



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

# **ESTUDIO DE LIBERACION DE QUERCETINA EN HEXANO DESDE MICROPARTICULAS ELABORADAS CON INULINA COMO AGENTE ENCAPSULANTE Y CAPSUL<sup>®</sup> COMO INDUCTOR DE POROS.**

Tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos

AURY PAMELA RODRIGUEZ TAPIA

Director de Tesis  
Dra. Paz Robert Canales  
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química  
Universidad de Chile

Co-Director  
Dra. Paula García Concha  
Ingeniero en Alimentos

Santiago, Chile  
2013

Tesis financiada por proyecto el Fondecyt N°1120308

## DEDICATORIA

*A mi Abuelo...*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mama Aurora, por apoyarme en todo momento, por tus consejos, tus valores, pero más que nada por tu amor, gracias a ti soy la mujer que soy.

A mi pololo Felipe Meza, por ser un parte importante en mi vida, gracias por todo lo que me has entregado, por tu apoyo incondicional, por creer en mí y sobre todo por tu paciencia y amor. T.A.

A mi familia, mi hermana, Nelson, y en especial a mi tío Luis, gracias por todo.

A mis amigos incondicionales, Claudia Hernández, Melany Santibáñez, Ivonne Castillo, y Rodrigo Jara, por haber hecho de esta etapa una experiencia inolvidable, sin ustedes no hubiera sido tan entretenida.

A mi directora de tesis Dra. Paz Robert, a mi co-directora Paula García y a Manuel Palma.

A mi abuelo, que aunque ya no estés con nosotros, siempre estarás presente en mi corazón, por haber creído en mi hasta el último momento, porque sé que en estos momentos te llenas de orgullo por todo lo que eh logrado, eres y siempre serás el mejor abuelo del mundo.

Y por último Agradezco a todas esas personas que no nombre pero que fueron parte de este proceso tan importante de mi vida

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
1.1. OXIDACIÓN DE LÍPIDOS.....	3
1.2. ANTIOXIDANTES.....	3
1.3. COMPUESTOS FENÓLICOS.....	4
1.4. FLAVONOIDES.....	4
1.5. MICROENCAPSULACIÓN.....	6
1.6. SECADO POR ATOMIZACIÓN.....	7
1.7. ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS .....	9
1.8. LIBERACIÓN CONTROLADA DESDE MICROPARTÍCULAS .....	9
1.8.1. Cinética de primer orden.....	10
1.8.2. Modelo cinético de Higuchi .....	10
1.8.3. Modelo cinético de Peppas.....	11
1.9. HIPÓTESIS.....	12
1.10. OBJETIVOS.....	12
1.10.1. Objetivos generales .....	12
1.10.2. Objetivos específicos .....	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
2.1. MATERIALES.....	13
2.2. ELABORACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS .....	13
2.2.1. Diseño experimental .....	13
2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS.....	15
2.3.1. Quercetina superficial .....	15
2.3.2. Quercetina total.....	16
2.3.3. Análisis cromatográfico.....	16
2.3.4. Eficiencia de encapsulación:.....	16
2.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS DEL DISEÑO OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS. ....	17
2.4.1. Morfología .....	17
2.4.2. Estudio de liberación en medio hidrofóbico .....	17

2.4.3. Análisis de las cinéticas de liberación.....	18
2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	18
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>19</b>
3.1 MICROENCAPSULACIÓN.....	19
3.1.1 Encapsulación de quercetina.....	19
3.1.2 Liberación de quercetina desde micropartículas del diseño Q-(In-C). .....	21
3.2 MICROPARTÍCULAS DE QUERCETINA OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS .....	26
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>32</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Variables independientes y niveles del diseño experimental Box-Behnken para la encapsulación de quercetina con inulina nativa y capsul®.....	14
Tabla 2: Condiciones experimentales utilizadas para la elaboración de micropartículas de quercetina con inulina nativa y capsul®.....	15
Tabla 3: Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y liberación de quercetina para micropartículas de quercetina con inulina nativa y capsul®, utilizando un diseño Box-Behnken.....	20
Tabla 4: Parámetros cinéticos obtenidos desde los perfiles de liberación del sistema estudiado.....	25
Tabla 5: Caracterización para las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para el diseño Q-In-C .....	28
Tabla 6: Parámetros cinéticos de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para el diseño Q-In-C .....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reacciones que describen el deterioro oxidativo de las materias grasas.....	3
Figura 2: Estructura química de la quercetina.....	5
Figura 3: Estructura química de la Inulina.....	8
Figura 4: Diseño experimental Box-Bhenken.....	14
Figura 5: Liberación en hexano a los 15 días para el diseño de micropartículas de quercetina con inulina nativa y capsul®.....	21
Figura 6: Canalización en microparticulas.....	22
Figura 7: Perfiles de liberación de quercetina desde micropartículas con inulina nativa y capsul®.....	23
Figura 8: Constantes de liberación de quercetina ajustadas al modelo cinético de Peppas para cada relación Q/In considerada en el diseño con respecto a porcentaje de capsul®.....	26
Figura 9: Gráfico obtenido mediante Metodología de Superficie Respuesta para la eficiencia de encapsulación del diseño Q-In-C.....	27
Figura 10: Gráfico obtenido mediante Metodología de Superficie Respuesta para la liberación del diseño Q-In-C.....	27
Figura 11: Microfotografía de las micropartículas de quercetina obtenidas bajo condiciones óptimas para el diseño estudiado.....	29
Figura 12: Perfil de liberación de Q desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en hexano a 30°C.....	30

## RESUMEN

La oxidación de lípidos es una importante causa de alteración en la calidad de los alimentos, provocando cambios en la textura, la vida útil, la apariencia, y el perfil nutricional. Los antioxidantes previenen la oxidación lipídica, siendo los flavonoides un grupo de compuestos fenólicos naturales que pueden actuar donando un átomo de hidrógeno al radical peroxil. Así, la encapsulación de flavonoides se presenta como una herramienta que permite su protección y controlar su liberación en sistemas lipídicos.

Una estrategia para obtener micropartículas que controlen la liberación de flavonoides es la utilización de un agente encapsulante insoluble en sistemas lipídicos y la incorporación de un inductor de poro que permita la canalización en la partícula para favorecer la liberación del flavonoide en un medio lipídico. En este contexto, el objetivo de este estudio fue estudiar la cinética y el mecanismo de liberación de quercetina (Q) en hexano desde micropartículas elaboradas utilizando inulina (In) como agente encapsulante y Capsul® (C) como inductor de poros.

Se encapsuló quercetina mediante secado por atomización, utilizando un diseño experimental Box-Behnken, donde las variables independientes fueron: la temperatura del aire de entrada al secador, la relación Q/In y el porcentaje de Capsul®. La eficiencia de encapsulación y la liberación de quercetina correspondieron a las variables dependientes. La eficiencia de encapsulación de quercetina (EE) fluctuó entre 39,7-73,3% y la liberación de quercetina en hexano a los 15 días, fluctuó entre 16,4-84,8%. La Metodología de Superficie Respuesta se aplicó para optimizar la EE y liberación de quercetina. Las condiciones óptimas para la obtención de micropartículas de quercetina por fueron: temperatura de entrada de aire al secador de 160°C, relación Q/In de 1:43 y un porcentaje de Capsul® de un 0%, para una EE de 63,6%.

Los datos del perfil de liberación se ajustaron a cinética de primer orden y a los modelos de Higuchi y Peppas. El mecanismo de cesión se asoció a difusión Fickiana debida a un gradiente de concentración. Los resultados de los estudios de cinéticas de liberación desde micropartículas son fundamentales para definir su aplicación en alimentos. En este estudio, la velocidad de liberación de Q desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, permitiría proyectarlas a sistemas lipídicos de larga duración como aceites comestibles.



## SUMMARY

### **“Study of quercetin release in hexane from microparticles prepared with inulin as encapsulant agent and Capsul® as pore-inducer”**

The oxidation of lipids is a major cause of alterations in the quality of food, affecting the texture, shelf life, appearance, and nutritional profile. Flavonoids are a wide group of natural phenolic compounds, which can act as antioxidants by donating a hydrogen atom to a peroxy radical, retarding the oxidation of fatty acids in foods.

Microencapsulation of flavonoids is a tool that allows protecting and controlling release of flavonoids in lipid systems. One method for preparing controlled release flavonoid microparticles is by microencapsulating flavonoids into lipid-insoluble polymers using spray-drying. The wall material is essential for purposes of controlling the release in lipidic systems and the incorporation of a pore-inducer as Capsul would allow the gradual release of the flavonoids in bulk lipid. In this context, the aim was to study the kinetic and mechanism of quercetin (Q) release in a hydrophobic medium (hexane), from microparticles using inulin (In) as encapsulating agent and Capsul as pore-inducer.

Quercetin was encapsulated by spray drying according to Box-Behnken experimental design. The inlet air temperature, Q/In ratio and percentage of Capsul®, were the independent variables and the encapsulation efficiency and quercetin release were the dependent variables. The quercetin encapsulation efficiency ranged from 39.7 to 73.3% and the quercetin release in hexane at 15 days ranged from 16.4 to 84.8%. The Response Surface Methodology was applied to optimize the EE and release of quercetin. The optimal conditions to obtain quercetin microparticles, which were: inlet air temperature of 160 °C, 1:43 Q/In of ratio and 0% of Capsul® with a 63.6% of EE.

The release data were fitted to three models: first-order kinetics, Higuchi and Peppas. The release mechanism was associated with Fickian diffusion.

The results of the release kinetics study from microparticles are fundamental for defining food application. In this study, the release rate constants of Q from microparticles obtained under optimal conditions could be used to fats and oils of long shelf-life.

## ABREVIATURAS

Q: Quercetina

In: Inulina nativa

C: Capsul ®

RMN : Resonancia Magnética Nuclear

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

MSR: Metodología de Superficie Respuesta

LIH: Liberación en hexano

EE: Eficiencia de encapsulación

PE: Porcentaje de encapsulación

LH: Lípido

L<sup>•</sup>: radical alquil

LOO<sup>•</sup>: radical peroxil

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido

## INTRODUCCION

La estabilidad de las materias grasas en general, depende de la adición de antioxidantes, que sean capaces de retardar su deterioro (Farag *et al.*, 2003; Márquez-Ruiz *et al.*, 2010). Con el propósito de evitar este proceso, se ha recurrido al uso de antioxidantes naturales y sintéticos que permiten la prolongación del periodo de inducción, mediante la donación de un átomo de hidrogeno a un radical peroxil (Bravo, 1998), retardando la oxidación lipídica. Sin embargo, el uso de antioxidantes sintéticos ha sido cuestionado por sus posibles efectos adversos en la salud (Shahidi y Zhong, 2010), como efectos carcinogénicos a concentraciones elevadas (Ito *et al.*, 1986); mientras que los antioxidantes naturales, tales como los compuestos fenólicos están adquiriendo una gran relevancia.

Los flavonoides son un amplio grupo de compuestos fenólicos naturales, ampliamente distribuidos en plantas, frutas y verduras. Estos compuestos se caracterizan por poseer actividad antioxidante, evitando la oxidación lipídica (Manach *et al.*, 2004).

La microencapsulación de flavonoides se presenta como una herramienta para controlar su liberación en una matriz lipídica, porque la liberación del flavonoide ocurriría a una velocidad controlada, extendiendo la vida útil del sistema lipídico. Por otro lado, la encapsulación de flavonoides permite también su protección de las condiciones ambientales (temperatura, oxígeno, luz y agua) y evita las interacciones con otros componentes del alimento (Wu *et al.*, 2008). En este contexto, estudios de liberación de antioxidantes desde micropartículas en sistemas lipídicos son escasos (Deng y Yu, 2004; Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006).

