal, ni generar efectos a nivel del sistema nervioso central (Aggarwal y Harikumar, 2008).

En la actualidad se investigan otras propiedades farmacológicas importantes como la antiproliferativa, antitumoral, incluyendo la cicatrización de heridas, úlceras, artritis y anticancerosa (Mesa y col., 2000; Ramos y col., 2008). En cuanto a células cancerosas se ha comprobado un efecto preventivo y curativo de extractos acuosos, sobre la división de estas células; así mismo, se ha observado un mayor efecto con la mezcla de curcumina y flavonoides que con la curcumina sola, con relación al cáncer de mama y de pulmón (Ramos y col., 2008).

Por otra parte en estudios relacionados con la actividad antioxidante de la cúrcumina indican que previene la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos y en membranas de eritrocito (Sugiyama y col., 1996; Kaul y Krishnakantha, 1997); este tipo de protección es muy similar a la presentada por la vitamina E contra el estrés oxidativo en células hepáticas (Cohly y col., 1998).

El estrés oxidativo en células hepáticas se ha relacionado con sus funciones en el metabolismo de las grasas y en la biotransformación de xenobióticos y sustancias tóxicas (Quiles y col., 1998; Mesa y col., 2000). También se ha observado que la curcumina unida a micelas de fosfatidilcolina inhibe la dioxigenación de ácidos grasos inducida por la lipooxigenasa 1, comprobando que con 8.6 μM de curcumina inhibe el 50% de la peroxidación del ácido linoleico (Began y col., 1999). Además ejerce una potente acción antioxidante sobre los ácidos grasos poliinsaturados de órganos animales *in vitro* (Kaul y Krishnakantha, 1997; Began y col., 1999).

Con respecto a la aterosclerosis que es una enfermedad multifactorial en la que existen alteraciones del metabolismo lipídico vascular, se ha observado que la cúrcumina disminuye el nivel de los peróxidos lipídicos plasmáticos, moléculas que juegan un papel importante en la patogénesis de dicha enfermedad. Ramírez y col., (1995) demostraron que la cúrcumina contribuye a disminuir la susceptibilidad de la oxidación de los LDL (lípidos de baja densidad); adicionalmente, Chen y Huang (1998) reportaron una inhibición de la proliferación de las células del músculo liso vascular, y Olajide (1999), reportó un efecto antitrombótico. Lo anterior aunado a que se ha comprobado que el 17- α -estradiol puede detener la oxidación de las LDL (Dittrich y col., 1999), podría explicar el

mecanismo de acción de la cúrcumina en la prevención de la aterosclerosis. Adicionalmente, Awasthi y *col.*, (1996), observaron que la cúrcumina protege de la aparición de cataratas originadas por la peroxidación lipídica en el ojo.

2.5 Capacidad antioxidante

Los radicales libres son átomos que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos ya que tienden a robar un electrón de moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha sustrae el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que destruye las células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando daño a moléculas (Avello y Suwalsky, 2006).

Algunas especies reactivas de oxígeno (ERO) son radicales como el superóxido (O_2^-), hidroxilo (HO.), óxido nítrico (NO.), y otras especies no son radicales como el oxígeno singulete (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito (O=N-O-O), oxígeno atómico (O), ozono (O_3) y dióxido de nitrógeno ($.NO_2$) (Hansberg, 2009).

El HO. es una de las especies más reactivas que se conocen. Por otro lado, el 1O_2 y el O_3 no son radicales pero son muy oxidantes. Por lo que la reactividad es una característica intrínseca de cada especie de oxígeno y no se caracteriza por ser o no un radical (Avello y Suwalsky, 2006; Hansberg, 2009).

Las ERO son indispensables para la diferenciación celular y para la muerte celular programada (Ramos y *col.*, 2008). Por lo que su toxicidad depende de su concentración y del contexto en el que se producen (Hansberg, 2009).

Con este fin, nuestro cuerpo produce moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otros compuestos. El sistema de defensa antioxidante está constituido por compuestos de naturaleza enzimática como son: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y compuestos de naturaleza no

enzimática como: vitamina E, β -caroteno, vitamina C, glutathion reducido, albúmina, flavonoides y curcumina (Troncoso, 2003; Kuskosky, 2005). Estas enzimas tienen la capacidad de desarmar a los radicales libres sin desestabilizarse.

2.5.1 Métodos de evaluación

Actualmente existen diversos métodos *in vitro* o *in vivo* para determinar la actividad antioxidante, los cuales son basados en su capacidad para captar radicales libres. En los métodos *in vitro* se encuentran: DPPH que tiene la capacidad para reducir el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), ABTS que tiene la capacidad para reducir el radical ácido 2,2', azino-bis (3- etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) (Troncoso, 2003; Kuskosky, 2005) y TPTZ que tiene la habilidad de reducir 2,3,5-triphenil-1,3,4- triaza-2-azoniaciclopenta-1,4-dieno cloruro (TPTZ) a una forma ferrosa (Troncoso, 2003; Kuskosky, 2005; Chuquimia y col., 2008).

A pesar del amplio uso de estos productos químicos en las pruebas de actividad antioxidante, su capacidad para predecir la actividad *in vivo* no se ha demostrado; esto es debido a que en estos ensayos no se reflejan las condiciones fisiológicas como la biodisponibilidad, la captación, el metabolismo de los antioxidantes y el sustrato biológico (Mermelstein, 2008).

Entre los métodos *in vivo* se encuentra el CAA (actividad antioxidantes celular), propuesto por Wolfe y Liu., (2007). Este método toma en cuenta aspectos de la captación celular, la distribución y el metabolismo de compuestos antioxidantes (Mermelstein, 2008).

Los sistemas biológicos son mucho más complejos que los simulados en el laboratorio con los compuestos químicos, además que los compuestos antioxidantes pueden operar a través de múltiples mecanismos. Esto hace que los modelos con animales y con humanos sean mejores métodos para la determinación de la capacidad antioxidante; sin embargo, es importante realizar primero un análisis con los métodos químicos y después proseguir con los

sistemas biológicos, debido a que estos últimos elevan el costo de la investigación y requieren de mayor tiempo para su realización (Mermelstein, 2008).

Generalmente cuando se estudia un compuesto que presente beneficios a la salud, como la cúrcumina que presenta capacidad antioxidante, se realizan estudios de digestibilidad ó de biodisponibilidad, por métodos *in vitro* o *in vivo*; sin embargo la biodisponibilidad requiere de más tiempo para su realización, debido a que es más completo que el estudio de digestibilidad (Sandmann y Mitchell, 2001; Kopsell y Kopsell 2006).

2.6. Biodisponibilidad

La biodisponibilidad se puede definir como la cantidad disponible de un nutrimento para el organismo, con la finalidad de que pueda ejercer sus funciones fisiológicas; en este proceso se engloba a la absorción, distribución, metabolismo y excreción del nutrimento (Serra y Aranceta, 2006). Debido a esto, es fundamental que los compuestos sean biodisponibles para que los beneficios que se les confieren, estén presentes para el consumidor.

En el caso de los compuestos fenólicos, los efectos benéficos dependen de: diversidad estructural; factores genéticos y agronómicos; procesado y almacenamiento en la industria; y de la biodisponibilidad. La cual varía ampliamente entre el 1 y 100%, dependiendo del tipo de polifenol; porque influye en la etapa de digestión y absorción (Martínez y col., 2000).

El proceso de digestión se inicia en la cavidad oral, al ingerir un alimento éste es mecánicamente fraccionado y lubricado con saliva antes de entrar en el estómago, posteriormente es mezclado con ácido clorhídrico, pepsina, y lipasa gástrica que son secretadas en la luz intestinal, dando como resultado la liberación parcial de los polifenoles; sin embargo, se dificulta caracterizar la biodisponibilidad de éstos en cada etapa, partiendo del hecho de que es difícil determinar con exactitud la cantidad y tipo de fenoles que se ingieren con la dieta. Adicionalmente, las formas metabólicas que circulan en sangre y llegan a los

órganos, no siempre desarrollan la misma actividad biológica y el mismo intervalo de acción que sus formas nativas (Duthie y *col.*, 2003).

En este sentido, Gee y *col.*, (1998) mencionaron que la mayoría de los compuestos fenólicos se encuentra en los alimentos en forma de ésteres, glucósidos o polímeros y que generalmente los glucósidos resisten la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al duodeno. Scalber y Williamson (2000) demostraron que el metabolismo de los polifenoles presenta aspectos comunes para los diferentes grupos de compuestos fenólicos; por otra parte, Lamuela y *col.*, (2005) reportaron que la absorción y metabolismo se ve influenciada por la solubilidad (liposolubles o hidrosolubles), por la unión con azúcares o ácidos orgánicos, o el grado de polimerización, el pH gástrico e intestinal, las fermentaciones intestinales, la excreción biliar y el tiempo de tránsito en el tubo digestivo.

El proceso de la absorción se inicia en el intestino delgado con la entrada del quimo, éste es asociado con la liberación de secreciones del páncreas y la bilis en la luz intestinal, donde la acidez del quimo es neutralizada por el bicarbonato, y enzimas hidrolíticas que degradan aún más los componentes de los alimentos. Las lipasas luminales hidrolizan los triglicéridos, fosfolípidos y ésteres, pero las sales biliares son necesarias para la partición de los productos lipofílicos en micelas mixtas (Hollander y Ruble, 1978).

Los compuestos fenólicos durante la absorción pueden pasar al metabolismo de fase I: donde pueden ser hidrolizados ó desconjugados. Ó al metabolismo de fase II, dentro del enterocito: donde pueden ser conjugados mediante reacciones de metilación, glucuronidación, sulfatación y glutatiónización. Las reacciones que ocurren en el metabolismo de fase II, ocurren con mayor frecuencia en el hígado; ya que su finalidad es aumentar la polaridad de las sustancias exógenas, para facilitar al organismo su excreción (Figura 5) (Hong y Mitchell, 2006).

Figura 5. Proceso de absorción, transporte y eliminación de los polifenoles a través de los diferentes órganos corporales implicados (Soler, 2009)

2.6.1 Modelos de estudio

Los factores que afectan o benefician la biodisponibilidad pueden ser estudiados por métodos *in vitro* ó *in vivo*.

2.6.1.1 Modelos *in vitro*

En este modelo se simulan los procesos digestivos, aislando células intestinales y segmentos intestinales. Los cuales representan modelos para el estudio de características específicas y de regulación. Estos modelos se han utilizado para investigar los efectos de la especiación química, matriz de los alimentos, accesibilidad y transporte intestinal, metabolismo de componentes de los alimentos y suplementos. Sin embargo, es importante señalar que no se ve influenciada por muchos factores que pueden afectar el receso digestivo y de absorción *in vivo*. Estos factores son principalmente: adecuadas mezclas, molienda, tránsito de la matriz a lo largo del epitelio de la mucosa, alteraciones en la luz intestinal, contenido de enzimas digestivas y sales biliares en respuesta a la cantidad y composición del alimento (Minekus y *col.*, 1995).

2.6.1.2 Modelos *in vivo*

Estos modelos de estudio son útiles, una vez que se han realizado las pruebas *in vitro*. En estos modelos se pueden utilizar animales y humanos.

2.6.1.2.1 Modelos animales

Los modelos animales presentan diversas ventajas para investigar los problemas nutricionales de los humanos, como son: la capacidad de inducir una dieta con deficiencia y excesos, administrar radioisótopos, recoger tejidos de interés, e inducir enfermedades crónicas. También se han realizado estudios tratando de conocer la absorción, metabolismo y la función de los carotenoides en diversos animales como son: ratón, rata, jerbo, hurón, primates, aves y anfibios (Lee y *col.*, 1999). Por otra parte también se han utilizado ratas como modelos biológicos en estudios farmacocinéticos de nanopartículas de curcumina encapsulada con polivinil (Shaikh y *col.*, 2009).

De acuerdo Failla y Chitchumronchokchai (2005) se considera que las ratas son un modelo preferido para estudiar las consecuencias fisiopatológicas de un suministro inadecuado de un nutrimento esencial, debido a que la deficiencia de este puede ser inducida.

3. JUSTIFICACIÓN

La cúrcumina es un compuesto proveniente de la cúrcuma, utilizado en la industria alimentaria como pigmento natural. Además por su capacidad de captar radicales libres y disminuir el estrés oxidativo del ser humano, se ha utilizado en el mejoramiento de la salud, por la relación entre el exceso de radicales libres y la generación de enfermedades crónicas.

Sin embargo, este es un compuesto lábil a diferentes factores físicos y químicos cuyo efecto puede disminuir su absorción y utilización por el organismo. Debido a esto, se postula la encapsulación con fructanos, como un método que ayudaría a su protección y la conservación de su capacidad antioxidante. En este sentido, existen reportes que mencionan la capacidad y el uso de este polisacárido, como material de pared para la encapsulación y protección de compuestos bioactivos.

Como fuente de fructanos entre otros tantos vegetales, se encuentra el agave que es una planta de amplia distribución en México y cuyo metabolismo genera estos compuestos como carbohidratos de reserva energética.

El estado de Morelos es uno de los estados que cultiva el *Agave angustifolia* Haw y no lo puede utilizar para la obtención de bebidas fermentadas como el tequila o mezcal, debido a las normas que protegen la comercialización de estos y solo son utilizados los que provienen de los estados protegidos por la “Denominación de Origen”. Por tal motivo, se ha considerado importante el uso de los fructanos derivados del *A. angustifolia* en la encapsulación de la oleorresina de cúrcuma, como una alternativa para el uso de éstos, que puede ayudar en la prevención de la degradación de la cúrcumina y a mantener su absorción.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante y la absorción *in vivo* de la oleorresina de cúrcuma encapsulada con fructanos de *Agave angustifolia* Haw.

