

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**“CINÉTICA Y MECANISMO DE LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES  
DESDE MICROPARTÍCULAS Y SU EFECTO SOBRE LA  
ESTABILIDAD OXIDATIVA EN LINOLEATO DE METILO”**

**Presentada a la Universidad de Chile**

**para optar al Grado de Doctor en Nutrición y Alimentos**

**Por:**

**Manuel Jesús Palma Astudillo**

**Director de Tesis**

**Dra. Paz Robert Canales**

**Co-director de Tesis**

**Dra. Paula Jiménez Patiño**

**SANTIAGO-CHILE**

**2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**“CINÉTICA Y MECANISMO DE LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES  
DESDE MICROPARTÍCULAS Y SU EFECTO SOBRE LA  
ESTABILIDAD OXIDATIVA EN LINOLEATO DE METILO”**

**Presentada a la Universidad de Chile**

**para optar al Grado de Doctor en Nutrición y Alimentos**

**Por:**

**Manuel Jesús Palma Astudillo**

**Director de Tesis**

**Dra. Paz Robert Canales**

**Co-director de Tesis**

**Dra. Paula Jiménez Patiño**

**ESTA TESIS FORMA PARTE DEL PROYECTO FONDECYT N°1120308**

**SANTIAGO, 2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Residencia presentada por el candidato:

**MANUEL JESÚS PALMA ASTUDILLO**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctora en Nutrición y Alimentos, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 13 de **NOVIEMBRE** de 2014.

**Directores de Tesis:**

Dra. Paz Robert C.

\_\_\_\_\_

Dra. Paula Jiménez P.

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante:**

Dra. Carmen Sáenz H. (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dr. Rubén Bustos C.

\_\_\_\_\_

Dr. Alfonso Valenzuela B.

\_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

*A mi familia, por su apoyo incondicional durante todos estos años*

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Manuel Palma Astudillo, nace en Chillán el 06 de Julio de 1981. Realiza sus estudios secundarios en el Instituto Superior de Comercio de Chillán, del cual egresa el año 2001. En el año 2002 inició sus estudios en la carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad de Concepción y obtiene el grado académico de Licenciado en Ciencias Veterinarias en diciembre de 2006 y el título de Médico Veterinario en octubre de 2007. El año 2009 ingresa al Magíster en Ciencia de los Alimentos y obtiene el grado en marzo de 2013. El año 2010 ingresa al programa conjunto Doctorado en Nutrición y Alimentos de la Universidad de Chile. La Tesis de Doctorado la realizó en el Laboratorio de Química de los Alimentos, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. Paz Robert Canales. En paralelo participa en actividades académicas y como colaborador de tesis de pre y postgrado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre y hermanas (Patricia y Jeanette) por guiarme y apoyarme, por su cariño, consejos y siempre estar presentes.

A Fernando por su apoyo incondicional durante todos estos años e impulso a seguir adelante.

A la Dra. Paz Robert, mi directora de tesis, por su apoyo incondicional, sus enseñanzas, su paciencia, por las largas horas de trabajo para que yo pudiese finalizar de la mejor forma posible la tesis de Doctorado. No sólo fue un gran académico, sino que también la persona que me impulsó a tener capacidad crítica y sentirme capaz de enfrentar cualquier obstáculo.

A mi co-directora de tesis, Dra. Paula Jiménez, por aceptar acompañarme en este viaje con entusiasmo, por su ayuda y dedicación.

A los profesores de la comisión informante de tesis: Rubén Bustos, Carmen Sáenz y Alfonso Valenzuela por sus comentarios, ayuda y apoyo en este trabajo.

A la Dra. Gloria Márquez-Ruiz, por recibirme con entusiasmo en mi estadía en el ICTAN-CSCI, por haber sido una gran maestra.

A Francisca Holgado (Paquita) con quien no sólo fui un compañero de laboratorio, sino que aprendí mucho de su bondad e inteligencia y obtuve una gran amiga.

A mis compañeros de laboratorio: Andrés Bustamante, Paula García y Cristina Vergara con quienes se crearon lazos de amistad que permanecerán por siempre.

Al laboratorio Recalcine por su amabilidad en proveer de uno de los polímeros.

A Conicyt por la Beca de Doctorado en Chile N° 21100745.

Al proyecto Fondecyt N° 1120308 por el financiamiento para llevar a cabo esta tesis.

## INDICE DE MATERIAS

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 OXIDACIÓN DE LÍPIDOS</b> .....	2
<b>1.2 PRINCIPALES MECANISMOS DE OXIDACIÓN LIPÍDICA</b> .....	3
1.2.1 Auto-oxidación.....	4
1.2.2 Foto-oxidación.....	5
1.2.3 Oxidación enzimática de lípidos.....	6
<b>1.3 COMPUESTOS DE OXIDACIÓN</b> .....	6
1.3.1 Compuestos primarios de oxidación.....	6
1.3.1.1 Formación de hidroperóxidos durante la oxidación de linoleato de metilo.....	7
1.3.2 Dienes y trienos conjugados.....	7
1.3.3 Compuestos secundarios de oxidación.....	8
1.3.3.1 Monómeros oxidados.....	8
1.3.3.2 Componentes volátiles.....	9
1.3.3.3 Dímeros y polímeros.....	9
<b>1.4 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA OXIDACIÓN</b> .....	10
1.4.1 Técnicas cromatográficas.....	10
<b>1.5 ANTIOXIDANTES</b> .....	11
1.5.1 Antioxidantes primarios.....	12
1.5.2 Antioxidantes secundarios.....	13

1.5.3 Antioxidantes naturales.....	13
1.5.3.1 Polifenoles.....	14
1.5.3.2 Flavonoides.....	15
1.5.3.3 Adición de flavonoides a sistemas lipídicos.....	17
<b>1.6 MICROENCAPSULACIÓN.....</b>	<b>19</b>
1.6.1 Secado por atomización.....	20
1.6.2 Agentes encapsulantes.....	21
1.6.2.1 Hidroxipropilcelulosa.....	21
1.6.2.2. Inulina.....	22
1.6.2.3 Capsul.....	23
1.6.3 Encapsulación de compuestos fenólicos.....	24
<b>1.7 LIBERACIÓN CONTROLADA DESDE MICROPARTÍCULAS.....</b>	<b>26</b>
1.7.1 Patrones y mecanismos de liberación.....	27
<b>1.8 HIPÓTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>1.9 OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
1.9.1 Objetivo general.....	29
1.9.2 Objetivos específicos.....	29
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 MATERIALES.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Preparación de las micropartículas.....	30
2.2.1.1 Preparación de las micropartículas con inulina como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante.....	30

2.2.1.2 Preparación de las micropartículas con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul <sup>®</sup> como agente canalizante.....	31
2.2.2 Diseño experimental.....	31
2.2.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación de flavonoides.....	32
2.2.3.1 Flavonoides totales.....	32
2.2.3.2 Flavonoides superficiales.....	33
2.2.4 Liberación de flavonoides en hexano desde micropartículas a los 14 días (t <sub>14</sub> ) y 28 días (t <sub>28</sub> ) de almacenamiento para los sistemas con inulina e hidroxipropilcelulosa, respectivamente.....	33
2.2.5 Determinación de flavonoides por cromatografía líquida (HPLC).....	34
2.2.6 Caracterización de micropartículas de flavonoides obtenidas bajo condiciones óptimas.....	34
2.2.7 Ensayos de liberación de flavonoides desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en hexano y en linoleato de metilo.....	35
2.2.7.1 Perfil de liberación de flavonoides en hexano desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas.....	35
2.2.7.2 Perfil de liberación de flavonoides en linoleato de metilo desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas.....	35
2.2.8 Análisis cinético de liberación.....	36
2.2.9 Ensayos de estabilidad oxidativa de linoleato de metilo y determinación de compuestos de oxidación .....	37
2.2.9.1 Preparación de micropartículas.....	37
2.2.9.2 Estabilidad oxidativa de linoleato de metilo.....	37

2.2.9.3 Estabilidad oxidativa de linoleato de metilo durante el almacenamiento.....	37
2.2.9.4 Cromatografía de exclusión por tamaño de alta eficiencia (HPSEC).....	38
2.2.9.5 Cromatografía de gas líquida (CGL).....	38
2.2.10 Análisis estadístico.....	39
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 MICROPARTÍCULAS DE FLAVONOIDES POR SECADO POR ATOMIZACIÓN.....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Micropartículas de flavonoides con inulina y Capsul <sup>®</sup> .....	40
3.1.2 Micropartículas de flavonoides con hidroxipropilcelulosa y Capsul <sup>®</sup> .....	44
<b>3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LAS MICROPARTÍCULAS DE FLAVONOIDES OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS PARA CADA SISTEMA ESTUDIADO.....</b>	<b>51</b>
3.2.1 Caracterización de las micropartículas de flavonoide con inulina y Capsul <sup>®</sup> , obtenidas bajo condiciones óptimas.....	51
3.2.1.1 Microfotografías SEM de las micropartículas de flavonoides obtenidas bajo condiciones óptimas.....	52
3.2.2 Caracterización de las micropartículas de flavonoide con hidroxipropilcelulosa y Capsul <sup>®</sup> , obtenidas bajo condiciones óptimas.....	53
3.2.2.1 Microfotografías SEM de las micropartículas de flavonoides obtenidas bajo condiciones óptimas.....	54
3.2.3 Comparación de resultados para las micropartículas de flavonoides	

obtenidas bajo condiciones óptimas con inulina o hidroxipropilcelulosa como agentes encapsulantes.....	55
<b>3.3 MECANISMO Y CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES DESDE MICROPARTÍCULAS CON INULINA O HIDROXIPROPILCELULOSA, OBTENIDOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS EN LINOLEATO DE METILO Y HEXANO COMO SISTEMAS LIPÍDICOS.....</b>	<b>57</b>
3.3.1 Perfil de liberación de flavonoides encapsulados con inulina como agente encapsulante y Capsul <sup>®</sup> como agente canalizante en linoleato de metilo y hexano	57
3.3.2 Parámetros cinéticos y mecanismo de liberación de flavonoides desde micropartículas con inulina en linoleato de metilo y en hexano.....	61
3.3.3 Perfil de liberación de flavonoides desde micropartículas con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul <sup>®</sup> como agente canalizante en linoleato de metilo y en hexano.....	63
3.3.4 Parámetros cinéticos y mecanismo de liberación de flavonoides desde micropartículas con hidroxipropilcelulosa en linoleato de metilo y en hexano.....	65
<b>3.4 EFECTO DE LOS FLAVONOIDES QUERCETINA, NARINGENINA O EPICATEQUINA LIBRES O ENCAPSULADOS SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LINOLEATO DE METILO EN CONDICIONES ACELERADAS DE OXIDACIÓN.....</b>	<b>68</b>
3.4.1 Ensayos de estabilidad oxidativa de linoleato de metilo adicionado de flavonoides libres .....	68
3.4.1.1 Tiempo de inducción en Rancimat .....	68
3.4.1.2 Evolución de la formación de compuestos de oxidación y retención de	

antioxidantes durante los ensayos de oxidación acelerada de linoleato de metilo en Rancimat a 60° C.....	71
3.4.1.3 Ensayos de estabilidad oxidativa en estufa a 60 °C.....	74
3.4.2 Ensayos de estabilidad oxidativa de linoleato de metilo adicionado de flavonoides encapsulados.....	78
3.4.2.1 Tiempo de inducción en Rancimat.....	79
3.4.2.2 Evolución de la formación de compuestos de oxidación y retención de antioxidantes encapsulados durante los ensayos de oxidación acelerada de linoleato de metilo en Rancimat a 60° C.....	80
3.4.3 Análisis de formación de compuestos de oxidación por HPSEC y pérdida de sustrato por GLC.....	84
<b>CONCLUSIONES</b> .....	86
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	87

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> CLASIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES CONSIDERANDO NÚMERO DE CARBONOS DE SU ESTRUCTURA.....	15
<b>TABLA 2.</b> EFECTO DE LA ADICIÓN DE FLAVONOIDES EN LA OXIDACIÓN DE DIFERENTES ACEITES.....	18
<b>TABLA 3.</b> CONDICIONES EXPERIMENTALES, EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN (EE) Y LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES EN HEXANO (T <sub>14</sub> ), PARA EL DISEÑO BOX-BEHNKEN DE Q, N Y E CON INULINA COMO AGENTE ENCAPSULANTE Y CAPSUL <sup>®</sup> COMO AGENTE CANALIZANTE....	41
<b>TABLA 4.</b> CONDICIONES EXPERIMENTALES, EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN (EE) Y LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES (T <sub>28</sub> ) PARA EL DISEÑO BOX-BEHNKEN DE Q, N Y E CON HIDROXIPROPILCELULOSA COMO AGENTE ENCAPSULANTE Y CAPSUL <sup>®</sup> COMO AGENTE CANALIZANTE.....	45
<b>TABLA 5.</b> CONDICIONES ÓPTIMAS DE OBTENCIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS DE Q, N Y E MEDIANTE SECADO POR ATOMIZACIÓN CON IN O HPC COMO AGENTE ENCAPSULANTE.....	50
<b>TABLA 6.</b> CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS DE FLAVONOIDES UTILIZANDO INULINA COMO AGENTE ENCAPSULANTE CON Y SIN LA ADICIÓN DE AGENTE CANALIZANTE (CAPSUL <sup>®</sup> ).....	51
<b>TABLA 7.</b> CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS DE FLAVONOIDES UTILIZANDO HIDROXIPROPILCELULOSA COMO AGENTE ENCAPSULANTE Y CAPSUL <sup>®</sup> COMO AGENTE CANALIZANTE.....	54
<b>TABLA 8.</b> PARÁMETROS CINÉTICOS Y MECANISMOS DE LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES DESDE MICROPARTÍCULAS CON INULINA COMO	

AGENTE ENCAPSULANTE Y CAPSUL <sup>®</sup> COMO AGENTE CANALIZANTE, EN LINOLEATO DE METILO.....	62
<b>TABLA 9.</b> PARÁMETROS CINÉTICOS Y MECANISMOS DE LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES DESDE MICROPARTÍCULAS CON INULINA COMO AGENTE ENCAPSULANTE Y CAPSUL <sup>®</sup> COMO AGENTE CANALIZANTE, EN HEXANO.....	62
<b>TABLA 10.</b> PARÁMETROS CINÉTICOS Y MECANISMO DE LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES DESDE MICROPARTÍCULAS CON HIDROXIPROPILCELULOSA COMO AGENTE ENCAPSULANTE Y CAPSUL <sup>®</sup> COMO AGENTE CANALIZANTE, EN LINOLEATO DE METILO.....	66
<b>TABLA 11.</b> PARÁMETROS CINÉTICOS Y MECANISMO DE LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES DESDE MICROPARTÍCULAS CON HIDROXIPROPILCELULOSA COMO AGENTE ENCAPSULANTE Y CAPSUL <sup>®</sup> COMO AGENTE CANALIZANTE, EN HEXANO.....	66
<b>TABLA 12.</b> TIEMPO DE INDUCCIÓN Y FACTOR DE PROTECCIÓN DE LINOLEATO DE METILO CON LA ADICIÓN DE FLAVONOIDES LIBRES (200 PPM) EN RANCIMAT A 60 °C.....	69
<b>TABLA 13.</b> FORMACIÓN DE COMPUESTOS DE OXIDACIÓN BAJO CONDICIONES ACELERADAS DE OXIDACIÓN DE LINOLEATO DE METILO EN RANCIMAT A 60 °C.....	72
<b>TABLA 14.</b> CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS DE FLAVONOIDES ENCAPSULADAS UTILIZANDO INULINA O HIDROXIPROPILCELULOSA COMO AGENTE ENCAPSULANTE Y CAPSUL <sup>®</sup> COMO AGENTE CANALIZANTE, UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS DE ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LINOLEATO DE METILO.....	78
<b>TABLA 15.</b> TIEMPO DE INDUCCIÓN Y FACTOR DE PROTECCIÓN DE LINOLEATO DE METILO CON LA ADICIÓN DE FLAVONOIDES	

ENCAPSULADOS (200 PPM), EN RANCIMAT A 60 °C.....	79
<b>TABLA 16.</b> COMPUESTOS TOTALES DE OXIDACIÓN Y PÉRDIDA DE SUSTRATO, EN LINOLEATO DE METILO CON MICROPARTÍCULAS DE EPICATEQUINA, EN CONDICIONES ACELERADAS DE OXIDACIÓN EN RANCIMAT A 60 °C.....	84
<b>TABLA 17.</b> COMPUESTOS TOTALES DE OXIDACIÓN Y PÉRDIDA DE SUSTRATO, EN LINOLEATO DE METILO CON ADICIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE QUERCETINA, EN CONDICIONES ACELERADAS DE OXIDACIÓN EN RANCIMAT A 60 °C.....	85
<b>TABLA 18.</b> COMPUESTOS TOTALES DE OXIDACIÓN Y PÉRDIDA DE SUSTRATO, EN LINOLEATO DE METILO CON ADICIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE FLAVONOIDES LIBRES, EN CONDICIONES ACELERADAS DE OXIDACIÓN EN RANCIMAT A 60 °C.....	85

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> ECUACIONES QUE DESCRIBEN LA AUTO-OXIDACIÓN DE MATERIAS GRASAS.....	4
<b>FIGURA 2.</b> ECUACIONES QUE DESCRIBEN LA FOTO-OXIDACIÓN.....	6
<b>FIGURA 3.</b> FORMACIÓN DE COMPUESTOS SECUNDARIOS DE OXIDACIÓN CON FUNCIONES HIDROXI Y CETO.....	8
<b>FIGURA 4.</b> REACCIÓN DE B-ESCISIÓN DE LOS HIDROPERÓXIDOS INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES.....	9
<b>FIGURA 5.</b> ECUACIONES QUE DESCRIBEN LA ACCIÓN ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LOS POLIFENOLES.....	15
<b>FIGURA 6.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA HIDROXIPROPILCELULOSA.....	22
<b>FIGURA 7.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA INULINA.....	23
<b>FIGURA 8.</b> FORMACIÓN DE CAPSUL <sup>®</sup> .....	24
<b>FIGURA 9.</b> CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS FLAVONOIDES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.....	25
<b>FIGURA 10.</b> GRÁFICOS DE PARETO PARA LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN, EN LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS Q-(IN-C) (A), N-(IN-C) (B) Y E-(IN-C) (C).....	42
<b>FIGURA 11.</b> GRÁFICOS DE PARETO PARA LA LIBERACIÓN EN HEXANO (T <sub>14</sub> ), EN LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS Q-(IN-C) (A), N-(IN-C) (B) Y E-(IN-C) (C).....	43
<b>FIGURA 12.</b> GRÁFICOS DE SUPERFICIE RESPUESTA PARA EL DISEÑO BOX-BEHNKEN DE LOS SISTEMAS FL-IN-C.....	44

<b>FIGURA 13.</b> GRÁFICOS DE PARETO PARA LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN, EN LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS Q-(HPC-C) (A), N-(HPC-C) (B) Y E-(HPC-C) (C).....	46
<b>FIGURA 14.</b> GRÁFICOS DE PARETO PARA LA LIBERACIÓN EN HEXANO (T <sub>28</sub> ), EN LOS SISTEMAS DE MICROPARTÍCULAS Q-(HPC-C) (A), N-(HPC-C) (B) Y E-(HPC-C) (C).....	47
<b>FIGURA 15.</b> GRÁFICOS DE SUPERFICIE RESPUESTA PARA EL DISEÑO BOX-BEHNKEN DE LOS SISTEMAS FL-HPC-C.....	48
<b>FIGURA 16.</b> MICROFOTOGRAFÍAS SEM DE FLAVONOIDES ENCAPSULADOS PARA LOS SISTEMAS FL-IN-C.....	53
<b>FIGURA 17.</b> MICROFOTOGRAFÍAS SEM DE FLAVONOIDES ENCAPSULADOS PARA LOS SISTEMAS FL-HPC-C.....	55
<b>FIGURA 18.</b> GRÁFICO DE LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES DESDE MICROPARTÍCULAS CON INULINA COMO AGENTE ENCAPSULANTE, EN LINOLEATO DE METILO SIN AGENTE CANALIZANTE Y CON AGENTE CANALIZANTE.....	58
<b>FIGURA 19.</b> GRÁFICO DE LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES DESDE MICROPARTÍCULAS CON INULINA COMO AGENTE ENCAPSULANTE, EN HEXANO SIN AGENTE CANALIZANTE Y CON AGENTE CANALIZANTE.....	59
<b>FIGURA 20.</b> ESQUEMA DE FORMACIÓN DE CANALES EN LA MICROPARTÍCULA.....	62
.	
<b>FIGURA 21.</b> GRÁFICOS DE LIBERACIÓN DE FLAVONOIDES DESDE MICROPARTÍCULAS CON HIDROXIPROPILCELULOSA COMO AGENTE ENCAPSULANTE Y CAPSUL <sup>®</sup> COMO AGENTE CANALIZANTE.....	65
<b>FIGURA 22.</b> CROMATOGRAMAS DE METIL LINOLEATO ANALIZADO	