La microencapsulación es una técnica donde un compuesto activo (sólido, líquido o gaseoso) es atrapado o recubierto por un biopolímero con el fin de proteger el activo y/o controlar su liberación (Desai y Park, 2005). Se entiende por liberación controlada al proceso por el cual un compuesto activo es liberado en el sitio y/o tiempo deseado, a una velocidad específica (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995).

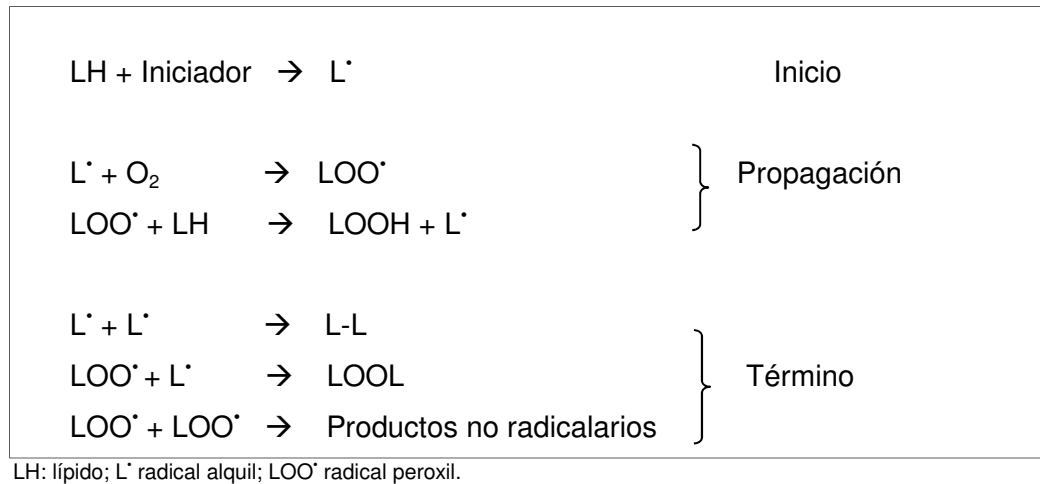
Entre los métodos de encapsulación, el secado por atomización es ampliamente utilizado en la industria de alimentos para encapsular ingredientes de forma económica, simple y continua (Ré, 1998; Desai y Park, 2005). Sin embargo, su desventaja radica en los pocos polímeros solubles o dispersables en agua que se pueden utilizar como agentes encapsulantes (Gouin, 2004).

El material encapsulante es esencial para propósitos de liberación controlada. La inulina es un fructo-oligosacárido que presenta propiedades que lo proyectan como un interesante agente encapsulante para el secado por atomización y por otra parte es un polímero insoluble en lípidos. Sin embargo, una estrategia para obtener micropartículas que controlen la liberación de flavonoides en sistemas hidrofóbicos es la utilización de un inductor de poros. El inductor de poros debería ser un polímero con características hidrofóbicas que permita la canalización en la partícula para favorecer la liberación del compuesto activo en un medio lipídico.

De acuerdo a estos antecedentes, en este estudio se elaborarán micropartículas de quercetina utilizando inulina como agente encapsulante, y se evaluará el efecto de la adición de un inductor de poros (Capsul®) sobre la eficiencia de encapsulación y la liberación del activo desde las micropartículas en un medio hidrofóbico (hexano).

## 1.1. Oxidación de lípidos

La autooxidación lipídica se puede representar en tres etapas distintas: iniciación, propagación y término (Nawar, 1996), las que se describen en la Figura 1.



**Figura 1: Reacciones que describen el deterioro oxidativo de las materias grasas.**

La susceptibilidad de los lípidos a la oxidación es una causa importante de las alteraciones en la calidad de muchos alimentos de origen natural o procesados (Nawar, 1996). Esta oxidación provoca cambios a nivel químico que se traducen en cambios de sabor, textura, vida útil, apariencia y perfil nutricional (McClements y Decker, 2006). Sin embargo, uno de los medios más eficaces para retardar la oxidación de lípidos en alimentos grasos es la incorporación de antioxidantes (Nawar, 1996).

## 1.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas orgánicas que pueden ser de origen natural o sintético. Se definen como cualquier sustancia que es capaz de retardar el desarrollo de rancidez en alimentos, extendiendo su período de inducción (Yanishlieva y Marinova, 2001).

Los antioxidantes sintéticos como el hidroxibutilanisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo se han utilizado con éxito en la

industria alimentaria. Sin embargo, los antioxidantes naturales a pesar de tener un mayor costo en comparación a los sintéticos, han mostrado un comportamiento similar y menores efectos tóxicos, lo que ha permitido utilizarlos como una alternativa a los sintéticos (Valenzuela y Nieto, 1996; Yanishlieva y Marinova, 2001).

Los antioxidantes naturales están presentes en plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales, donde tienen múltiples efectos biológicos (Halliwell, 1995; Barclay y Vinqvist, 2003). Entre los principales grupos se encuentran los compuestos fenólicos y tocoferoles. Sin embargo, uno de los inconvenientes es que, los antioxidantes son susceptibles a la degradación durante el procesamiento y/o almacenamiento de los alimentos por acción de la temperatura, oxígeno, luz, agua, y/o interacciones con otros componentes del alimento, limitando su aplicación (Wu *et al.*, 2008). Además presentan una limitada solubilidad en sistemas lipídicos y algunos de ellos presentan astringencia.

### **1.3. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Presentan una estructura compuesta por uno o varios anillos benceno con uno o más grupos hidroxilos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). De acuerdo a su estructura química (número de anillos fenólicos y elementos estructurales unidos a los anillos), pueden dividirse en diferentes clases encontrándose desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos, siendo los flavonoides el grupo más importante (Manach *et al.*, 2004).

### **1.4. Flavonoides**

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los tallos, hojas y flores de los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, entre otros. Tienen efectos terapéuticos en un número elevado de

patologías, incluyendo la aterosclerosis y el cáncer. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ( $C_6-C_3-C_6$ ), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de sus características estructurales. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en varios grupos, siendo los principales los flavanos, las flavonas, las antocianinas y los flavonoles (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

La relación entre las características estructurales de los flavonoides y su actividad antioxidante en sistemas hidrofílicos está bien establecida. Sin embargo, en sistemas lipídicos se ha encontrado que los factores más relevantes que influyen la actividad antioxidante son: el número de grupos hidroxil y el enlace doble 2,3 en el anillo C en linoleato de metilo (Pekkarinen *et al.*, 1999; Pedrielli y Skibsted, 2002) y aceite de girasol purificado (Marinova *et al.*, 2008). La quercetina (Figura 2) reúne los tres criterios necesarios para ejercer una efectiva función antioxidante (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

La quercetina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócolis, cerezas, uvas, entre otros. Tiene una capacidad antioxidante de 4,7 mM expresada como Trolox, la cual es cinco veces mayor que la de las vitaminas E y C. Además, presenta una solubilidad similar a la vitamina E (Sartor *et al.*, 2002).

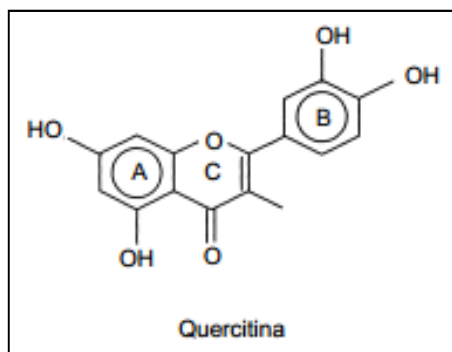


Figura 2: Estructura química de la quercetina

Debido a que los flavonoides son susceptibles a la degradación por factores ambientales o del propio alimento donde es añadido, la microencapsulación permitiría proteger estos compuestos activos y liberarlos en forma controlada. Esta estrategia será desarrollada en este estudio.

### **1.5. Microencapsulación**

La microencapsulación es una técnica mediante la cual compuestos activos, sólidos, líquidos o gaseosos (antioxidantes, vitaminas, sabores, bactericidas, entre otros) son introducidos en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de proteger los activos del medio ambiente, de su interacción con otros componentes del alimento, o bien para controlar su liberación (Yáñez *et al.*, 2002).

Una micropartícula posee una estructura morfológica compuesta por dos elementos: el material encapsulado, conocido como material del núcleo o fase interna, y el agente encapsulante (Gibbs *et al.*, 1999). En general las micropartículas tienen un amplio rango de tamaño que va de 0,2 a 5000  $\mu\text{m}$ , con múltiples formas dependiendo del material y método utilizado para su preparación (Shahidi y Han, 1993). Para elaborar micropartículas hay numerosas técnicas, no obstante algunos autores clasifican a los métodos de encapsulación en tres procesos:

- Procesos físicos: secado por atomización, extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado, y separación por suspensión rotacional.
- Procesos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja, liposomas y gelación iónica.
- Procesos químicos: inclusión molecular y polimerización interfacial.

La selección de un método de encapsulación dependerá del tamaño de partícula requerido, de las propiedades físicas y químicas del agente encapsulante y del activo, de los costos y de la aplicación de las micropartículas entre otros (Gharsallaoui *et al.*, 2007).



## 1.6. Secado por atomización

El secado por atomización o por aspersión es ampliamente usado en la industria de los alimentos para encapsular ingredientes alimenticios, debido a que es un método económico y efectivo en la protección de materiales sensibles (Yáñez *et al.*, 2002). Además, permite obtener micropartículas en polvo con baja actividad de agua, lo que facilita el transporte, manipulación y almacenamiento del producto (Murugesan y Orsat, 2011). Por último una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles a la temperatura, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s) (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

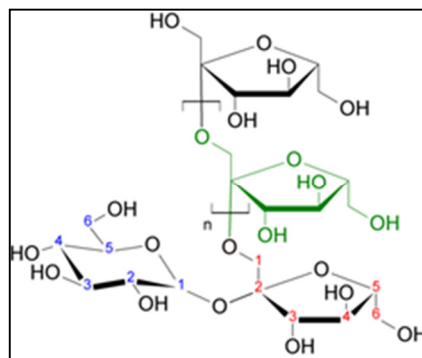
Las etapas del secado por atomización incluyen: obtener una solución, dispersión o emulsión de un agente encapsulante y un compuesto activo; atomizar la dispersión en aire caliente mediante un disco rotatorio o boquilla de pulverización, permitiendo una rápida remoción del solvente (generalmente agua). Las partículas secas son separadas desde la zona de aire caliente a una de menor temperatura (Gibbs *et al.*, 1999; De Vos *et al.*, 2010). En general, se obtienen micropartículas con un rango de tamaño entre 10 y 100  $\mu\text{m}$  (Fang y Bhandari, 2010).

Los agentes encapsulantes pueden seleccionarse a partir de una amplia gama de biopolímeros naturales y sintéticos, dependiendo del material a encapsular y de las características deseadas en el producto final. Los requisitos para que un material encapsulante pueda ser utilizado en secado por atomización incluyen un alto grado de solubilidad, baja viscosidad que permita formar soluciones, dispersiones ó emulsiones con un alto contenido de sólidos, buenas propiedades emulsificantes, un carácter no higroscópico, sabor suave, no reactivo y bajo costo (Murúa-Pagola *et al.*, 2009).