4.2 Objetivo específicos

- Extraer y caracterizar fructanos de *A. angustifolia*, para la encapsulación de la oleorresina de cúrcuma
- Formular y caracterizar las emulsiones a base de fructanos de *A. angustifolia*, para la encapsulación de la oleorresina de cúrcuma.
- Caracterizar los encapsulados de la oleorresina de cúrcuma con fructanos de *A. angustifolia* mediante análisis químicos, microscopia óptica de epifluorescencia y HPLC.
- Determinar la capacidad antioxidante de la cúrcumina encapsulada con fructanos de agave.
- Determinar la absorción *in vivo* de la cúrcumina encapsulada.

5. HIPÓTESIS

El encapsulamiento de la oleorresina de cúrcuma utilizando fructanos de *Agave angustifolia* Haw, ayuda a mejorar la absorción de la cúrcumina.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Material biológico

- Las plantas de agave fueron proporcionadas por el Centro de Acopio de Agave de Morelos y colectadas en el mes agosto del 2010 de una plantación ubicada en el municipio de Tlalquitenango, Morelos.
- La Oleorresina de cúrcuma L001 fue donada por SENSIENT Colors S.A de C.V. Con una concentración de 165 mg/g de oleorresina.
- Las ratas Wistar machos con un peso de 250 g, fueron proporcionadas por el bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, campus Zacatenco.
- El método usado para el bioensayo fue de acuerdo al reglamento del comité de bioética de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN.

6.2 Desarrollo experimental

En la figura 6 se puede observar el diagrama de trabajo que se siguió para el desarrollo de la tesis. En éste se observa el proceso para obtener y caracterizar fructanos de *A. angustifolia*, formular y caracterizar las emulsiones de oleorresina de cúrcuma elaboradas a base de fructanos; además de caracterizar los encapsulados de olerresina de cúrcuma con fructanos de Agave.

“Piña” de *A. angustifolia*

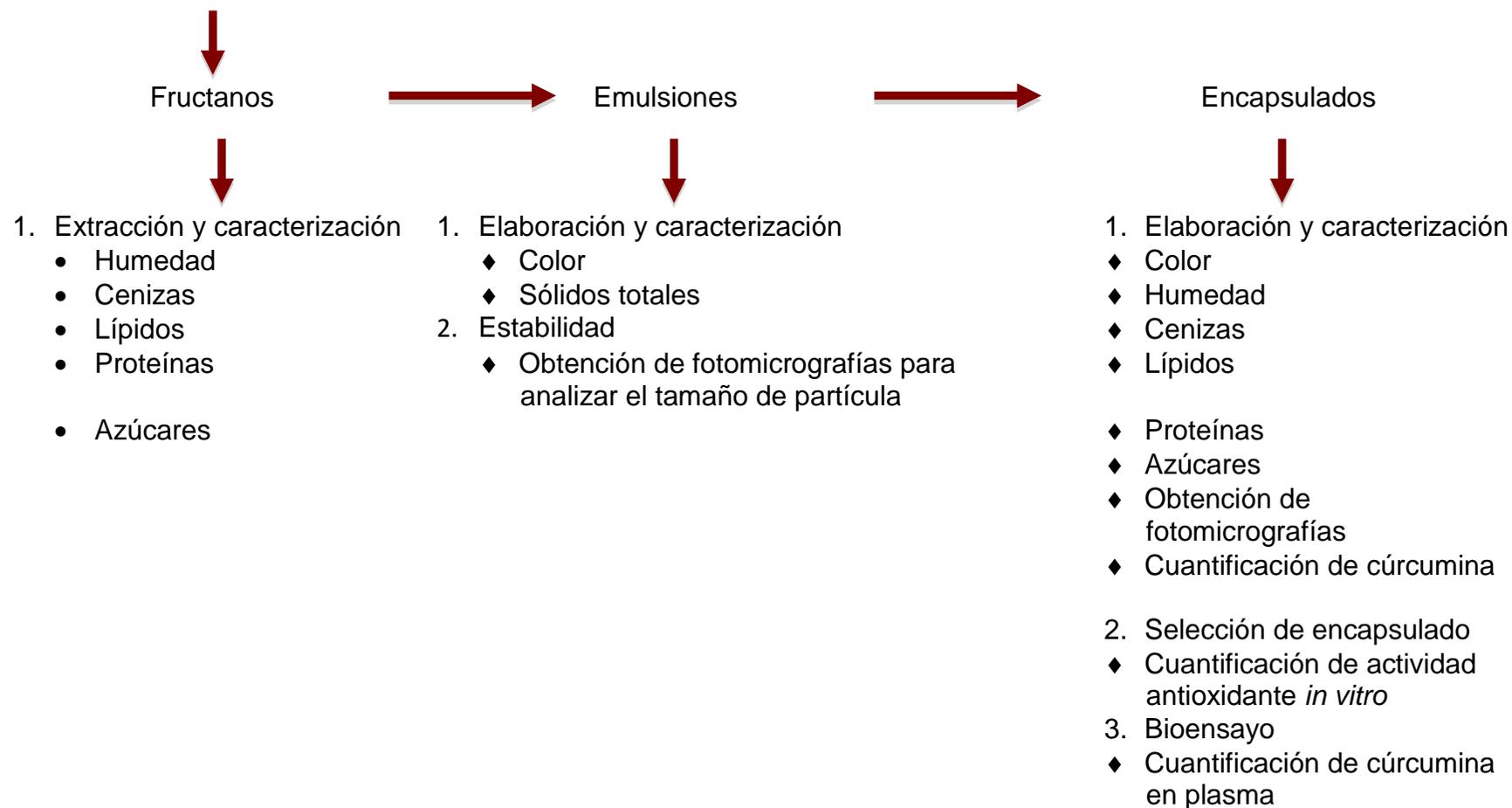


Figura 6. Diagrama de flujo del desarrollo del trabajo

6.3 Metodología

6.3.1 Extracción de los fructanos

La extracción de fructanos del Agave, se realizó de acuerdo al método descrito por Madrigal y Sangronis, (2007), con modificaciones en algunas etapas del proceso como la molienda, la extracción del jugo, la neutralización, la purificación y refinación. El proceso se inició con el jimado del *Agave*, el cual consistió en cortar y retirar las pencas y extraer “la piña” o el tallo del suelo, posteriormente la piña fue cortada para obtener fragmentos menores a 10 cm de largo y ancho, después se seleccionaron 6 kg libres de daño físico y de plagas los cuales se lavaron 2 veces con agua de la llave. Los trozos de piña seleccionados se molieron en una licuadora tipo industrial (International, México) y se colocaron en un recipiente al cual se le adicionaron 6 L de agua purificada, después la piña se calentó a 80 ° C durante 10 min, moviendo constantemente para obtener una mejor distribución del calor y evitar reacciones indeseables en el proceso (reacciones de Maillard). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se exprimió el bagazo manualmente con ayuda de un lienzo para obtener el jugo; después se ajustó el pH del jugo a 6 con CaOH_2 y se dejó en reposo 2 h hasta observar la formación de un precipitado. Finalmente el jugo se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min y el sobrenadante obtenido fue secado con un secador por aspersión en contra corriente (Niro MOBILE MINOR TM Spray dryer, Dinamarca) (Figura 7), con una alimentación de 1.2 L/h, temperatura de entrada y salida de 180 - 80 ° C respectivamente y presión de 1.2 Kg/cm².

6.3.2. Caracterización de los fructanos

6.3.2.1 Composición química proximal

La composición química se determinó usando las técnicas de la AACC, (2000) para Humedad (44-16), Cenizas (08-01), Lípidos (30-25) y Proteínas (46-13).



Figura 7. Secador por aspersión Niro MOBILE MINOR™ Spray dryer

6.3.2.2 Determinación de azúcares

La determinación de azúcares reductores, azúcares totales y fructosa se realizó de acuerdo a la técnica de Ting (1956).

6.3.2.2.1 Preparación de la solución madre

Se pesaron 2 g de los fructanos y se adicionaron 10 mL de etanol al 80%, después se colocó la muestra a ebullición durante 5 min y se dejó en reposo durante 24 h, posteriormente se filtró por medio de un cartucho de celulosa y se realizó extracción de lípidos en un equipo (Buchi, Suiza) utilizando hexano como disolvente, durante 4 h a 80 ° C. Se eliminó la mayor cantidad del disolvente y se adicionaron 10 mL de crema de alumbre, se filtró y se llevó a un volumen de 10 mL.

6.3.2.2.2 Azúcares reductores

Se transfirió 1 mL de la solución madre de los fructanos en un matraz aforado de 100 mL de capacidad y se adicionaron 5 mL de la solución de ferricianuro de potasio [4 g de ferricianuro + 160 g de Na_2CO_3 + 150 g de Na_2HPO_4 / L], después

se colocó en baño maría a ebullición durante 20 min y se enfrió con agua corriente. Se adicionaron 10 mL de ácido sulfúrico 2 N y se agitó hasta eliminar completamente el gas. Se adicionaron 4 mL de la solución de arseniomolibdato de amonio [50 g de $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 3 g de Na_3AsO_4 + 21 mL de H_2SO_4 / L] y se mantuvo en reposo durante 10 min, después se llevó a aforo con agua destilada y se dejó reposar durante 15 min.

Finalmente se calibró el espectrofotómetro (Shimadzu UV-Vis, Japón) con agua destilada y se leyó la muestra a 515 nm, utilizando agua destilada como testigo. Esta técnica se realizó por triplicado. Para la elaboración de las curvas tipo, se prepararon soluciones de glucosa y fructosa que contenían 0.020, 0.040, 0.060, 0.080, 0.100, 0.120 y 0.140 g del azúcar en un volumen de 100 mL de agua. Posteriormente se procedió a realizar el método descrito a las temperaturas de 55 y 100 ° C. La curva tipo se obtuvo graficando la absorbancia contra el contenido de azúcar (g/100 mL) en el programa Excel (Microsoft ® Excel ® 2008 para Mac, Versión 12.0).

6.3.2.2.3 Azúcares totales

Para esta determinación se transfirieron 10 mL de la solución madre de los fructanos y 10 mL de ácido clorhídrico-agua 1:1 (v/v) en un vaso de precipitado, se dejó reposar 18 h y después se ajustó el pH entre 5 y 7 con una solución de NaOH_2 10 N y NaOH 1 N. Después se realizó el método antes descrito para la determinación de azúcares reductores (6.3.2.2.2), realizándolo por triplicado.

6.3.2.2.4 Fructosa

La determinación de fructosa de los fructanos fue realizada de acuerdo con el método antes descrito para la determinación de azúcares reductores en la sección 6.3.2.2.2, con modificaciones en las condiciones utilizadas para el baño maría (55 ° C durante 30 min), por triplicado.

El cálculo para determinar azúcares totales, azúcares reductores, fructosa y glucosa se realizó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Azúcares reductores

$$k = c/a \dots \text{Ec. 1}$$

Donde:

k = Proviene del valor de K de la curva tipo a 100 °C

c = Concentración en g de azúcares reductores/100 mL de la muestra líquida

a = Absorbancia de la solución

El valor de k se designa como K para calcular la concentración de diferentes azúcares.

$$S = K * A * D \dots \text{Ec. 2}$$

Donde:

S = Concentración de azúcares totales

K = Proviene del valor de K de la curva tipo

A = Absorbancia de la muestra

D = Factor de dilución

Fructosa

Los valores de k_f y k_g provienen de la fructosa y glucosa oxidada a 55 °C. Y se obtienen de la curva tipo de los 2 azúcares.

$$G + F = S \dots \text{Ec. 3}$$

$$G / Q + F = L \dots \text{Ec. 4}$$

Donde:

G = Cantidad de glucosa en muestra

F = Cantidad de fructosa en muestra

S = Cantidad de azúcares totales

L = Fructosa aparente

Q = Radio entre k_g y k_f (k_g/k_f)

La fructosa aparente se calcula como la ec. 2, sustituyendo L por S y k_f por K . Y la solución de la ec. 3 y 4 se obtienen de la ec. 5.

$$G = (S - L) * Q / Q-1 \dots \text{Ec. 5}$$

6.3.3 Elaboración de emulsiones

Se prepararon emulsiones con 3 proporciones de fructanos:oleorresina de cúrcuma de la siguiente manera: 2:1 (emulsión A), 3:1 (emulsión B) y 4:1 (emulsión C) (Cuadro 1). La fase continua se elaboró mezclando agua, jugo de agave y sacarosa durante 5 min a 60 rpm en una agitadora magnética (Thermo Scientific Cimarec, USA). La fase dispersa se elaboró mezclando aceite y lecitina durante 5 min a 60 rpm. Después ambas fases fueron mezcladas con un homogenizador (Virtis 45, USA) durante 5 min a 18 000 rpm, en ausencia de luz y en un baño de hielo. Posteriormente se adicionó oleorresina de cúrcuma a la mezcla y se colocó nuevamente en el homogenizador durante 10 minutos a 18 000 rpm, manteniéndose la mezcla en ausencia de luz y en un baño de hielo. La estabilidad fue medida por el tiempo que tardaron las emulsiones en separarse nuevamente en 2 fases, esta prueba se realizó por triplicado.

Cuadro 1. Composición de las emulsiones utilizadas para encapsulación

Emulsión	Fase continua			Fase dispersa		
	Agua (mL)	Sacarosa (g)	Fructanos (g)	Aceite (mL)	Lecitina (mL)	Oleorresina de cúrcuma (mL)
A	69.3	4.95	14.85	8.25	0.99	0.99
B	59.4	4.95	24.75	8.25	0.99	0.99
C	49.5	4.95	34.65	8.25	0.99	0.99

Se utilizaron fructanos de agave extraídos en el CeProBi, Oleorresina de cúrcuma (L001 Sensient Colors S.A de C.V.), sacarosa grado analítico (Merk), agua destilada, lecitina de soya (Pronat ultra) y aceite de maíz (La gloria).