MEDIANTE HPSEC DURANTE LA OXIDACIÓN DE LINOLEATO DE METILO BAJO CONDICIONES ACELERADAS DE OXIDACIÓN EN RANCIMAT A 60 °C.....	73
<b>FIGURA 23.</b> GRÁFICO DE LA EVOLUCIÓN DE LA FORMACIÓN DE COMPUESTOS DE OXIDACIÓN Y RETENCIÓN DE FLAVONOIDES LIBRES DURANTE LOS ENSAYOS DE OXIDACIÓN ACELERADA DE LINOLEATO DE METILO EN RANCIMAT A 60° C.....	76
<b>FIGURA 24.</b> GRÁFICO DE LA EVOLUCIÓN DE LA FORMACIÓN DE COMPUESTOS DE OXIDACIÓN Y RETENCIÓN DE FLAVONOIDES DURANTE LOS ENSAYOS DE OXIDACIÓN ACELERADA DE LINOLEATO DE METILO EN ESTUFA A 60° C.....	77
<b>FIGURA 25.</b> GRÁFICOS DE LA CINÉTICAS DE FORMACIÓN DE COMPUESTOS DE OXIDACIÓN Y RETENCIÓN DE FLAVONOIDES DURANTE LA OXIDACIÓN DE LINOLEATO DE METILO CON LA ADICIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE QUERCETINA, EN CONDICIONES ACELERADAS DE OXIDACIÓN EN RANCIMAT A 60° C.....	82
<b>FIGURA 26.</b> GRÁFICOS DE LA CINÉTICAS DE FORMACIÓN DE COMPUESTOS DE OXIDACIÓN Y RETENCIÓN DE FLAVONOIDES DURANTE LA OXIDACIÓN DE LINOLEATO DE METILO CON LA ADICIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE EPICATEQUINA, EN CONDICIONES ACELERADAS DE OXIDACIÓN EN RANCIMAT A 60° C.....	83

## ABREVIATURAS

AE: Agentes encapsulantes  
BHA: Butilhidroxianisol  
BHT: Butilhidroxitolueno  
C: Capsul<sup>®</sup>  
CG: Cromatógrafo de gases  
DIM: Dímeros  
DS: Desviación estándar  
E: Epicatequina  
EE: Eficiencia de encapsulación  
FL: Flavonoide  
IN: Inulina  
H: Hexano  
HPC: Hidroxipropilcelulosa  
HPSEC: Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución  
LM: Linoleato de metilo  
N: Naringenina  
oxMON: Monómeros oxidados  
PG: Galato de propilo  
POL: Polímeros  
PP<sup>\*</sup>: Radical fenoxil  
PV: Valor de peróxidos  
Q: Quercetina  
R<sup>\*</sup>: Radical alquil  
RH: ácido graso  
ROO<sup>\*</sup>: Radical peroxil  
ROOH: Hidroperóxido  
SEM: Microscopía electrónica de barrido  
TBHQ: Terbutilhidroquinona

## RESUMEN

La oxidación lipídica es una de las principales reacciones que afectan la calidad de los aceites, transformándose en uno de los principales problemas para la industria alimentaria por la aparición de olores y sabores indeseables. Para la protección de la oxidación lipídica, se pueden utilizar micropartículas de flavonoides de liberación controlada para extender la vida útil de las materias grasas y disminuir la utilización inefectiva del antioxidante natural.

De acuerdo a estos antecedentes el objetivo de este estudio fue estudiar la cinética y mecanismo de liberación de flavonoides desde micropartículas con y sin la adición de un agente canalizante en linoleato de metilo (LM) y su efecto en la formación de compuestos polares.

Se encapsularon los flavonoides quercetina (Q), naringenina (N) o epicatequina (E), mediante secado por atomización, utilizando inulina (IN) o hidroxipropilcelulosa (HPC) como agentes encapsulantes y Capsul<sup>®</sup> (C) como agente canalizante, de acuerdo a un diseño Box-Behnken, con un total de 15 experimentos para cada sistema de micropartículas estudiado (Q-(IN-C), N-(IN-C), E-(IN-C), Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C)). Las variables independientes fueron la relación flavonoide/agente encapsulante, temperatura del aire entrada y contenido de Capsul. Las variables dependientes fueron la eficiencia de encapsulación y liberación de flavonoides a los 14 días ( $t_{14}$ ) y a los 28 días ( $t_{28}$ ) de almacenamiento en hexano (H) para los sistemas con IN y HPC, respectivamente. Se utilizó la metodología de Superficie Respuesta para la obtención de micropartículas bajo condiciones óptimas.

Los sistemas de micropartículas obtenidos bajo condiciones óptimas (Q-IN, Q-(IN-C), N-IN, N-(IN-C), E-IN, E-(IN-C), Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C)) se utilizaron para determinar la EE y el perfil de liberación de flavonoides en H y LM. La determinación de flavonoides se realizó mediante HPLC. Las micropartículas obtenidas mostraron EE superiores al 60% para los sistemas de Q y E y menores para

los sistemas con N. Un incremento en el número de grupos OH en el flavonoide aumentó la EE debido a la interacción entre los grupos OH del flavonoide con los sitios OH de IN y HPC mediante puentes de hidrógeno.

El perfil de liberación de flavonoides desde las micropartículas en H y en LM durante el almacenamiento en estufa a 30 °C, mostró que para las micropartículas con IN sin y con C, la constante de velocidad de liberación de N fue significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) respecto a las de Q y E en LM y en H. Mientras que la constante de velocidad de liberación de E fue significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) respecto a Q y N en LM y en H. El parámetro “n” en el modelo de Peppas para las micropartículas con IN sugiere que el mecanismo de liberación de los flavonoides se atribuye a la presencia de un agente canalizante, independiente de la naturaleza del flavonoide. Para las micropartículas con HPC solamente se observó la liberación de N en LM y correspondió a liberación de los flavonoides superficiales. Mientras que en H se observó liberación de N y Q sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las constantes de liberación. El parámetro “n” en el modelo de Peppas sugiere que el mecanismo de liberación de los flavonoides se atribuye a la interacción agente encapsulante-medio de disolución y flavonoide-agente encapsulante.

Se realizaron ensayos de estabilidad oxidativa en linoleato de metilo a 60 °C con la adición de flavonoides libres (LM-N, LM-Q y LM-E) y encapsulados (LM-Q-IN, LM-Q-(IN-C), LM-Q-(HPC-C), LM-E-IN, LM-E-(IN-C) y LM-E-(HPC-C)) (200 mg/Kg). Las micropartículas de flavonoides se elaboraron utilizando la misma relación flavonoide-agente encapsulante, mientras que el contenido de C y temperatura de entrada al secador correspondieron a las utilizadas en la elaboración de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas. La determinación de compuestos de oxidación se realizó por HPSEC y la retención de flavonoides por HPLC. La adición de flavonoides libres mostró un factor de protección y tiempo de inducción significativamente mayor para E, en relación a Q y N, mientras que N no ejerció ningún efecto sobre la estabilidad oxidativa. La adición de flavonoides encapsulados al LM mostró un aumento significativo en el factor de protección y tiempo de inducción, respecto al LM y fue mayor para el sistema LM-Q-(IN-C) mostrando el efecto del agente canalizante sobre el

control de la liberación. En todos los sistemas el final de la fase lag e inicio de la propagación fue claramente marcado por la desaparición de Q y E y la iniciación de la formación de polímeros coincide con el tiempo de inducción

Se puede concluir que conocer el perfil de liberación y capacidad antioxidante determina la aplicabilidad de las micropartículas en sistemas lipídicos.

## ABSTRACT

Lipid oxidation is one of the main reactions affecting the quality of oils; it is also responsible for the appearance of unwanted smells and tastes, negatively impacting the food industry. However, the use of controlled-release flavonoid microparticles can reduce the effects of lipid oxidation, thus extending the shelf life of fats, and reducing the ineffective use of natural antioxidants.

Based on the above, the objective of this research was to study the kinetics and mechanism of flavonoid release from microparticles with and without the addition of a channeling agent in methyl linoleate (ML), and its effect on the formation of polar compounds.

The flavonoids quercetin (Q), naringenin (N) or epicatechin (E) were encapsulated by spray-drying, using Inulin (IN) or Hydroxypropylcellulose (HPC) as encapsulating agents, and Capsul (C) as channeling agent, using a Box-Behnken design. A total of 15 experiments were conducted for each microparticles system (Q-(IN-C), N-(IN-C), E-(IN-C), Q-(HPC-C), N-(HPC-C) and E-(HPC-C)). The independent variables were the flavonoid/encapsulating agent ratio, air inlet temperature and Capsul content, whereas the dependent variables were encapsulation efficiency and flavonoid release at 14 (t14) and 28 (t28) days of storage in hexane (H) for the IN and HPC systems, respectively. The Response Surface methodology was used to obtain microparticles under optimal conditions.

The microparticles systems obtained under optimal conditions (Q-(IN-C), N-(IN-C), E-(IN-C), Q-(HPC-C), N-(HPC-C) and E-(HPC-C)) were used to determine the EE, and the flavonoid release profile in H and ML. The determination of flavonoids was performed using HPLC. The obtained microparticles indicated that the encapsulation efficiency (EE) to be greater than 60% for the Q and E systems, and less for the N

systems. An increase in the number of OH groups in the flavonoid increased the EE due to the interaction between the OH groups of the flavonoid with the OH sites of IN and HPC through hydrogen bonds.

The release profile of flavonoids from the microparticles in H and in ML during oven storage at 30° showed that, for the microparticles with IN and with and without C, the constant release rate of N was significantly greater than ( $p \leq 0.05$ ) with respect to the one of Q and E in ML and in H. While the release rate constant of E was significantly lower ( $p \leq 0.05$ ) with respect to Q and N in ML and in H, the “n” parameter for Peppas model for the microparticles with IN suggests that the release mechanism of flavonoids is attributed to the presence of a channeling agent, irrespective of the nature of the flavonoid. For the microparticles with HPC, only the release of N in ML was observed, and it corresponded to the release of superficial flavonoids, whereas for H the release of N and Q was observed without significant differences ( $p > 0.05$ ) amongst the release constants. The “n” parameter in Peppas model suggests that the release mechanism of flavonoids is attributed to the interaction of both the encapsulating agent-dissolution medium and flavonoid-encapsulating agent medium.

Oxidative stability trials were performed in methyl linoleate at 60° with the addition of free flavonoids (ML-N, ML-Q and ML-E) and encapsulated flavonoids (ML-Q-IN, ML-Q-(IN-C), ML-Q-(HPC-C), ML-E-IN, ML-E-(IN-C) and MLE-E-(HPC-C)) (200 mg/kg). The flavonoid microparticles were elaborated using the same flavonoid-encapsulating agent ratio, while the content of C and inlet temperature of the dryer corresponded to those used in the elaboration of microparticles obtained under optimal conditions. The determination of oxidative compounds was performed using HPSEC, and the retention of flavonoids using HPLC. The addition of free flavonoids presented a protection factor and induction time significantly higher for E in relation to Q and N, whereas N did not have an effect on the oxidative stability. The addition of encapsulated flavonoids to ML showed a significant increase in the protection factor and induction period with respect to ML, and it was greater for the ML-Q-(IN-C) system, displaying

the effect of the channeling agent over the release control. In all systems, the end of lag phase and the initiation of propagation were clearly marked by the vanishing of Q and E. The appearance of the formation of polymers coincides with the induction period. It can be concluded that knowing the release profile and antioxidant capacity determine the applicability of microparticles in a lipid systems.

## INTRODUCCIÓN

Los lípidos pueden sufrir una serie de reacciones oxidativas que llevan a pérdida de su calidad química y nutricional (Márquez-Ruíz *et al.*, 2010). Comúnmente, para la protección contra la oxidación lipídica se utilizan antioxidantes sintéticos, sin embargo, éstos son cuestionados por sus posibles efectos adversos sobre la salud, mientras que los antioxidantes naturales, como los compuestos fenólicos, están tomando importancia (Shahidi y Zhong, 2010), debido al aumento en las preferencias de los consumidores por productos naturales.

Los flavonoides, son un amplio grupo de compuestos fenólicos que pueden actuar como antioxidantes en sistemas lipídicos (Huber *et al.*, 2009; Naz *et al.*, 2008; Tsimogiannis y Oreopoulou, 2006; Russin *et al.*, 2006; Antoshina *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2004; Wanasundara y Shahidi, 1998; Nieto *et al.*, 1993) al donar un átomo de hidrógeno al radical peroxil. El radical fenoxil formado es estabilizado por resonancia y puede también reaccionar con otros radicales libres. El efecto de la adición de algunos flavonoides se ha estudiado en linoleato de metilo (Pedrielli y Skibsted, 2002; Pekkarinen *et al.*, 1999); en grasas y aceites (Huber *et al.*, 2009; Naz *et al.*, 2008; Tsimogiannis y Oreopoulou, 2006; Russin *et al.*, 2006; Antoshina *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2004; Wanasundara y Shahidi, 1998; Ho *et al.*, 1997; Wanasundara y Shahidi, 1994; Nieto *et al.*, 1993; Pereira y Das, 1990) y en emulsiones (Di Mattia *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Sin embargo, su acción es limitada porque pueden degradarse y/o oxidarse a altas temperaturas, siendo necesario en algunos casos adicionar un alto contenido para obtener el efecto deseado.

La encapsulación de antioxidantes es una potencial herramienta para controlar su liberación en una matriz lipídica, en la que la liberación del antioxidante ocurriría a una velocidad controlada, extendiendo la vida útil y disminuyendo la utilización inefectiva del antioxidante natural. En este contexto, estudios sobre liberación

controlada de antioxidantes encapsulados en sistemas lipídicos son escasos (Wu *et al.*, 2006a; Wu *et al.*, 2006b; Wu *et al.*, 2005; Deng y Yu, 2004).

El agente encapsulante es esencial para controlar la liberación de antioxidantes en sistemas lipídicos. Un método para preparar micropartículas de flavonoides de liberación controlada, es por encapsulación de flavonoides en polímeros insolubles en lípidos que se comportarán como una matriz inerte, adicionalmente, la incorporación de un agente canalizante permitirá la formación de canales en la matriz de la micropartícula para la liberación gradual de flavonoides en sistemas lipídicos (Song *et al.*, 2005).

### **1.1 Oxidación de lípidos**

Los lípidos son importantes debido a su contribución en la palatabilidad, saciedad y nutrición. El consumo de lípidos alcanza un promedio anual de 33,8 kilogramos por persona en Estados Unidos, por esta razón, es importante considerar su calidad (O'Brien, 2004).

La oxidación lipídica es una de las principales causas de deterioro de los alimentos y corresponde a la segunda causa de deterioro después de la acción de los microorganismos. El deterioro oxidativo es una importante preocupación para la industria alimentaria, porque limita la vida media de los alimentos al afectar tanto la calidad sensorial como nutricional (Yanishlieva y Marinova, 2001) porque produce alteraciones del aroma y sabor (enranciamiento), pérdida de nutrientes y la formación de sustancias potencialmente nocivas (Halliwell *et al.*, 1995) con los consiguientes costos económicos asociados. Los triglicéridos constituyen más del 95% de los lípidos y la oxidación lipídica ocurre en el doble enlace de los ácidos grasos insaturados (McClements y Decker, 2000; Frankel, 1998). Los ácidos grasos insaturados en el triglicérido no son volátiles y no contribuyen directamente al aroma de los alimentos, sin embargo, éstos ácidos grasos pueden descomponerse durante la oxidación lipídica a

compuestos de menor tamaño, como son los compuestos volátiles que producen aromas indeseados asociado a la rancidez oxidativa. Estos compuestos volátiles tienen efectos dañinos en la calidad de los alimentos, excepto en el caso de los alimentos fritos, cereales y quesos, donde pequeñas cantidades de estos volátiles son importantes en el perfil de sabor (Chaiyasit *et al.*, 2007).

La oxidación lipídica es una reacción natural favorecida por muchos factores tales como: la temperatura, composición en ácidos grasos (al aumentar la insaturación de los ácidos grasos en el triglicérido aumenta su susceptibilidad a la oxidación), contacto y concentración de oxígeno, luz, ausencia de compuestos antioxidantes (tocoferoles y polifenoles), presencia de ácidos grasos libres, metales, pigmentos, enzimas y compuestos oxidados térmicamente (Choe y Min, 2006; Yanishlieva, 2001).

Para retardar la oxidación de lípidos se utilizan diferentes estrategias, siendo el uso de antioxidantes la herramienta más empleada (Yanishlieva *et al.*, 2005). Muchos de estos compuestos antioxidantes son sintéticos, los que se perciben como negativos por parte de los consumidores (Chaiyasit *et al.*, 2007), mientras que los antioxidantes naturales están tomando importancia al ser percibidos como seguros, además entregan efectos benéficos a la salud (Seppanem *et al.*, 2010).

## **1.2 Principales mecanismos de oxidación lipídica**

La oxidación de lípidos puede ocurrir por tres mecanismos: auto-oxidación, foto-oxidación y oxidación enzimática. La oxidación lipídica puede ser acelerada por la presencia de prooxidantes como trazas de metales (hierro, cobre y cobalto principalmente), fotosensibilizadores, luz UV y enzimas, entre otros (Chaiyasit *et al.*, 2007).

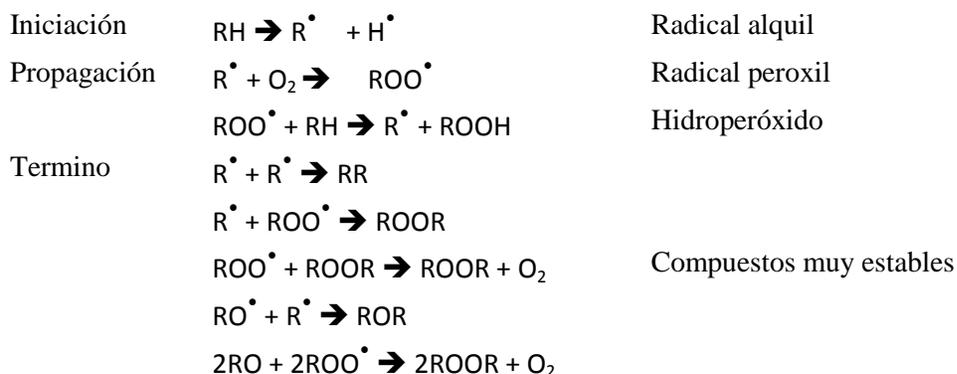
### 1.2.1 Auto-oxidación

La auto-oxidación de ácidos grasos insaturados es una reacción en cadena que incluye los pasos de iniciación, propagación y término (Figura 1). El proceso de auto-oxidación ha sido estudiado durante décadas por distintos investigadores, lo que permite tener un conocimiento más amplio de los mecanismos involucrados en el proceso (Schneider, 2009; Choe y Min, 2006; Frankel, 2005; Yanishlieva y Marinova, 2001; Belitz, 1997).

En la **iniciación**, un radical libre o iniciador (luz o metales) extrae el átomo de hidrógeno desde el ácido graso o acilglicerol (RH) produciendo un radical alquil ( $R^\bullet$ ).

En la **propagación**, el radical alquil ( $R^\bullet$ ) reaccionará rápidamente con oxígeno formando un radical peroxil ( $ROO^\bullet$ ). A su vez, el radical peroxil puede extraer el hidrógeno desde otra molécula de lípido en la posición alílica o bis alílica para formar el hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical alquil ( $R^\bullet$ ), propagando la oxidación.

Al **término**, los radicales tienden a dimerizar para terminar la reacción en cadena. Los radicales libres provenientes de la descomposición de los hidroperóxidos se asocian para formar una serie de compuestos no radicalarios estables, como aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres y otros compuestos secundarios (Choe y Min, 2006; Bravo, 1998), los cuales son responsables de aromas y sabores indeseables y de cambios en el color (Cheftel, 1992). Los compuestos secundarios, junto con los radicales libres, constituyen la base para medir el deterioro oxidativo de los lípidos.