La inulina, es un fructo-oligosacáridos (FOS) obtenido de la raíz de la achicoria (*Cichoriumintybus*), compuesto por unidades de fructosa unidas mediante enlaces  $\beta$ -(2-1) ligadas con una glucosa en el extremo de la cadena y ligeramente ramificado (1-5%) (Stevens *et al.*, 2001). La Figura 3 muestra la estructura química de la inulina.

La inulina tiene efectos prebióticos, acción de fibra dietética y mejora la biodisponibilidad de calcio. Esta se hidroliza sólo en pequeñas cantidades en el estómago, siendo degradada por las bacterias del intestino, por lo tanto no hay un aumento en el índice glicémico, pudiendo utilizarse en alimentos para diabéticos (Hovgaard y Bronsted, 1996).

La inulina se ha utilizado como agente encapsulante de betalaínas y polifenoles (Sáenz *et al.*, 2009; Robert *et al.*, 2012) y se seleccionó para este estudio debido a su capacidad para interaccionar con moléculas activas y ser insoluble en sistemas lipídicos, actuando como matriz inerte.



**Figura 3: Estructura química de la Inulina**

Capsul® es un almidón modificado químicamente derivado de maíz ceroso que incorpora en su estructura un componente lipofílico. Es adecuado para la encapsulación de sabores, aromas, vitaminas y especias. La compatibilidad de Capsul® con sustancias insolubles en agua permite la preparación de micropartículas con altos niveles de ingredientes activos, ya que su habilidad para formar una película reduce la pérdida de compuestos bioactivos durante la encapsulación y el almacenamiento (Kolanowski *et al.*, 2004; Jonsdottir *et al.*, 2005). Debido a sus características de viscosidad, solubilidad y estabilidad se ha seleccionado como un agente inductor de poros.

## **1.7. Encapsulación de compuestos fenólicos**

Se han reportado varios estudios acerca de la microencapsulación por secado por atomización de flavonoides tales como: antocianinas de zanahorias negras con maltodextrinas (Ersus y Yurdagel, 2007); procianidinas de uva con maltodextrina y goma arábica (Zhang *et al.*, 2007); polifenoles de extracto de hojas de olivo con quitosano (Kosaraju *et al.*, 2006); extracto de soja con almidón (Georgetti *et al.*, 2008), extracto de manzana con caseinato de sodio y lecitina de soja (Kosaraju *et al.*, 2008); pulpa de *Opuntia ficus indica* con maltodextrina e inulina (Sáenz *et al.*, 2009); jugo de granada con aislado de proteína de soja y maltodextrina (Robert *et al.*, 2010); naringenina y quercetina con acetato ftalato de celulosa (Sansone *et al.*, 2011) y ácido gálico con inulina y almidón modificados (Robert *et al.*, 2012).

La mayoría de estos estudios se han dirigido principalmente a la protección de los flavonoides frente a condiciones ambientales (luz, oxígeno, temperatura y agua), evitando la oxidación, aumentando la vida útil y preservando y/o mejorando su biodisponibilidad (Ersus y Yurdagel, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Kosaraju *et al.*, 2006; Georgetti *et al.*, 2008; Sáenz *et al.*, 2009; Robert *et al.*, 2010). Otros se enfocan en la liberación dirigida a un sitio específico del organismo (intestino) para evitar su degradación en el tracto gastrointestinal, optimizando la eficiencia de la absorción (Kosaraju *et al.*, 2008; Sansone *et al.*, 2011; Manach *et al.*, 2004). Sin embargo, los estudios acerca de la liberación controlada de flavonoides desde micropartículas en los alimentos son escasos, especialmente en sistemas lipídicos (Deng y Yu, 2004; Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006).

## **1.8. Liberación controlada desde micropartículas**

La liberación controlada es definida como el método mediante el cual uno o más agentes activos estarán disponibles en un sitio y/o tiempo determinado a una velocidad específica (Pothakamury y Barbosa-Canovas, 1995). El método más comúnmente utilizado para conseguir una liberación controlada en la industria alimentaria es la encapsulación.

En el área de alimentos, los mecanismos propuestos para controlar la liberación de compuestos activos desde micropartículas son: difusión, hinchamiento, biodegradación y presión osmótica (Pothakamury y Barbosa-Canovas, 1995), los cuales se han estudiado principalmente en matrices acuosas. Sin embargo, en la práctica no es común encontrar un único mecanismo de liberación sino más bien una combinación de ellos.

Para interpretar los datos de un perfil de liberación (gráfico de porcentaje de liberación versus tiempo), se aplican diferentes modelos matemáticos (primer orden, orden cero, Higuchi, Peppas, entre otros), donde el coeficiente de correlación se utiliza para encontrar el mejor ajuste.

### **1.8.1 Cinética de primer orden**

Las reacciones de primer orden (Ecuación 1) son frecuentemente las que se producen en los alimentos. La expresión integrada para este orden se muestra en la Ecuación 2.

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (\text{Ec.1})$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad (\text{Ec.2})$$

Donde C es la cantidad de activo liberado a tiempo t, C<sub>0</sub> es la cantidad inicial de activo en el medio de disolución y k es la constante de primer orden. De esta forma, la representación del logaritmo natural de la cantidad de activo disuelto frente al tiempo transcurrido da lugar a una recta, donde la pendiente corresponde a la constante de velocidad de liberación del agente activo.

### **1.8.2. Modelo cinético de Higuchi**

Explica la liberación del activo controlada por un proceso de difusión a través del polímero. Esta difusión está basada en la ley de Fick que depende de la raíz cuadrada del tiempo (Ecuación 3) (Higuchi, 1963; Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{0,5} \quad (\text{Ec.3})$$

Donde,  $M_t$  es la cantidad de compuesto activo liberado en el tiempo;  $M_\infty$  la cantidad de compuesto activo liberado al tiempo infinito y  $k$  la constante de velocidad de liberación.

### 1.8.3. Modelo cinético de Peppas

El modelo de Peppas corresponde a una ecuación más general (Ecuación 4) (Peppas y Sahlin, 1986; Siepmann y Peppas, 2001), dada por un proceso de difusión, hinchamiento o ambos.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Ec.4})$$

Donde,  $M_t$  es cantidad de compuesto activo liberado en el tiempo,  $M_\infty$  la cantidad de compuesto activo liberado al tiempo infinito y  $k$  es la constante de velocidad de liberación.

El coeficiente  $n$  (exponente difusional) proporciona información sobre el mecanismo de liberación del activo desde la micropartícula. Cuando  $n=0,5$  el agente activo es liberado por difusión Fickiana (modelo Higuchi); Valores de  $n > 0,5$  se asocian a un mecanismo de difusión no Fickiano (anómalo). En particular cuando  $0,5 < n < 1$ , el proceso está dominado por procesos de difusión y relajación de las cadenas poliméricas. Cuando  $n=1$  se trata de un caso límite de transporte no Fickiano, denominado "Transporte caso II", controlado por la relajación de las cadenas del polímero (Siepmann y Peppas, 2001).

Es importante considerar que el mecanismo y la cinética de liberación del activo dependerán de: la naturaleza del activo, del agente encapsulante, y del medio de disolución (Sáez *et al.*, 2004).

## **1.9. Hipótesis**

La utilización de inulina como agente encapsulante junto a la adición de un inductor de poros, permitirán controlar la liberación de quercetina desde micropartículas en un medio hidrofóbico.

## **1.10. Objetivos**

### **1.10.1. Objetivos generales**

Estudiar la cinética y el mecanismo de liberación de quercetina en hexano desde micropartículas elaboradas utilizando inulina como agente encapsulante y Capsul® como inductor de poros.

### **1.10.2. Objetivos específicos**

- ✓ Estudiar la relación quercetina/inulina, la temperatura del aire de entrada al secador y el porcentaje de inductor de poros (Capsul®) (variables independientes), sobre la eficiencia de encapsulación de quercetina y su liberación en hexano (variables dependientes) optimizado por Metodología de Superficie Respuesta (MSR).
- ✓ Caracterizar física, química y morfológicamente las micropartículas de quercetina obtenidas bajo condiciones óptimas.
- ✓ Estudiar los mecanismos y la cinética de liberación de quercetina en hexano desde las micropartículas del diseño obtenidas bajo condiciones óptimas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

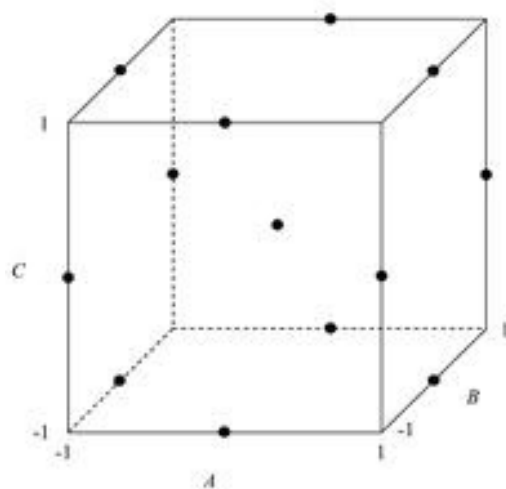
- Agente encapsulante: Inulina HP (DP>23) (In) Raftilina®, obtenida de Alfa Chile S.A.
- Flavonoide: Quercetina (Q) >98% de pureza, adquirida en Sigma-Aldrich
- Inductor de poros: Capsul®, obtenido de National Starch.

### 2.2. Elaboración de las micropartículas

Las micropartículas del diseño Q-(In-C) se prepararon considerando 100 g de solución. La In (6,8-17 g) y C (0-1,7 g) se disolvieron en una mezcla de agua: etanol (80:20 v/v) a 70°C. La solución se dejó enfriar y se agregó 0,34 g de Q con agitación constante. Las dispersiones resultantes se sonicaron durante 20 min (FS-30H-Fisher Scientific) y se alimentaron a un mini spray-dryer B-290 (Buchi, Suiza) con alimentación y flujo de aire de secado en paralelo. El equipo operó a una temperatura del aire de entrada que fluctuó entre 120 y 160°C. El flujo de aire, la velocidad de alimentación y la presión de atomización correspondieron a 600 L/h, 2 mL/min y 5 bar, respectivamente. Las micropartículas resultantes se almacenaron en oscuridad a -20°C hasta posterior análisis.

#### 2.2.1. Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental Box-Behnken (Figura 4). Con un total de 15 experimentos (12 puntos medios de los bordes del cubo y 3 puntos centrales) para el diseño Q-(In-C). La relación Q/In, el porcentaje de inductor de poros y la temperatura del aire de entrada al secador se evaluaron como variables independientes. Las variables respuesta correspondieron a eficiencia de encapsulación de quercetina (EE) y liberación de quercetina en hexano (LIH).



**Figura 4: Diseño experimental Box-Bhenken**

En la Tabla 1, se presentan los niveles para las condiciones que se utilizaron en el diseño estadístico.

**Tabla 1: Variables independientes y niveles del diseño experimental Box-Behnken para la encapsulación de quercetina con inulina nativa y capsul® como inductor de poros.**

N° experimentos	Relación Q/In		Temperatura del aire de entrada (°C)		Capsul® (%) <sup>*</sup>	
	-1	1	-1	1	-1	1
15	1:20	1:50	120	160	0%	25%

Q: quercetina; In: inulina; \* % Capsul® respecto a inulina



En la Tabla 2, se presentan las condiciones experimentales, utilizadas en la elaboración de las micropartículas de quercetina con inulina nativa y Capsul® como inductor de poros para el diseño Q-(In-C).