6.3.4 Caracterización de las emulsiones

6.3.4.1 Determinación de color

Para la determinación de color se calibró el colorímetro (MILTON ROY Diano Color Products Color Mate, USA) usando un estándar blanco (Serial 4FB4186006), posteriormente se adicionaron 3 mL de la muestra en una celda de vidrio y se obtuvieron los parámetros L, a, b del modelo CIE-Lab, en el cual el parámetro L corresponde a la claridad o brillo, mientras que a y b corresponden a la cromaticidad.

El parámetro a define al componente rojo (+) y verde (-). El parámetro b define al componente amarillo (+) y azul (-). Con lo cual se determinó el índice de color IC* descrito por Vignoni y col., (2006), de acuerdo a la ecuación 1. El análisis fue realizado por triplicado.

$$IC^* = \frac{a \cdot 1000}{L \cdot b} \quad \text{Ec. 1}$$

El IC* por sus características puede utilizarse como una variable de control de la calidad organoléptica de los alimentos; la escala de valores y colores es la siguiente:

- ✚ IC* entre -40 y -20, su valor relaciona los colores que van desde el azul-violeta al verde profundo.
- ✚ IC* entre -20 y -2, su valor relaciona los colores que van desde el verde profundo al verde amarillento.
- ✚ IC* entre -2 y +2, su valor relaciona los colores que van desde el verde amarillento al amarillo pálido.
- ✚ IC* entre +2 y +20, su valor relaciona los colores que van desde el amarillo pálido al naranja intenso.
- ✚ IC* entre +20 y +40, su valor relaciona los colores que van desde el naranja intenso al rojo profundo.

6.3.4.2 Determinación de sólidos totales

Esta determinación se realizó con la finalidad de verificar que las emulsiones estuvieran en el intervalo de 25 a 50% de sólidos totales, para poder utilizarse en el secador por aspersion.

Para conocer los sólidos totales se pesaron 2 g de la muestra en una termobalanza (OHAUS MB200,USA) y fue programada durante 30 min a 130 ° C. La cantidad de sólidos totales se obtuvo mediante el equipo y el análisis se realizó por triplicado (Kirk y *col.*, 1996).

6.3.4.3 Obtención de fotomicrografías y su análisis

Se realizó utilizando un microscopio óptico (Nikon ECLIPSE 90, Japón), acoplado a un cabezal electrónico digital con una cámara de video. Se colocó 1 gota de la emulsión en un portaobjeto y se observó con el microscopio a un aumento de 10 X, después se capturaron 15 imágenes mediante el programa Metamorph (V 5.0), para obtener un archivo en formato jpg. Las imágenes capturadas fueron procesadas con el programa Image J (1.44 p), en el cual se midió el área de cada glóbulo para conocer el tamaño, distribución y frecuencia de la emulsión (se realizó el mismo procedimiento para cada emulsión).

6.3.5 Elaboración de encapsulados

Las emulsiones elaboradas anteriormente y que presentaron la mayor estabilidad fueron utilizadas para la encapsulación mediante un secador por aspersion en contra corriente.

Para esto se empleó la metodología descrita por Arenas-Ocampo y *col.*, (2009), con modificaciones en la temperatura de entrada y salida. Las condiciones del equipo fueron: alimentación de 1.2 L/h, temperatura de entrada 180 ° C, temperatura de salida de 80 ° C y presión de 1.2 Kg/cm².

6.3.6 Caracterización de los encapsulados

6.3.6.1 Determinación de color

El color de los encapsulados se determinó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.3.4.1. Utilizando 5 g del encapsulado para cada análisis.

6.3.6.2 Composición química de los encapsulados

La composición química de los encapsulados se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 6.3.2.1 y 6.3.2.2.

6.3.7. Determinación de la eficiencia del encapsulado

6.3.7.1 Obtención de fotomicrografías y su análisis

La fluorescencia de la cúrcuma se midió mediante la técnica utilizada por Vargas y *col.*, (2010), con modificaciones en los lavados con disolvente y la ruptura del encapsulado propuestos por Quintanilla (2008). Para esto se colocaron los encapsulados en un portaobjeto y fueron observados con microscopía óptica y de epifluorescencia, utilizando un microscopio óptico a 40 X, después se hizo una prueba de lavado de los encapsulados con etanol al 96% y cloroformo, posteriormente se volvieron a observar los encapsulados con el microscopio óptico con las condiciones antes descritas. Finalmente los encapsulados lavados se colocaron en una cinta adhesiva, se les aplicó presión manual (con el objetivo de romper la capsula) y observaron por microscopía óptica y de epifluorescencia bajo las condiciones antes descritas.

6.3.7.2 Extracción de la cúrcuma de los encapsulados

Se pesó 1 g del encapsulado y se adicionaron 3 mL de agua, después se agitó la muestra durante 1 min a 60 rpm en una agitadora magnética (Thermo Scientific Cimarec), posteriormente se adicionaron 3 mL de acetona y se agitó la muestra con las condiciones antes descritas, finalmente se separó el precipitado del

extracto y éste fue filtrado a través de una membrana de nylon con poro 0.45 µm. Se realizó este mismo procedimiento para ambos encapsulados.

6.3.7.2.1 Cuantificación de la cúrcuma por HPLC

Se realizó por el método descrito por Guerra- Vargas y *col.*, 2001. Para esto, se prepararon soluciones con el estándar de cúrcuma (Sigma Aldrich) a diferentes concentraciones (0,12.5, 25, 50, 75 y 100 µg / mL). Las soluciones del estándar y las muestras (extracto del encapsulado B, extracto del encapsulado C y oleorresina de cúrcuma) se colocaron en el porta muestra del cromatógrafo (Varian 920 LC, USA) con un detector en arreglo de fotodiodos para auto inyectado. La fase utilizada para la elución isocrática de las muestras fue 35% metanol, 75% acetonitrilo y 7% tetrahidrofurano, a un flujo de 1 mL/min, el volumen de inyección fue de 20 µL (loop) y el tiempo de corrida fue de 50 min. Utilizando una columna C18 de 15 cm x 0.25 mm (Omni Spheric-5) y la detección fue realizada a 440 y 450 nm. El programa empleado fue Galaxie Chromatography Data System. Todos los disolventes utilizados fueron grado HPLC y filtrados a vacío a través de una membrana de 0.2 µm, las muestras y el estándar de cúrcuma fueron filtradas con una membrana de 0.45 µm. Con los valores obtenidos del estándar de cúrcuma se realizó una curva tipo en el programa Excel (Microsoft ® Excel ® 2008 para Mac, Versión 12.0), para conocer la concentración de cúrcumina presente en las muestras.

6.3.7.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante de curcumina por el método por Scartezzini y *col.*, (2006)

Para esto, se pesaron 6.6×10^{-3} g de persulfato de potasio y 3.84×10^{-2} g del radical ABTS (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-carboxílico-2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), se colocaron en un recipiente color ámbar para evitar la degradación del radical y después se disolvieron en 10 mL de agua destilada, se mezclaron con un agitador (vortex) y se dejó en reposo la solución durante 16 hrs. Posteriormente se tomaron 0.5 mL de la solución madre de ABTS y se colocaron en un matraz volumétrico, se llevó hasta un volumen de 50 mL en

un matraz aforado con etanol anhidro, se leyó la solución de ABTS en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm y se ajustó hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 .

Después de que la solución de ABTS alcanzó la absorbancia requerida, se tomaron 990 μL de la solución y se mezclaron con 10 μL de la muestra ó con soluciones de estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-carboxílico) a 0, 250, 500, 750, 1000, 1200 y 1500 μM para conocer las concentraciones en la curva de tipo en el programa Excel (Microsoft [®] Excel [®] 2008 para Mac, Versión 12.0).

Finalmente se tomaron las lecturas de absorbancia de las muestras en intervalos de 1 a 7 min, utilizando acetona como testigo. Se emplearon las ecuaciones 6, 7 y 8 para obtener el % de inhibición y conocer la capacidad antioxidante de las muestras.

$$\Delta \text{ Abs} = \frac{(\text{Abs } T_{0 \text{ muestra}} - \text{Abs } T_{F \text{ muestra}})}{\text{Abs } T_{0 \text{ muestra}} - [\text{Abs } T_{0 \text{ solvente}} - \text{Abs } T_{F \text{ solvente}} / \text{Abs } T_{0 \text{ solvente}}]} \dots \text{ Ec. 6}$$

Donde:

$\Delta \text{ Abs}$ = Diferencia de las absorbancias despue de la muestra y el solvente

$\text{Abs } T_{0 \text{ muestra}}$ = Absorbancia de la muestra en el tiempo 0

$\text{Abs } T_{0 \text{ muestra}}$ = Absorbancia de la muestra en el minuto 5

$\text{Abs } T_{0 \text{ solvente}}$ = Absorbancia del solvente en el tiempo 0

$\text{Abs } T_{0 \text{ solvente}}$ = Absorbancia del solvente en el minuto 5

$$\% \text{ de inhibición} = \Delta \text{ Abs} * 100 \dots \text{ Ec. 7}$$

Donde:

% de inhibición = Capacidad que tiene la muestra para poder reducir el radical ABTS

$$\text{Concentración de} = [(y - 0.97) / 4.48] * D * (V \text{ total} / W \text{ muestra}) \dots \text{ Ec. 8}$$

Donde:

y = % de inhibición

D = Factor de dilución

V total = Volumen total de la muestra (mL)

W muestra = Peso de la muestra (g)

6.3.8 Evaluación de la absorción de cúrcumina en ratas

Se utilizaron 3 ratas Wistar (machos; de 200 a 250 g) para cada tratamiento. Los tratamientos suministrados fueron: Oleorresina de cúrcuma (1), Oleorresina de cúrcuma encapsulada con fructanos de *A. angustifolia* (2) y testigo negativo (3). Para esto, se extrajo la sangre de cada rata por punción retro orbital a las 0, 2, 4 y 6 h. Después de haber obtenido la sangre de las ratas, se alimentó 1 g de encapsulado en 0.5 mL de agua por vía intragástrica (Parental oral: PO) a cada rata del tratamiento "1"; para el caso del tratamiento "2", se alimentó 1 mL de la oleorresina de cúrcuma a cada rata y para el tratamiento "3" no se suministró tratamiento de alimento a ninguna rata.

La sangre obtenida de las ratas incluidas en cada tratamiento se colocaron en un tubo con heparina (Inhepar, PiSA® Farmaceutica Mexicana), posteriormente se centrifugó a 3500 rpm a 5 ° C, durante 5 min para obtener el plasma, al cual se le adicionó 1 mL de acetona. La mezcla del plasma con la acetona fue centrifugada a 10 000 rpm durante 5 min y se extrajo el sobrenadante. Finalmente el sobrenadante obtenido se inyectó en el HPLC, siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3.7.2.1.

6.3.9 Análisis estadístico

Los parámetros estadísticos se calcularon utilizando el paquete estadístico Sigma-Plot, versión 11. Realizando una prueba t-student para los análisis de la caracterización de los encapsulados y cuantificación de la capacidad antioxidante. Y una prueba ANOVA de una vía para la caracterización de las emulsiones, cuantificación de cúrcumina por HPLC y la evaluación de la absorción de

cúrcumina, cuando se encontraron diferencias significativas en las variables medidas, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de fructanos

Se obtuvieron fructanos de agave secados por aspersión (Figura 8). Los fructanos obtenidos fueron de color blanco y solubles en agua a temperatura ambiente, lo cual coincide con la información descrita por Chacón (2006) y Madrigal (2007).



Figura 8. Fructanos de *Agave angustifolia* Haw secados por aspersión

Mediante el análisis químico proximal, se observó que el contenido de humedad para los fructanos de *A. angustifolia* fue de 2 g/ 100 g (Cuadro 2), lo cual puede favorecer su conservación. Este contenido de humedad es menor al reportado por Vargas (2009), quien obtuvo 2.65% de humedad en fructanos de piña de *A. salmiana*.

Por otra parte, el contenido de cenizas en los fructanos fue de 0.83 g/ 100 g, el cual fue mayor al reportado por Vargas (2009), quien obtuvo 0.15% en *A. salmiana* L., este resultado probablemente se debe a que hay una mayor presencia de minerales en los fructanos de *A. angustifolia* que en los fructanos de *A. salmiana*, y/o al método utilizado, en el cual al precipitar con etanol se obtienen fructanos más puros.

Cuadro 2. Análisis químico de los fructanos de *A. angustifolia*

Muestra	Humedad (g/100 g muestra)	Proteínas (g/100 g muestra)	Lípidos (g/100 g muestra)	Cenizas (g/100 g muestra)
Fructanos de <i>A. angustifolia</i> finos	2±0.1	0.07± 0.1	1±0	0.83±0.15

Media de tres repeticiones ± desviación estándar

En la figura 9 se muestra el ajuste de la curva de calibración obtenida a partir de glucosa y fructosa a 55 y 100 ° C, las cuales se realizaron para determinar la cantidad de azúcares totales, azúcares reductores y fructosa presente en los fructanos.