**Figura 1.** Ecuaciones que describen la auto-oxidación de materias grasas

Los metales son importantes iniciadores de la oxidación lipídica y corresponden a uno de los principales prooxidantes (Dimakou *et al.*, 2007; Mancuso *et al.*, 2000; Mei *et al.*, 1998). Los iones de metales de transición en su estado de valencia más bajo ( $M^{n+}$ ), reaccionan rápidamente con los hidroperóxidos, actuando como donantes de un electrón para formar radicales alcoxil (Ecuación 1.1), lo cual puede ser considerado como la ramificación de la fase de propagación.



En una reacción lenta posterior, el estado reducido del ión metálico se regenera gracias a una molécula de hidroperóxido (Ecuación 1.2).

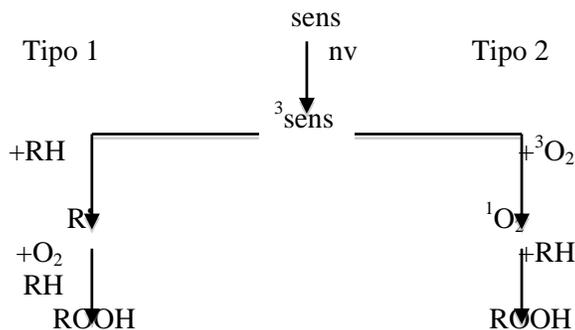


Los radicales producidos en las Ecuaciones 1.1 y 1.2 se introducen en la secuencia de la propagación y disminuyen el período de inducción.

### 1.2.2 Foto-oxidación

Una vía alternativa a la producción de radicales libres, que también conduce a la formación de hidroperóxidos es la ruta foto-oxidativa. En este caso, la oxidación de los lípidos se produce en presencia de luz y un sensibilizador. En la ruta foto-oxidativa no hay período de inducción, ya que la formación de hidroperóxidos transcurre mediante adición directa del oxígeno al doble enlace, por un mecanismo tipo <<ene>> (Pokorny *et al.*, 2005).

El oxígeno ambiental se encuentra normalmente en el estado de más baja energía, es decir, como triplete ( ${}^3O_2$ ) y puede ser excitado por la luz al estado de singulete, en presencia de un sensibilizador, como la clorofila, pasando a un estado singulete ( ${}^1O_2$ ) de alta energía de acuerdo a la reacción que se presenta en la Figura 2.



**Figura 2.** Ecuaciones que describen la foto-oxidación

### 1.2.3 Oxidación enzimática de lípidos

Las reacciones catalizadas por enzimas, como la lipoxidasa y la lipoxigenasa, con los ácidos grasos, se diferencia de la auto-oxidación por las características propias de la catálisis enzimática, es decir, la especificidad del sustrato, existencia de un pH óptimo y temperatura. Las lipoxidasas peroxidan específicamente los ácidos grasos con sistemas pentadienos, como el ácido linoleico y linolénico. La lipoxigenasa, también puede atacar a varios compuestos que tienen dobles enlaces en su estructura química.

En el caso de las lipoxidasas que son metaloproteínas con un ión hierro, la enzima es activada por su producto de oxidación, es decir, cuando el  $Fe^{2+}$  se oxida a  $Fe^{3+}$ . Del sustrato oxidable se extrae un átomo de hidrógeno del grupo 1,4 pentadieno. El radical pentadieno unido a la enzima se transforma en un sistema conjugado que reacciona con el oxígeno. El radical peroxil formado, es reducido por la enzima y por fijación de un protón se forma el hidroperóxido. Una vez formados los hidroperóxidos, pueden ocurrir las etapas de propagación y término (Pokorny *et al.*, 2005).

## 1.3 Compuestos de oxidación

### 1.3.1 Compuestos primarios de oxidación

Los hidroperóxidos son los compuestos primarios de oxidación y se forman tanto por

reacciones de propagación como de término. Son compuestos inestables, que se descomponen fácilmente en radicales, principalmente hidroxil y alcoxil y entonces se pueden formar aldehídos, cetonas, ácidos, éster, alcoholes e hidrocarburos de cadena corta (Choe y Min, 2006). En condiciones de temperaturas bajas y moderadas constituyen una fracción muy importante de los compuestos de oxidación. Los hidroperóxidos se forman y descomponen simultáneamente a altas temperaturas, mientras que a bajas temperaturas ocurre una acumulación de los hidroperóxidos y se requiere un tiempo prolongado para su descomposición. Cuando se acumulan altos niveles de hidroperóxidos su descomposición se produce más rápido que su formación y aumenta la velocidad de oxidación exponencialmente (Holgado, 2011).

1.3.1.1 *Formación de hidroperóxidos durante la oxidación de linoleato de metilo:* La sustracción del hidrógeno tiene lugar preferentemente en los átomos de carbono donde la energía de disociación del enlace es baja, como en los grupos metileno situados entre dos grupos alqueno del ácido graso insaturado. El radical formado inicialmente a partir del linoleato de metilo se deslocaliza a partir de 5 átomos de carbono de la región 1,4 pentadienilo y la reacción con el oxígeno tiene lugar preferentemente por adición a uno de los carbonos terminales de esta estructura. Esto lleva a la formación de los 9- y 13-hidroperóxidos (Pokorny *et al.*, 2005).

### 1.3.2 *Dienos y trienos conjugados*

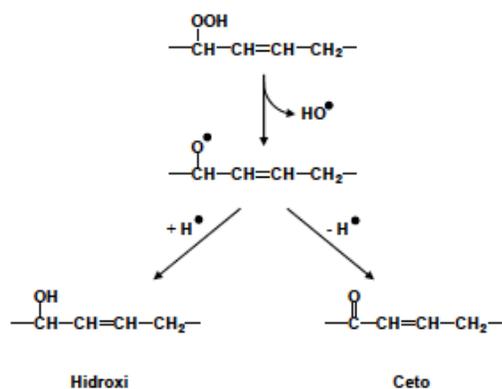
Durante la formación de hidroperóxidos, desde los ácidos grasos insaturados se producen dienos conjugados debido al reordenamiento del doble enlace. Los dienos conjugados exhiben una intensa absorción a 234 nm, mientras que los trienos conjugados absorben a 268 nm. Un incremento en la absorción UV teóricamente refleja la formación de productos primarios de oxidación en grasas y aceites. La detección ultravioleta de dienos conjugados es simple, rápida, no requiere agentes químicos y sólo se necesita una pequeña cantidad de muestra, sin embargo, este método es menos específico y sensible que la medición de valor de peróxido, además puede haber interferencias con otros compuestos que absorben a la misma longitud de onda, como

son los carotenoides. El método de dienos conjugados se ha utilizado para evaluar la estabilidad oxidativa de aceites comestibles (Marmesat *et al.*, 2009; Iqbal y Bhangar, 2007; Suja *et al.*, 2004) y sistemas lipídicos modelo, como linoleato de metilo (Marmesat *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2001; Pekkarinen *et al.*, 1999).

### 1.3.3 Compuestos secundarios de oxidación

Los compuestos secundarios se forman a partir de los hidroperóxidos a través de distintos tipos de reacciones y pueden clasificarse en tres grupos en función del peso molecular: monómeros oxidados (compuestos de peso molecular similar al de los triglicéridos no oxidados), volátiles (compuestos de menor peso molecular al de los triglicéridos no oxidados) y compuestos diméricos y poliméricos (de peso molecular superior al de los triglicéridos no oxidados) (Holgado, 2011).

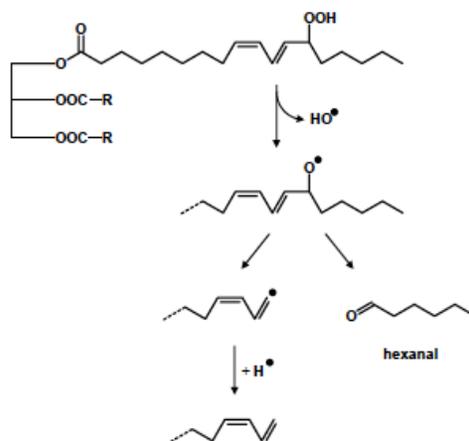
1.3.3.1 *Monómeros oxidados*: La vía principal de descomposición de los hidroperóxidos es la escisión homolítica del grupo hidroperóxido, formando radicales hidroxilo y alcoxilo (Min y Boff, 2002). El radical alcoxilo puede participar en diferentes reacciones que conducen a la formación de compuestos con función epoxi, hidroxilo y ceto, entre otras, que constituyen, junto a los hidroperóxidos, el grupo mayoritario originado por degradación oxidativa a temperatura ambiente o moderada (Frankel, 2005). La formación de compuestos secundarios con funciones hidroxilo y ceto se muestran en la Figura 3.



**Figura 3.** Formación de compuestos secundarios de oxidación con funciones hidroxilo y ceto

1.3.3.2 *Componentes volátiles*: Los radicales alcoxilo también pueden sufrir la escisión homolítica del enlace C-C a ambos lados del grupo funcional (posición  $\beta$  respecto al O), dando lugar a la formación de volátiles (Figura 4). Se produce un aldehído estable y un radical que puede reaccionar con otros radicales, dando lugar a compuestos estables, o reaccionar con el oxígeno, reiniciándose así de nuevo la cadena de propagación (Kochhar, 1993). Reacciones similares ocurren tras la escisión al otro lado de la cadena (que porta el grupo carboxilo), que darían lugar a la formación de ácidos, hidroxiácidos o aldehídos ácidos unidos al glicerol en el caso de los triglicéridos, formando así parte de una molécula no volátil. La compleja mezcla de compuestos volátiles formados sólo son una pequeña parte del total de los productos de oxidación, pero poseen importancia desde el punto de vista sensorial (Frankel, 2005).

1.3.3.3 *Dímeros y polímeros*: Los radicales alcoxilo pueden participar en reacciones de condensación con otros radicales para formar dímeros y polímeros de triglicéridos con enlaces del tipo puente éter (C-O-C) y puente peróxido (C-O-O-C). Aunque los dímeros y polímeros son los productos mayoritarios a elevadas temperaturas, a la que predominan las uniones tipo éter y C-C (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 2007; Sánchez-Muniz *et al.*, 2007), también se forman a bajas temperaturas al final del período de inducción (Márquez-Ruiz y Dobarganes, 2006).



**Figura 4.** Reacción de  $\beta$ -escisión de los hidropéroxidos involucrados en la formación de compuestos volátiles

## 1.4 Métodos de evaluación de la oxidación lipídica

Para evaluar el nivel de oxidación de los aceites y lípidos de los alimentos se han desarrollado un gran número de métodos analíticos, sin embargo, no existe un método universal que permita evaluar el estado de oxidación de forma objetiva, por lo que se recomienda el uso de métodos combinados (Frankel, 2005; Pokorny *et al.*, 2005). Los métodos que se utilizan tradicionalmente en la evaluación de la oxidación lipídica se pueden dividir en 5 grandes grupos que corresponden a: medición de la absorción de oxígeno, de cambio en el reactante, de productos primarios de oxidación, de productos secundarios de oxidación y la evaluación sensorial (Shahidi y Zong, 2005).

### 1.4.1 Técnicas cromatográficas

Las técnicas analíticas tradicionales, requieren pasos especiales de preparación de las muestras, que pueden generar procesos de oxidación, introducción de contaminantes o cambios y/o pérdidas en los componentes individuales a detectar, por lo tanto, se deben evaluar técnicas analíticas que entreguen una mejor recuperación de los componentes a analizar sin introducir sustancias que interfieran con la medición (Gromadzka y Wardencki, 2011), como las técnicas cromatográficas. Las técnicas cromatográficas pueden ser utilizados tanto para la detección de compuestos primarios como de compuestos secundarios de oxidación. En el caso de los compuestos primarios de oxidación, proporcionan información específica de los hidroperóxidos, mientras que otros ensayos sólo miden la cantidad total. Los métodos comúnmente usados son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Los métodos cromatográficos requieren una pequeña cantidad de muestra y las interferencias con otros compuestos pueden ser fácilmente excluidas. La operación se realiza a temperatura ambiente, lo que disminuye el riesgo de formación de artefactos. Un amplio rango de hidroperóxidos pueden ser analizados usando HPLC normal o de fase reversa.

Para la determinación de compuestos secundarios de oxidación, la determinación de compuestos polares es un parámetro ampliamente aceptado (Farhoosh y Tavassoli,

2011), sin embargo, los métodos estándar de determinación de formación de compuestos de oxidación requieren grandes cantidades de solventes orgánicos y toman varias horas. Dobarganes *et al.*, (2000) demostraron que el método cromatográfico por columnas para la determinación de polares puede ser modificado a pequeña escala, pero el procedimiento también consume mucho tiempo.

El uso de columnas de cromatografía de exclusión por tamaño, permiten separar moléculas en relación a su tamaño debido a la presencia de poros en las columnas. Las moléculas de mayor tamaño no penetran los poros, por lo tanto, eluyen antes que las moléculas de menor tamaño. Los estudios demostraron que el uso de columnas de 500 Å de tamaño de poro es óptimo para la separación mediante inyección directa, pero si ésta es utilizada en paralelo con columnas de 100 Å mejora aún más la separación (Márquez-Ruiz *et al.*, 2007), puesto que cuando no se utilizan columnas en paralelo se dificulta la separación de triglicéridos y diglicéridos porque ellos son estéricamente similares en tamaño. El método de cromatografía de exclusión por tamaño (HPSEC) permite determinar los parámetros de calidad de aceites en un solo análisis y cuantificar los distintos compuestos de oxidación (Houhoula *et al.*, 2003), se correlaciona bien con el método de cromatografía en columna, los resultados se obtienen en un corto tiempo, es menos laborioso y requiere menor cantidad de solventes, requiere pequeñas cantidades de muestras y además es más eficiente y sensible que otras metodologías de rutina, tal como fue demostrado en ensayos de oxidación utilizando como sustrato oxidable linoleato de metilo (Caponio *et al.*, 2007; Márquez-Ruiz *et al.*, 2007).

## **1.5 Antioxidantes**

Los antioxidantes son cualquier sustancia que a muy bajas concentraciones, comparado con la especie oxidable, sea capaz de prevenir o retardar la oxidación (Halliwell, 1995). Se reporta que los antioxidantes aumentan la vida útil de un alimento rico en grasas entre un 15 a un 200% (Maestro-Durán y Borja-Padilla, 1993).

Basado en sus funciones, los antioxidantes lipídicos se clasifican en antioxidantes primarios o rompedores de cadena y antioxidantes secundarios o preventivos (Antolovich *et al.*, 2002; Ou *et al.*, 2001). Algunos antioxidantes pueden actuar como antioxidantes primarios y secundarios al mismo tiempo. Comúnmente, los antioxidantes primarios tienen la habilidad de atrapar radicales e inhibir la iniciación, propagación y la reacción de  $\beta$ -escisión, mientras que los antioxidantes secundarios retardan la oxidación al reaccionar con prooxidantes (como los metales de transición) o intermediarios de la oxidación. La capacidad antioxidante depende de la concentración y polaridad del antioxidante, así como también del medio y presencia de otros antioxidantes (Samotyja y Malecka, 2007; Cuvelier *et al.*, 2000).

Hay una serie de condiciones que deben cumplir los antioxidantes para ser utilizados en sistemas alimenticios, tales como:

- (a) ser económicos, no tóxicos y efectivos a bajas concentraciones,
- (b) tener alta estabilidad y capacidad de resistir las condiciones de procesamiento,
- (c) no tener olor, sabor y color,
- (d) y ser fácil de incorporar y tener buena solubilidad en el producto final (Fennema, 1996).

#### 1.5.1 *Antioxidantes primarios*

Los antioxidantes primarios son principalmente atrapadores de radicales libres, que retardan o inhiben los pasos de iniciación o interrumpen la propagación en la auto-oxidación lipídica (Richards *et al.*, 2002). Las propiedades químicas del compuesto influyen en su capacidad antioxidante (Nawar, 1996). Los antioxidantes primarios tienen la capacidad de donar sus átomos de hidrógeno a los “radicales lipídicos” y producir derivados lipídicos y radicales antioxidantes que son más estables y menos reactivos (Cao y Prior, 1999). El radical antioxidante es estabilizado por delocalización del electrón no apareado, lo que permite formar un híbrido de resonancia estable que finalmente participa en las reacciones de término, resultando en la formación de un dímero no radical. Esto indica, que cada atrapador de radicales libres es capaz de

inactivar al menos dos radicales libres, el primero es inactivado cuando el atrapador de radicales libres interactúa con el radical peroxil y el segundo, cuando el atrapador de radicales libres entra a la reacción de término con otro radical libre (Kiokias, 2002).

Los antioxidantes primarios son mono o polihidroxifenoles con varias sustituciones en los anillos e incluye a los antioxidantes sintéticos como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), ter-butil-hidroquinona (TBHQ), galato de propilo (PG) y antioxidantes naturales como tocoferoles y polifenoles, entre otros (Papadopoulos y Boskou, 1991). Su potencia antioxidante es determinada por varios factores, tales como: reactividad química de los antioxidantes hacia los radicales, concentración, solubilidad e interacción con otros antioxidantes (Papas, 1999).

#### 1.5.2 *Antioxidantes secundarios*

Los compuestos que retardan la velocidad de oxidación lipídica a través de la quelación de metales, reposición de hidrógenos a los antioxidantes primarios, quenching de oxígeno singlete y desactivación de especies reactivas, son llamados antioxidantes secundarios (Reische *et al.*, 1998). Algunos de ellos actúan como sinergistas al promover la acción de los antioxidantes primarios. Ninguno de estos mecanismos implican la conversión de radicales libres a especies más estables. Entre los queladores de metales se encuentran etildiaminotetraacético (EDTA), fitato y apo-transferrina. Los queladores de metales naturales, como el ácido cítrico, tienden a ser menos efectivos y se limita su uso sólo a algunos alimentos por su sabor, solubilidad y/o requerimientos de un ambiente ácido (McClements y Decker, 2000).

#### 1.5.3 *Antioxidantes naturales*

Los antioxidantes sintéticos son de uso frecuente en la industria de los alimentos debido a su alta eficiencia y estabilidad, sin embargo, en estudios realizados en ratas se encontró que pueden generar hepatomegalia e inducción de cáncer hepático (Yu *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 1986; Ito *et al.*, 1985). Debido a estos efectos y a la creciente importancia de los antioxidantes en la industria alimentaria, en varios países la cantidad a usar es regulada a

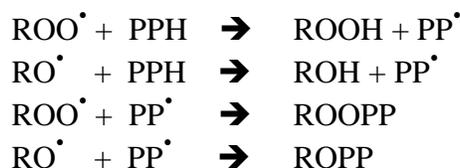
partir de estudios de toxicidad (Taghvaei y Jafari, 2013). Estos antecedentes sugieren que es necesario la búsqueda de moléculas alternativas de origen natural, sin efectos citotóxicos ni genotóxicos y que sean catalogadas como seguras (Ramarathan *et al.*, 1995). Entre estas moléculas alternativas se encuentran los flavonoides.

Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todos los vegetales, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales, donde tienen múltiples efectos biológicos (Barclay y Vinquist, 2003; Halliwell, 1995). La mayoría corresponde a compuestos fenólicos, entre los cuales los principales grupos son los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles) y polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos).

1.5.3.1 *Polifenoles*: Los polifenoles se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Por sus propiedades antioxidantes se han relacionado con múltiples efectos biológicos y proporcionan protección frente a algunas enfermedades como: cáncer, diabetes y alteraciones cardiovasculares (Soobrattee *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 1997; Pace-Asciak *et al.*, 1995). En general, poseen dos rutas de biosíntesis: desde el ácido siquímico y acetato. De acuerdo a su estructura pueden dividirse en diferentes clases (Tabla 1), encontrándose desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos, siendo los flavonoides el grupo más importante (Bruneton 1999; Harborne, 1989). La acción antioxidante *in vitro* de los polifenoles se debe a su capacidad de atrapar tanto radicales libres (por donación de un átomo de hidrógeno) como iones metálicos (agente quelante) (Bravo, 1998). El radical intermediario fenoxil ( $PP^{\bullet}$ ) que se forma es relativamente estable, inhibiendo la propagación al reaccionar con otros radicales libres. La representación de esta acción aparece en la Figura 5. La actividad antioxidante de los polifenoles varía en función de su estructura química y de su solubilidad (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

**Tabla 1:** Clasificación de los polifenoles considerando número de carbonos de su estructura

Polifenoles	Nombre de la estructura
C <sub>6</sub>	Fenoles simples y benzoquinonas
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ácidos fenilacéticos y acetofenonas
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinámicos, derivados fenilpropanoides, cumarinas y cromonas
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos, antraquinonas
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos condensados
(C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos hidrolizables
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninas



**Figura 5.** Ecuaciones que describen la acción antioxidante in vitro de los polifenoles. (PPH: polifenol; PP<sup>•</sup>: radical fenoxil; ROO<sup>•</sup>: radical peroxil)

1.5.3.2 *Flavonoides*: Los flavonoides son compuestos fenólicos sintetizadas como metabolitos secundarios de las plantas y distribuidos en hojas, semillas, flores, frutas y verduras en donde entregan protección frente a la radiación ultravioleta, patógenos y herbívoros. Los flavonoides derivan de la benzo- $\gamma$ -pirona, tienen un bajo peso molecular y comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) compuesto por dos anillos fenil (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Existen más de 5000 flavonoides identificados, los que se clasifican en 6 grupos que incluyen flavonoles, flavonas, flavanoles, isoflavonas, flavanonas y antocianos (Manach *et al.*, 2004). Se consumen en la dieta humana en forma habitual, estimando un consumo promedio de 1 g/día (Manach *et al.*, 2004; Aherne y O'Brien, 2002). Tienen efectos benéficos sobre la salud, tales como: protección frente a enfermedades cardiovasculares y algunas formas de cáncer (Kampa *et al.*, 2004; Arts *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 1997;

Hertog *et al.*, 1993), reducción de los niveles de colesterol sanguíneo (Hodgson, 2008), reducción de la agregación plaquetaria y marcadores de activación de plaquetas (Rein *et al.*, 2000) y prevención en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Yu *et al.*, 2005), entre otros. Los flavonoides se encuentran comúnmente como *o*-glicósidos en la posición C3 y con menor frecuencia en la posición C7 del anillo A, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Otros azúcares son la D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y el ácido D-glucurónico. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo (Cook y Samman, 1996).