**Tabla 2: Condiciones experimentales utilizadas para la elaboración de micropartículas de quercetina con inulina nativa y capsul® como inductor de poro para el diseño Q-(In-C).**

Relación Q/In	Temperatura del aire de entrada (°C)	Capsul® (%)*	Quercetina (g)	Inulina (g)	Capsul® (g)
1:20	140	0	0,34	6,8	0
1:20	120	13	0,34	6,8	0,85
1:20	160	13	0,34	6,8	0,85
1:20	140	25	0,34	6,8	1,7
1:35	120	0	0,34	11,9	0
1:35	160	0	0,34	11,9	0
1:35	140	7	0,34	11,9	0,85
1:35	140	7	0,34	11,9	0,85
1:35	140	7	0,34	11,9	0,85
1:35	120	14	0,34	11,9	1,7
1:35	160	14	0,34	11,9	1,7
1:50	140	0	0,34	17,0	0
1:50	120	5	0,34	17,0	0,85
1:50	160	5	0,34	17,0	0,85
1:50	140	10	0,34	17,0	1,7

Q: quercetina; In: inulina; \* porcentaje de Capsul, respecto a la inulina.

## 2.3. Caracterización de las micropartículas

### 2.3.1. Quercetina superficial

Las micropartículas (100 mg) se dispersaron con 2 mL de metanol, se agitaron suavemente por 1 min y luego se dejaron decantar por 10 min. Posteriormente, el

sobrenadante se llevó a un matraz de 25 mL y se aforó con solución agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético. La quercetina superficial se cuantificó por HPLC con detector de arreglo de diodo.

### **2.3.2. Quercetina total**

Las microparticulas (100 mg) se trataron con 4 ml de solución agua:etanol:acetona 50:25:25 (v/v/v). Las dispersiones se agitaron en vortex por 1 min, luego se sonicaron por 20 min (FS-30H-Fisher Scientific) y se centrifugaron por 3 min. El sobrenadante se traspasó a un matraz de aforo de 50 mL y el precipitado se sometió nuevamente al mismo procedimiento. Posteriormente, el volumen del matraz se completó con agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético. La quercetina total de la micropartícula se cuantificó por HPLC con detector de arreglo de diodo.

### **2.3.3. Análisis cromatográfico**

El contenido de Q superficial y total de las micropartículas se cuantificó por HPLC utilizando una bomba Merck–Hitachi L-6200, con detector de arreglo de diodos Waters 996 acoplado a un computador equipado con el software Empower Pro, y una columna C18 (3 µm, 4,6 d.i x 150 mm, Atlantis®, Waters, Irlanda). Se utilizó una fase móvil isocrática agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético y flujo de 1 mL/min. La detección de Q se realizó a 368 nm y se cuantificó utilizando una curva de calibración (1-100 µg/mL, R<sup>2</sup>=0,999) (Anexo 1). Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en mg Q/g de polvo.

### **2.3.4. Eficiencia de encapsulación:**

El porcentaje de Q superficial y EE se calcularon de acuerdo a las Ecuaciones 5 y 6, respectivamente.

$$Q_s (\%) = \frac{\text{quercetina superficial}}{\text{quercetina total experimental}} \times 100 \quad (\text{Ec.5})$$

$$EE (\%) = 100 - Q_s(\%) \quad (\text{Ec.6})$$

## **2.4. Caracterización de las micropartículas del diseño Q-(In-C), obtenidas bajo condiciones óptimas.**

### **2.4.1. Morfología**

La estructura externa de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se cubrieron con oro/paladio utilizando un Varian Vacuum Evaporator PS 10E y se analizaron utilizando un LEO 1420VP (LEO Microscopía Electrónica Ltd, Cambridge, Reino Unido) operado a 20 kV. Las imágenes se obtuvieron digitalmente utilizando un software EDS 7424 (Oxford Instruments, Oxford, Reino Unido).

### **2.4.2. Estudio de liberación en medio hidrofóbico**

La cinética de liberación de quercetina desde las micropartículas se evaluó utilizando hexano como medio de disolución a una temperatura de 30 °C en estufa (Mettler) por un periodo de 101 días. Se pesaron 500 mg de micropartículas en bolsas de filtro de celulosa y se introdujeron dentro de botellas de vidrio con 100 mL de hexano y 0,5 % de span 85. Se tomaron alícuotas de 2 mL a intervalos de tiempo específicos (cada dos días), manteniendo el volumen inicial (100 mL) por reposición del medio de disolución respectivo. Las alícuotas se trataron con 3 mL de solución agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético, se agitaron en vortex por 1 min y se centrifugaron por 3 min. La muestra se traspasó a un matraz de 5 mL, repitiéndose el proceso con 2 mL de solución. El volumen del matraz se completó con solución agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético. La quercetina se cuantificó por HPLC con detector de arreglo de diodo

### 2.4.3. Análisis de las cinéticas de liberación

Los datos obtenidos desde el perfil de liberación de quercetina se ajustaron a modelos cinéticos de Primer orden, Higuchi (Higuchi, 1963) y Peppas (Peppas y Sahlin, 1986) de acuerdo a las ecuaciones 7, 8 y 9, respectivamente.

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2} \quad (\text{Ec. 8})$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Ec.9})$$

$M_t$  se define como la cantidad de Q liberada a tiempo t;  $M_\infty$  es la cantidad inicial de Q. La constante de liberación ( $k$ ) para cinéticas de primer orden se obtuvo a partir de la pendiente de la gráfica del logaritmo natural (Ln) del porcentaje de retención vs el tiempo; para el modelo de Higuchi desde la pendiente del gráfico  $M_t/M_\infty$  vs (tiempo)<sup>1/2</sup>; y para el modelo de Peppas desde el intercepto del gráfico Ln ( $M_t/M_\infty$ ) vs Ln del tiempo y de la pendiente se obtuvo el valor del exponente  $n$ .

### 2.5. Análisis Estadístico

Las condiciones óptimas para el diseño se obtuvieron mediante Metodología de Superficie Respuesta (MSR). Para determinar las constantes de velocidad de liberación se empleó regresión lineal. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics versión 7.0 (Manugistics Inc., Statistical Graphics Corporation, 1993, Rockville, MA, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1 Microencapsulación

De acuerdo a la literatura, el proceso de secado por atomización debe realizarse en condiciones de operación tales que permitan obtener en lo posible una alta eficiencia de encapsulación. La temperatura de alimentación, temperatura del aire de entrada al secador y temperatura de salida del secador, se han establecido como variables importantes para el proceso de secado por atomización. En este estudio, se evaluó: variables de proceso (temperatura del aire de entrada al secador) y de formulación (relación Q/(In) y porcentaje de inductor de poros) sobre la eficiencia de encapsulación y la liberación de quercetina (variables respuestas), de acuerdo a un diseño experimental Box-Behnken con un total de 15 experimentos con 3 puntos centrales.

#### 3.1.1 Encapsulación de quercetina

En la Tabla 3 se presentan las condiciones experimentales, la EE y la LIH al día 15 para cada uno de los 15 experimentos del diseño Q-(In-C).

La eficiencia de encapsulación de Q fluctuó entre 39,7-73,3%. En general, se observa que para los experimentos sin C, a medida que aumentó el agente encapsulante (inulina) se obtuvieron mayores EE. Por otro lado, la eficiencia de encapsulación de quercetina disminuyó con el aumento de Capsul® en la formulación de las micropartículas. Estos resultados se podrían explicar debido a que la In presenta en su estructura grupos hidrofílicos que favorecerían la interacción Q-polímero, mientras que C tiene más grupos hidrofóbicos, los cuales serían menos afines por la Q, que es de naturaleza más polar.

**Tabla 3: Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y liberación de quercetina para micropartículas de quercetina con inulina nativa y capsul® (Q-(In-C)), utilizando un diseño Box-Behnken.**

Experimento	Relación Q/(In)	Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	Capsul® (%)*	EE (%) X ± DE	LIH (%) X ± DE
1	1:20	140	0	53,5 ± 1,3 <sup>cde</sup>	21,3 ± 2,8 <sup>a</sup>
2	1:20	120	13	39,7 ± 2,2 <sup>a</sup>	65,5 ± 2,7 <sup>c</sup>
3	1:20	160	13	44,0 ± 1,2 <sup>ab</sup>	80,1 ± 3,6 <sup>et</sup>
4	1:20	140	25	50,6 ± 2,0 <sup>bcd</sup>	73,8 ± 2,2 <sup>de</sup>
5	1:35	120	0	63,2 ± 5,9 <sup>f</sup>	18,9 ± 2,2 <sup>a</sup>
6	1:35	160	0	61,3 ± 0,8 <sup>ef</sup>	16,4 ± 1,9 <sup>a</sup>
7	1:35	140	7	51,8 ± 1,2 <sup>bcd</sup>	68,9 ± 2,7 <sup>cd</sup>
8	1:35	140	7	45,9 ± 0,5 <sup>abc</sup>	73,6 ± 5,0 <sup>cde</sup>
9	1:35	140	7	49,3 ± 3,1 <sup>bcd</sup>	75,4 ± 0,3 <sup>def</sup>
10	1:35	120	14	50,9 ± 2,8 <sup>bcd</sup>	52,5 ± 1,0 <sup>b</sup>
11	1:35	160	14	56,1 ± 2,4 <sup>bcd</sup>	84,8 ± 4,8 <sup>g</sup>
12	1:50	140	0	73,3 ± 2,7 <sup>g</sup>	49,7 ± 2,0 <sup>b</sup>
13	1:50	120	5	52,2 ± 2,4 <sup>bcd</sup>	77,7 ± 4,1 <sup>def</sup>
14	1:50	160	5	49,2 ± 5,8 <sup>bcd</sup>	73,8 ± 5,2 <sup>cde</sup>
15	1:50	140	10	46,3 ± 1,2 <sup>abc</sup>	76,1 ± 1,2 <sup>def</sup>

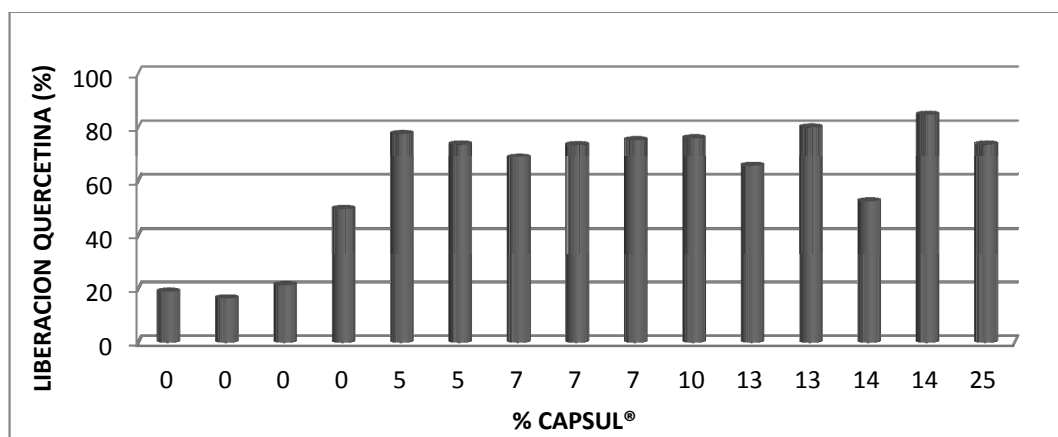
Q: quercetina; In: inulina; C: Capsul®; EE: eficiencia de encapsulación; LIH: liberación en hexano. \* % de Capsul con respecto a inulina. Valores expresados como promedio (X) ± desviación estándar (DE). Letras distintas en una columna representan diferencias significativas (p ≤ 0,05).