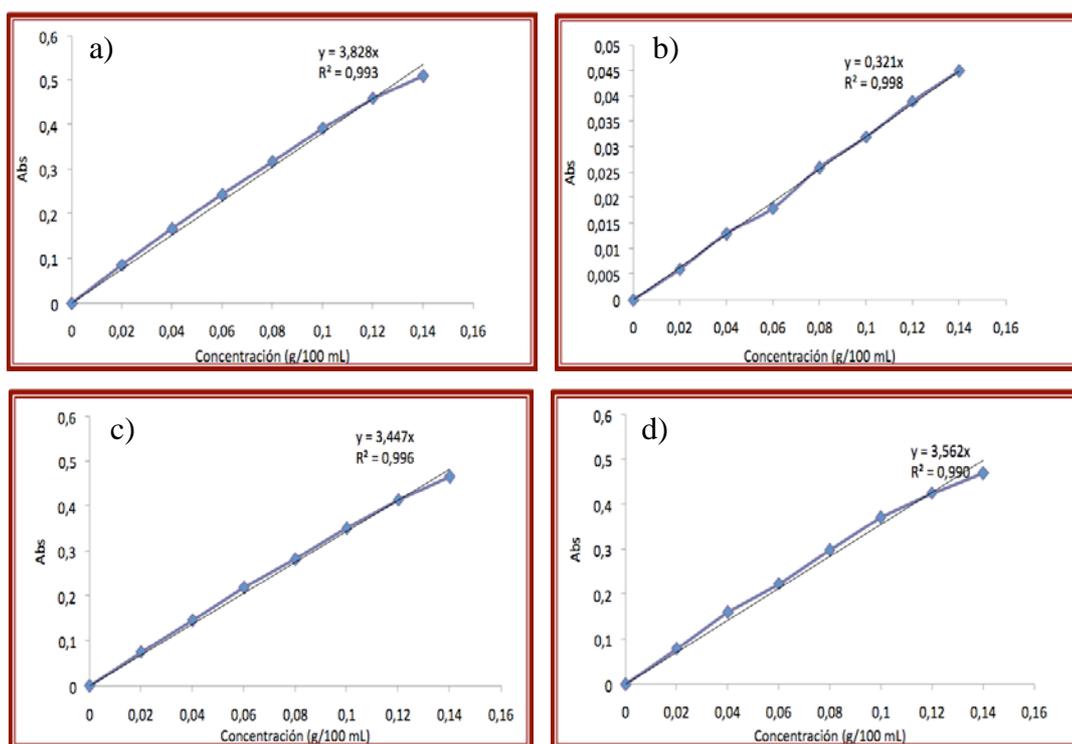


Figura 9. Curva de calibración de azúcares. a) Fructosa a 55 ° C; b) Glucosa a 55 ° C; c) Fructosa a 100 ° C; d) Glucosa a 100 ° C.

Respecto a los azúcares totales en los fructanos de *A. angustifolia* se obtuvieron 3.6 g/100 mL de muestra, que corresponde al 96.1% de azúcares totales en los fructanos (Cuadro 3), lo cual es lógico si se considera que los fructanos están compuestos por polímeros de fructosa y una molécula de glucosa.

Por otra parte el contenido de azúcares reductores para los fructanos fue de 2 g/100 mL de muestra. Esto podría estar relacionado con la capacidad de unirse a otros compuestos mediante su carbón anomérico (Voet y Voet, 2006), la cual puede ser aprovechada en la elaboración de las emulsiones que se ocuparon para encapsular la oleorresina de cúrcuma.

En cuanto al contenido de monosacáridos presente en los fructanos, se obtuvieron 1.64 g /100 mL de muestra de fructosa y 0.4 g /100 mL muestra de para glucosa. Es importante resaltar el mayor contenido de fructosa que de glucosa encontrado, debido a que la principal reserva de carbohidratos de los agaves son polímeros de fructosa con una molécula de glucosa unida a esta cadena (Bautista-Justo y col., 2001).

Cuadro 3. Contenido de azúcares en fructanos de *A. angustifolia*

Muestra	Azúcares totales (g/100 mL)	Azúcares reductores (g/100 mL)	Fructosa (g/100 mL)	Glucosa (g/100 mL)
Fructanos de <i>A. angustifolia</i>	3.6±0.2	2± 0.34	1.64±0.15	0.4±0.15

Media de tres repeticiones ± desviación estándar

7.2 Emulsiones

7.2.1 Sólidos totales y estabilidad

Las emulsiones (Figura 10) presentaron diferencias estadísticamente significativas en la estabilidad y en el contenido de sólidos totales. Así, la emulsión A (relación 2:1 fructanos: oleorresina de cúrcuma) presentó un 25 % de sólidos totales y el menor tiempo de estabilidad, el cual fue 0.003472 días (d) respecto a la emulsión B y C (Cuadro 4). Es importante mencionar que esta formulación (A) fue descartada porque no presentó la cantidad de sólidos totales necesarios (30 a 50 % de sólidos totales) para tener un rendimiento adecuado al momento de obtener los encapsulados.

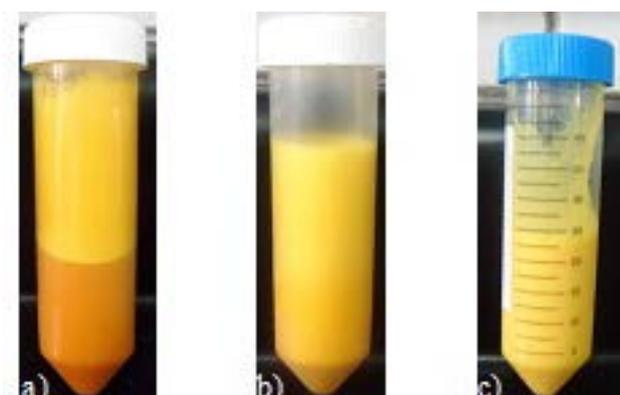


Figura 10. Emulsiones elaboradas con oleorresina de cúrcuma y diferentes proporciones de fructanos de agave. a) Emulsión A; b) emulsión B; c) emulsión C.

En la emulsión B con una relación 3:1, se incrementó: el % de sólidos totales a 41.3% y la estabilidad a 0.958 d. Mientras que la emulsión C con una relación 4:1, obtuvo el mayor contenido de sólidos totales el cual fue de 48% y un tiempo de estabilidad de 24 d, considerándose como la emulsión con mayor tiempo de estabilidad.

Cuadro 4. Concentración de sólidos totales y estabilidad en las emulsiones elaboradas con oleorresina de cúrcuma y fructanos de agave

Determinación	Sólidos totales (%)	Estabilidad (d)
Emulsión A	25 ±0.173 ^a	0.003472 ± 0.0002 ^a
Emulsión B	41.3± 0.513 ^b	0.958 ± 0.0212 ^b
Emulsión C	48±0.252 ^c	24 ± 0.1 ^c

Media de tres repeticiones ± desviación estándar, diferentes letras entre las filas para la determinación de sólidos totales y estabilidad indican diferencia significativa

Por lo anterior se decidió usar las emulsiones B y C que están dentro del intervalo de 30 a 50 % de sólidos totales necesarios, para no tener un rendimiento bajo al momento de obtener los encapsulados.

Es importante mencionar que la emulsión C fue la más estable, lo cual puede estar relacionado con una mayor presencia de fructanos, de acuerdo a lo descrito por Chacón (2006), quien reportó que los fructooligosacáridos tienen la capacidad de estabilizar emulsiones y espumas cuando se encuentran en una proporción del 1 al 5% en medio acuoso.

Por su parte Aranberri y *col.* (2006) mencionan que a mayor cantidad del polímero (fructanos), más estables serán las emulsiones debido a que la adición de estos polímeros hidrosolubles, aumenta la viscosidad de la fase continua y disminuye la movilidad de las gotas, logrando reducir la probabilidad de que dos gotas se encuentren y se agreguen. Pero si la concentración de los polímeros en la emulsión es menor, ocurre un efecto inverso al mencionado, provocando un proceso de inestabilidad

En este caso, probablemente la inestabilidad de las emulsiones pueda ser atribuida al proceso de “creaming” (en el cual la densidad del aceite es menor al presentado por la fase acuosa y la fase oleosa se queda en la superficie de la emulsión), al engrosamiento de las gotas y/o a la coalescencia (se fusionan las

gotas pequeñas para formar gotas más grandes), de acuerdo con lo descrito por Aranberri y col., (2006).

7.2.2 Determinación de color

Se observaron diferencias significativas en el IC* calculado para la oleoresina de cúrcuma y las 3 emulsiones. De esta manera se obtuvo un IC* de 28 para la oleoresina; por otra parte la emulsión A que contenía la menor cantidad de fructanos presentó el menor IC* con un valor de 2.37, que corresponde al amarillo pálido (Figura 11); para el caso de la emulsión B que tuvo mayor cantidad de fructanos a comparación de la emulsión anterior, se alcanzó un IC* de 3.913.

Este mismo comportamiento de alcanzar un mayor IC* al incrementar la cantidad de fructanos, se observó en la emulsión C; en donde se obtuvo un IC* de 7.67, que correspondiente con un amarillo más intenso.

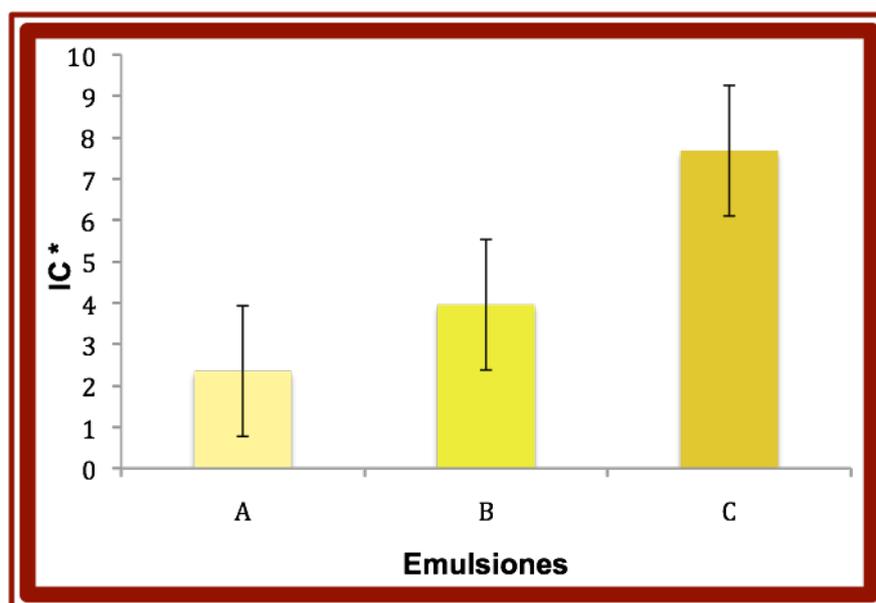


Figura 11. Índice de color (IC*) de las emulsiones con fructanos

7.2.3 Análisis de imágenes de las emulsiones

En la emulsión A, B y C se encontraron glóbulos o micelas de diferente tamaño (Figura 12), los cuales se agruparon en pequeños (menor a 0.1 μm), medianos (0.1 - 0.5) y grandes (mayor de 0.5 μm).

Como se muestra en la figura 13, la emulsión A presentó una mayor frecuencia de glóbulos pequeños en la imagen (100 ± 0.1 glóbulos), respecto a la emulsión B y C que presentaron 92 ± 0.12 y 90 ± 0.1 de glóbulos pequeños respectivamente. Por otra parte la emulsión B presentó una mayor frecuencia de glóbulos medianos en la imagen (60 ± 0.2 glóbulos), en comparación de la emulsión C y A que tuvieron una menor cantidad (45 ± 0.1 y 26 ± 0.18 glóbulos respectivamente).

Con respecto a la presencia de glóbulos grandes, la emulsión A presentó una mayor cantidad de estos en la imagen (4 ± 0.1), en comparación de la emulsión B con 1 ± 0.1 glóbulo y la emulsión C que no presentó ningún glóbulo de tamaño grande.

Este resultado con respecto a la presencia de glóbulos grandes a una menor cantidad de fructanos, está asociado con una menor estabilidad, de acuerdo con lo reportado por Lisant (1984), quien describe que las emulsiones tienden a coalescer mientras mayor sea el tamaño de partícula presente.

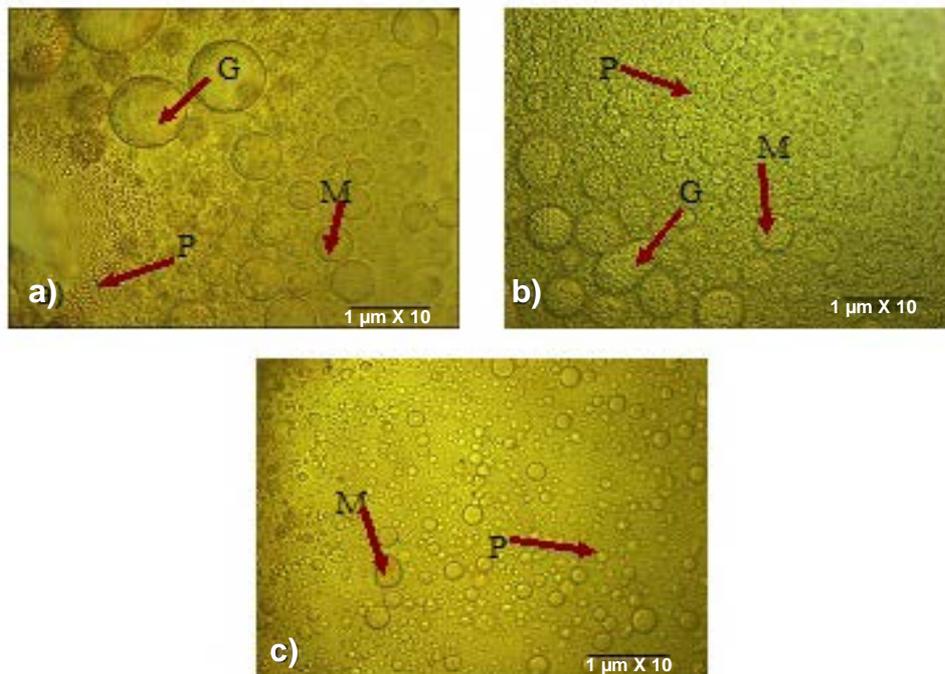


Figura 12. Imágenes del tamaño de glóbulos presentes en las emulsiones con fructanos.