La actividad antioxidante de los flavonoides depende de sus características estructurales y de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos (Bors *et al.*, 1990). Su capacidad antioxidante se atribuye a su habilidad de quelar metales, atrapar radicales libres e inhibir enzimas. La habilidad de quelar cobre y hierro fue investigada (Engelmann *et al.*, 2005; Mira *et al.*, 2002) encontrando que el grupo orto-hidroxil sobre el anillo B, el 3-hidroxil combinado con el 4-carbonil, o el 5-hidroxil combinado con el grupo 4-carbonil, son los sitios de quelación de metales. Sin embargo, Cao *et al.* (1997) observaron que los flavonoides actuaban como prooxidantes en presencia de cobre, además la actividad prooxidante de los flavonoides sería directamente proporcional al número de grupos OH en la molécula. Aquellos compuestos con una estructura pirogalol en el anillo A, también promoverían la producción de peróxido de hidrógeno a partir de los radicales altamente reactivos que pueden ser generados por la reacción de Fenton (Heim *et al.*, 2002; Galey, 1997).

Para correlacionar las características estructurales de los flavonoides con la actividad antioxidante, se han utilizado diferentes métodos para evaluar la capacidad antioxidante, entre ellos: capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), potencial antioxidante total (TRAP), potencial antioxidante reductor férrico (FRAP) y 2,2-Difenil-1-picrihidrazil (DPPH) (Antolovich *et al.*, 2002), determinándose que son tres las características estructurales de

los flavonoides las que define su función antioxidante: (1) la presencia de grupos hidroxilo en posición *o*-dihidroxi en el anillo B (2) la presencia de un doble enlace en posición 2,3 en el anillo C, y (3) la presencia de un grupo 4-carbonilo en el anillo C (Heim *et al.*, 2002; Bors *et al.*, 1997; Bors *et al.*, 1990). Así, correlaciones entre la estructura de los flavonoides y la actividad antioxidante en sistemas hidrofílicos está bien establecida (Henning *et al.*, 2003), mientras que, los estudios en matrices lipídicas son escasos y los resultados no son concluyentes, ya que para una misma estructura se obtuvieron diferentes resultados (Michote *et al.*, 2011; Tsimogianis y Oreopoulou, 2006; Nieto *et al.*, 1993).

1.5.3.3 *Adición de flavonoides a sistemas lipídicos*: El efecto de la adición de flavonoides sobre linoleato de metilo a bajas temperaturas (<60°C) mostró un efecto antioxidante de los flavonoides, disminuyendo la formación de hidroperóxidos y TBARs (Pedrielli y Skibsted, 2002; Pekkarinen *et al.*, 1999). Además varios estudios han demostrado un efecto antioxidante de los flavonoides en diferentes materias grasas, tales como: aceite de palma (Pereira y Das, 1990), aceite de canola (Su *et al.*, 2004; Wanasundara y Shahidi, 1994), aceite de linaza (Russin *et al.*, 2006), aceite de algodón (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2007), aceite de maíz (Naz *et al.*, 2008), grasas animales (Antoshina *et al.*, 2005) y aceites marinos (Huber *et al.*, 2009; Wanasundara y Shahidi, 1998; Ho *et al.*, 1997; Nieto *et al.*, 1993), entre otros. Los estudios se resumen en la Tabla 2, en ellos las condiciones experimentales son muy diversas, lo que contribuye a una gran variabilidad en los resultados, encontrando una actividad antioxidante alta, moderada y baja para un mismo flavonoide. En la mayoría de los estudios, los flavonoides se incorporaron directamente en el aceite. Algunos factores como la estructura y concentración del flavonoide, insaturación de los ácidos grasos de la matriz lipídica, temperatura y el método para determinar la oxidación de la materia grasa influyen sobre los resultados obtenidos.

**Tabla 2:** Efecto de la adición de flavonoides en la oxidación de diferentes aceites

<b>Tipo de Matriz</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Flavonoide</b>	<b>Efecto antioxidante</b>	<b>Referencia</b>
Aceite de pescado	TBARs 70° C	quercetina (Q) quercetina-3-O-glicósido (Q-G) 0.1, 0.5 y 1 mM	Alto Q-G > Q	Huber <i>et al.</i> , 2009
Aceite de maíz	PV, p-anisidina y valor de yodo 180° C	Pelargonidina (P), cianidina (C), quercetina (Q), miricetina (M), ácido gálico (GC).	Alto GA>Q>M>C >P	Naz <i>et al.</i> , 2008
Aceite de algodón	PV 70° C	quercetina, fisetina, (+)- catequina luteolina, taxifolina, eriodictiol	Alto Moderado	Tsimogiannis y Oreopoulou, 2007
Aceite de linaza	PV 60° C	genisteína: 2 µm/ g aceite 4 µm/ g aceite	Moderado Moderado	Russin <i>et al.</i> , 2006
Lípidos neutros de origen animal	PV 72° C	1 x 10 <sup>-4</sup> a 5 x 10 <sup>-3</sup> M baikaleina quercetina, dihidroquercetina baikalina, genisteína, diadzeína	Alta Moderada Baja	Antoshina <i>et al.</i> , 2005
Aceite de girasol	PV 98° C	10 <sup>-3</sup> M Apigenina Luteolina Kempferol Miricetina Quercetina	Pro-oxidante Pro-oxidante Pro-oxidante Moderada Pro-oxidante	Skerget <i>et al.</i> , 2005
Aceite de canola	Test de consumo de oxígeno 95° C	0,5 mM (+)- catequina, (-) epicatequina Teaflavinas	Alta Moderada	Su <i>et al.</i> , 2004
Aceites marinos	PV, TBARs 100° C	miricetina, quercetina y morina	Alta	Wanasundara y Shahidi, 1998
Aceites marinos	PV 65° C	(-)-epicatequina (EC); (-)-epigallocatequina (EGC); (-)- epigallocatequina galato (EGCG); (-)- epicatequina galato (ECG)	Alta ECG > EGCG>EGC ≈EC	Ho <i>et al.</i> , 1997

Aceites marinos	PV, TBARs, dienos conjugados 65° C	(-)-epicatequina (EC); (-)-epigallocatequina (EGC); (-)-epigallocatequina galato (EGCG); (-)-epicatequina galato (ECG) (200 ppm)	Alta ECG>EGCG >EGC>EC	Wanasundara y Shahidi, 1996
Aceite de canola	PV, TBARs 65° C	miricetina (M), (-)-epicatequina (EC), naringina (N), rutina (R), quercetina (Q) y morina (M)	Alta M>EC≈N≈R ≈Q≈M	Wanasundara y Shahidi, 1994
Aceite de pescado	PV, TBARs 60° C	(+)-catequina, morina y quercetina (0,7 g/Kg aceite)	Alta	Nieto <i>et al.</i> , 1993
Aceite de palma	Tiempo inducción 170° C	(30 μm) miricetina>morina>kaempferol> quercetina	Alta	Pereira y Das, 1990
	180° C	morina>kaempferol>miricetina> quercetina	Alta	

---

PV: valor de peróxido; TBARs: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

## 1.6 Microencapsulación

En el ámbito alimentario, la microencapsulación permite encapsular sustancias activas sólidas, líquidas o gaseosas en delgadas películas de un agente encapsulante, cuya finalidad es protegerlas del oxígeno u otras condiciones que afecten su estabilidad y disminuir o controlar la liberación del activo (Mozafari *et al.*, 2008; Desai y Park, 2005; Gibbs *et al.*, 1999; Shahidi y Han, 1993). Las micropartículas formadas tienen un amplio rango de tamaño que va de 0,2 a 5000 μm con múltiples formas dependiendo del material y métodos utilizados para su obtención (Shaikh *et al.*, 2006). En los últimos años, la tecnología de encapsulación incrementó su importancia en la industria de alimentos, particularmente en el desarrollo de alimentos funcionales y saludables. La mayor parte de los estudios sobre encapsulación de compuestos bioactivos se orientan a la protección contra efectos deletéreos del medio ambiente (luz, oxígeno, temperatura y humedad),

evitando su degradación y aumentando su vida útil (Munin y Edwards, 2011; Fang y Bhandari, 2010; Campagnaro *et al.*, 2007; Desai y Park, 2005; Shahidi y Han, 1993).

A pesar que la microencapsulación de antioxidantes es una herramienta potencial para controlar la liberación de un activo en una matriz, los estudios sobre liberación de antioxidantes desde micropartículas en sistemas lipídicos son escasos (Wu *et al.*, 2006a,b; Wu *et al.*, 2005; Deng y Yu, 2004). La liberación controlada podría tener un importante efecto en prolongar la vida útil de matrices lipídicas sometidas a altas temperaturas.

Existe una gran variedad de métodos disponibles para la obtención de micropartículas, tales como: secado por atomización, extrusión, coacervación, gelificación iónica, liposomas, liofilización, cocrystalización y emulsiones, entre otros (Augustín y Hemar, 2009; Desai y Park, 2005; Gibbs *et al.*, 1999). La elección de un método particular depende del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, del activo, de las aplicaciones propuestas del material encapsulado, del mecanismo de liberación deseado y del costo (Minemoto *et al.*, 1999).

#### 1.6.1 *Secado por atomización*

El secado por atomización es el método más utilizado en la industria de alimentos para encapsular ingredientes (aromas, lípidos, carotenoides), de forma económica, simple y continua (Su *et al.*, 2008; Desai y Park, 2005; Ré, 1998). Es una operación simple que transforma un producto líquido en un polvo sólido, en un solo paso. El principio del secado por atomización es disolver el activo en una dispersión de un agente encapsulante seleccionado. La dispersión es subsecuentemente atomizada en aire caliente mediante un disco rotatorio o boquilla de pulverización, lo que promueve una rápida remoción del solvente (agua). Las partículas secas son separadas desde la zona de aire caliente a una de menor temperatura (de Vos *et al.*, 2010; Gibbs *et al.*, 1999). La forma típica de las micropartículas es esférica, con un rango de tamaño entre los 10-100  $\mu\text{m}$  (Fang y Bhandari, 2010). Una desventaja de la tecnología de secado por atomización es el

limitado número de materiales encapsulantes disponibles, puesto que el material debe ser soluble en agua a un nivel aceptable (Desai y Park., 2005).

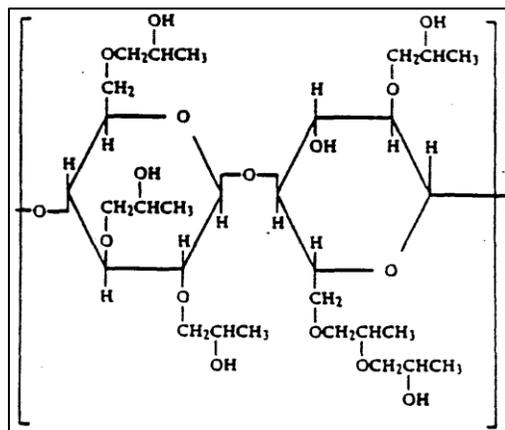
### 1.6.2 Agentes encapsulantes

Dependiendo del agente activo a encapsular, se pueden seleccionar diferentes agentes encapsulantes. Éstos deben tener buena solubilidad, buenas propiedades emulsificantes cuando el activo es hidrofóbico, además de poseer baja viscosidad en soluciones concentradas. Se han utilizado diferentes agentes encapsulantes para la microencapsulación por secado por atomización, estos incluyen polisacáridos (almidón, maltodextrinas de diferente equivalente de dextrosa (DE), jarabes de maíz), gomas (goma arábiga), lípidos (ácido esteárico, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, caseína, suero de leche, soya y trigo), siendo las maltodextrinas las más utilizadas (Saénz *et al.*, 2009; Lokuwan, 2007; Krishnan *et al.*, 2005a,b). Para el propósito de liberación controlada la elección del agente encapsulante es fundamental ya que influirá sobre las características de las micropartículas y su aplicación final.

En este estudio se seleccionaron como agentes encapsulantes el derivado de celulosa hidroxipropilcelulosa (HPC) e inulina, por su habilidad de unir moléculas activas, ser insolubles en sistemas lipídicos y poder comportarse como matriz inerte. Para lograr la liberación controlada de compuestos activos, desde micropartículas en el sistema lipídico, se puede añadir un polímero que actúe como agente canalizante, el que al disolverse permitirá la formación de canales en la matriz de la micropartícula, lo que facilitaría la liberación de los compuestos activos (Song *et al.*, 2005). En este trabajo se estudió como agente canalizante el polisacárido Capsul<sup>®</sup>.

1.6.2.1 *Hidroxipropilcelulosa*: Existen numerosos derivados obtenidos por modificaciones químicas de la celulosa, sin embargo, sólo unos pocos éteres de celulosa tienen aplicación en la industria alimentaria. Los éteres de celulosa son derivados obtenidos a partir de la eterificación de los grupos hidroxilo disponibles y entre los más conocidos están: hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC),

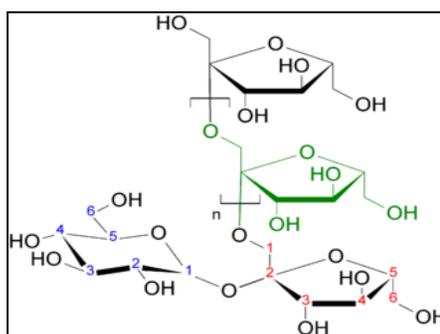
carboximetilcelulosa sódica (CMC Na), metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y celulosa acetato ftalato. Los éteres de celulosa son polímeros hidrofílicos ampliamente utilizados en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos, siendo biológicamente compatibles y no tóxicos. Su propiedad más importante es la viscosidad, la que se manifiesta de acuerdo al peso molecular, así a medida que el peso molecular disminuye la viscosidad disminuye. Además, estos productos se caracterizan y diferencian entre y dentro de ellos por el grado de sustitución (DS) (Gafourian *et al.*, 2007; Nahringbauer, 1995). La hidroxipropilcelulosa (Figura 6) es un polímero soluble en agua y etanol (Skinner *et al.*, 1999), se utiliza en las formulaciones de liberación controlada y como película de revestimiento de drogas (Sinha y Rohera, 2002). Al utilizar HPC con diferente grado de viscosidad como material de recubrimiento, se observó que a medida que aumenta la viscosidad el tiempo lag de liberación de las drogas se prolonga (Fukui *et al.*, 2000).



**Figura 6.** Estructura química de la hidroxipropilcelulosa

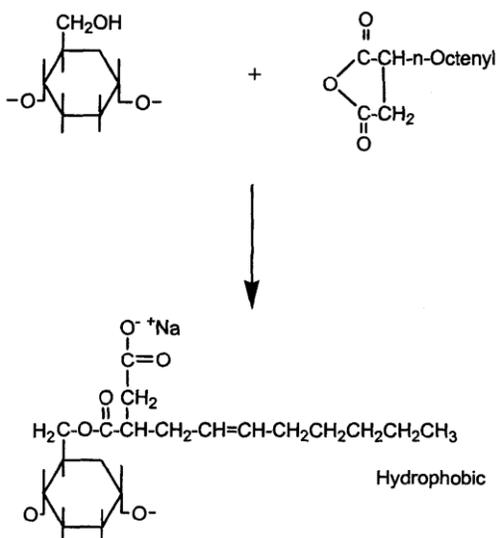
1.6.2.2 *Inulina*: La inulina (Figura 7) es un fructooligosacárido (FOS), obtenido de la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*), Dalia (*Dahlia pinnata Cav.*) y alcachofa de Jerusalem (*Helianthus tuberosus*), las cuales tienen un grado de polimerización (DP) promedio de 10-14, 20 y 6, respectivamente. El DP depende principalmente del tipo de vegetal del cual se obtiene, de las condiciones climáticas durante el crecimiento y de las condiciones fisiológicas del vegetal (Rusu *et al.*, 2006). La inulina es un polímero no tóxico, soluble en agua, compuesto por unidades de fructosa con enlaces  $\beta$ -(2-1) y es

ligeramente ramificada con enlaces  $\beta$ -(2-6) en una proporción de 1-5% (Stevens *et al.*, 2001). La inulina es un agente encapsulante de interés por sus efectos prebióticos, es una fibra dietaria y mejora la biodisponibilidad de calcio (Saéñz *et al.*, 2009). A nivel industrial, la inulina se utiliza como ingrediente alimentario y ofrece ventajas tecnológicas al ser un polímero de grado alimentario, biodegradable, dispersable en agua y de bajo costo (Trípedo *et al.*, 2005).



**Figura 7.** Estructura química de la inulina

1.6.2.3 *Capsul*<sup>®</sup>: El *Capsul*<sup>®</sup> es un almidón modificado químicamente, derivado del maíz ceroso, que incorpora en su estructura un componente lipofílico, mediante octenil succinilación (Figura 8). Al compararlo con otros agentes encapsulantes como goma arábica, una de sus características únicas es su habilidad de formar emulsiones aceite en agua de alta estabilidad (Finotelli y Rocha, 2005; Shahidi y Han, 1993; Reineccius, 1991). Su baja viscosidad permite la preparación de emulsiones con alto contenido de sólidos, obteniéndose micropartículas con una alta retención del compuesto activo (Kolanowski *et al.*, 2004). La compatibilidad de *Capsul*<sup>®</sup> con sustancias insolubles en agua permite la preparación de micropartículas con altos niveles de agente activo, ya que su habilidad para formar una película, reduce la pérdida de compuestos bioactivos durante la microencapsulación y el almacenamiento (Jonsdottir *et al.*, 2005; Kolanowski *et al.*, 2004).

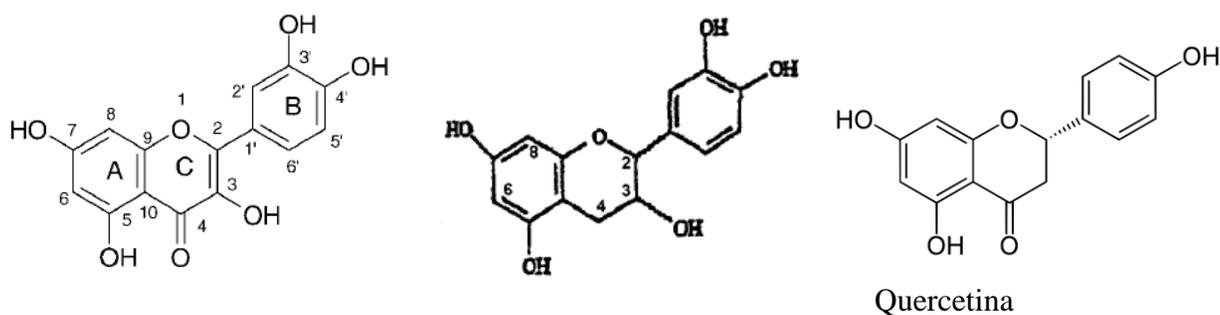


**Figura 8.** Formación de Capsul<sup>®</sup>

### 1.6.3 Encapsulación de compuestos fenólicos

Los polifenoles son compuestos que pueden ser fácilmente degradados por las condiciones ambientales como luz, calor, humedad y oxígeno (Nicoli *et al.*, 2000). Por otra parte, algunos polifenoles tienen sabores astringentes, pueden tener problemas de solubilidad en medios hidrofóbicos y pueden interactuar con otros componentes presentes en las materias grasas. Desde este punto de vista, la microencapsulación se presenta como una tecnología que permite mejorar la estabilidad del compuesto activo, extender su vida útil, preservar sus propiedades funcionales, liberar los compuestos activos en forma controlada y facilitar su manipulación cuando son añadidos a una matriz alimenticia (de Voos *et al.*, 2010).