Valores similares de EE de polifenoles por secado por atomización se encontraron para encapsulación de: pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus indica*) con inulina nativa (Sáenz *et al.*, 2009), jugo de granada con aislado proteico de soja y con maltodextrinas (Robert *et al.*, 2010), procianidinas de semillas de uva con maltodextrina y goma arábica (Zhang *et al.*, 2007) y epigallocatequina galato con los mismos agentes encapsulantes (Rocha *et al.*, 2011). Sin embargo, valores menores de EE fueron reportados por Kosaraju *et al.* (2006), para la encapsulación de polifenoles de extractos de hojas de olivo (27%) con quitosano y por Sun-Waterhouse *et al.* (2012) para quercetina (9-19%) utilizando diferentes fibras naturales. En otros estudios de

encapsulación de compuestos fenólicos utilizando otros métodos de encapsulación como nanoprecipitación (Wu *et al.*, 2008) para quercetina, gelificación iónica (Hu *et al.*, 2008) para catequinas de té y coacervación compleja (Deladino *et al.*, 2008) para extractos de yerba mate, se encontraron EE de 99%, 24-53% y 85%, respectivamente. El amplio rango de valores de EE de polifenoles (9-99%) obtenidos con distintas condiciones de trabajo, sugiere que la encapsulación depende del tipo de agente encapsulante empleado, del tipo de extracto, las condiciones del proceso y del método de encapsulación entre otras variables.

### 3.1.2 Liberación de quercetina desde micropartículas del diseño Q-(In-C).

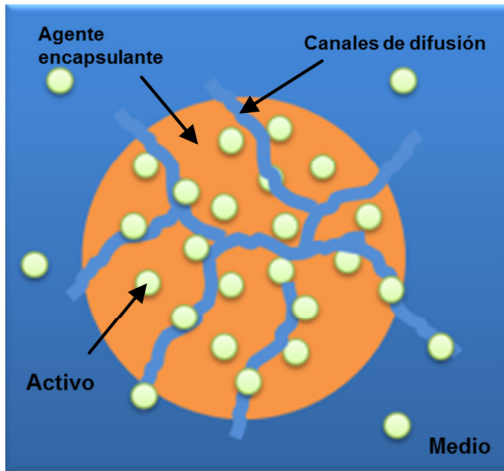
La liberación de Q en hexano desde micropartículas Q-(In-C) para los experimentos del diseño Box-Behnken, a los 15 días de almacenamiento, fluctuó entre 16,4-84,8% (Tabla 3). En la Figura 5 se muestra el porcentaje de liberación de Q al día 15 versus el porcentaje de Capsul®.



**Figura 5: Liberación de quercetina en hexano a los 15 días de almacenamiento desde micropartículas de quercetina con inulina nativa y Capsul® (Q-(In-C)) con respecto al porcentaje de Capsul®.**

En esta Figura, se observa que los experimentos donde se adicionó el agente inductor de poros, presentaron una mayor liberación de Q hacia el medio de disolución (hexano) en relación a los experimentos sin C. Estos resultados sugieren que los grupos

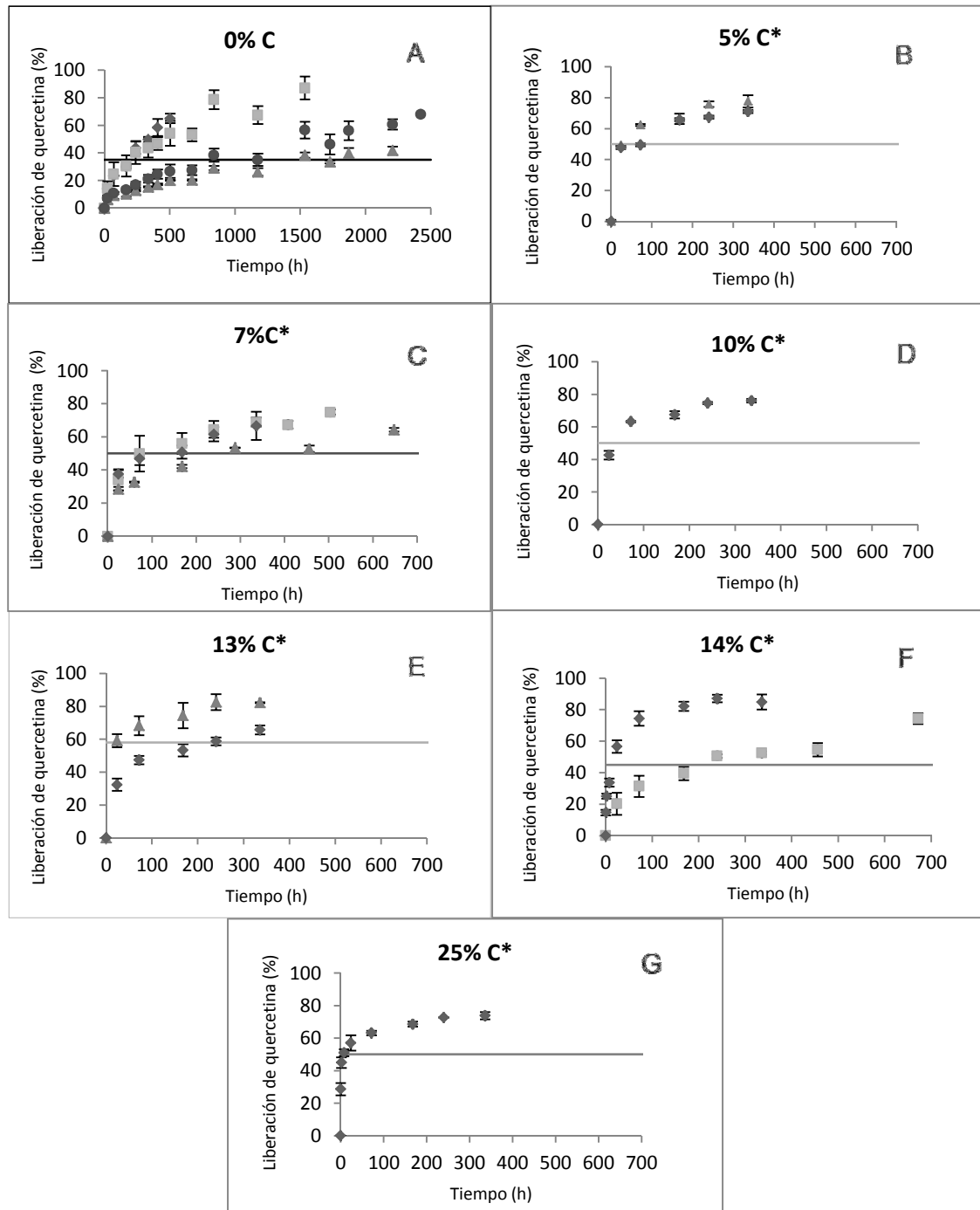
hidrofóbicos presentes en el C tendrían una mayor afinidad con el hexano con respecto a la inulina (hidrofílica), favoreciendo la formación de canales (Figura 6) en la estructura de las micropartículas y por lo tanto facilitando la difusión de Q al medio de disolución.



**Figura 6: Canalización en micropartículas de Q-(In-C).**

En la Figura 7 (A, B, C, D, E, y G) se presentan los perfiles de liberación de Q durante 101 días de almacenamiento para los 15 experimentos del diseño Q-(In-C) con 0, 5, 7, 10, 13, 14, 25 % de Capsul, respectivamente. En los perfiles de liberación (Figura 7) es posible distinguir dos zonas para todos los experimentos del diseño estudiado. La primera zona correspondiente a la liberación de Q superficial y la segunda a la liberación de Q encapsulada. En general, la liberación de Q desde las micropartículas en los experimentos sin Capsul® (Figura 7A) en comparación a los experimentos con Capsul® (Figura 7(B-G)), mantienen el mismo comportamiento observado durante los primeros 15 días de almacenamiento.





**Figura 7: Perfiles de liberación de quercetina desde micropartículas con inulina nativa y capsul® (A): sin Capsul® (0% C) ■ 160°C, 1:35; ♦ 140°C, 1:50; ▲ 160°C, 1:35 ; (B): 5% Capsul® ♦ 160°C, 1:50; ▲ 120°C, 1:50; (C): 7% Capsul® ■ 140°C, 1:35; ♦ 140°C, 1:35; ▲ 140°C, 1:35; (D): 10% Capsul® ♦ 140°C, 1:50 ; (E): 13% Capsul® ♦ 120°C, 1:20; ▲ 160°C, 1:20; (F): 14% Capsul® ■ 120°C, 1:35; ♦ 160°C, 1:35; (G): 25% Capsul® ♦ 140°C, 1:20. — Promedio de superficiales. \* Porcentaje de Capsul® con respecto a inulina.**

Se aplicaron tres modelos matemáticos (Primer orden, Higuchi y Peppas) para explicar los perfiles de liberación de Q en hexano. Se utilizó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) como criterio de ajuste al modelo, permitiendo describir la cinética de liberación (AppaRao *et al.*, 2010). En la Tabla 4 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos para la liberación de Q en hexano desde las micropartículas para cada experimento del diseño Q-(In-C) a 30°C.

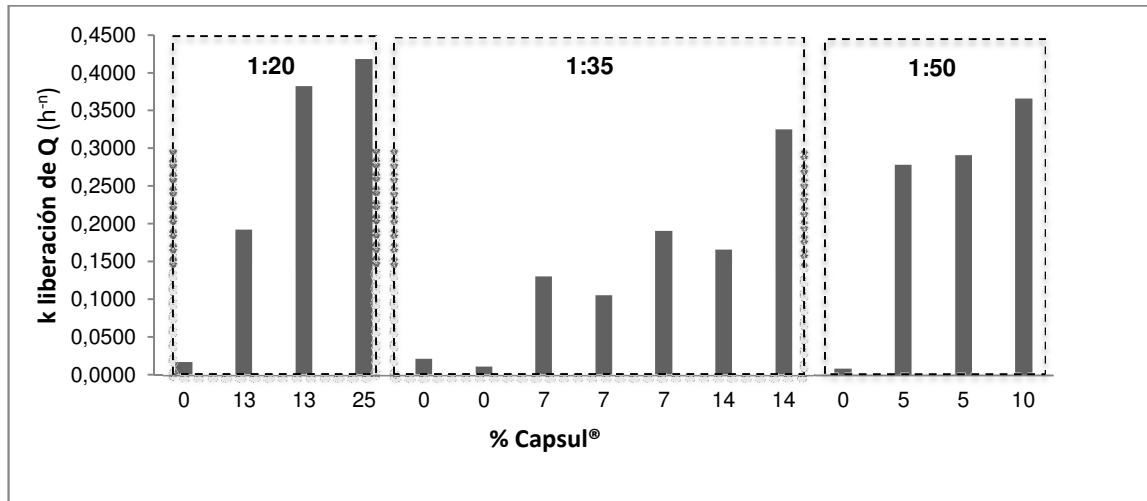
Los datos presentaron un buen ajuste a los tres modelos matemáticos con valores  $R^2 \geq 0,9$ . De acuerdo al valor del exponente  $n$  del modelo de Peppas es posible establecer el mecanismo por el cual el agente activo es liberado desde las micropartículas (Pothakamury y Barbosa-Canovas, 1995). Para todos los experimentos el exponente fue  $n \leq 0,5$ , indicando que la liberación de la quercetina ocurriría principalmente por un mecanismo de difusión Fickiana, debida a un gradiente de concentración (Aragón-Fernández *et al.*, 2009). Sin embargo, en la práctica, la liberación de un activo desde micropartículas ocurre por una combinación de mecanismos como difusión, hinchamiento, biodegradación y presión osmótica (Pothakamury y Barbosa-Canovas, 1995). Además, de acuerdo al modelo de Peppas, al aumentar el porcentaje de inductor de poros (Capsul®) para cada relación Q/(In), aumentaron las constantes de velocidad de liberación de quercetina (Figura 8). La relación 1:20 presentó las mayores constantes de liberación debido a que tiene una menor cantidad de inulina en la formulación de la micropartícula.