a) Emulsión A; b) Emulsión B; c) Emulsión C. P (Pequeños: menor a $0.1 \mu\text{m}$); M (Medianos: de 0.1 a $0.5 \mu\text{m}$); G (Grandes: mayor a $0.5 \mu\text{m}$)

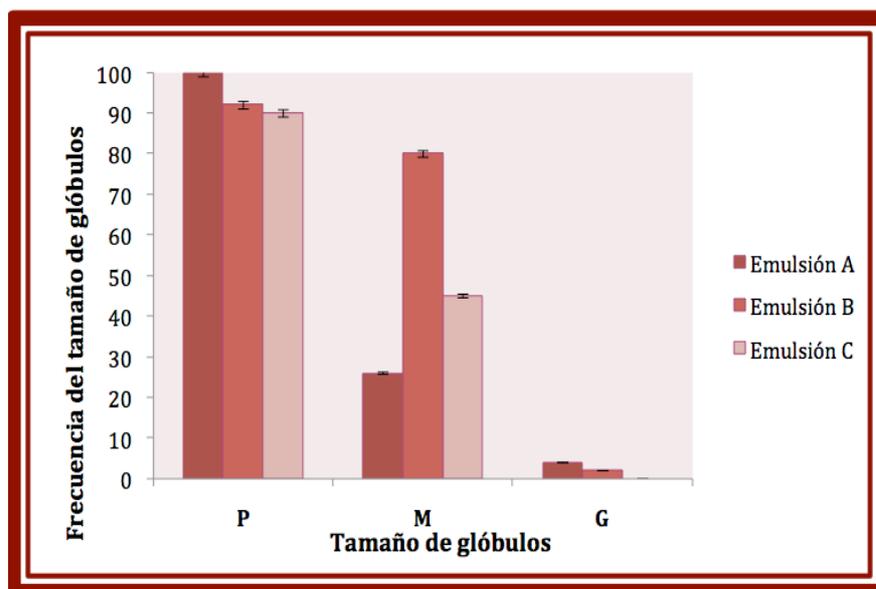


Figura 13. Frecuencia del tamaño de los glóbulos en las emulsiones. P (Pequeños: menor a 0.1 μm); M (Medianos: de 0.1 a 0.5 μm); G (Grandes: mayor a 0.5 μm)

7.3 Encapsulados

Después de secar las emulsiones B y C, se obtuvieron encapsulados B y C respectivamente. Obteniendo del encapsulado B 205 g de encapsulados (Figura 14); mientras que para la encapsulado C se obtuvo 253.71 g de encapsulado. Con lo cual se obtuvo que el rendimiento en el proceso de encapsulación fue de 85.99 % para el encapsulado B y para el encapsulado C se obtuvo un valor similar, el cual fue 88.01 %.



Figura 14. Oleorresina de cúrcuma encapsulada con fructanos de *A. angustifolia*. a) Encapsulados proveniente de la emulsión B; b) encapsulados provenientes de la emulsión C

7.3.1 Análisis de color

Con el análisis de color se obtuvo que los encapsulados B y C no mostraron diferencia estadísticamente significativa, debido a que presentaron valores similares para el IC*. Obteniéndose un IC* de 0.54 ± 0.01 para el encapsulado B y un IC* de 0.52 ± 0.01 para el encapsulado C. Considerándose que estos valores tuvieron tendencia al amarillo pálido

De acuerdo con los resultados obtenidos en el IC* para los encapsulados B y C, siendo que provenían de las emulsiones B y C respectivamente, en las cuales si se observaron diferencias estadísticamente significativa. Probablemente este resultado se debe a que las emulsiones se evaporan después de pasar por el proceso de secado, con lo cual se disminuye la claridad y a su vez se disminuya el IC*.

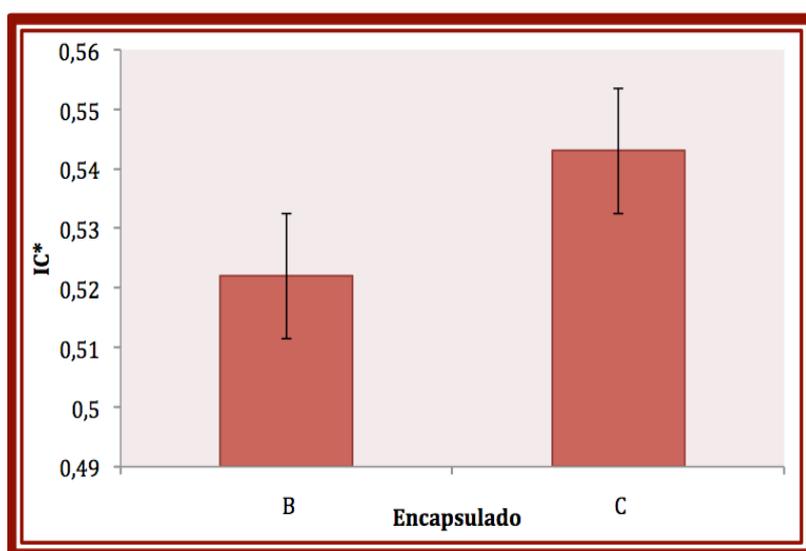


Figura 15. Índice de color (IC*) de los encapsulados

7.3.2 Análisis químicos

En los datos presentados en el cuadro 5 se observó que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el contenido de humedad de los encapsulados B y C, encontrándose valores muy similares. Con respecto al encapsulado B el contenido de humedad fue de 2 g/ 100 g de encapsulado, mientras que para el

encapsulado C se obtuvo 1.75 g / 100 g de encapsulado, por lo tanto el bajo contenido de humedad de los encapsulados B y C, tiene un efecto favorable sobre el tiempo de conservación, de acuerdo a Vargas, (2009).

Por otra parte no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el contenido de cenizas para los encapsulados B y C. En donde se observó valores muy similares en esta determinación. Para el encapsulado B se obtuvo 0.95 g/ 100 g de encapsulado y para el encapsulado C se obtuvo 0.96 g/ 100 g de encapsulado. Este resultado indica que en los encapsulados B y C hubo una baja presencia de minerales de acuerdo a lo reportado por Vargas, (2009).

Con respecto al contenido de lípidos, se encontró que hubo diferencia estadísticamente significativa entre los encapsulados B y C. Para el encapsulado B se obtuvo 10.6 g/ 100 g de encapsulado y para el encapsulado C se obtuvo 8.8 g/ 100 g de encapsulado. Se observó que el contenido de lípidos de los encapsulados B fue superior al de los encapsulados C. Lo cual probablemente se debe a que la proporción de lípidos utilizados para elaborar los encapsulados B, fue mayor a la proporción que se utilizó para elaborar los encapsulados C.

Cuadro 5. Análisis químicos de los encapsulados B y C

	Encapsulado B	Encapsulado C
Humedad (g/ 100 g de encapsulado)	2±0.2 ^a	1.75±0.15 ^a
Cenizas (g/ 100 g de encapsulado)	0.95± 0.01 ^a	0.96± 0.01 ^a
Lípidos (g/ 100 g de encapsulado)	10.6±0.25 ^a	8.80.11 ^b
Proteínas (g/ 100 g de encapsulado)	0.01± 0 ^a	0.01± 0 ^a

Media de tres repeticiones ± desviación estándar; diferentes letras entre las filas para la determinación de humedad, cenizas, lípidos y proteínas indican diferencia significativa

El contenido de azúcares totales (Cuadro 6) fue mayor en los encapsulados B que en los C los cuales tuvieron 1.4 y 2.2 g/100 mL de azúcares totales para el encapsulado B y C respectivamente; de éstos 0.8 y 1.3 g/ 100 ml fueron azúcares reductores respectivamente. Tomando como base este contenido de azúcares reductores, la fructosa se encontró en una mayor proporción en todos los casos,

así en el encapsulado B el 80% y el 20% correspondió a fructosa y glucosa respectivamente y para el encapsulado C el contenido de fructosa y glucosa fue de 84.6 y 15.6% respectivamente. El menor contenido de azúcares en los encapsulados B en comparación de los encapsulados C, probablemente se debe a la proporción de azúcares utilizados en su elaboración.

Cuadro 6. Contenido de azúcares en encapsulados B y C

Muestra	Azúcares totales (g/100 mL)	Azúcares reductores (g/100 mL)	Fructosa (g/100 mL)	Glucosa (g/100 mL)
Encapsulado B	1.4 ±0.01 ^a	0.8± 0.04 ^a	0.64±0.01 ^a	0.16±0.02 ^a
Encapsulado C	2.2.±0.01 ^a	1.3± 0.01 ^a	1.1± 0.03 ^a	0.2±0.02 ^a

Media de tres repeticiones ± desviación estándar; diferentes letras en g/100 mL de azúcares totales, azúcares reductores, fructosa y glucosa indican diferencia significativa.

7.3.3 Eficiencia del encapsulado

7.3.3.1 Análisis de imágenes obtenidas por microscopía óptica de epifluorescencia

Las observaciones realizadas con el microscopio óptico indican que el tamaño de partícula fue de 2 a 78 µm de diámetro para los encapsulados B y C. Y las capsulas presentaron forma esférica.

Tanto los encapsulados B como los C tuvieron la capacidad de fluorescer (Figura 16), lo cual es debido a que la oleorresina de cúrcuma se compone de moléculas que en su estructura tienen dobles enlaces y moléculas cíclicas (Anand y col., 2010), lo cual les permite absorber la luz en presencia de una radiación excitante y que las moléculas excitadas cuando regresen a su estado normal, liberen el exceso de energía en forma de luz visible de mayor longitud de onda que la radiación excitante (Vives y Aguilar, 2006).

En los encapsulados B el área fluorescente estuvo entre 10.45 %, mientras que en el encapsulado C esta área fue de 9.5%. Debido a que los encapsulados se elaboraron bajo las mismas condiciones, se tiene una similar área fluorescente para ambos encapsulados; podría pensarse que el compuesto bioactivo se encuentra disperso en la matriz encapsulante (Shahidi y Han, 1993; Gharsallaoui y col., 2007; Lozano, 2009).

Debido al resultado antes mencionado, se realizaron lavados con diferentes disolventes para remover de la superficie el compuesto bioactivo y poder identificar su presencia dentro del encapsulado y se observó que los encapsulados lavados con etanol, presentaron una mayor área fluorescente respecto a los encapsulados sin lavar, esto probablemente se debe a que los fructanos son solubles o parcialmente solubles en etanol (Chacón, 2006) y posiblemente rompió la estructura de las cápsulas y liberó la oleoresina, provocando una mayor fluorescencia.

Por otra parte los encapsulados que fueron lavados con cloroformo no presentaron área fluorescente, esto probablemente se debe a que es un disolvente no polar y por lo tanto permite una extracción de compuestos liposolubles como la cúrcumina utilizada.

En los encapsulados que fueron partidos después de lavados con cloroformo, se observó una mayor área fluorescente en los B 49.1 % , en comparación a los encapsulados C en los que se obtuvo 36.1 %. Por lo que se puede decir que el encapsulado B elaborado con *A. angustifolia*, ayuda a mantener una mayor cantidad de la curcumina encapsulada.

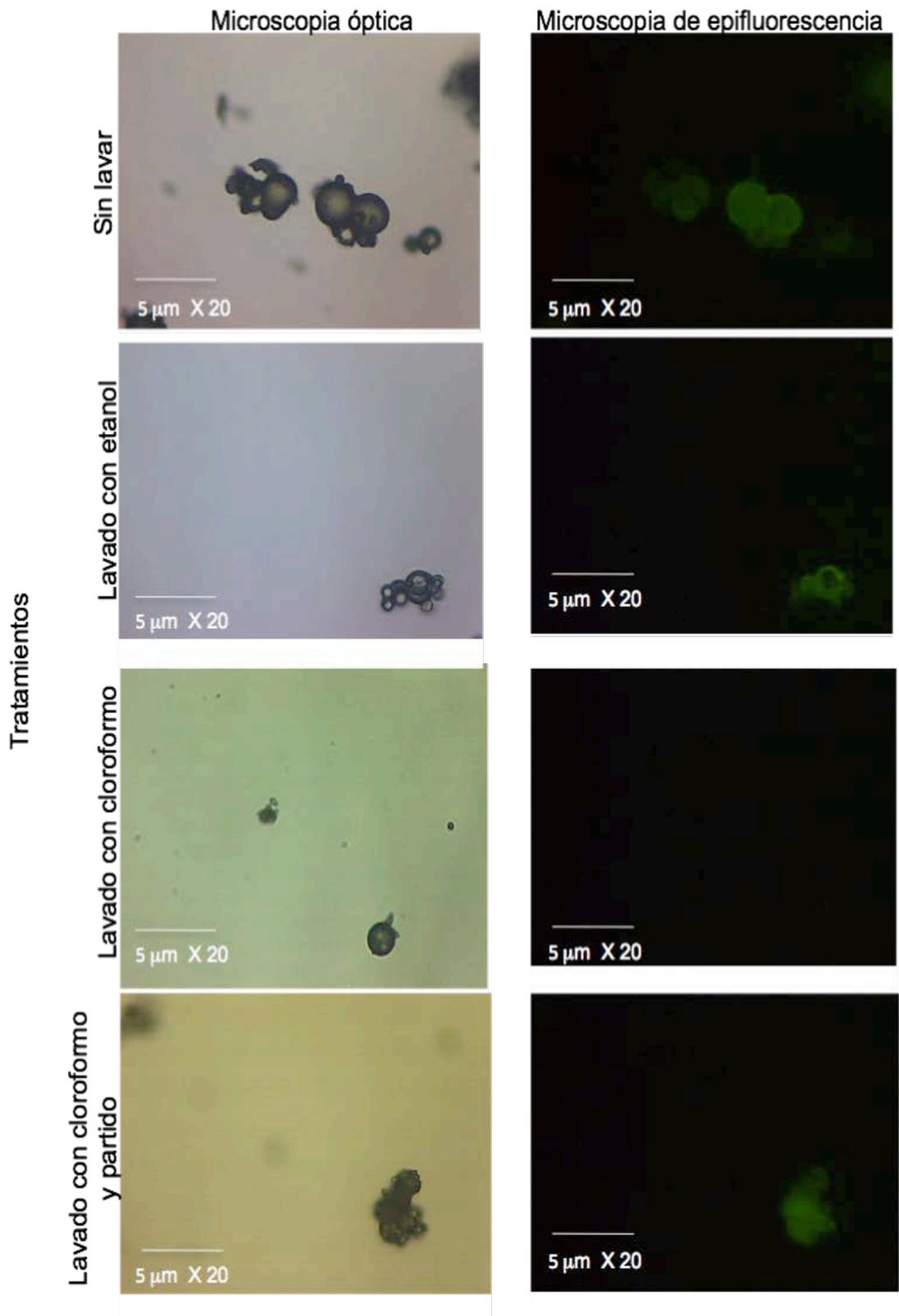


Figura 16. Fotomicrográficas a 20 X de los encapsulados B antes y después de lavarse con disolventes

7.3.3.2 Cuantificación de cúrcumina por HPLC

En la figura 17 se muestra el ajuste de la curva de calibración obtenida con el estándar de cúrcumina, usada para obtener la concentración de este compuesto en los encapsulados.