Los estudios de liberación de polifenoles desde micropartículas son escasos, pero son fundamentales para definir su real aplicación, por lo que este estudio se enfocó en este tópico. Los flavonoides utilizados en este estudio (quercetina, naringenina y epicatequina) se seleccionaron en base a sus diferencias en estructura química y capacidad antioxidante, lo cual influyó sobre la eficiencia de encapsulación y el perfil de liberación. La estructura química de ellos se presenta en la Figura 9.



Epicatequina

Naringenina

Quercetina

**Figura 9.** Características estructurales de los flavonoides utilizados en este estudio

Existe un número reducido de investigaciones de encapsulación de compuestos fenólicos. En la encapsulación de polifenoles por el método de secado por atomización se utilizaron diferentes tipos de extractos vegetales como: tina púrpura (Sáenz *et al.*, 2009), zanahoria morada (Ersus y Yudargel, 2007) granadas (Robert *et al.*, 2010), semillas de uva (Zhang *et al.*, 2007), pomaza de manzana y hojas de olivo (Kosaraju *et al.*, 2008), entre otros. Estos autores, emplearon diversos agentes encapsulantes, como carbohidratos y proteínas. En otros estudios, aplicando otros métodos de encapsulación como: coacervación (Deladino *et al.*, 2008), nanoencapsulación (Hu *et al.*, 2008) atrapamiento en liposomas, complejos de inclusión, co-cristalización, liofilización y emulsificación (Munin y Edwards, 2011; Fang y Bhandari, 2010), se encapsularon extractos de yerba mate, catequinas del té y curcumina. La mayoría de estos estudios se enfocaron en la protección del polifenol frente a condiciones medioambientales, logrando prolongar su vida útil (Robert *et al.*, 2010; Sáenz *et al.*, 2009; Kosaraju *et al.*, 2008; Ersus y Yudargel, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Otros trabajos se enfocaron en la liberación de polifenoles en el sistema gástrico e intestinal, a través de estudios “in vitro” simulando condiciones de pH y/o enzimas (Sansone *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2007), con el propósito de dirigir la liberación de polifenoles en el lugar donde son absorbidos.

Entre los estudios de polifenoles encapsulados para adicionar a aceites se encuentran: Deng y Yu (2004) quienes prepararon micropartículas de polifenoles de té mediante secado por congelación, mostrando un mayor efecto antioxidante que las micropartículas

de propil galato y BHA; Wu *et al.* (2005) quienes encapsularon quercetina utilizando proteína de soya con etilcelulosa (4:1) como material pared, reportaron efectos protectores frente a la oxidación. Wu *et al.* (2006a) reportaron que los flavonoides extraídos de una planta medicinal (*Cuscuta chinensis*) encapsulados con  $\beta$ -ciclodextrina, goma arábica y etilcelulosa como material pared y monoesterato de glicerol como emulsificante, se pueden utilizar disueltos en aceite, produciendo actividad antioxidante por liberación controlada y aparentemente prolongarían el período de inducción (Wu *et al.*, 2006b).

### **1.7 Liberación controlada desde micropartículas**

La liberación controlada se define como el método mediante el cual uno o más agentes activos estarán disponibles en un tiempo adecuado y/o en un lugar preciso a una velocidad específica (Pothakamury y Barbosa-Canovas, 1995).

Desde hace años la industria farmacéutica trabaja en el desarrollo de biomateriales capaces de actuar como sistemas de liberación controlada de fármacos, debido a las diversas ventajas que pueden presentar, como permitir un efecto terapéutico sostenido en el tiempo y evitar fluctuaciones en el contenido de fármacos circulantes en tejidos y plasma que podrían llevar a posibles efectos tóxicos, poca eficiencia y baja biodisponibilidad (Aragón-Fernández *et al.*, 2009). En casi todos los sistemas de liberación controlada, el componente polimérico es el principal encargado de controlar el proceso de liberación del fármaco o principio activo, mientras que el relleno inorgánico es el encargado de variar la cinética de liberación de los sistemas obtenidos. En ambos casos, los perfiles de liberación se caracterizan por presentar una disminución de la velocidad de liberación con el tiempo, que se relaciona con la mayor distancia que tiene que recorrer el activo dentro de la matriz. El uso de matrices hidrofílicas es el sistema de liberación controlada más utilizado debido a su facilidad de uso y bajo costo. Existen algunas publicaciones que reportan los mecanismos de liberación desde matrices hidrofílicas, sin embargo, los mecanismos de liberación aún continúan en debate

(Miranda *et al.*, 2006; Siepmann y Peppas, 2001). Si bien los mecanismos de liberación fueron ampliamente estudiados en la industria farmacéutica, existe escasa información en el área alimentaria, más aún cuando se utilizan polímeros hidrofílicos que se comportarían como matrices inertes en un medio hidrofóbico, lo que obligaría a adicionar un agente canalizante en la formulación que permita un mejor control de la liberación del activo.

La liberación del activo desde una matriz polimérica puede deberse a distintos tipos de mecanismos: difusión, biodegradación, hinchamiento, presión osmótica y tortuosidad o canalización (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995). En la mayoría de los casos la liberación se debe a más de uno de estos mecanismos (Paños *et al.*, 2008). El perfil de liberación del principio activo desde la micropartícula depende de la naturaleza del compuesto activo y del agente encapsulante, de la interacción entre ambos y del medio de disolución (Brannon-Peppas y Peppas 1989; Kou *et al.*, 1988).

Las ventajas de la liberación controlada de compuestos bioactivos es que la cesión de los compuestos se puede prolongar en el tiempo, otorgándole una mayor vida útil al compuesto activo (Brannon-Peppas, 1995; Dziezak, 1988).

#### 1.7.1 *Patrones y mecanismos de liberación*

Existen una serie de modelos matemáticos, a través de los cuales es posible explicar las cinéticas y predecir los mecanismos de liberación desde las micropartículas. Entre estos modelos matemáticos se encuentran: los de primer orden, orden cero, Higuchi, Peppas, Hixson-Crowell, entre otros.

Una forma simplificada del modelo de Higuchi, cuando el compuesto activo es liberado por difusión Fickiana (Higuchi, 1963; Higuchi, 1961) se muestra en la Ecuación 1.3. Este modelo ajusta bien cuando el hinchamiento y la erosión son despreciables.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2} \quad (\text{Ec. 1.3})$$

Mt: cantidad de compuesto activo liberado en el tiempo; M<sub>∞</sub>: Cantidad de compuesto activo liberado al tiempo infinito; k: constante de velocidad de liberación.

Una ecuación más general fue descrita por Peppas, que describe la liberación de compuestos, tanto por el mecanismo de difusión como por hinchamiento (Ecuación 1.4) (Siepmann y Peppas, 2001; Peppas y Sahlin, 1986). El parámetro “n”, que es el exponente difusional, indica los mecanismos de cesión de un activo. Cuando n=0,5 el agente activo es liberado por difusión fickiana; cuando 0,5<n< 1,0 el transporte es no fickiano (transporte anómalo); cuando n=1 difusión es descrita como caso transporte II (cinética de primer orden) y cuando n>1,0 es descrito como Super caso transporte II.

En los casos donde el sistema de liberación es un material poroso, la constante “n” puede tomar valores menores que 0,5, puesto que se combinan los mecanismos de difusión parcial a través de una matriz hinchada y a través de los poros llenos de agua (Aragón-Fernández *et al.*, 2009). Además, valores de n<0,5 denotan la existencia de otro proceso simultáneo al proceso de difusión. No obstante, Peppas sugiere que esta expresión podría aplicarse para el análisis fenomenológico de cualquier mecanismo de liberación, independientemente del mecanismo molecular específico de transporte del activo (Korsmeyer y Peppas, 1983).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Ec. 1.4})$$

El modelo cinético de Hixson-Crowell (Ley de la raíz cúbica) es utilizado para describir la liberación de un principio activo desde matrices isométricas que experimentan erosión (Ecuación 1.5).

$$(\% \text{ no disuelto})^{1/3} = 1 - kt \quad (\text{Ec. 1.5})$$

Donde: k: constante de velocidad de liberación.

## **1.8 Hipótesis**

La adición de micropartículas de flavonoides con agente canalizante en una matriz lipídica permitirá la liberación controlada de flavonoides, aumentando su estabilidad oxidativa.

## **1.9 Objetivos**

### *1.9.1 Objetivo General*

Estudiar la cinética y mecanismo de liberación de flavonoides desde micropartículas con y sin la adición de agente canalizante en linoleato de metilo y su efecto en la formación de compuestos polares.

### *1.9.2 Objetivos específicos*

1.- Estudiar la relación flavonoide/agente encapsulante, la temperatura del aire de entrada y la cantidad de agente canalizante necesario (Capsul<sup>®</sup>) (variables independientes) sobre la eficiencia de encapsulación de flavonoides y liberación en un sistema modelo (variables dependientes) utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM).

2.- Caracterizar fisicoquímica y morfológicamente las micropartículas de flavonoides obtenidas bajo condiciones óptimas para cada sistema estudiado.

3.- Estudiar los mecanismos y la cinética de liberación de flavonoides encapsulados con inulina ó hidroxipropilcelulosa, obtenidos bajo condiciones óptimas en linoleato de metilo como sistema lipídico.

4.- Estudiar el efecto de los flavonoides encapsulados sobre la estabilidad oxidativa de un modelo lipídico (linoleato de metilo) en condiciones aceleradas de oxidación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

Flavonoides: Quercetina (Q) > 90%, naringenina (N) > 95% y epicatequina (E) > 90%, adquiridos en Sigma-Aldrich.

Agentes encapsulantes: Inulina (IN) Raftilina<sup>®</sup> HP (DP > 23), adquirida en Alfa-chilena. Hidroxipropilcelulosa (HPC) (Klucel EF), donada por laboratorios Recalcine.

Agente canalizante: Capsul<sup>®</sup> (C) obtenido de National Starch.

Modelos lipídicos: Linoleato de metilo (LM), adquirido en Sigma-Aldrich. Hexano (H) grado HPLC adquirido en Merck S.A.

Los solventes utilizados, grado p.a. y HPLC, fueron adquiridos en Merck S.A.

### 2.2. Métodos

#### 2.2.1 Preparación de las micropartículas

2.2.1.1 *Preparación de las micropartículas con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante:* La encapsulación de los sistemas Q-(IN-C), N-(IN-C) y E-(IN-C) se realizó de acuerdo a un diseño experimental Box-Behnken, con un total de 15 experimentos por sistema. Inulina (6,8 a 17 g) y Capsul<sup>®</sup> (0 a 1,7 g) se disolvieron en agua (64,8 a 74,3 g) a 70 °C, con agitación constante (200 rpm) y posteriormente se enfriaron a temperatura ambiente. Los flavonoides Q, N o E (0,34 g) se disolvieron en etanol (16,2 a 18,6 g) y se adicionaron a la dispersión de polímeros con agitación constante (200 rpm). La mezcla resultante en agua:etanol 80:20, se ultrasonificó (230 W y frecuencia nominal de 50 Hz a temperatura ambiente, FS-30H-Fisher-Scientific) por

20 minutos. La dispersión resultante se alimentó a un secador mini Spray-Dryer B-290 (Büchi, Suiza), con alimentación y flujo de aire de secado en paralelo. El equipo operó a una temperatura de ingreso del aire que fluctuó entre 120-160 °C. El flujo del aire, la velocidad de alimentación y la presión de atomización correspondieron a 600 L/h, 1 mL/min y 5 bar, respectivamente. Las micropartículas resultantes se colocaron en bolsas de polipropileno y almacenaron en la oscuridad a -20 °C hasta el momento de su análisis.

*2.2.1.2 Preparación de las micropartículas con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante:* La encapsulación de los sistemas Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C) se realizó de acuerdo a un diseño experimental Box-Behnken, con un total de 15 experimentos por sistema. La HPC (4 a 10 g) se disolvió en etanol (71,0 a 76,6 g) y se mantuvo en agitación constante (200 rpm) por 2 horas. C (0 a 1,0 g) se disolvió en agua (17,8 a 19,2 gramos) a 70 °C, con agitación constante (200 rpm), posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó a la HPC. Los flavonoides Q, N o E (0,2 g) se adicionaron a la dispersión de polímeros con agitación constante (200 rpm). La mezcla en agua:etanol 20:80 se ultrasonicó (230 W y frecuencia nominal de 50 Hz a temperatura ambiente, FS-30H-Fisher-Scientific) por 20 minutos. La dispersión resultante se alimentó a un secador mini Spray-Dryer B-290 (Büchi, Suiza), con alimentación y flujo de aire de secado en paralelo. El equipo operó a una temperatura de ingreso del aire que fluctuó entre 70-110 °C. El flujo del aire, la velocidad de alimentación y la presión de atomización correspondieron a 600 L/h, 1 mL/min y 5 bar, respectivamente. Las micropartículas resultantes se colocaron en bolsas de polipropileno y almacenaron en la oscuridad a -20 °C hasta el momento de su análisis.

### *2.2.2 Diseño experimental*

Se empleó un diseño experimental Box-Behnken (DBB), con un total de 15 experimentos para cada sistema de micropartículas estudiado (Q-(IN-C), N-(IN-C), E-(IN-C), Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C)). La representación gráfica de DBB es un cubo que considera 12 puntos experimentales y 3 puntos centrales. Las variables independientes fueron la relación flavonoide/agente encapsulante (1:20-1:50),

temperatura del aire entrada (120 °C-160 °C para los sistemas con IN y 70 °C-110 °C para los sistemas con HPC) y contenido de Capsul (0-1,7 g para los sistemas con IN y 0-1,0 g para los sistemas con HPC). Las variables dependientes fueron la eficiencia de encapsulación y liberación de flavonoides a los 14 días ( $t_{14}$ ) y a los 28 días ( $t_{28}$ ) de almacenamiento en hexano para los sistemas con IN y HPC, respectivamente. La metodología de Superficie Respuesta (MSR) se aplicó para determinar las condiciones óptimas para cada sistema estudiado. La función deseabilidad (FD) se utilizó para optimizar las respuestas múltiples en MSR.

Los datos se ajustaron a un modelo de regresión de segundo orden, de acuerdo a la Ecuación 2.1, donde Y es la variable respuesta, los subíndices  $i$  y  $j$  estuvieron en rangos de 1 a 3 (número de variables independientes),  $b_0$  es el intercepto,  $b_i$  es el coeficiente lineal,  $b_{ii}$  es el coeficiente cuadrático,  $b_{ij}$  es el coeficiente de interacción y  $X_i$  y  $X_j$  son los niveles de variables independientes. Todos los experimentos se realizaron al azar para evitar el sesgo en los análisis.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j \quad (\text{Ec. 2.1})$$

### 2.2.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación de flavonoides

2.2.3.1 *Flavonoides totales*: Para los sistemas de micropartículas con IN (100 mg) (Q-(IN-C), N-(IN-C) y (E-IN-C)) se disolvieron en 4 mL de agua:etanol:acetona (50:25:25 v/v/v). Para los sistemas de micropartículas con HPC (100 mg) (Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C)) se disolvieron en 4 mL de etanol. Una vez disueltos, se agitaron por un minuto, se ultrasonificaron por 20 minutos y se centrifugaron a 452,8 xg por 3 minutos. El sobrenadante se retiró y transfirió a un matraz aforado. El proceso se repitió dos veces, entonces, el matraz se aforó con una mezcla de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15) que contenía un 1% de ácido acético glacial y una alícuota se inyectó en el HPLC.

2.2.3.2 *Flavonoides superficiales*: Para los sistemas de micropartículas con IN (100 mg) (Q-(IN-C), N-(IN-C) y (E-IN-C)) se disolvieron en 3 mL de metanol y se agitaron suavemente. Para los sistemas de micropartículas con HPC (100 mg) (Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C)) se disolvieron en 3 mL de una mezcla de éter etílico:metanol (9:1) y se agitaron suavemente. Así, se obtuvieron los flavonoides superficiales (Robert *et al.*, 2012). El sobrenadante se transfirió a un matraz volumétrico, luego se aforó con una mezcla de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15) que contenía un 1% de ácido acético glacial y una alícuota se inyectó en el HPLC.

La eficiencia de encapsulación se calculó de acuerdo a la Ecuación 2.2.

$$\% \text{ Eficiencia encapsulación} = \frac{\text{Flavonoides experimentales totales} - \text{Flavonoides superficiales}}{\text{Flavonoides experimentales totales}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2.2})$$

2.2.4 *Liberación de flavonoides desde micropartículas a los 14 días ( $t_{14}$ ) y 28 días ( $t_{28}$ ) de almacenamiento en hexano para los sistemas con inulina e hidroxipropilcelulosa, respectivamente*

Se evaluó la liberación de flavonoides en hexano desde las micropartículas para cada experimento del diseño Box-Behnken y cada sistema de micropartículas (Q-(IN-C), N-(IN-C), E-(IN-C), Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C)). Las micropartículas (0,5 g) se colocaron en bolsas filtros de celulosa y luego en botellas de vidrio que contenían hexano (100 mL) con 0,5% de Span, se taparon y almacenaron en estufa con control de temperatura a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Mettler, modelo UFE 500, Alemania) en la oscuridad. Se tomaron alícuotas de 2 mL a los 14 días de almacenamiento ( $t_{14}$ ) para los sistemas con inulina y a los 28 días ( $t_{28}$ ) para los sistemas con hidroxipropilcelulosa. Las muestras se trataron con 3 mL de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) que contenía un 1% de ácido acético glacial, se agitaron en un vortex por 1 minuto y se centrifugaron a  $452,8 \times g$  por 3 minutos. Se removió la fase acuosa-metanólica y se colocó en un matraz aforado (5 mL) el que se aforó con una mezcla de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15) que contenía 1% de ácido acético glacial y una alícuota se inyectó en el HPLC.

### *2.2.5 Determinación de flavonoides por Cromatografía Líquida (HPLC)*

El análisis de los flavonoides (Q, N o E) se realizó por HPLC, empleando un equipo Merck Hitachi D-600, con bomba L-6200 (Intelligent Pump), detector de arreglo de diodo (Waters 996), conectado al software Empower Pro (Waters). Se utilizó una columna C-18 (tamaño de partícula 3  $\mu\text{m}$ , 4,6 d.i. x 150 mm, Atlantis®, Waters, Irlanda). Para la determinación de Q o N, se utilizó una fase móvil isocrática de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) que contenía un 1% de ácido acético glacial. Para la determinación de E se utilizó una fase móvil isocrática A:B (80:20 v/v). La fase A contenía agua (Millipore) con 2,5% de ácido acético glacial y la fase B correspondió a una mezcla de acetonitrilo:fase A (80:20 v/v). El flujo fue de 1 mL/min y el volumen de inyección de 20  $\mu\text{l}$ .

Los flavonoides se cuantificaron, utilizando una curva de calibración (1-100  $\mu\text{g/mL}$ ,  $R^2 = 0,998$ ,  $0,999$  y  $0,998$  para Q, N y E, respectivamente). La detección de Q, N y E se realizó a 368, 310 y 280 nm, respectivamente.

### *2.2.6 Caracterización de micropartículas de flavonoides obtenidas bajo condiciones óptimas*

Los flavonoides totales y superficiales y la eficiencia de encapsulación, se determinaron como se describió en el punto 2.2.3. La morfología de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se recubrieron con oro/paladio utilizando un evaporador al vacío Varian PS 10E y se analizaron utilizando un microscopio LEO 1420 VP (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK) operado a 20 kV. Las imágenes se obtuvieron digitalmente, usando el software EDS 7424 (Oxford Instrument, Oxford, UK). El tamaño de partícula y su distribución se determinó por difracción de luz laser (LLD).

### *2.2.7 Ensayos de liberación de flavonoides desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en hexano y en linoleato de metilo*

*2.2.7.1 Perfil de liberación de flavonoides en hexano desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas:* Para evaluar la liberación de flavonoides desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas (Q-IN, N-IN, E-IN, Q-(IN-C), N-(IN-C), E-(IN-C), Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C)) en hexano, se colocaron las micropartículas (0,5 g) en bolsas filtros de celulosa y posteriormente en botellas de vidrio que contenían hexano (100 mL) con 0,5% de Span. Las botellas se taparon con tapones de teflón y se almacenaron en la oscuridad en estufa con control de temperatura (Mettler modelo UFE 500, Alemania) a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se tomaron alícuotas de hexano (2 mL) a distintos intervalos de tiempo, manteniendo el volumen inicial por adición de hexano. Para los análisis en HPLC, las muestras se trataron con 3 mL de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) que contenía un 1% de ácido acético glacial, se agitaron en un vortex por 1 minuto y se centrifugaron a  $452,8\text{ } \times g$  por 3 minutos. Se removió la fase acuosa-metanólica y se colocó en un matraz volumétrico (5 mL), se aforó con una mezcla de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15) que contenía 1% de ácido acético glacial y una alícuota se inyectó en el HPLC.