Son escasos los estudios de liberación de polifenoles desde micropartículas. Deladino *et al.* (2008) en micropartículas de extracto acuoso de yerba mate (*Ilex Paraguensis*) utilizando alginato de calcio o alginato de calcio-quitosano encontraron constantes de velocidad de liberación de polifenoles (modelo Peppas) menores a las de este estudio. Sin embargo, no se puede comparar con este estudio porque el medio de disolución es diferente. Estos resultados indican que el tipo de agente encapsulante, activo y el medio de disolución son esenciales para controlar la cesión de un compuesto activo.

**Tabla 4: Parámetros cinéticos obtenidos desde los perfiles de liberación de quercetina para el diseño Q-(In-C).**

Capsul® (%)	Primer orden		Higuchi		Peppas		
	$10^3 k_{obs} \pm 10^3 DE$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$10^2 k_{obs} \pm 10^2 DE$ (h <sup>-0,5</sup> )	R <sup>2</sup>	$10 k_{obs} \pm 10^2 DE$ (h <sup>-n</sup> )	n	R <sup>2</sup>
0	0,4 ± 0,1	0,913	1,3 ± 0,1	0,928	1,84 ± 0,7	0,47	0,952
13	1,0 ± 0,1	0,989	1,8 ± 0,1	0,972	19,3 ± 1,9	0,21	0,950
13	3,3 ± 0,6	0,959	2,0 ± 0,2	0,962	38,2 ± 2,5	0,14	0,940
25	2,0 ± 0,3	0,903	1,6 ± 0,2	0,929	41,8 ± 2,5	0,10	0,981
0	0,9 ± 0,1	0,935	1,8 ± 0,1	0,919	2,3 ± 1,1	0,50	0,975
0	0,2 ± 0,1	0,960	0,9 ± 0,2	0,968	1,2 ± 0,8	0,44	0,937
7	1,5 ± 0,7	0,916	2,4 ± 0,4	0,963	13,0 ± 4,6	0,28	0,982
7	1,0 ± 0,1	0,918	1,6 ± 0,2	0,937	10,6 ± 1,1	0,27	0,954
7	1,3 ± 0,6	0,916	2,1 ± 0,4	0,952	19,1 ± 0,3	0,21	0,943
14	2,0 ± 0,7	0,970	2,2 ± 0,4	0,954	16,7 ± 5,1	0,24	0,959
14	5,0 ± 1,0	0,944	2,7 ± 0,5	0,925	32,5 ± 5,4	0,18	0,952
0	1,7 ± 0,6	0,970	3,5 ± 0,3	0,972	1,0 ± 0,1	0,50	0,978
5	2,7 ± 0,6	0,919	2,2 ± 0,3	0,928	29,1 ± 2,0	0,17	0,943
5	1,7 ± 0,6	0,978	1,9 ± 0,4	0,962	27,8 ± 4,6	0,16	0,880
10	3,0 ± 0,1	0,869	2,3 ± 0,1	0,871	22,9 ± 2,3	0,21	0,943

\*Valores expresados como promedio ± DE.



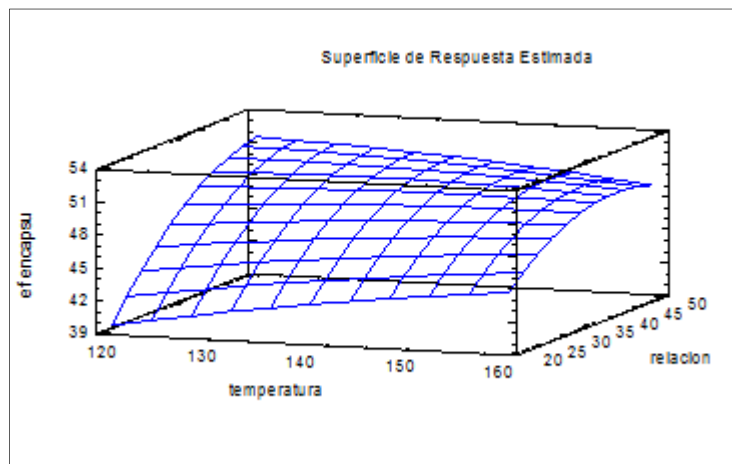
**Figura 8: Constantes de liberación de quercetina desde micropartículas de Q/(In-C), ajustadas al modelo cinético de Peppas con respecto a porcentaje de Capsul® para las relaciones Q/(In) 1:20, 1:35 y 1:50.**

### 3.2 Micropartículas de quercetina obtenidas bajo condiciones óptimas

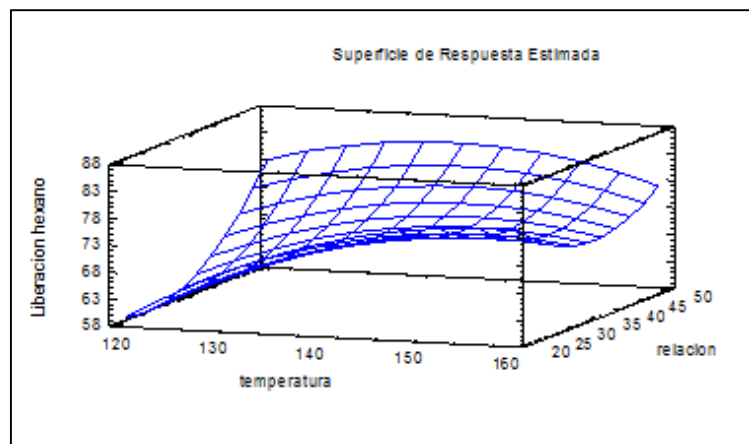
Para obtener las micropartículas bajo condiciones óptimas del diseño Q-(In-C) estudiado se utilizó la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) considerando la forma cuadrática, lineal y la interacción para las variables independientes estudiadas a un nivel  $p \leq 0,05$ . La degradación de polifenoles se asocia con reacciones de oxidación y/o degradación inducidas por calor. Sin embargo, las recuperaciones de quercetina después del proceso de secado por atomización fueron altas, en un rango entre 80-99%, debido a que los tiempos de residencia en la cámara de secado (5-30 s) son breves.

Los resultados del análisis de varianza para la EE del diseño Q-(In-Q), indicaron que la forma lineal y cuadrática de la temperatura no tuvieron un efecto significativo ( $p > 0,05$ ). La relación Q/In en su forma lineal, el inductor de poros en su forma lineal y cuadrática, y la interacción entre ambas variables tuvieron un efecto significativo ( $p \leq 0,05$ ) sobre la EE de Q. Por lo tanto, la relación fue significativa para la EE mostrando un efecto positivo, mientras que el inductor de poros fue significativo mostrando un efecto negativo (Anexo 3).

El análisis de varianza para la liberación de Q en hexano para el diseño Q-(In-C) indicó que la temperatura y la relación Q/In no tuvieron un efecto significativo ( $p>0,05$ ) sobre la liberación. Sin embargo, la forma lineal y cuadrática del inductor de poros tuvo un efecto significativo ( $p\leq 0,05$ ). De esta forma, los experimentos a los cuales se les adicionó C, liberaron más rápidamente la Q debido a la mayor canalización de las micropartículas en comparación a aquellos sin C (Anexo 3). Las Figuras 9 y 10 muestran el gráfico de Superficie Respuesta para la EE y liberación de Q en hexano al día 15 del diseño Q-(In-C)



**Figura 9:** Gráfico obtenido mediante Metodología de Superficie Respuesta para la eficiencia de encapsulación del diseño Q-(In-C).



**Figura 10:** Gráfico obtenido mediante Metodología de Superficie Respuesta para la liberación de quercetina para el diseño Q-(In-C).

### 3.2.1 Micropartículas de quercetina obtenidas bajo condiciones óptimas para el diseño Q-(In-C).

La Tabla 5 muestra las condiciones óptimas para la encapsulación de Q para el diseño Q-(In-C).

**Tabla 5: Condiciones óptimas y eficiencia de encapsulación de quercetina para las micropartículas del diseño Q-(In-C).**

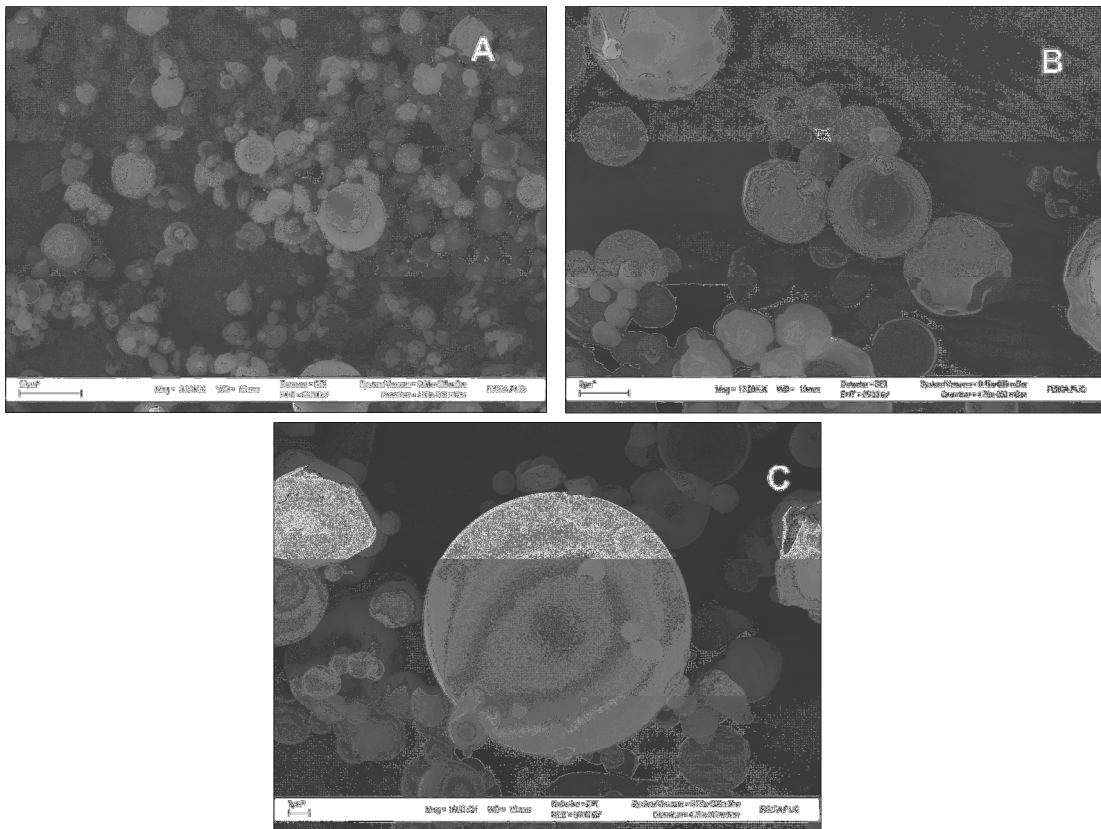
<b>Caracterización</b>	
Relación Q/(In)	1:43
Temperatura aire de entrada al secador (°C)	160
Capsul® (%)	0
Eficiencia de encapsulación (%)	63,6 ± 0,2

Q: quercetina; In: Inulina; \* porcentaje de Capsul, respecto a la inulina; Valores expresados como promedio ± desviación estándar.