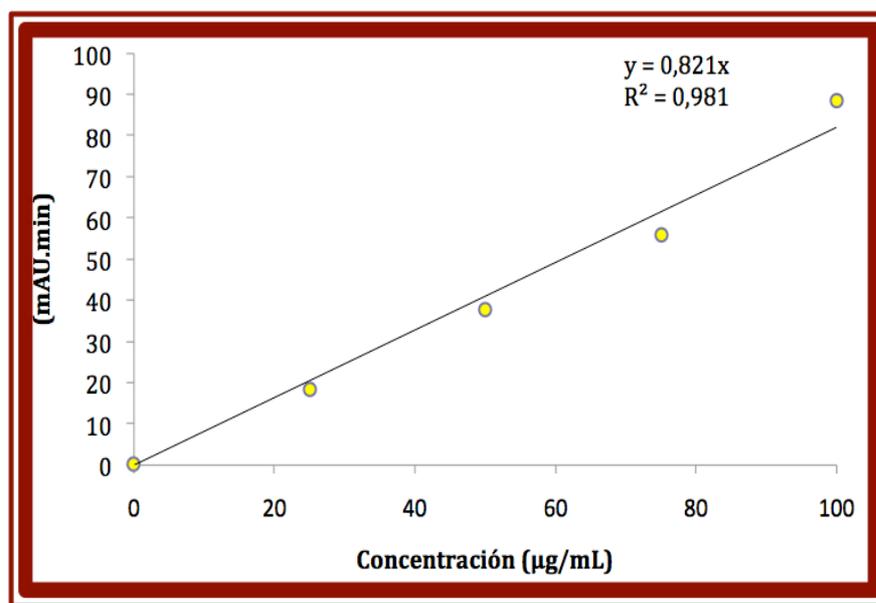


Figura 17. Curva de calibración del estándar de cúrcumina

En las figuras 18, 19 y 20 se muestran los cromatogramas obtenidos de la cúrcumina proveniente de la oleorresina de cúrcuma, del encapsulado B y encapsulado C respectivamente.

En los 3 casos se observó un pico a un tiempo de retención de 1.52 min, que corresponde a la cúrcumina. Esto puede indicar que la cúrcumina proveniente de la oleorresina de cúrcuma no fue modificada durante el proceso de encapsulación. Una modificación en el tiempo de retención o la aparición de otros picos nos estarían señalando una modificación estructural y/o la presencia de isómeros del compuesto.

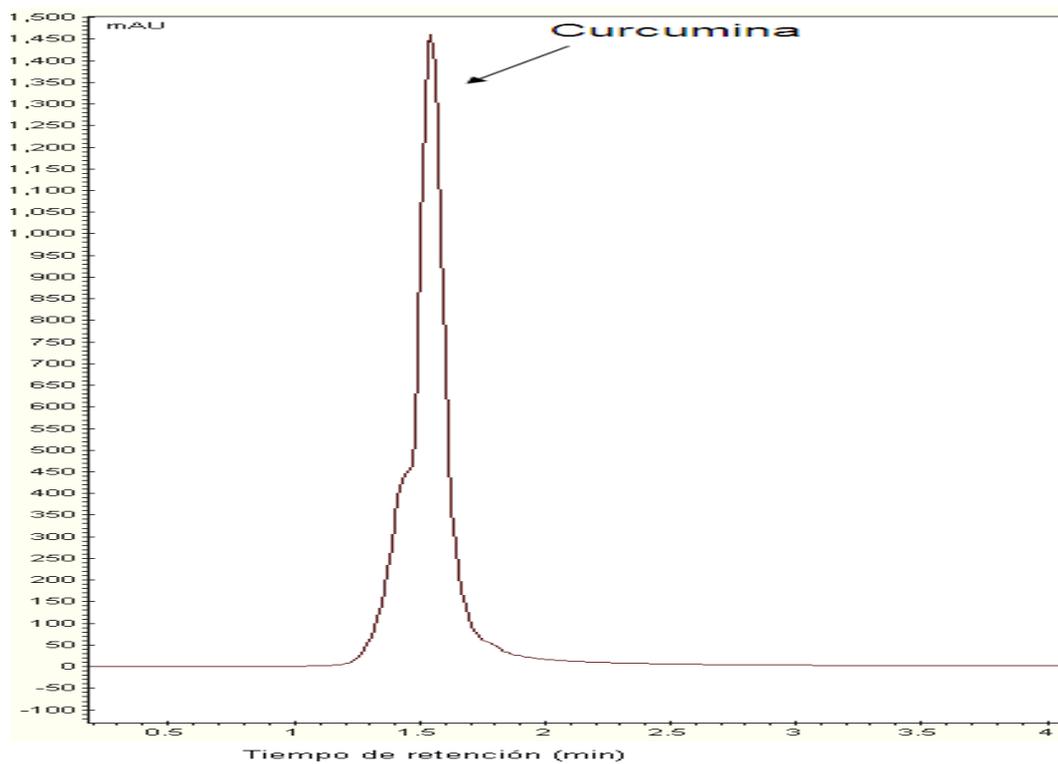


Figura 18. Cromatograma de cúrcuma de la oleoresina de cúrcuma

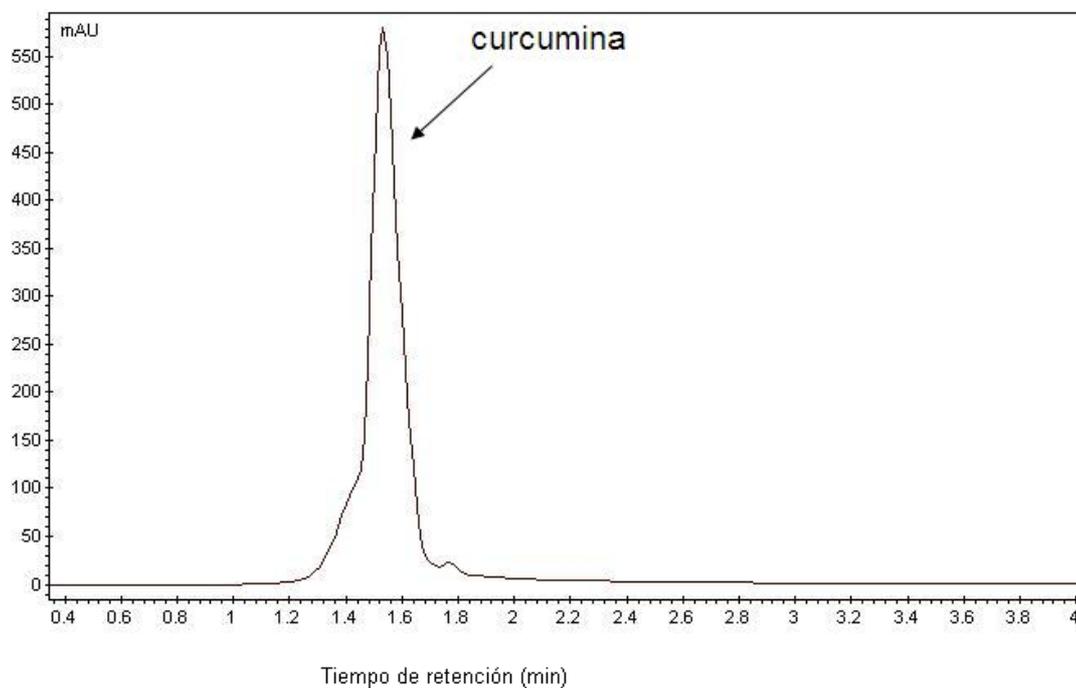


Figura 19. Cromatograma de cúrcuma del encapsulado B por HPLC

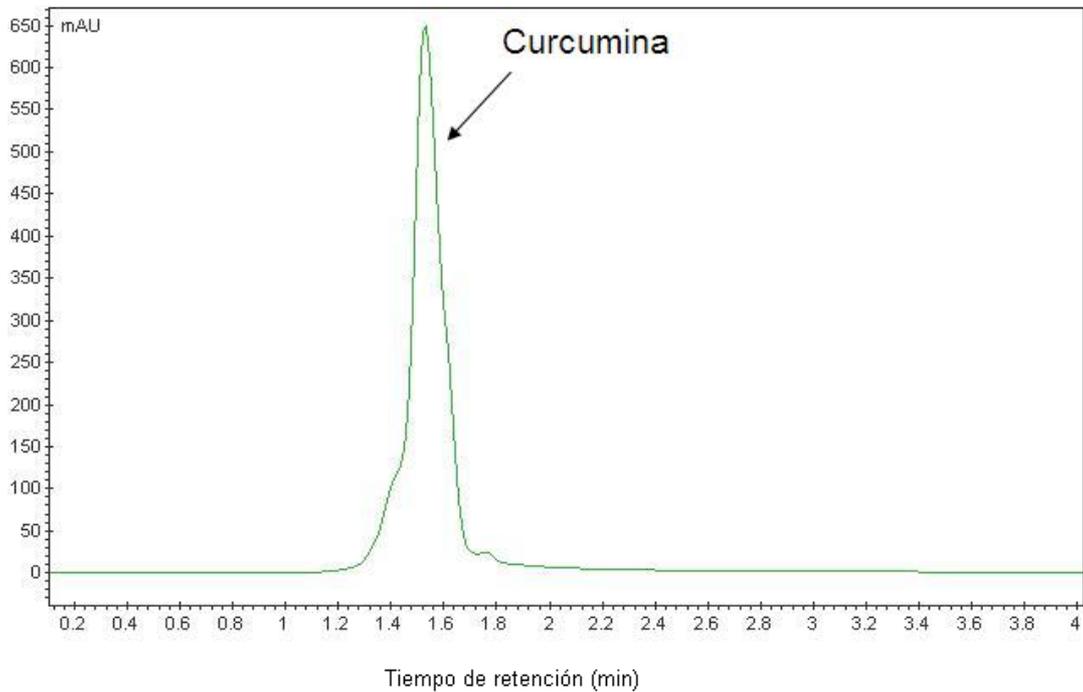


Figura 20. Cromatograma de cúrcumina del encapsulado C por HPLC

Respecto al contenido de cúrcumina en la oleorresina de cúrcuma, encapsulado B y encapsulado C, se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Así para la oleorresina de cúrcuma se tuvo un contenido de 165164.43 μg de cúrcumina/g de oleorresina y para los encapsulados B y C se obtuvieron 5109.86 y 3981.48 μg de cúrcumina/g de encapsulado respectivamente. Lo que indica que se obtuvo 99.8 y 99.9% de eficiencia de retención de cúrcumina después del proceso de encapsulación para los encapsulados B y C respectivamente (Cuadro 7).

El mayor contenido de cúrcumina en la oleorresina de cúrcuma que en los encapsulados, se explica porque la cúrcumina es el principal componente en la oleorresina y en los encapsulados la oleorresina de cúrcuma se encuentra en una proporción del 10%, por lo tanto el contenido de cúrcumina disminuye. Sin embargo, el contenido de cúrcumina en los encapsulados B es mayor que en los encapsulados C.

Cuadro 7. Eficiencia de retención de cúrcumina después del proceso de encapsulación

Encapsulado	Retención de cúrcumina (%)
B	99.8
C	99.9

7.3.4 Análisis de la capacidad antioxidante

En la figura 21 se muestra el ajuste de la curva de calibración obtenida a partir de trolox, la cual se trazó para determinar la capacidad antioxidante que está presente en la oleorresina de cúrcuma encapsulada.