*2.2.7.2 Perfil de liberación de flavonoides en linoleato de metilo desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas:* Para evaluar la liberación de flavonoides desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas (Q-IN, N-IN, E-IN, Q-(IN-C), N-(IN-C), E-(IN-C), Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C)) en linoleato de metilo, se colocaron las micropartículas (0,1 g) en bolsas filtros de celulosa y luego en tubos de vidrio (16 x 100 mm) que contenían 10 g de linoleato de metilo, los tubos se taparon con tapones de teflón y se almacenaron en la oscuridad, en una estufa con control de temperatura (Mettler modelo UFE 500, Alemania) a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se tomaron alícuotas de LM (1 mL) a distintos intervalos de tiempo, manteniendo el volumen inicial por la adición de LM. Para los análisis en HPLC, a las muestras se adicionaron 2 mL de hexano, posteriormente se trataron con 3 mL de

agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) que contenía un 1% de ácido acético glacial, se agitaron en un vortex por 1 minuto y se centrifugaron a 452,8 xg por 3 minutos. Se removió la fase acuosa-metanólica y se colocó en un matraz volumétrico (5 mL), se aforó con una mezcla de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15) que contenía 1% de ácido acético glacial y una alícuota se inyectó en el HPLC.

### 2.2.8 *Análisis cinético de liberación*

Los datos de liberación de flavonoides desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas se ajustaron a modelos matemáticos (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995) de Higuchi (Higuchi, 1963) y Peppas (Peppas y Sahlin, 1986) de acuerdo a las Ecuaciones 2.3 y 2.4, respectivamente para los sistemas con IN y HPC y al modelo de Hixson-Crowel (Ecuación 2.5) para los sistemas con HPC en hexano.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2} \quad (\text{Ec. 2.3})$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Ec. 2.4})$$

$$(\% \text{ no disuelto})^{1/3} = 1 - kt \quad (\text{Ec. 2.5})$$

Donde  $M_t$  corresponde a la cantidad de flavonoides liberados al tiempo  $t$ , y  $M_\infty$  corresponde a la cantidad de flavonoides liberados al tiempo infinito. La constante de velocidad de liberación ( $k$ ) se obtuvo como se describe a continuación. Para el modelo de Higuchi, desde la pendiente del gráfico  $M_t/M_\infty$  vs.  $(\text{tiempo})^{1/2}$ , para el modelo de Peppas, desde el intercepto del gráfico de log natural de  $M_t/M_\infty$  vs. el log natural del tiempo y el parámetro “n” se obtuvo desde la pendiente, para el modelo de Hixson-Crowel desde la pendiente del gráfico  $(\% \text{ no disuelto})^{1/3}$  vs. tiempo.

## *2.2.9 Ensayos de estabilidad oxidativa de linoleato de metilo y determinación de compuestos de oxidación*

*2.2.9.1 Preparación de micropartículas:* La encapsulación de Q y E se realizó considerando las temperaturas de entrada óptimas de acuerdo al diseño experimental Box-Behnken (para las micropartículas de Q y E con IN se utilizó 160 °C y 145 °C, respectivamente y aquella con HPC 110 °C y 92 °C, respectivamente). La relación flavonoide:agente encapsulante fue de 1:45. Las micropartículas con IN se prepararon sin y con la adición de 5% C, mientras que las micropartículas con HPC, se prepararon sólo con 3,5% de C (las micropartículas de HPC sin C no presentaron liberación del flavonoide en el rango de tiempo estudiado). Las condiciones de preparación de las dispersiones, condiciones de secado y determinación de eficiencia de encapsulación, son las descritas en los puntos 2.2.1 y 2.2.3. Las micropartículas resultantes se colocaron en bolsas de polipropileno y se almacenaron en la oscuridad a -20 °C hasta el momento de su análisis.

### *2.2.9.2 Estabilidad oxidativa de linoleato de metilo*

- *Tiempo de inducción:* Para determinar el tiempo de inducción se utilizó un equipo Rancimat 679 (Metrohm, Herisau, Suiza) a 60 °C, con un flujo de aire de 20 L/h. A cada tubo de reacción se añadió linoleato de metilo (4 g) y los flavonoides libres (Q, N y E) o las micropartículas (Q-IN, Q-(IN-C), Q-(HPC-C), E-IN, E-(IN-C), E-(HPC-C)) (200 mg/Kg). Los experimentos se realizaron en triplicado, pero en diferentes días para corroborar la repetibilidad de los experimentos.

### *2.2.9.3 Estabilidad oxidativa de linoleato de metilo durante el almacenamiento*

- *Sin burbujeo de oxígeno:* En frascos de vidrio se añadieron los flavonoides libres (Q, N y E) (200 mg/Kg) y el linoleato de metilo (5 g). Los frascos destapados se almacenaron en una estufa (Labolan) en oscuridad a 60 °C (relación superficie volumen de 11,5 cm<sup>-1</sup>). Se tomaron alícuotas a intervalos de tiempos específicos, para determinar mediante HPSEC la formación de compuestos de oxidación (monómeros oxidados

(OxMONs), dímeros (DIMs) y polímeros (POLs)). La pérdida de sustrato se determinó mediante cromatografía de gas líquido (CGL). Los experimentos se realizaron en triplicado, a la misma temperatura y relación superficie-volumen, pero en diferentes días para corroborar la repetibilidad de los experimentos.

- *Con burbujeo de oxígeno*: En tubos de vidrio se añadieron los flavonoides libres (Q, N y E) (200 mg/Kg) o las micropartículas (Q-IN, Q-(IN-C), Q-(HPC-C), E-IN, E-(IN-C), E-(HPC-C)) (200 mg/Kg) y el linoleato de metilo (4 g). Los tubos se almacenaron a 60 °C y flujo de aire de 20 L/h en una placa calefactora (Rancimat 679, Metrohm, Herisau, Suiza). Se tomaron alícuotas a intervalos de tiempos específicos, para determinar mediante HPSEC la formación de compuestos de oxidación (monómeros oxidados (OxMONs), dímeros (DIMs) y polímeros (POLs)). La pérdida de sustrato se determinó mediante cromatografía de gas líquido (CGL). Los experimentos se realizaron en triplicado, pero en diferentes días para corroborar la repetibilidad de los experimentos.

2.2.9.4 *Cromatografía de exclusión por tamaño de alta eficiencia (HPSEC)*: las muestras ( $\approx 20$  mg) se disolvieron en tetrahidrofurano (50 mg/mL), se inyectaron en el equipo HPSEC. El equipo consistió de una bomba Waters 510 y un detector de índice de refracción Waters 2414 (Waters, Milford, MA, USA), un inyector Rheodyne 7725i con 10  $\mu$ L de loop. La separación se realizó utilizando dos columnas Ultrastayragel de 100 Å y 500 Å (25 cm x 0,77 cm d.i., Hewlett–Packard, Avondale, PA, USA.), conectadas en serie. La fase móvil fue tetrahidrofurano (1 mL/min). Los grupos de compuestos separados y cuantificados fueron: monómeros oxidados (OxMONs), dímeros (DIMs) y polímeros (POLs).

2.2.9.5 *Cromatografía de gas líquida (CGL)*: la muestra (1  $\mu$ L, 50 mg/mL) que contenía 20 mg/mL del ester metílico de ácido eicosanoico como estándar interno, se introdujeron en un inyector (modo split 40:1) a 250 °C. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo HP-6850 (Hewlett–Packard, Avondale, PA, USA), con inyector 6850 (Agilent Technologies, PA, USA) y detector de ionización de llama. Se utilizó una

columna capilar de polietilenglicol HP-INNOWax (30m x 0,25mm d.i., espesor de película de 0,25  $\mu\text{m}$ , Agilent, PA, USA) e hidrógeno (1 mL/min) como carrier. La temperatura inicial del horno fue de 180 °C (2 min) y luego se incrementó con una velocidad de 3 °C/min hasta alcanzar los 230 °C (12 min).

#### *2.2.10 Análisis estadístico*

Las condiciones óptimas para cada diseño se obtuvieron mediante metodología de Superficie de Respuesta. Para determinar las constantes de velocidad de liberación se empleó regresión lineal. Para determinar las diferencias estadísticas en eficiencia de encapsulación, recuperación, cantidad de flavonoides totales después del proceso de secado, constantes de velocidad de liberación, tiempos de inducción y factor de protección, entre los sistemas estudiados, se utilizó el análisis de varianza (ANDEVA). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics software version 7 (Manugistic Inc., Statistical Graphics Corporation, 1993, Rockville, MA, USA). Cuando los resultados mostraron diferencias significativas se aplicó el test de rangos múltiples de Tukey. Todos los experimentos se realizaron en triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Micropartículas de flavonoides por secado por atomización

Los flavonoides Q, N y E se encapsularon con inulina (IN) ó hidroxipropilcelulosa (HPC) como agentes encapsulantes y Capsul<sup>®</sup> (C) como agente canalizante, utilizando secado por atomización como método de encapsulación, con un total de 6 sistemas (Q-(IN-C), N-(IN-C), E-(IN-C), Q-(HPC-C), N-(HPC-C), E-(HPC-C)).

Las condiciones experimentales a utilizar son características para cada sistema de micropartículas estudiado, por esta razón, se aplican diseños estadísticos donde se consideran tanto variables de proceso como de formulación, tales como: temperatura de alimentación, temperatura de aire de entrada al secador, temperatura de salida y relación activo/agente encapsulante (Gharsalloui *et al.*, 2007; Kenyon, 1995). Adicionalmente, para lograr altas eficiencias de encapsulación (EE), recuperación (R) y rendimiento es necesario optimizar las condiciones de secado (Gharsalloui *et al.*, 2007).

En base a estos antecedentes, se aplicó un diseño Box-Behnken para cada uno de los 6 sistemas estudiados, donde las variables independientes correspondieron a la temperatura del aire de entrada al secador (variable de proceso), relación flavonoide/agente encapsulante (variable de formulación) y contenido de Capsul<sup>®</sup>. Las variables respuestas correspondieron a la eficiencia de encapsulación y liberación de flavonoides en hexano.

#### 3.1.1 Micropartículas de flavonoides con inulina y Capsul<sup>®</sup>

En la Tabla 3 se presentan los resultados de eficiencia de encapsulación (EE) y liberación de flavonoide en hexano ( $t_{14}$ ), para el diseño experimental Box-Behnken de los sistemas de micropartículas Q-(IN-C), N-(IN-C) y E-(IN-C), obtenidas mediante secado por atomización.

**Tabla 3** Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación (EE) y liberación de flavonoides en hexano ( $t_{14}$ ), para el diseño Box-Behnken de Q, N y E con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

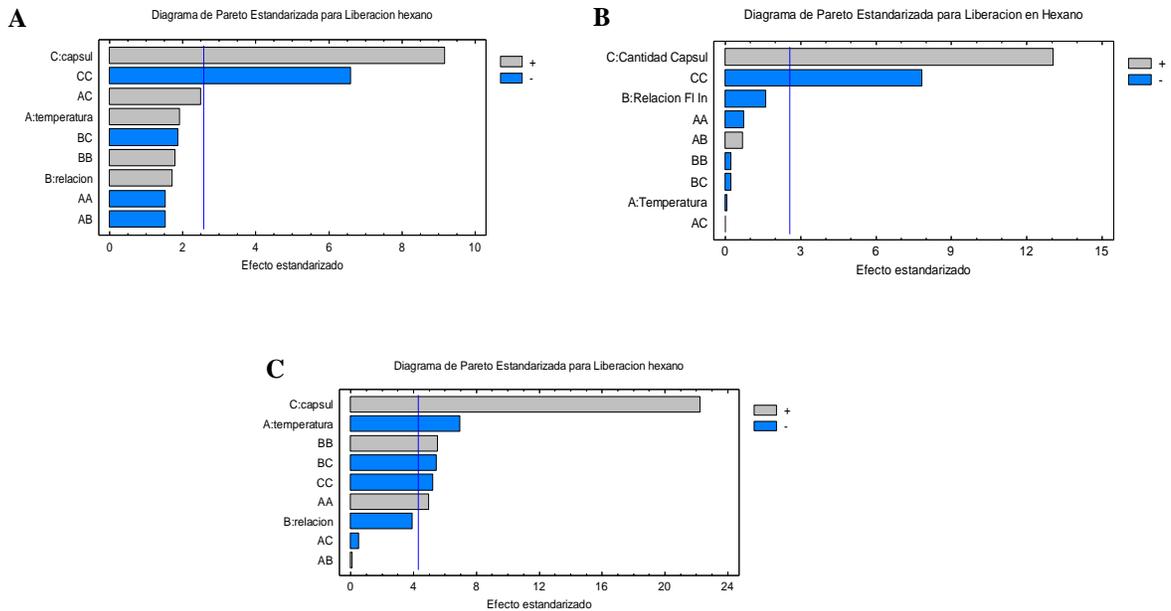
Relación F/IN	Capsul <sup>®</sup> (%) <sup>*</sup>	Temperatura aire de entrada (°C)	Quercetina		Naringenina		Epicatequina	
			EE (%) (X ± DS)	Liberación † (%) (X ± DS)	EE (%) (X ± DS)	Liberación † (%) (X ± DS)	EE (%) (X ± DS)	Liberación † (%) (X ± DS)
1:20	0	140	53,5 ± 1,3	21,3 ± 2,8	30,4 ± 4,0	16,6 ± 2,0	54,9 ± 4,2	7,7 ± 0,8
1:20	12,5	120	39,7 ± 2,2	65,5 ± 2,7	38,4 ± 1,6	97,5 ± 1,3	64,8 ± 2,4	83,5 ± 0,2
1:20	12,5	160	44,0 ± 1,2	80,1 ± 3,6	39,0 ± 0,3	86,0 ± 4,5	64,7 ± 1,1	60,8 ± 1,1
1:20	25	140	50,6 ± 2,4	73,8 ± 2,2	35,3 ± 4,5	94,6 ± 2,8	78,6 ± 1,0	77,4 ± 5,9
1:35	0	120	63,2 ± 5,9	18,9 ± 2,2	36,5 ± 1,2	17,1 ± 0,9	50,1 ± 0,1	20,7 ± 4,54
1:35	0	160	61,3 ± 0,8	16,4 ± 1,9	38,4 ± 1,4	22,4 ± 2,0	50,5 ± 3,2	11,5 ± 2,5
1:35	6,6	140	51,8 ± 1,2	68,9 ± 2,7	39,0 ± 0,3	81,5 ± 0,9	82,8 ± 3,0	46,3 ± 13,2
1:35	6,6	140	45,9 ± 0,5	73,6 ± 5,0	37,5 ± 0,1	87,7 ± 12,7	77,9 ± 0,1	43,9 ± 0,2
1:35	6,6	140	49,3 ± 3,1	75,4 ± 0,3	36,2 ± 0,3	93,1 ± 10,4	81,3 ± 1,4	39,7 ± 3,1
1:35	12,5	120	50,9 ± 2,8	52,5 ± 1,0	33,8 ± 4,8	83,5 ± 2,3	85,2 ± 0,9	75,6 ± 11,7
1:35	12,5	160	56,1 ± 2,4	84,8 ± 4,8	37,9 ± 3,2	88,8 ± 9,3	85,0 ± 0,4	63,4 ± 7,5
1:50	0	140	73,3 ± 2,7	49,7 ± 2,0	41,4 ± 0,9	17,1 ± 2,7	63,1 ± 5,5	28,5 ± 9,1
1:50	4,8	120	52,2 ± 2,4	77,7 ± 4,1	50,5 ± 3,4	75,6 ± 2,3	76,9 ± 1,7	62 ± 9,47
1:50	4,8	160	49,2 ± 5,8	73,8 ± 5,2	48,1 ± 6,3	74,8 ± 3,4	82,0 ± 0,2	40 ± 7,52
1:50	9,1	140	46,3 ± 1,2	76,1 ± 1,2	46,9 ± 2,3	91,6 ± 1,9	79,5 ± 0,6	61,9 ± 2,3

\*Porcentaje de Capsul<sup>®</sup> (C) calculado en base al peso de inulina. † Liberación de flavonoides en hexano a los 14 días de almacenamiento. F: flavonoide; IN: inulina; EE: eficiencia de encapsulación; X: promedio; DS: desviación estándar

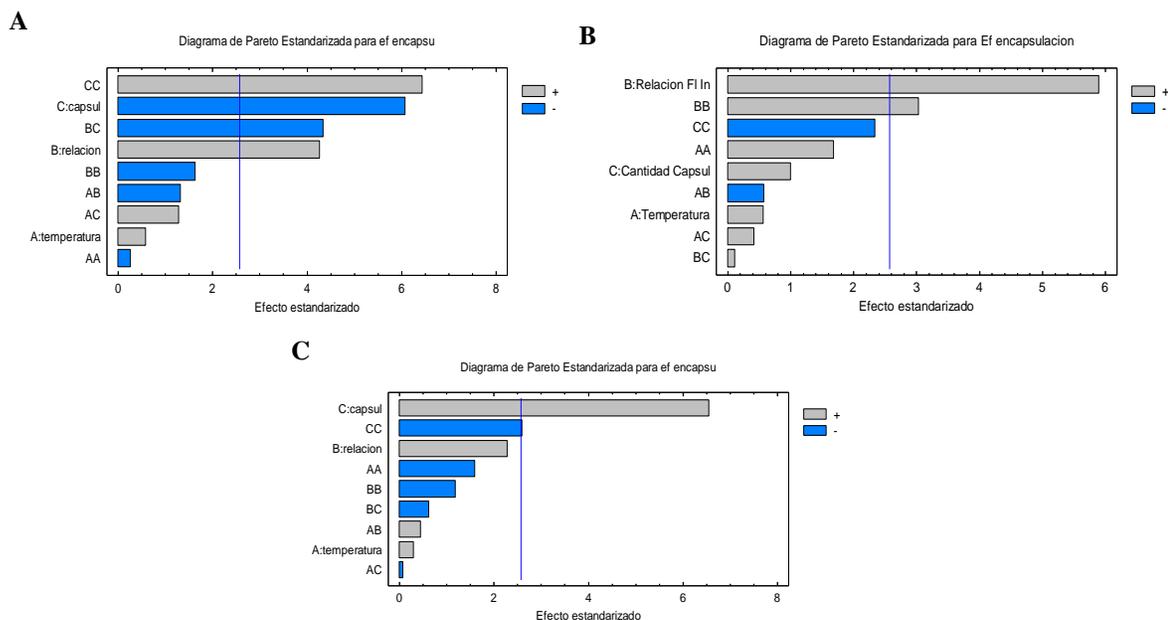
En los sistemas Q-(IN-C), N-(IN-C) y E-(IN-C) la EE fluctuó entre 39,7-73,3%, 30,4-50,5% y 50,1-85,2%, respectivamente. Un aumento en el contenido de IN, aumentó la EE para los tres sistemas estudiados, lo que se debería a un aumento en la velocidad de formación de la costra en la superficie de la gota, permitiendo la difusión del agua y la retención del agente activo, como fue reportado previamente (Kenyon, 1995; Young *et al.*, 1993; Rosenberg *et al.*, 1990). La liberación de flavonoide en hexano ( $t_{14}$ ) para las micropartículas de los sistemas Q-(IN-C), N-(IN-C) y E-(IN-C) alcanzaron valores entre 16,4-84,8%, 16,6-97,5% y 7,7-83,5%, respectivamente. Como se esperaba, en todos los sistemas un aumento en el contenido de agente canalizante aumentó la liberación de flavonoide en hexano a los 14 días de almacenamiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para las variables dependientes EE y liberación de flavonoides en hexano ( $t_{14}$ ) para los sistemas Q-(IN-C), N-(IN-C) y E-(IN-C) (Anexo 1).

En las Figuras 10 y 11 se presentan los gráficos de Pareto para la EE y liberación de flavonoides en hexano ( $t_{14}$ ), respectivamente, de los sistemas de micropartículas Q-(IN-C) (A), N-(IN-C) (B) y E-(IN-C) (C).