En la Tabla 5 se observa que las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas presentaron una eficiencia de encapsulación de 63,6%. Este valor se obtuvo a una relación Q/In (1:43) con alto contenido de sólidos solubles, lo cual favorecería la velocidad de formación de la costra sobre la superficie de la partícula durante el proceso de secado, permitiendo la difusión del agua y la retención del activo (Kenyon, 1995).

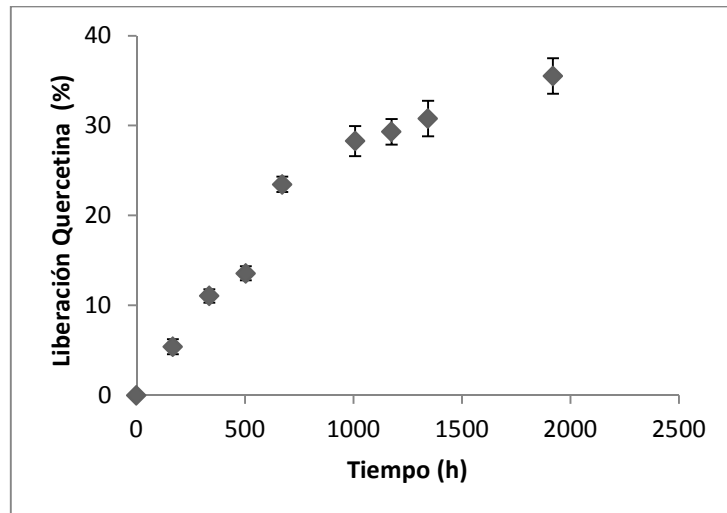
La Figura 11 (A-C) muestra las microfotografías SEM de las micropartículas de Q obtenidas bajo condiciones óptimas. La mayoría de las micropartículas presentaron forma esférica, superficie lisa con pocas indentaciones. La presencia de indentaciones sobre la superficie de las partículas se puede atribuir a las altas temperaturas de secado (160°C) produciéndose una rápida evaporación del agua y una alta presión en el interior de las partículas (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005). Esta morfología es similar a la encontrada por Ronkart *et al.* (2007), quien reportó que la temperatura de alimentación al secador afecta la morfología superficial del polvo de inulina, dependiendo si la mezcla de alimentación correspondía a una solución o a una dispersión, obteniéndose partículas lisas o rugosas y esféricas o amorfas, respectivamente.

La morfología de las micropartículas depende de diferentes parámetros que intervienen en el secado como: temperatura de alimentación al secador, temperatura del aire de entrada al secador y solvente utilizado entre otros factores (Kosaraju et al., 2006).



**Figura 11: Microfotografía de las micropartículas de quercetina obtenidas bajo condiciones óptimas a diferentes amplitudes para el diseño Q-(In-C). A: (Mag 3.00 KX); B: (Mag 12.00 KX); C:(Mag10.00 KX).**

La Figura 12 muestra el perfil de liberación de Q en hexano desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para el diseño Q-(In-C), durante 1920 horas (ochenta días) a 30°C. Para mejorar la dispersabilidad de la Q en hexano, se agregó 0,5% de Span 85.



**Figura 12: Perfil de liberación de Q desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en hexano a 30°C para el diseño Q-(In-C).**

Se observó un comportamiento bifásico en el gráfico de perfil de liberación para las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, en acuerdo con los estudios realizados por Poulain *et al.* (2003) y Robert *et al.* (2012). Sin embargo, la liberación de quercetina, que alcanzó un 35% a las 1820 horas correspondió a la quercetina dispuesta superficialmente en las micropartículas, no observándose liberación de la quercetina encapsulada durante el tiempo de estudio. Este comportamiento se debería a una fuerte interacción quercetina-Inulina, a la baja solubilidad de la quercetina en el medio de disolución (hexano) y a la ausencia del inductor de poros que permita la formación de canales en la micropartícula. Por lo tanto, los resultados señalan que el perfil de liberación de un compuesto activo dependerá del tipo de agente encapsulante, del medio de disolución y de la solubilidad del activo en el medio.

Para explicar el perfil de liberación de la Q los datos se ajustaron a tres modelos matemáticos (Primer orden, Higuchi y Peppas). La Tabla 6 muestra los parámetros



cinéticos obtenidos de la curva de liberación de quercetina desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en hexano a 30 °C, para el diseño Q-(In-C).

**Tabla 6: Parámetros cinéticos de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para el diseño Q-In-C**

<b>Parámetros cinéticos</b>	<b>K</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Constante de Primer orden $10^3 k_{obs}$ (h <sup>-1</sup> )	0,2 ± 0,1	0,933
Constante Higuchi $10^2 k_{obs} \pm 10^2$ DE (h <sup>-0,5</sup> )	1,0 ± 0,1	0,920
Constante Peppas $10^1 k_{obs} \pm 10^1$ DE (h <sup>-n</sup> )	1,0 ± 0,7	0,920
Coefficiente <i>n</i> (Peppas)	0,5	

Se observó un buen ajuste de los datos cinéticos a los tres modelos estudiados con R<sup>2</sup>>0,9. Las constantes de velocidad de liberación presentaron bajos valores, lo que correspondería a una liberación lenta de la Q hacia el hexano desde las micropartículas. De acuerdo al valor del exponente n del modelo de Peppas (n=0,5) se puede establecer que la liberación de la Q desde las micropartículas en hexano ocurrió principalmente por un mecanismo de difusión Fickiana a favor de un gradiente de concentración. Estos resultados son similares al comportamiento observado en las micropartículas del diseño que no contenían agente inductor de poros, por lo cual no habría formación de canales que permitieran la difusión del activo hacia el medio.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrollaron micropartículas de quercetina con inulina nativa como agente encapsulante y capsul® como inductor de poros, para estudiar la cinética de liberación del flavonoide en un medio hidrofóbico. Los resultados obtenidos mostraron que la hipótesis en este estudio se cumplió.

1.- La eficiencia de encapsulación de quercetina fue significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) en las micropartículas que contenían inductor de poros (Capsul), debido a que este compuesto disminuye la interacción quercetina-inulina (hidrofilico), ya que en su estructura presenta un componente lipofílico que afectaría la interacción polímero-activo.

2. El perfil de liberación de quercetina en hexano desde las micropartículas se asoció directamente al agente inductor de poros. Las constantes de velocidad de liberación fueron mayores en las micropartículas que contenían inductor de poros, debido a la formación de canales en la micropartícula.

3. El análisis de la cinética de liberación de quercetina en hexano desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, indicó que la quercetina se liberó hacia el medio hidrofóbico principalmente a través de un mecanismo de difusión de tipo Fickiano.

4. De acuerdo al perfil de liberación, las micropartículas de quercetina podrían tener diferentes aplicaciones en sistemas alimentarios como por ejemplo aceites comestibles.

## REFERENCIAS

Aragón-Fernández A., González-Santos R. and Brizuela-Guerra N. (2009). Estudio cinético de liberación in vitro en un biomaterial compuesto por HAP200/POVIAC/CaCO<sub>3</sub>. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 10: 119-130.

Alamilla-Beltrán L., Chanona-Pérez J.J., Jiménez-Aparicio A.R. and Gutiérrez- López G.F. (2005). Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* 67: 179-184.

AppaRao B., Shivalingam M.R., Kishore Y.V., Sunitha N., Jyothibasu T. and Shyam T. (2010). Design and evaluation of sustained release microcapsules containing diclofenac sodium. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research* 1: 90-93

Barclay L. and Vinquist M.R. (2003). Phenols as antioxidants. In Z. Rappoport (edit), *The chemistry of phenols*. pp: 839-908. New York, USA.

De Vos P., Faas M., Spasojevic M. and Sikkema J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 20: 292-302.

Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56: 317-333.

Deng Z.Y. and Yu Y. (2004). Process for Producing Oil-soluble Microencapsulated Tea Polyphenols. *Fine and Specialty Chemicals* [DOI] cnki:ISSN:1008-1100.0.2004-16-003.

Deladino L., Anbinder P.S., Navarro A. and Martino M.N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate polymers* 71: 126-134.

Desai K. and Park H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*. 23: 1361-1394.

Ersus S. and Yurdagel U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier. *Journal of Food Engineering* 80: 805-812.

Fang Z. and Bhandari B. (2010). Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends in Food Science and Technology* 21: 510-523.

Farag R., Baroty G. and Basun A. (2003). The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. *Picual and Kronakii*), on the stability of sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology* 38: 81-87.

Fennema, O. (1993). *Química de Alimentos*. pp 29-79 y 157-273. Acribia, Zaragoza, España.

Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A. and Saurel R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* 10: 1107-1121.

Georgetti S.R., Casagrande R., Fernandes C.R., Pereira W. and Vieira M.J. (2008). Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology* 41: 1521-1527.

Gibbs B., Kermasha S., Allí I. and Mulligan C. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food and Nutrition* 50: 213-224.

Gouin S. (2004). Microencapsulation: Industrial Appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology* 15: 330-347.

Halliwell B. (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 49: 1341-1348.

Higuchi T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52: 1145-1149.

Hovgaard L. and Bronsted H. (1996). Current applications of polysaccharides in colon targeting. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 13: 185–223

Hu B., Pan CH., Sun Y., Hou Z., Ye H. and Zeng X. (2008). Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for Delivery of tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7451-7458.

Ito N., Hiroze M., Fukushima G., Tauda H., Shira T. and Tatematsu M. (1986). Studies on antioxidants; their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology* 24: 1071-1081.

Jonsdottir R., Bragadottir M. and Arnarson G. (2005). Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). *Journal of Food Science* 70: 433-440.

Kenyon M. (1995). Modified starch, maltodextrin and corn syrup solids as wall material for food encapsulation. In: S. Risch and G. Reineccius.(eds) *Encapsulation and controlled release of food ingredients* pp 42-50. Washington DC, American Chemical Society.

Kolanowski W., Laufenberg G. and Kunz B. (2004). Fish oil stabilization by microencapsulation with modified cellulose. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 55: 333-43.

Kosaraju S., Labbett D., Emin M., Konczak I. and Lundin L. (2008). Delivering polyphenols for healthy ageing. *Nutrition and Dietetics* 65: S48-S52.

Kosaraju S.L., D´ath L. and Lawrence A. (2006). Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers* 64: 163-167.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727-747.

Marinova E., Toneva A., Yanishlieva N. (2008) Synergistic antioxidant effect of  $\alpha$ -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food Chemistry* 106: 628–633.

Márquez-Ruiz G., Ruiz-Méndez M.V., Velasco J. and Dobarganes M.C. (2010) Preventing oxidation during frying of foods. In: *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications. Volumen 2: Management in different industry sectors*. E Decker, R Elias, D J Mc Clements (eds), Woodhead Publishing Limited. Copenhagen, Denmark, pp. 239-273.

Martínez-Flórez J., Gónzales-Gallego J.M. and Tuñón M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 6: 271-278.

McClements D. and Decker E. (2006). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science* 65: 1270-1282.