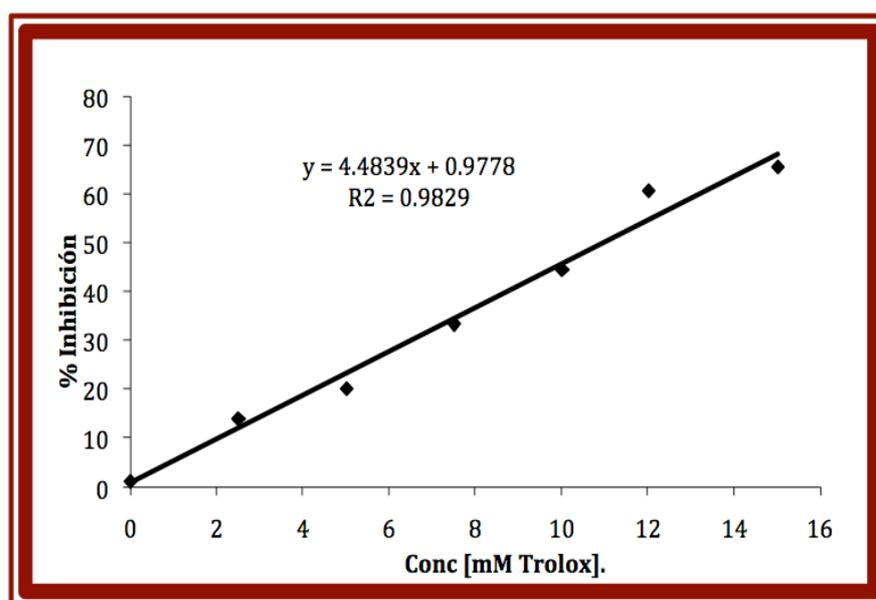


Figura 21. Curva de calibración de trolox

De acuerdo al análisis de la capacidad antioxidante realizado, se observó que la oleorresina de cúrcuma tuvo una capacidad de 239.801 $\mu\text{mol trolox/g}$ de oleorresina (Cuadro 8); esto corresponde con una mayor capacidad antioxidante en ésta que en la oleorresina encapsulada, la cual fue de 189.77 $\mu\text{mol trolox/g}$ de encapsulado para el B. Esta diferencia entre las dos muestras fue

estadísticamente significativa. Este resultado es obvio si se toma en cuenta que en la oleorresina hay una cantidad mayor de cúrcumina por g.

Cuadro 8. Capacidad antioxidante de la oleorresina de cúrcuma encapsulada

Muestra	Cantidad de muestra utilizada (g)	Concentración de cúrcumina (μg de cúrcumina/ g de muestra)	Capacidad antioxidante (μmol trolox/ g de muestra)
Oleorresina de cúrcuma	1	165164.43	239.801 \pm 1.6 ^a
Encapsulado B	1	5109.86	189,777 \pm 1.2 ^b

Media de tres repeticiones \pm desviación estándar; diferentes letras en μmol trolox/g de la capacidad antioxidante indican diferencia significativa.

7.3.5 Análisis de la absorción de cúrcumina *in vivo*

En la figura 22 se muestran los cromatogramas obtenidos del plasma de las ratas, después de haber consumido la oleorresina de cúrcuma y la oleorresina de cúrcuma encapsulada. En ésta se observa un pico con un tiempo de retención de 1.52 min, que corresponde a la cúrcumina y otro pico de menor tamaño en un tiempo de retención de 3.95 min., el cual posiblemente corresponde a un isómero de la cúrcumina, debido probablemente a modificaciones ocasionadas después de haber sido consumida y metabolizada (Pan y col., 1999).

La cúrcumina proveniente de la oleorresina de cúrcuma, se encuentra en una cantidad de 10.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de plasma sanguíneo después de 2 h de su consumo por vía PO. Sin embargo su concentración en sangre disminuyó a 8.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de plasma sanguíneo a partir de las 4 h, manteniendo esa tendencia hasta las 6 h; en donde se encontró una concentración de 7.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de plasma sanguíneo (Figura 23).

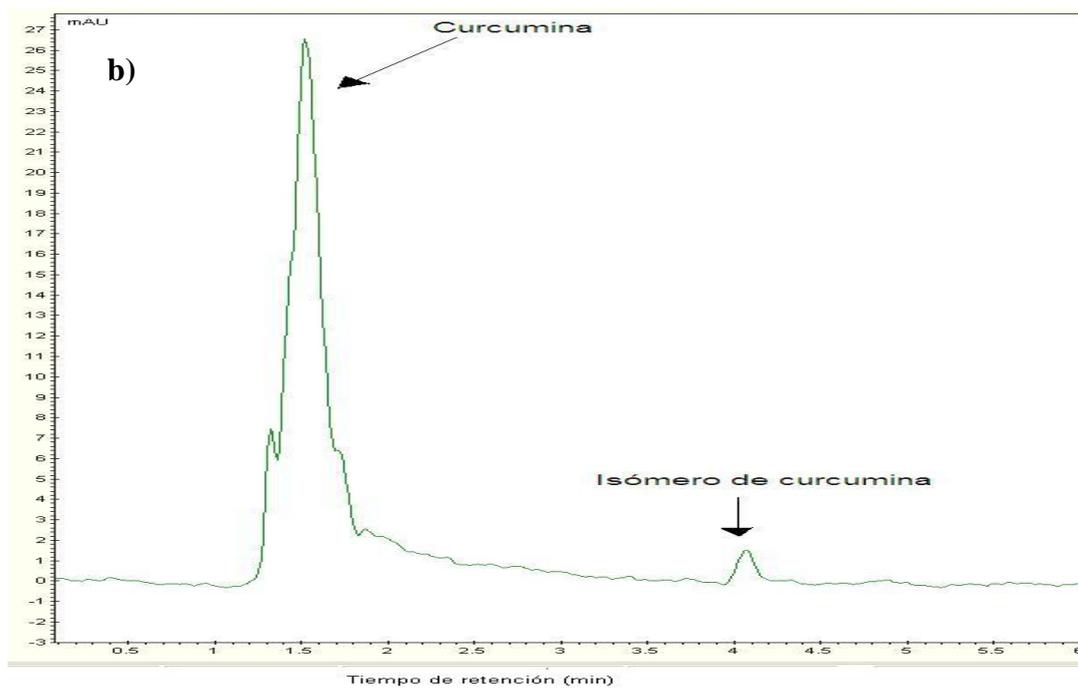
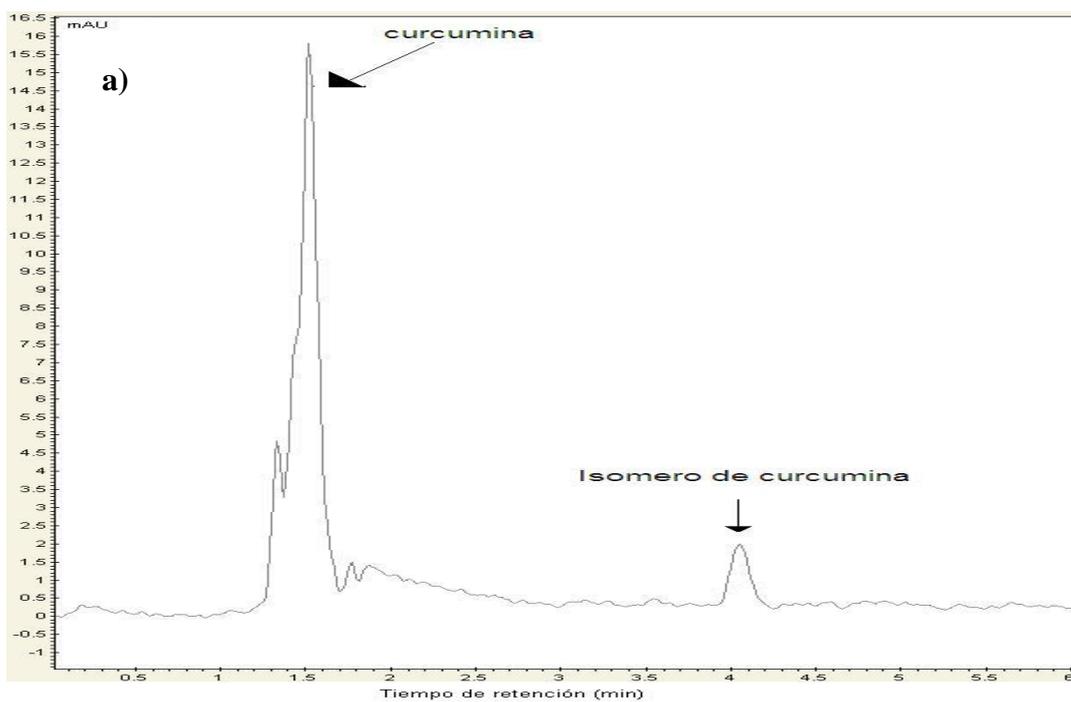


Figura 22. Cromatogramas de la cúrcuma presente en plasma sanguíneo de ratas. a) Tratamiento con oleorresina de cúrcuma; b) Tratamiento con oleorresina de cúrcuma encapsulada

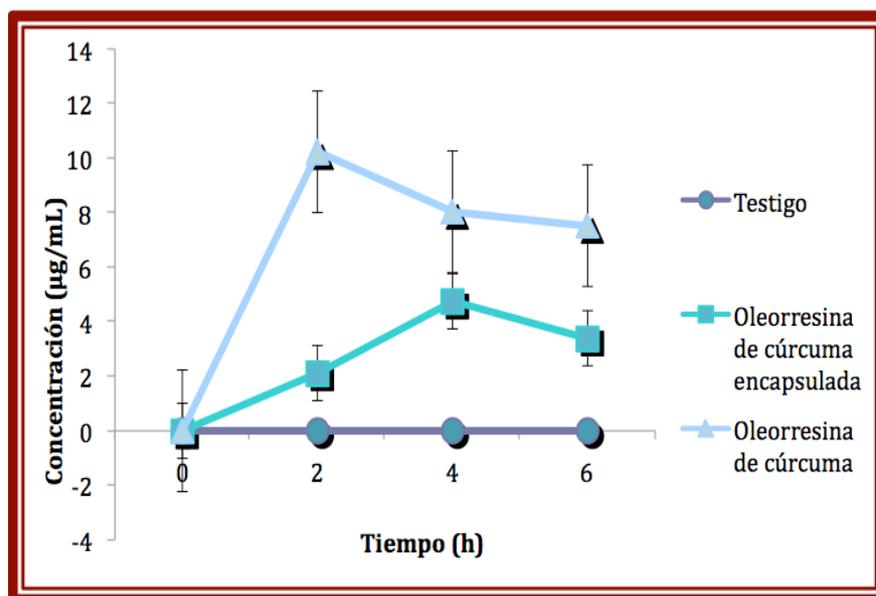


Figura 23. Contenido de cúrcumina en plasma sanguíneo

Este resultado probablemente se debe a que los lípidos alcanzan su máxima concentración en sangre a las 3 h siguientes a su ingestión, de acuerdo a lo descrito por Feldman (1996). Mientras que la presencia de la cúrcumina a partir de las 2 h de su consumo, se puede ser debida a que las ratas utilizadas en este trabajo estuvieron en ayuno 1 día antes de la prueba y por lo tanto se aceleraron los procesos metabólicos involucrados después del consumo de alimentos. Este mismo comportamiento de encontrar cúrcumina a partir de las 2 h de su ingesta, se observó en el plasma de las ratas que fueron alimentadas con oleoresina de cúrcuma encapsulada con fructanos de *A. angustifolia*. En donde se obtuvo 2.11 µg de cúrcumina/mL de plasma sanguíneo a las 2 h. Sin embargo, en este tratamiento se observó que los individuos alcanzaron la máxima concentración de cúrcumina a partir de las 4 h, la cual fue de 4.75 µg/mL de plasma sanguíneo; posteriormente hubo una disminución de cúrcumina a las 6 h de haber ingerido los encapsulados, hasta un nivel de 3.39 µg/mL de plasma sanguíneo. Este resultado probablemente se debe a que los fructanos son hidrolizados parcialmente en el estomago por acción de los ácidos gástricos y provoca que haya una liberación mínima de la cúrcumina. Por lo tanto como los fructanos son hidrolizados principalmente en el colon (Chacón, 2006), se realiza una mayor absorción de cúrcumina después de haber pasado por el intestino delgado.

Considerando que la máxima concentración de cúrcumina en sangre para la oleorresina encapsulada fue de 0.005 mg/mL de plasma sanguíneo, después de que se suministró 1 g del encapsulado que contenía 5.1 mg/g de encapsulado. Mientras que la máxima concentración de cúrcumina para la oleorresina de cúrcuma fue de 0.0010 mg/mL de plasma sanguíneo, después de una ingesta de 1 g de oleorresina la cual contenía 165.1 mg de cúrcumina, Considerando lo anterior, la absorción de cúrcumina para la oleorresina encapsulada fue del 0.005%, mientras que de la oleorresina sin encapsular fue apenas 0.0006%, lo cual significa que la absorción de la cúrcumina fue mejor en la oleorresina de cúrcuma encapsulada a comparación de la oleorresina de cúrcuma sin encapsular. Este resultado puede tener muchas causas, desde aquellos relacionados con la elaboración de los encapsulados, hasta las modificaciones en el compuesto que puedan ocurrir posterior a su ingestión, ya que por la naturaleza lipídica de algunos de los componentes, pueden ser más fácilmente absorbidos debido a su solubilidad en la capa lipídica de las membranas celulares de la mucosa intestinal, permeabilizando pasivamente el borde en cepillo (Voet y Voet, 2006)

Por otra parte la baja concentración en sangre de cúrcumina proveniente de la oleorresina de cúrcuma encapsulada y sin encapsular, posiblemente se debe a que la cúrcumina pudiera encontrarse depositada en algún órgano del cuerpo ó que haya sido excretado (Hong y Mitchell 2006).

8. CONCLUSIONES

- El método de extracción que se utilizó, permite obtener fructanos de *Agave angustifolia* Haw.
- La emulsión con mayor contenido de fructanos, presentó una mejor estabilidad durante su almacenamiento.
- El encapsulado elaborado con una proporción 3:1 de fructanos:oleorresina, fue el que conservó la mayor cantidad de curcumina acuerdo con el análisis de microscopia óptica de epifluorescencia y HPLC .
- El proceso de encapsulación mantiene la capacidad antioxidante de la oleorresina de cúrcuma.
- La oleorresina de cúrcuma encapsulada, tuvo una mejor absorción, representada por un mayor nivel de curcumina en plasma que el obtenido por la oleorresina sin encapsular.

9. PERSPECTIVAS

- Probar otros métodos de evaluación de capacidad antioxidante.
- Realizar la identificación del isómero de cúrcumina presente en el plasma.
- Realizar estudios en los órganos participantes del metabolismo de la cúrcumina después de ser ingeridos.
- Realizar estudios para dilucidar la probable causa de la mejor absorción de la curcumina obtenida con la olerorresina de cúrcuma encapsulada.