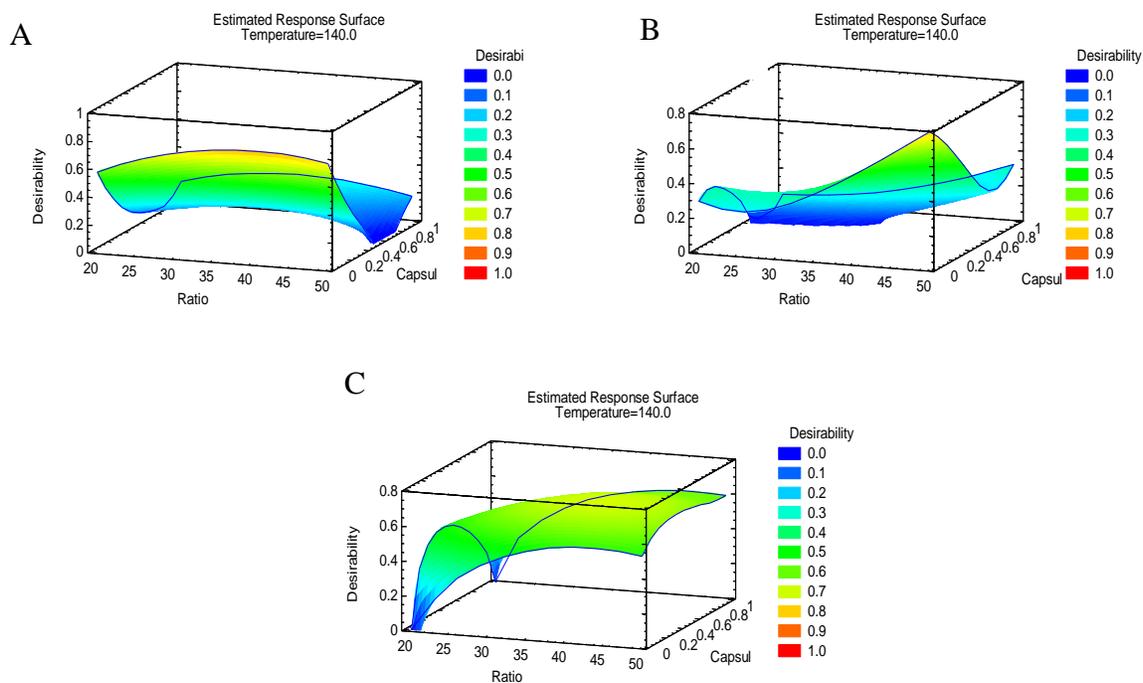
**Figura 10.** Gráficos de Pareto para la eficiencia de encapsulación, en los sistemas de micropartículas Q-(IN-C) (A), N-(IN-C) (B) y E-(IN-C) (C)



**Figura 11.** Gráficos de Pareto para la liberación en hexano ( $t_{14}$ ), en los sistemas de micropartículas Q-(IN-C) (A), N-(IN-C) (B) y E-(IN-C) (C)

Para la obtención de las condiciones óptimas en cada sistema estudiado (Q-(IN-C), N-(IN-C) y E-(IN-C)) se aplicó la función deseabilidad (optimización múltiple); para lo cual se maximizó la EE y se minimizó la liberación de flavonoides en hexano. Para los sistemas Q-(IN-C), N-(IN-C) y E-(IN-C), el valor de  $r^2$  ajustado explicó el 89,2%, 76,7% y 77,9% de la variabilidad en la EE, respectivamente y el 91,1% 94,2% y 86,6% de la variabilidad en la liberación en hexano ( $t_{14}$ ), respectivamente para el modelo utilizado.

La metodología de Superficie Respuesta se utilizó para optimizar las variables respuesta (eficiencia de encapsulación de flavonoides y liberación de los flavonoides en hexano a los 14 días de almacenamiento). La Figura 12 (A, B y C) muestra los gráficos de Superficie Respuesta estimada para el diseño Box-Behnken de los sistemas Q-(IN-C), N-(IN-C) y E-(IN-C), respectivamente. Se observa en las figuras, que para los tres sistemas estudiados la optimización se alcanzó a mayores contenidos de IN y bajos contenidos de C.



**Figura 12.** Gráficos de Superficie Respuesta para el diseño Box-Behnken de los sistemas Q-(IN-C) (A), N-(IN-C) (B) y E-(IN-C) (C)

### 3.1.2 Micropartículas de flavonoides con hidroxipropilcelulosa y Capsul<sup>®</sup>

En la Tabla 4 se presentan los resultados de eficiencia de encapsulación (EE) y liberación de flavonoide en hexano ( $t_{28}$ ), para el diseño experimental Box-Behnken de los sistemas de micropartículas Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C) mediante secado por atomización.

**Tabla 4** Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación (EE) y liberación de flavonoides ( $t_{28}$ ) para el diseño Box-Behnken de Q, N y E con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

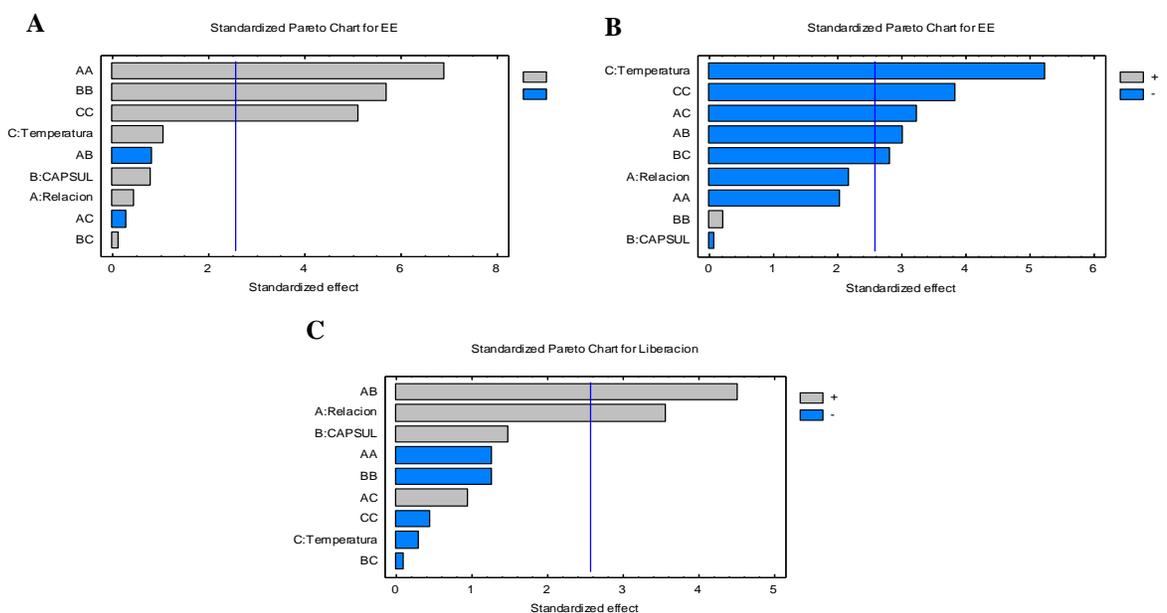
Relación F/HPC	Capsul <sup>®</sup> (%) <sup>*</sup>	Temperatura aire de entrada (°C)	Quercetina		Naringenina		Epicatequina	
			EE (%) (X ± DS)	Liberación <sup>†</sup> (%) (X ± DS)	EE (%) (X ± DS)	Liberación <sup>†</sup> (%) (X ± DS)	EE (%) (X ± DS)	Liberación <sup>†</sup> (%) (X ± DS)
1:20	0	90	58,2 ± 2,0	2,4 ± 0,1	43,4 ± 0,6	2,8 ± 0,1	82,9 ± 0,5	1,9 ± 0,3
1:20	12,5	70	54,6 ± 1,4	2,4 ± 0,3	42,5 ± 1,0	4,4 ± 0,7	80,3 ± 0,7	1,3 ± 0,1
1:20	12,5	110	59,1 ± 2,0	2,4 ± 0,2	41,1 ± 0,8	7,2 ± 0,7	77,9 ± 0,9	1,2 ± 0,2
1:20	25	90	61,1 ± 1,0	4,6 ± 0,3	53,2 ± 1,9	11,9 ± 0,3	79,6 ± 0,2	3,2 ± 0,3
1:35	0	70	56,4 ± 0,9	3,7 ± 0,1	46,4 ± 0,1	4,4 ± 0,2	74,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0
1:35	0	110	55,7 ± 1,1	3,8 ± 0,1	44,2 ± 1,4	4,3 ± 0,1	74,4 ± 1,0	1,4 ± 0,4
1:35	6,6	90	46,3 ± 0,1	3,8 ± 0,4	49,3 ± 4,1	4,8 ± 0,2	74,4 ± 1,5	2,1 ± 0,2
1:35	6,6	90	42,8 ± 0,8	3,8 ± 0,1	47,4 ± 0,1	4,5 ± 0,2	76,9 ± 0,9	1,9 ± 0,3
1:35	6,6	90	43,2 ± 0,5	3,7 ± 0,1	47,2 ± 0,6	5,0 ± 0,4	75,1 ± 1,3	3,0 ± 0,3
1:35	12,5	70	57,6 ± 0,3	6,9 ± 0,6	49,6 ± 5,4	10,5 ± 0,4	76,6 ± 0,6	1,9 ± 0,1
1:35	12,5	110	57,6 ± 1,7	5,2 ± 0,3	34,6 ± 1,1	8,6 ± 0,7	72,4 ± 2,7	0,5 ± 0,1
1:50	0	90	58,7 ± 0,5	3,1 ± 0,1	45,3 ± 2,6	6,4 ± 0,1	77,1 ± 1,7	1,2 ± 0,2
1:50	4,8	70	58,1 ± 0,8	5,8 ± 0,1	47,8 ± 1,6	2,5 ± 0,3	73,9 ± 0,3	0,0 ± 0,0
1:50	4,8	110	61,3 ± 0,4	2,5 ± 0,4	32,2 ± 0,3	2,2 ± 0,2	69,5 ± 3,6	0,0 ± 0,0
1:50	9,1	90	57,8 ± 3,3	5,8 ± 0,3	41,4 ± 2,6	9,0 ± 0,6	76,6 ± 1,1	0,0 ± 0,0

\* Porcentaje de Capsul<sup>®</sup> (C) calculado en base al peso de hidroxipropilcelulosa. † Liberación de flavonoides en hexano a los 28 días de almacenamiento. F: flavonoide; HPC: hidroxipropilcelulosa, EE: eficiencia de encapsulación; X: promedio; DS: desviación estándar

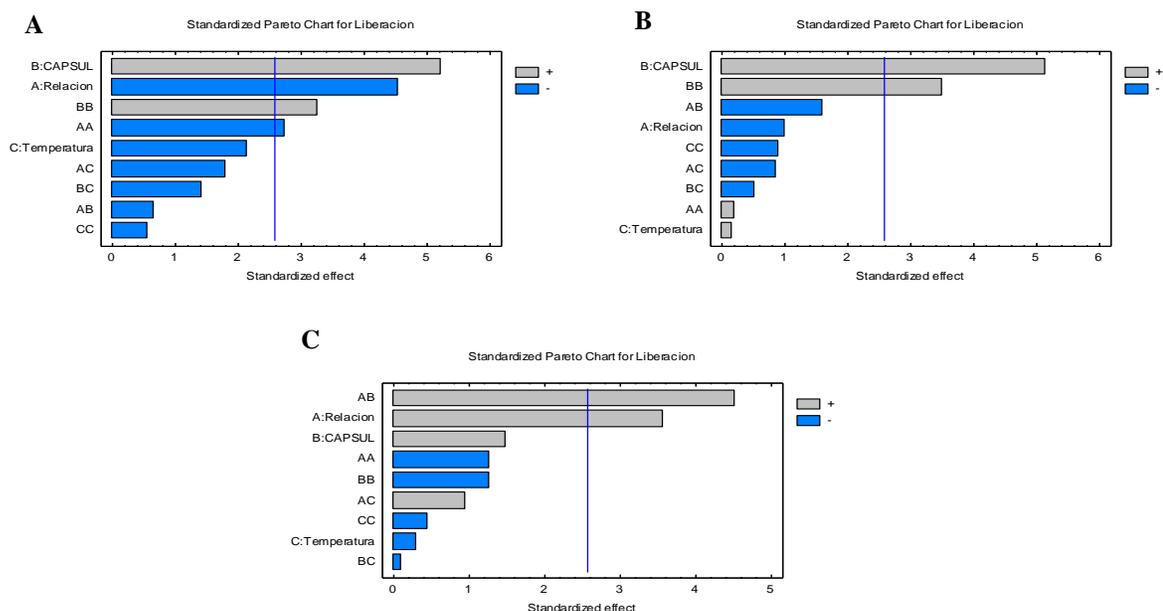
En los sistemas Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C) la EE fluctuó entre 42,8-61,3%, 32,2-53,2% y 69,5-82,9%, respectivamente. En la Tabla 4 se observa que un aumento en el contenido de HPC no incrementó la EE, contrariamente a lo encontrado en los sistemas con inulina. Este resultado, se podría explicar debido a las diferencias en viscosidad entre IN y HPC, ya que un aumento de la viscosidad, como en HPC, también permite una mayor velocidad de formación de la costra (Gharsallaoui *et al.*, 2007). La liberación de flavonoides en hexano ( $t_{28}$ ) desde las micropartículas Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C) alcanzó valores entre 2,4-6,9, 2,2-11,9% y 0,0-3,2%, respectivamente. Como se esperaba, un aumento en el contenido de agente canalizante aumentó la liberación de flavonoide en hexano a los 28 días de almacenamiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para las variables dependientes EE y liberación de flavonoides en hexano ( $t_{28}$ ) para los sistemas Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C), respectivamente (Anexo 2).

En las Figuras 13 y 14 se presentan los gráficos de Pareto para EE y liberación de flavonoides en hexano ( $t_{28}$ ), respectivamente, de los sistemas de micropartículas Q-(HPC-C) (A), N-(HPC-C) (B) y E-(HPC-C) (C).



**Figura 13.** Gráficos de Pareto para la eficiencia de encapsulación, en los sistemas de micropartículas Q-(HPC-C) (A), N-(HPC-C) (B) y E-(HPC-C) (C)



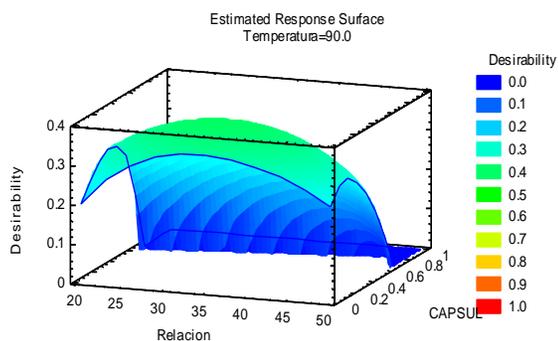
**Figura 14.** Gráficos de Pareto para la liberación en hexano ( $t_{28}$ ), en los sistemas de micropartículas Q-(HPC-C) (A), N-(HPC-C) (B) y E-(HPC-C) (C)

Para la obtención de las condiciones óptimas en cada sistema estudiado Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C), se maximizó la EE y se minimizó la liberación de flavonoide en hexano ( $t_{28}$ ), aplicando la optimización múltiple (función deseabilidad). El valor  $r^2$  ajustado para los sistemas Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C) indicó que el modelo explicó el 86,1%, 83,1% y 74,9% de la variabilidad en la EE, respectivamente y el 83,2% 71,7% y 68,4,6% de la variabilidad en la liberación de flavonoide en hexano ( $t_{28}$ ), respectivamente.

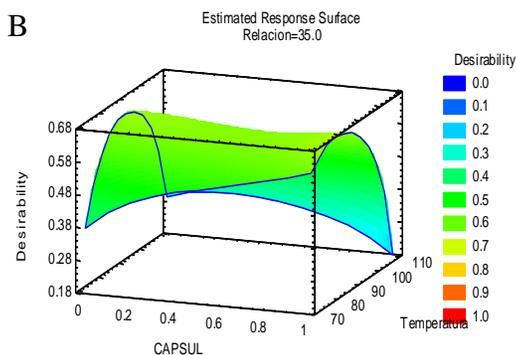
La metodología de Superficie Respuesta se utilizó para optimizar la eficiencia de encapsulación y la liberación de los flavonoides en hexano a los 28 días de almacenamiento. La Figura 15 (A, B y C) muestra los gráficos de Superficie Respuesta estimada para el diseño Box-Behnken de los sistemas Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C), respectivamente. Se observa que la optimización se alcanzó a mayores contenidos de HPC en el sistema E-(HPC-C), bajo contenido de C para los tres sistemas

estudiados y a temperaturas del aire de entrada al secador: mayores para el sistema Q-(HPC-C), menores para el sistema N-(HPC-C) e intermedias para el sistema E-(HPC-C).

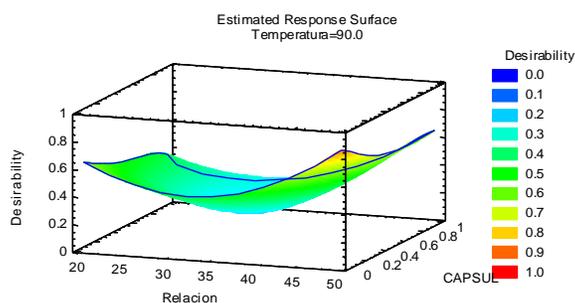
A



B



C



**Figura 15.** Gráficos de Superficie Respuesta para el diseño Box-Behnken de los sistemas Q-(HPC-C) (A), N-(HPC-C) (B) y E-(HPC-C) (C)

Los agentes encapsulantes, IN y HPC, son polímeros hidrofílicos que se comportan como matrices inertes en un medio hidrofóbico. Para facilitar la liberación de flavonoides se utilizó Capsul® (almidón de maíz ceroso modificado químicamente que incorpora en su estructura un componente lipofílico) como agente canalizante, que formaría canales en las micropartículas y permitiría la difusión de los flavonoides hacia un medio hidrofóbico. La naturaleza del polímero, influirían en la EE para un mismo flavonoide encapsulado.

En general, las EE de flavonoides con HPC fueron mayores que con IN. Estas diferencias se deberían a las diferencias de viscosidad entre los dos polímeros. Así, HPC presenta una viscosidad de 150 a 700 cps en etanol a una concentración del 10% (Klucel, ficha técnica), mientras que IN presenta una viscosidad en agua menor a 2 cps a una concentración del 5% (Franck, 2002). La mayor viscosidad de HPC permitiría la rápida formación de una membrana semipermeable (costra) que retiene el activo (Jafari *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 1990) y aumenta la EE.

Las micropartículas con un 25% de C (respecto al agente encapsulante) alcanzaron porcentajes de liberación de flavonoides superiores en los sistemas con IN (74-95%) respecto a los sistemas con HPC (3-11%), cuando se compara para un mismo flavonoide. Estos resultados se pueden atribuir a diferencias en la interacción flavonoide-agente encapsulante y/o a la capacidad de hinchamiento del polímero en el medio de disolución.

Cuando se elaboran micropartículas mediante secado por atomización, es necesario optimizar las condiciones de secado que permitan obtener mayores EE para favorecer la protección del activo encapsulado, utilizando la metodología de Superficie Respuesta. La temperatura de alimentación, la temperatura del aire de entrada al secador y la temperatura de salida, son variables importantes durante el proceso de secado (Gharsallaoui *et al.*, 2007). La temperatura de entrada es uno de los parámetros más importantes, ya que se relaciona con la velocidad de secado de la gota y con el contenido final de humedad de las micropartículas. La temperatura de salida se considera un parámetro de control porque corresponde a la temperatura final a la que se expondrán las micropartículas al término del proceso de encapsulación, sin embargo, este parámetro no puede ser controlado directamente y depende de la temperatura de entrada al secador en los equipos de laboratorio (Fang y Bhandari, 2010; Gharsallaoui *et al.*, 2007). El otro parámetro a considerar es la relación activo/agente encapsulante, porque determina el contenido de sólidos del sistema. Cuando el contenido de sólidos es alto, aumenta la viscosidad y la velocidad de formación de la costra sobre la superficie de la gota (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Kenyon, 1995).

La Tabla 5 presenta las condiciones óptimas de obtención de las micropartículas mediante secado por atomización de los flavonoides Q, N y E, utilizando IN o HPC como agente encapsulante.