Murúa-Pagola B., Beristain-Guevara C.I. and Martínez-Bustos F. (2009). “Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying”. *Journal of Food Engineering* 91: 380-386.

Murugesan R. and Orsat, V. (2011). Spray-drying for the production of nutraceutical ingredients- A review. *Food and Bioprocess Technology* 5: 3-14.

Nawar W. 1996. Lipids. In: Fennema OR, editor. *Food chemistry*, 3rd ed. New York: Marcel Dekker p 225-319.

Peppas N. and Sahlin J. (1986). A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics* 57: 169-172.

Pedrielli P., Skibsted L. (2002). Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on  $\alpha$ -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7138-7144.

Pekkarinen S., Heinonen M., Hopia A. (1999) Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (p)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *Journal of the Science and Food Agriculture* 79: 99–506.

Pothakamury U. and Barbosa-Cánovas G. (1995). Fundamental aspect of controlled release in food. *Trends in Food Science and Technology* 6: 397-406.

Poulain N., Dez I., Perrio C., Lasne M.C., Prud'homme M.P. and Nakache E. (2003). Microspheres based on inulin for the controlled release of serine protease inhibitors: preparation, characterization and in vitro release. *Journal of Controlled Release* 92: 27-38.

Ré, M. (1998). Microencapsulation by Spray Drying. *Drying Technology* 16: 1195-1236.

Robert P., Gorena T., Romero N., Sepúlveda E., Chávez J., Sáenz C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology* 45: 1386-1394.

Robert P., García P., Reyes N., Chávez J. and Santos J. (2012). Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their released behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry* 134:1-8.

Rocha S., Generalov R., Pereira Mdo C., Peres I., Juzenas P. and Coelho M.A. (2011). Epigallocatechin gallate-loaded polysaccharide nanoparticles for prostate cancer chemoprevention. *Nanomedicine* 6: 63-167.

Ronkart S., Deroanne C., Paquot M., Fougnyes C., Lambrechts J.C. and Blecker C. (2007). Characterization of the physical state of spray-dried inulin. *Food Biophysics* 2: 83-92.

Sáez V., Hernández V. and Sanz L. (2004). Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 5: 87-101.

Sáenz C., Tapia S., Chávez J. and Robert P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* 114: 616-622.

Sansone F., Picerno P., Mencherini T., Vilecco F., D'Ursi A.M., Aquino RP. and Lauro M.R. (2011). Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability. *Journal of Food Engineering* 103: 188-196.

Sartor L., Pezzato E., Dell-Aica I., Caniato R., Biggin S. and Garbisa S. (2002). Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochemical Pharmacology* 64: 229-237.

Shahidi F. and Han X. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33: 501-547.

Shahidi F. and Zhong Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews* 39: 4067-407.

Siepmann J., and Peppas N. (2001). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Review*. 48: 139-157.



Stevens C., Meriggi A. and Booten K. (2001). Chemical modification of inulin, available renewable resource and its industrial applications. *Biomacromolecules* 2: 1-15.

Sun-Waterhouse D., Sandhya S., and Waterhouse G. (2012). Spray-Drying microencapsulation of polyphenol bioactives: A comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. *Food and Bioprocess Technology* DOI 10.1007/s11947-0120946-y.

Valenzuela A. and Nieto S. (1996). Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites* 47:186-196.

Warner, K. (2004). Chemical and physical reactions in oil during frying. In M. Gupta, K. Warner y P. White (eds), *Frying Technology and Practices*. pp 16-28. AOCS Press Champaign, Illinois, USA.

Wu C., Chen L. and Li W. (2005). Preparation of microencapsulation quercetin and its antioxidative properties in oils. *The Food Industry* [DOI] cnki:ISSN:1004-471X.0.2005-03-011.

Wu C., Chen L. and Li J. (2006). Microencapsulation of semen cuscuteae flavonoids and releasing property. *Transaction of the Chinese Society of Agricultural Engineering* [DOI] cnki:ISSN:1002-6819.0.2006-09-056.

Wu T., Yen F., Lin L., Tsai T., Lin C. and Cham T. (2008). Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 346: 160-168.

Yanishlieva N. and Marinova E. (2001). Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103: 752-767.

Yáñez Fernández J., Salazar Montoya J., Chaires Martínez I., Jiménez Hernández J., Márquez Robles, M. and Ramos Ramírez E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva* 21: 313-319.

Zhang L., Mou D. and Du Y. (2007). Procyanidins: Extraction and microencapsulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 2192-2197.

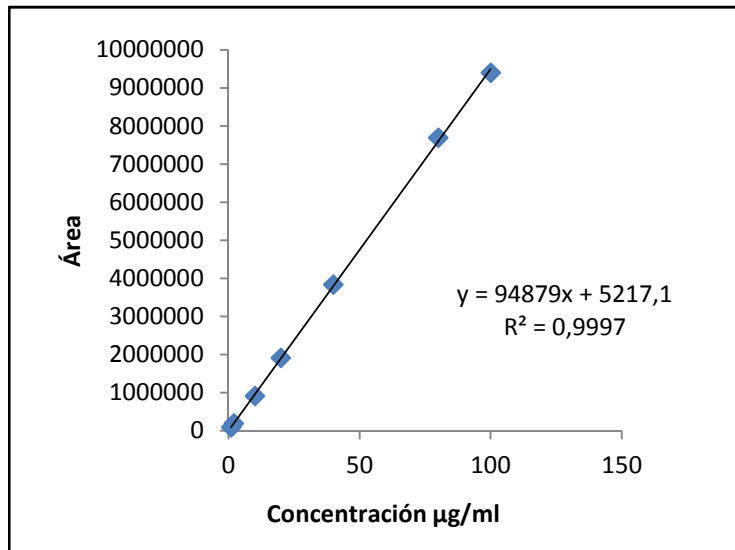
## ANEXOS

**Anexo 1:** Diseño experimental para las micropartículas de quercetina con inulina nativa y capsul® como inductor de poros.

Relación Q/(In)	Capsul® (%)*	Temperatura del aire de entrada (°C)
1:20	0	140
1:20	13	120
1:20	13	160
1:20	25	140
1:35	0	120
1:35	0	160
1:35	7	140
1:35	7	140
1:35	7	140
1:35	14	120
1:35	14	160
1:50	0	140
1:50	5	120
1:50	5	160
1:50	10	140

\*Porcentaje de Capsul respecto a inulina.

**Anexo 2:** Curva de calibración de quercetina por cromatografía HPLC con detector de arreglo de diodos.



Concentración Quercetina µg/mL	Área
100	9400708
80	7694730
40	3838861
20	1910914
10	916028
2	189582
1	90023

### Anexo 3: Análisis de varianza Metodología de Superficie Respuesta (MSR)

#### Análisis de Varianza para la Eficiencia de encapsulación de quercetina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:temperatura	2,645	1	2,645	0,35	0,5815
B:relacion	138,611	1	138,611	18,18	0,0080
C:capsul	282,031	1	282,031	36,99	0,0017
AA	0,519231	1	0,519231	0,07	0,8045
AB	13,3225	1	13,3225	1,75	0,2435
AC	12,6025	1	12,6025	1,65	0,2549
BB	20,3908	1	20,3908	2,67	0,1629
BC	144,0	1	144,0	18,89	0,0074
CC	315,923	1	315,923	41,44	0,0013
Error total	38,1225	5	7,6245		
Total (corr.)	984,884	14			

R-cuadrada = 96,1292 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 89,1619 por ciento

Error estándar del est. = 2,76125

Error absoluto medio = 1,31667

Estadístico Durbin-Watson = 2,29114 (P=0,4955)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,146751

#### Análisis de Varianza para Liberación de quercetina en hexano

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:temperatura	178,605	1	178,605	3,67	0,1135
B:relacion	143,651	1	143,651	2,95	0,1463
C:capsul	4090,6	1	4090,6	84,11	0,0003
AA	113,903	1	113,903	2,34	0,1865
AB	112,36	1	112,36	2,31	0,1890
AC	302,76	1	302,76	6,23	0,0548
BB	157,002	1	157,002	3,23	0,1323
BC	170,303	1	170,303	3,50	0,1202
CC	2114,23	1	2114,23	43,47	0,0012
Error total	243,164	5	48,6328		
Total (corr.)	7684,74	14			

R-cuadrada = 96,8358 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 91,1401 por ciento

Error estándar del est. = 6,97372

Error absoluto medio = 3,10111

Estadístico Durbin-Watson = 1,88126 (P=0,2223)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,034459

#### Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo = 0,86167

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
temperatura	120,0	160,0	160,0
relacion	20,0	50,0	43,3896
capsul	0,0	1,7	0,0000789505

Respuesta	Óptimo
ef encapsu	66,5382
Liberacion hexano	21,6646

**Anexo 4:** Análisis Anova para eficiencia de encapsulación y liberación en hexano de quercetina para los experimentos del diseño

**Tabla ANOVA para EE por Experimento**

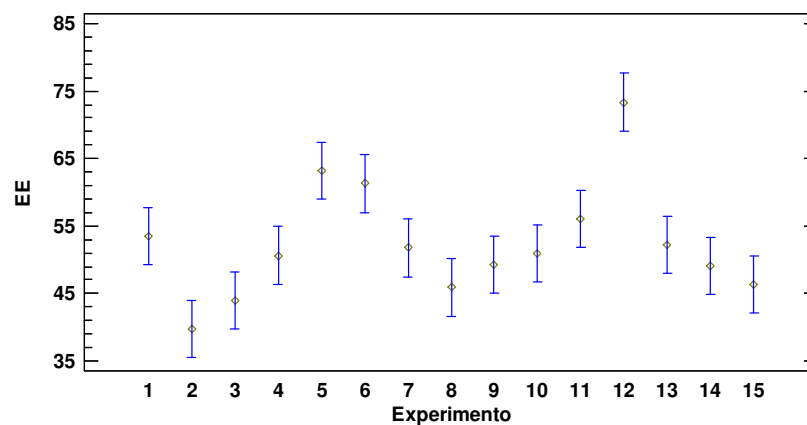
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2955,96	14	211,14	26,29	0,0000
Intra grupos	240,92	30	8,03067		
Total (Corr.)	3196,88	44			

**Pruebas de Múltiple Rangos para EE por Experimento**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Experimento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	3	39,7333	X
3	3	44,0	XX
8	3	45,9333	XXX
15	3	46,3333	XXX
14	3	49,1333	XXX
9	3	49,2667	XXX
4	3	50,6333	XXX
10	3	50,9667	XXX
7	3	51,7667	XXX
13	3	52,2333	XXX
1	3	53,5333	XXX
11	3	56,1	XXX
6	3	61,3	XX
5	3	63,2333	X
12	3	73,3333	X

**Medias y 95,0% de Tukey HSD**



**Tabla ANOVA para LIH por Experimento**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	23227,6	14	1659,11	169,62	0,0000
Intra grupos	293,433	30	9,78111		
Total (Corr.)	23521,0	44			

**Pruebas de Múltiple Rangos para LIH por Experimento**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Experimento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	16,4333	X
5	3	18,9	X
1	3	21,3	X
12	3	49,7	X
10	3	52,5	X
2	3	65,5	X
7	3	68,9	XX
8	3	73,5667	XXX
14	3	73,7667	XXX
4	3	73,8	XXX
9	3	75,4	XXX
15	3	76,0667	XXX
13	3	77,6667	XXX
3	3	80,1	XX
11	3	84,8	X

**Medias y 95,0% de Tukey HSD**