10. BIBLIOGRAFÍA

- AACC. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 10 th Ed. vol. I y II.
- Aggarwal B. B. y Harikumar K. B. 2008. Potential therapeutic effects of curcumin, the antiinflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Journal Biochemicals Cell Biology* 10:10-16.
- Aggarwal B. B., Harikumar A. y Bharti A. C. 2003. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research* 23:363-398.
- Aggarwal B. B. y Sung B. 2009. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age old spice with modern targets. *Trends Pharmacology Science* 30(2):85-94.
- Anand P., Nair H. B., Sung B., Kunnumakkara A. B., Yadav V. R., Tekmal R. R. y Aggarwal. B. B. 2010. Design of curcumin loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochemical Pharmacology* 79:330-338.
- Aranberri I., Binks B. P., Clint J. H. y Fletcher P. D. I. 2006. Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 7(3):211-231.
- Avello M. y Suwalsky. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concep)* 474:161-172
- Awasthi S., Srivastava S. K., Piper J. T., Singhall S. S., Chaubey M. y Awasthi Y. C. 1996. Curcumin protects against 4-hidroxy-2-trans-noneal-induced cataract formation in rat lenses. *American Journal of Clinical Nutrition* 64:761-766.
- Bautista-Justo M., García-Oropeza L., Salcedo-Hernández R. y Parra-Negrete L. 2001. Azúcares en agaves (*Agave tequilana* Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta Universitaria* 11:33-38.
- Began G., Sudharshan E., Udaya S. K. y Appu R. A. G. 1999. Interaction of curcumin with phosphatidylcholine: a spectrofluorometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4992–4997.
- Biedrzycka E. y Bielecka M. 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Science Technology* 15:170-175.

- Chacón V. A. 2006. Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacáridos (fos). *Agronomía Mesoamericana* 17(2):265-286.
- Chen H. W. y Huang H. C. 1998. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Brisch Journal Pharmacology* 124:1029-1040.
- Chuquimia F., Alvarado J. A. y Penarrieta j. M. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides de cuatro especies vegetales de la región Andina de Bolivia. *Revista Boliviana de Química* 25(1):76-84.
- Cohly H. H. P., Taylor A. Angel M. F. y Salahudeen A. K. 1998. Effect of turmeric, turmerin and curcumin on H₂O₂ induced renal epithelial (LLS-PKI) cell injury. *Free Radic Biology & Medicine* 24:49-54.
- CONABIO. 2002. Biodiversista. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad 6(44):1-15.
- CONAFOR. 2011. Paquetes Tecnológicos: *Agave angustifolia* Haw. Ficha técnica elaborada por el Sistema de Información para la reforestación. 1-5. Revisado el 15 de Agosto del 2011. Pagina web:http://148.223.105.188:2222/gif/snif_portal/index.php?option=com_content&task=view&id=23&Itemid=24.
- Dittrich R., Muller A., Hensen J. y Wildt L. 1999. The inhibition of low density lipoprotein oxidation by 17-alpha estradiol. *Experimental and Clinical endocrinology & Diabetes* 107:53-57.
- Duthie G. G., Gardner P. T. y Kyle J. 2003. Plant polyphenols : are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society* 62(3):599-603.
- Dziezak J. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology* 42:136-151.
- Englyst H. y Hudson G. 1996. The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chemistry* 57: 15-21.
- Failla M. L. y Chitchumronchokchai C. 2005. *In vitro* models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. *Harvest Plus Technical Monograph* 3. Washington, USA. Pp:1-32.
- Feldman E. B. 1996. *Principios de Nutrición Clínica*. Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Pp: 22-23.
- García M. A. J. 2007. Los agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23.

- Gee J. M., DuPont M. S., Rhodes M. J.C. y Johnson I. T. 1998. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology and Medicine* 25: 19-25.
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A. y Saurel R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* 40: 1107–1121.
- Gibbs B. F., Kermasha S., Alli, I. y Mulligan C. N. 1999. Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal Food Sciences and Nutrition* 50(3):213-224.
- Goel A., Kunnumakkara A. B. y Aggarwal B. B. 2008. Curcumin as “Curcumin”: from kitchen to clinic. *Biochemistry Pharmacology* 75:787-809.
- González G. Y., González R. O. y Nungaray A. J. 2005. Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *e-Gnosis* 3(14):1-18.
- Gouin S. 2004. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology* 15:330–347.
- Guerra-Vargas M., Jaramillo-Flores M. E., Dorantes-Alvarez L. y Hernández-Sánchez H. 2001. Carotenoid retention in canned pickled jalapeño peppers and carrots as affected by sodium chloride, acetic acid, and pasteurization. *Journal of Food Science: Sensory and Nutritive Qualities of Food* 66(4):620-626.
- Hansberg W. 2009. Las especies reactivas del oxígeno y el estrés oxidante. Simposio Estrés oxidativo, antioxidantes y salud. México. Pp. 1-2.
- Hollander D. y Ruble P. E. 1978. β -carotene absorption: bile, fatty acid, pH and flow rate effects on transport. *American Journal Physiology* 235:E686–E691.
- Hong Y. J. y Mitchell A. E. 2006. Identification of glutathione-related quercetin metabolites in humans. *Chemical Research in Toxicology* 19(11):1525-1532.
- Kaul S. y Krishnakantha T. P. 1997. Influence of retinol deficiency and curcumin/turmeric feeding on tissue microsomal membrane lipid peroxidation and fatty acids in rats. *Molecular Cell Biochemistry* 175:43-48.
- Kirk R. S., Sawyer R. y Egan, H. 1996. Composición y análisis de alimentos de Pearson, segunda edición. Continental S. A. de C.V. México. Pp. 25.

- Kopsell D. A. y Kopsell D. E. 2006. Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *TRENDS in Plant Science* 11(10):499-507.
- Kumar V., Lewis S. A., Mutalik S., Shenoy D. B. y Venkatesh U. N. 2002. Biodegradable microspheres of curcumin for treatment of inflammation. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 46:209–217.
- Kuskoski E. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 25(4):726-732.
- Lamuela R. R. M., Romero P. A. I., Andrés L. C. y Tornero A. 2005. Review: health effects of cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International* 11(3):159-176.
- Lee C. M., Boileau A. C., Boileau T., Williams A. W., Swanson K. S., Heintz K. A. y Erdman J. 1999. Review of animal models in carotenoid research. *Journal of Nutrition* 129:2271–2277.
- Lissant, K. J. 1984. *Emulsions and Emulsion Technology*. Marcel Dekker, Inc. Vol. VI. Nueva York. E.U.
- López H. O. D. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana Farmacéutica* 44(3):381-389.
- López M., Mancilla M. N. y Mendoza. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber variedad azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:7835-7840.
- Lozano B. M. 2009. Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de *Opuntia stricta* mediante secado por atomización. Tesis profesional. Universidad Politécnica de Cartagena. Colombia.
- Madrigal L. y Sangronis E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57(4):387-396.
- Marczylo T. H., Verschoyle R. D., Cooke D. N., Morazzoni P., Steward W. P. y Gescher A. J. 2007. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 60: 171–177.
- Martinez V. I., Periago M. J. y Ros G. 2000. Nutritional significance of phenolic compounds in the diet. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50: 5-18.
- Mermelstein N. H. 2008. Determining antioxidant activity. *Food Chemistry* 11:63-66.

- Mesa M. D.; Ramírez T. M. C.; Aguilera, C. M.; Ramírez B. A. y Gil A. 2000. Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides. *ARS Pharmaceutica* 41(3):307-321.
- Minekus M., Marteau P., Havenaar R. y Huis V. 1995. Multicompartmental Multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Alternatives Laboratory Animals* 23:197–209.
- Morales R. R. 2008. Ingeniería básica de una planta para la industria del Mezcal en Mitla, Tlacolula, Oaxaca. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca- IPN. México.
- Oetari S., Sudibyo M., Commandeur J. N., Samhoedi R. y Vermeulen N. P. 1995. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione-S-transferase activities in rat liver. *Biochemistry Pharmacology* 51:39–45.
- Olajide O. A. 1999. Investigation of the effects of selected medicinal plants on experimental thrombosis. *Journal Phytotherapy Research* 13(3):231-232.
- Pan M. H., Huang T. M. y Lin J. K. 1999. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metabolism Dispositives* 27:486-494.
- Pedroza-Islas R. 2002. Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. México. Pp. 438-447.
- Pedroza I. R., Vernon C. E. J., Durán D. C. y Trejo, S. 1999. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation. I. Microcapsule particle size, morphology and microstructure. *Food Research International* 32:367-374.
- Quiles J. L., Aguilera C., Mesa M. D., Ramírez T. M. C., Baró L. y Gil A. 1998. An ethanolic-aqueous extract of *Cúrcuma longa* decreases the susceptibility of liver microsomes and mitochondria to lipids peroxidation in atherosclerotic rabbits. *Bio Factors* 8:51-57.
- Quintanilla C. M. X. 2008. Estudio sobre la nanoestructura en materiales protectores y su efecto en la estabilidad de biomoléculas. Exámen predoctoral de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. México.

- Ramírez B. A., Soler A., Gutiérrez M., Álvarez J. L. y Almagro E. Q. 1995. Antioxidant curcuma extracts decrease the blood lipid peroxide levels of human subjects. *Age* 18:167-169.
- Ramos L. E. E., Castañeda C. B. y Ibáñez V. L. A. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Academica Peruana de la Salud* 15: 42-46.
- Ravindran P. N. 2006. Turmeric the golden spice of life. *Turmeric: The genus Curcuma*. Taylor and Francis Group 1: 1–14.
- Roberfroid M. 2000. Non digestible oligosaccharides. *Critical Reviews Food Science Nutrition* 40:461-480.
- Roberfroid M. 2005. *Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients*. Boca Raton, USA: CRC Press. 370 pp.29.
- Saenz C., Tapia S., Chávez J. y Robert P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* 114: 616-622.
- Salmaso S., Bersani S., Semenzato A. y Caliceti P. 2007. New cyclodextrin bioconjugates for active tumour targeting. *Journal of Drug Targeting* 15:379–390.
- Sandmann G. y Mitchell G. 2001. In vitro inhibition studies of phytoene desaturase by bleaching ketomorpholine derivatives. *Journal Agriculture Food Chemistry* 49:139-141.
- Scalbert A. y Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130(8):2073S-2085S.
- Scartezzini P., Antognoni F., Raggi M. A., Poli F. y Sabbioni C. 2006. Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Emblica officinalis* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology* 104:113-118.
- Scotter M. J. 2009. Synthesis and chemical characterization of curcuminoid colouring principles for their potential use as HPLC standars and for the determination of curcumin colour in food. *LWT-Food Science and Technology* 42:1345-1351.
- Serra M. L. y Aranceta B. J. 2006. *Nutrición y salud pública: Metodos, bases científicas y aplicaciones*. Masson. Barcelona, España. Segunda edición. Pp. 21-22.

- Shahidi, F. y Han, X. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33(6):501-547.
- Shaikh j., Ankola D.D., Beniwal V., Singh D. y Ravi K. M. N. V. 2009. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 37:223–230.
- Shen L. y Ji H. F. 2007. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. *Spectrochemical Acta parte A: Molar Biomolecular Spectroscopy Journal articles*. 67:619–623.
- Sistema Producto Maguey-Mezcal. 2007. Sistema Producto Maguey-Mezcal. *Revista Agroproduce* 1:2-3 y 20-21.
- Soler C. A. 2009. Estudio de la capacidad antioxidante y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva. Tesis de Doctorado. Universidad de Lleida. Inglaterra.
- Sugiyama Y., Kawakishi S. y Osawa T. 1996. Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochemistry Pharmacology* 52(4):519-525.
- Ting S. V. 1956. Rapid colorimetric methods for simultaneous determination of total reducing sugar and fructose in citrus juices. *Florida Citrus Experiment Station* 4:263-266.
- Tonnesen H. H. y Karlsen J. 1985. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch* 80:402–404.
- Tonnesen H. H. 2002. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. *Studies of curcumin and curcuminoids, XXVIII. Die Pharmazie* 57: 820–824.
- Troncoso G. Q. 2003. Capacidad antioxidante del chimichurri y sus componentes. Segundo Congreso Internacional FITO. Lima, Perú .
- Vargas S. S. V., Arenas O. M. L., Jiménez A. A. R., Campos M. R. y Martínez V. R. 2010. Cinética de degradación de encapsulados de carotenoides de Cempaxuchil (*Tagetes erecta*) con fructanos de agave. VII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. Centro de Investigaciones en Optica. León, Guanajuato; México.

- Vargas V. C. G. 2009. Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas de agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*). Tesis de Grado. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-IPN-MICHOACAN. México.
- Vehring R. 2008. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical Research* 25(5):999-1022
- Vignoni L. A., Césari R. M., Forte M., Mirábile M. L., 2006. Determinación de índice de color en ajo picado. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 17(6):63-67.
- Vives C. J. L. y Aguilar B. J. L. 2006. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología. Masson. España. Pp.35.
- Voet D. y Voet J. 2006. Bioquímica. Medica Panamericana. Argentina. Pp. 376-377 y 945-951.
- Wang Y. J., Pan M. H., Cheng A. L., Lin L. I., Ho Y. S. y Hsieh C. Y. 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutic Biomedical Analysis* 15:1867-1876.
- Wolfe K. L. y Liu, R. H. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal. Agricultural. Food and Chemistry* 55:8896-8907.
- Yáñez-Fernández. J., Salazar R. M. J., Chaires M. L., Jiménez H. J., Márquez R. M. y Ramírez E. G. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva* 21:313-19.