**Tabla 5.** Condiciones óptimas de obtención de las micropartículas de Q, N y E mediante secado por atomización con IN o HPC como agente encapsulante

Sistemas	Relación F/AE	Capsul <sup>®</sup> * (%)	Temperatura del aire entrada al secador (°C)
<b>Inulina</b>			
Q-(IN-C)	1:43	0	160
N-(IN-C)	1:50	0	120
E-(IN-C)	1:41	5	145
<b>Hidroxipropilcelulosa</b>			
Q-(HPC-C)	1:49	3,5	110
N-(HPC-C)	1:38	3,5	77
E-(HPC-C)	1:44	3,5	92

\*Porcentaje de Capsul<sup>®</sup> calculado en base al peso de los agentes encapsulantes. F: flavonoide; AE: agente encapsulante; Q: quercetina; N: naringenina; E: epicatequina; IN: inulina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul<sup>®</sup>

En la Tabla 5 se observa que las condiciones óptimas para la obtención de micropartículas de flavonoides por secado por atomización es característica para cada sistema F/AE. La relación F/AE óptima para los 6 sistemas estudiados se encontró para valores altos de agente encapsulante. La temperatura óptima del aire de entrada al secador fueron menores para los sistemas con HPC respecto a los con IN. Estos resultados se deberían al tipo de solvente utilizado en la formulación de las soluciones de alimentación (para IN agua:etanol (80:20) y para HPC agua:etanol (20:80)) y también a la naturaleza del agente encapsulante.

Se obtuvieron diferentes porcentajes óptimos de agente canalizante para los sistemas con IN. Para evaluar el efecto de la estructura de los flavonoides se prepararon micropartículas bajo condiciones óptimas de F/IN y temperatura del aire de entrada al secador, sin y con agente canalizante (5%). En los sistemas con HPC el porcentaje de C óptimo fue un 3,5% para todos los sistemas de flavonoides.

## 3.2 Caracterización fisicoquímica y morfológica de las micropartículas de flavonoides obtenidas bajo condiciones óptimas para cada sistema estudiado

### 3.2.1 Caracterización de las micropartículas de flavonoide con inulina y Capsul<sup>®</sup>, obtenidas bajo condiciones óptimas

En la Tabla 6 se presentan los resultados de eficiencia de encapsulación y recuperación de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidas bajo condiciones óptimas, sin agente canalizante (Q-IN, N-IN y E-IN) y con 5% de agente canalizante (Q-(IN-C), N-(IN-C) y E-(IN-C)) (Anexo 3).

**Tabla 6.** Caracterización de las micropartículas de flavonoides utilizando inulina como agente encapsulante con y sin la adición de agente canalizante (Capsul<sup>®</sup>)

Sistemas	Relación F/IN	Capsul <sup>®</sup> † (%)	Temperatura del aire de entrada (° C)	Flavonoides totales después del secado (mg/g polvo)	Eficiencia de encapsulación (%)	Recuperación (%)	Tamaño de partícula D(3,2) (µm)
Q-IN	1:43	0	160	21,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	63,6 ± 0,6 <sup>bc</sup>	96 ± 1,3 <sup>a</sup>	2,0
Q-(IN-C)	1:43	5	160	20,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	61,8 ± 2,3 <sup>c</sup>	95 ± 1,1 <sup>a</sup>	2,4
N-IN	1:50	0	120	16,8 ± 1,0 <sup>c</sup>	43,0 ± 0,8 <sup>d</sup>	86 ± 4,9 <sup>a</sup>	2,3
N-(IN-C)	1:50	5	120	17,6 ± 0,6 <sup>bc</sup>	38,9 ± 1,6 <sup>d</sup>	94 ± 3,1 <sup>a</sup>	2,5
E-IN	1:41	0	145	20,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	69,3 ± 0,8 <sup>ab</sup>	87 ± 2,5 <sup>a</sup>	2,5
E-(IN-C)	1:41	5	145	19,7 ± 0,2 <sup>ab</sup>	69,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	86 ± 0,8 <sup>a</sup>	2,4

† Valores son expresados como promedios ± DS (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre sistemas. F: flavonoide; IN: inulina; Q: quercetina; N: naringenina; E: epicatequina; C: Capsul<sup>®</sup>

En la Tabla 6 se observa que en los sistemas sin agente canalizante Q y E tuvieron una EE significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) respecto a N, sugiriendo que se puede atribuir a diferencias estructurales entre los flavonoides. Así, Q es una flavonol, E un flavanol y N es una flavanona (Rice-Evans *et al.*, 1996), que se diferencian en el doble enlace 2,3, el grupo 4-ceto y el grupo 3-OH en el anillo C y el número de grupos OH en el anillo B. La mayor EE de Q y E se asocia con el mayor número de grupos OH en el flavonoide (cinco grupos OH en la molécula) que favorecería la interacción entre los grupos OH del flavonoide y los sitios OH de la IN mediante puentes de hidrógeno. Contrariamente, N tiene menos grupos OH (tres grupos OH en la molécula). Este mismo comportamiento se encontró para las micropartículas con agente canalizante. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la EE entre micropartículas con y sin agente canalizante para cada flavonoide estudiado, lo que sugiere que C solo actuaría como un agente canalizante y no como un agente encapsulante.

La degradación de flavonoides se asocia con reacciones de oxidación y/o degradación inducidas por el calor (Bravo, 1998), sin embargo, la recuperación de flavonoides después del proceso de secado fue alta (86%-96%) para todos los sistemas estudiados, lo que se atribuiría al corto tiempo de secado (5-30 s) y/o a la rápida formación de la costra en la superficie de la gota durante el proceso de secado (Gharsallaoui *et al.*, 2007). La recuperación de flavonoides alcanzó valores sobre 86% y fue independiente de la naturaleza del flavonoide, mostrando que los flavonoides fueron estables a las altas temperaturas de secado (Moreira *et al.*, 2002).

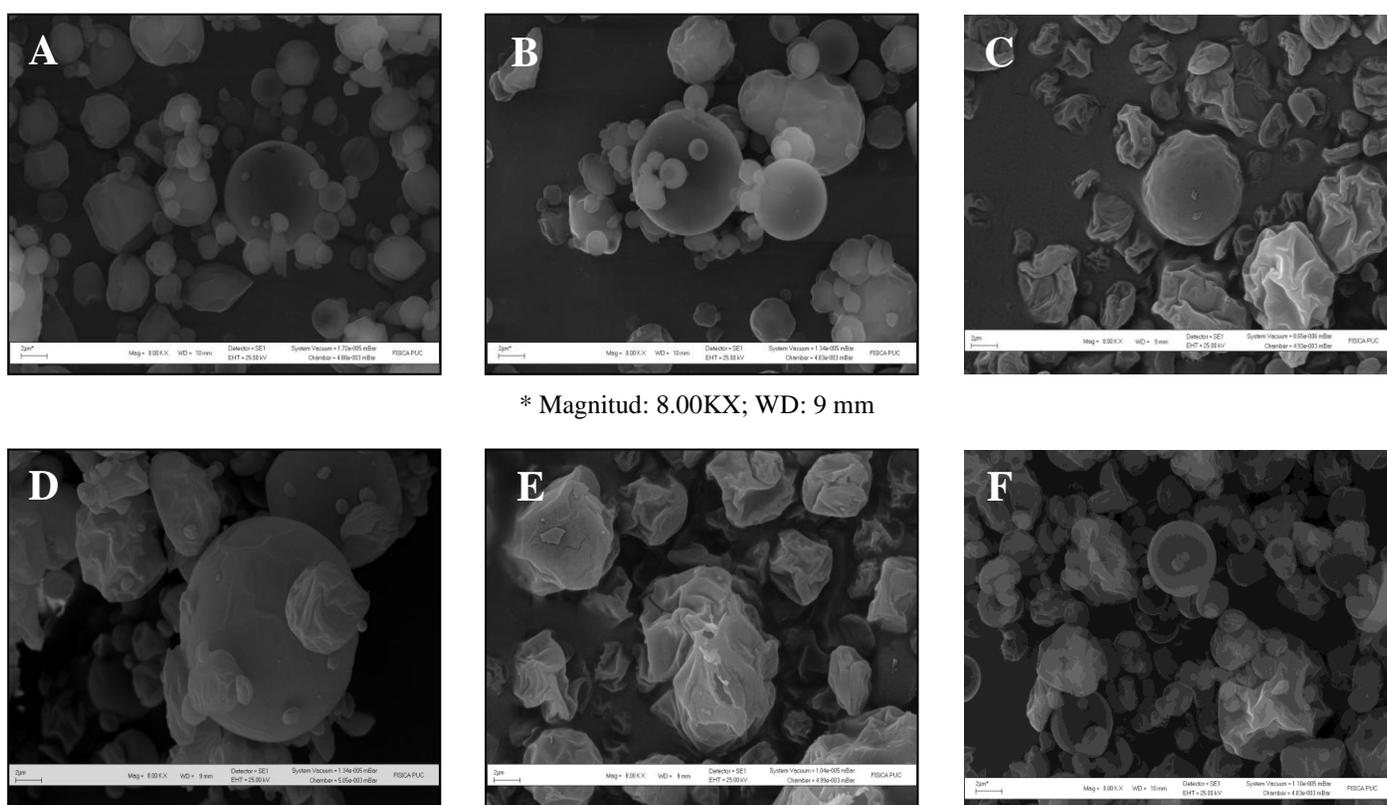
La cantidad de flavonoides totales después del proceso de secado fue significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) para los sistemas con N en comparación a los sistemas con Q y E que no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos. Este resultado no se asociaría con pérdidas durante el proceso de secado porque la recuperación fue sobre un 86% (sin diferencias significativas entre los sistemas), por lo tanto, la mayor cantidad de sólidos en las micropartículas con N explicaría su menor contenido de flavonoides totales.

El tamaño de las micropartículas elaboradas bajo condiciones óptimas se presenta de acuerdo al valor  $D(3,2)$ , el cual fluctuó entre 2,0 y 2,5  $\mu\text{m}$  y está dentro de los rangos reportados en la literatura en procesos de secado por atomización (Gharsallaoui *et al.*, 2007). La distribución de tamaño para todos los sistemas de micropartículas estudiados fue unimodal, con partículas en un sólo rango de tamaño.

*3.2.1.1 Microfotografías SEM de las micropartículas de flavonoides obtenidas bajo condiciones óptimas:* La Figura 16 (A-F) muestra las fotografías de Q, N y E, por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas utilizando IN como agente encapsulante sin y con 5% de agente canalizante (Capsul<sup>®</sup>).

En general, las micropartículas de Q, N y E tienen forma esférica, paredes continuas, aparentemente sin presencia de fisuras o grietas. Sin embargo, algunas presentan superficies lisas mientras que otras presentan indentaciones. La formación de indentaciones durante el proceso de secado se puede producir a bajas temperaturas como en el sistema N-IN o a altas

temperaturas de secado como en el sistema Q-IN (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005). A bajas temperaturas existe una menor difusión del agua y las partículas tienen mayor tiempo para encogerse, mientras que a altas temperaturas, la rápida evaporación del agua y la presión en el interior de las partículas también produce encogimiento (Sun-Waterhouse *et al.*, 2012; Ronkart *et al.*, 2007). Las micropartículas con C presentan mayor tendencia a la aglomeración que aquellas que no lo contienen, que se asociaría a la distinta interacción polímero-polímero, ya que IN es un polímero hidrofílico, mientras que C contiene un componente hidrofílico y uno hidrofóbico.



**Figura 16.** Microfotografías SEM de flavonoides encapsulados para los sistemas Q-IN (A), N-IN (B), E-IN (C), Q-(IN-C) (D), N-(IN-C) (E) y E-(IN-C) (F)

### 3.2.2 Caracterización de las micropartículas de flavonoide con hidroxipropilcelulosa y Capsul<sup>®</sup>, obtenidas bajo condiciones óptimas

En la Tabla 7 se presentan los resultados de eficiencia de encapsulación y recuperación de los sistemas de micropartículas de flavonoides con HPC obtenidas bajo condiciones óptimas (Q-(HPC-C), N-(HPC-C) y E-(HPC-C)). Se elaboraron solamente micropartículas con 3,5%

de C debido a que las micropartículas sin C no presentaron liberación a los 28 días de almacenamiento en hexano (Anexo 4).

**Tabla 7.** Caracterización de las micropartículas de flavonoides utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante †

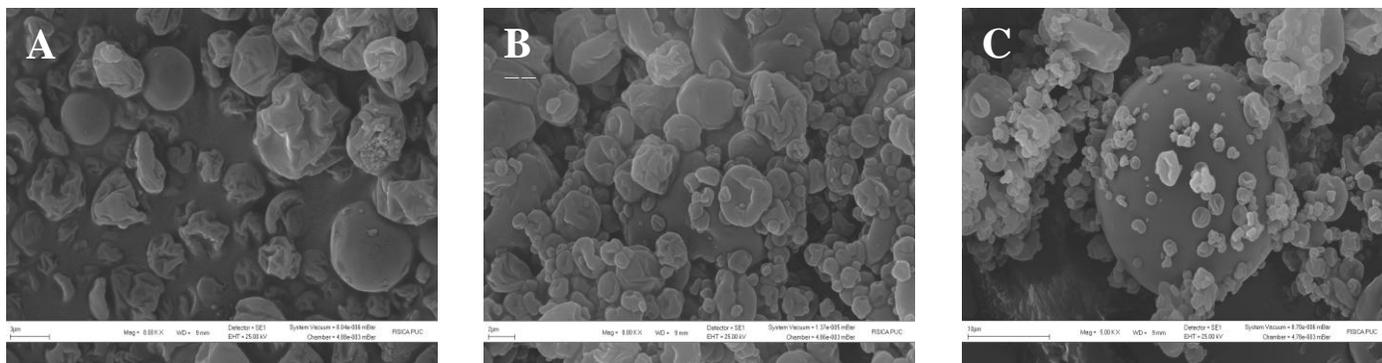
Sistemas	Relación F/HPC	Capsul <sup>®</sup> (%)	Temperatura del aire de entrada (° C)	Flavonoides totales después del secado (mg/g powder)	Eficiencia de encapsulación (%)	Recuperación (%)
Q-(HPC-C)	1:49	3,5	110	17,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	69,6 ± 3,3 <sup>a</sup>	89 ± 1,3 <sup>b</sup>
N-(HPC-C)	1:38	3,5	77	24,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	55,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	98 ± 0,4 <sup>a</sup>
E-(HPC-C)	1:44	3,5	92	13,6 ± 0,4 <sup>c</sup>	68,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	63 ± 1,7 <sup>c</sup>

† Valores son expresados como promedios ± DS (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre sistemas. F: flavonoide; Q: quercetina; N: naringenina; E: epicatequina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul<sup>®</sup>

Como se observa en la Tabla 7, los resultados de EE para las micropartículas con HPC fueron similares a los encontrados para las micropartículas con IN. Q y E tuvieron una EE significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) que N, lo que se atribuye a la estructura química de los flavonoides y por tanto a la interacción flavonoide-agente encapsulante, como se discutió previamente.

La recuperación de Q y N en las micropartículas fue de un 89% y 98%, respectivamente. Mientras que E tuvo un porcentaje de recuperación de un 63%, siendo el sistema que presentó mayores pérdidas durante el proceso de secado. La cantidad de flavonoides totales después del proceso de secado fue significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) para los sistemas con N en comparación a los sistemas con Q y E, de acuerdo al menor contenido de sólidos en las micropartículas.

*3.2.2.1 Microfotografías SEM de las micropartículas de flavonoides obtenidas bajo condiciones óptimas:* La Figura 17 (A-C) muestra las fotografías por microscopía electrónica de barrido (SEM) para las micropartículas de Q, N y E obtenidas bajo condiciones óptimas utilizando HPC como agente encapsulante y C como agente canalizante.



\* Magnitud: 8.00KX; WD: 9 mm

**Figura 17.** Microfotografías SEM Q-(HPC-C) (A), N-(HPC-C) (B) y E-(HPC-C) (C)

En general, las micropartículas obtenidas utilizando HPC como agente encapsulante son irregulares en forma y tamaño, se presentan colapsadas, con hendiduras y aglomeradas. Una morfología similar se describió para micropartículas de polifenoles con hidroxipropilmetilcelulosa (Sun-Waterhouse *et al.*, 2012). Las micropartículas de flavonoides con HPC se prepararon con etanol:agua (80:20) lo que permitió utilizar temperaturas de secado menores, pero con tendencia a formar aglomerados (Quek *et al.*, 2007). La rápida evaporación del etanol durante el proceso de secado podría influir en la aparición de hendiduras en las micropartículas, como fue reportado por Lee *et al.* (1997) al utilizar acetato de etilo como solvente de disolución.

### 3.2.3 Comparación de resultados para las micropartículas de flavonoides obtenidas bajo condiciones óptimas con inulina o hidroxipropilcelulosa como agentes encapsulantes

Mayores valores de EE a los obtenidos en este estudio con IN y HPC, se reportaron en micropartículas de Q y N con celulosa acetato ftalato (62-94%) como agente encapsulante y tween 85 o dodecilsulfato benceno de sodio como emulsificante mediante secado por atomización, utilizando una temperatura de entrada al secador de 125 °C (Sansone *et al.*, 2011). Por otra parte, menores valores de EE se reportaron para micropartículas de Q con hidroxipropilmetilcelulosa o inulina (9-18,5%) como agente encapsulante y lecitina de soya como emulsificante mediante secado por atomización, utilizando una temperatura de entrada de 165 °C (Sun-Waterhouse *et al.*, 2012), según los autores eficiencias de encapsulación menores se deberían a la susceptibilidad de Q a las fuertes condiciones de homogeneización y a la temperatura de entrada.

Utilizando otras técnicas de encapsulación se encontraron mayores valores de EE en micropartículas de Q con celulosa acetato propionato y celulosa acetato ftalato (90-100%) mediante evaporación de solvente, la alta EE se debería a la afinidad de Q con los polímeros utilizados (Scarfato *et al.*, 2008) y en nanopartículas de Q (79,8%) y E (76,1%) con copolímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA) (Pool *et al.*, 2012). Contrariamente, menores valores de EE se reportaron para micropartículas de catequinas de té (26-47%) por gelificación iónica (Hu *et al.*, 2008) y para micropartículas de E (30%) y Q (35%) encapsuladas con  $\beta$ -ciclodextrinas mediante formación de complejos (Kalogeropoulos *et al.*, 2010).

Menores valores de recuperación a los obtenidos en este estudio con IN y HPC reportó Lauro *et al.* (2007) al encapsular N mediante secado por atomización con celulosa acetato ftalato (60-80%) y resultados similares con hidroxipropilmetilcelulosa (80-92%). Por lo tanto, la EE y la recuperación de flavonoides dependen de la naturaleza del agente encapsulante, las características estructurales de los flavonoides, la temperatura de entrada al secador y el solvente de disolución, entre otros.

Las diferencias encontradas en EE, recuperación de flavonoides y morfología por SEM para los sistemas con IN y HPC, se pueden atribuir a la diferente estructura química de los flavonoides utilizados, hidrofobicidad, hidrofiliidad, solubilidad (Rice-Evans *et al.*, 1996), a las características estructurales de los polímeros utilizados como agentes encapsulantes que difieren en su carga y fuerza intermolecular (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas y repulsiones estéricas) (Banerjee y Bhattacharya, 2012), al agente canalizante y al solvente utilizado en la preparación de las soluciones de alimentación, que influyeron en las distintas temperaturas de entrada al secador (Kosaraju *et al.*, 2006). Estas diferencias influyen en el tamaño de la gota que ingresa al secador, en la cohesión y adhesión, aglomeración y endurecimiento, por lo tanto, afectan el tamaño, área superficial, rugosidad y porosidad de las micropartículas obtenidas (Daniher y Zhu, 2008). Inulina (Figura 7) es un fructo-oligosacárido (FOS) compuesto por unidades de fructosa, con enlaces  $\beta$ -(2-1) y ligeramente ramificado (1-5%) (Stevens *et al.*, 2001), mientras que HPC (Figura 6) es un éter de celulosa compuesto de glucosa con enlaces  $\beta$ -(1-4), lineal, no iónico, soluble en agua y con un alto grado de viscosidad (Klucel, ficha técnica) que permitiría la

rápida formación de una costra alrededor de la gota y retiene de mejor forma el activo y aumenta la EE.

### **3.3 Mecanismo y cinética de liberación de flavonoides desde micropartículas con inulina ó hidroxipropilcelulosa, obtenidos bajo condiciones óptimas en linoleato de metilo y hexano como sistemas lipídicos**

Para evaluar la aplicabilidad de las micropartículas en matrices alimentarias es importante determinar las cinéticas de liberación de flavonoides, ajustando los datos a modelos matemáticos que permitan establecer los mecanismos involucrados. En este contexto, para estudiar el efecto de la naturaleza de los flavonoides, agentes encapsulantes, agente canalizante y medio de disolución, sobre la cinética y mecanismo de liberación, los sistemas de micropartículas de flavonoides (Q, N o E) con inulina o hidroxipropilcelulosa, obtenidos bajo condiciones óptimas, se almacenaron en linoleato de metilo y en hexano a 30 °C.

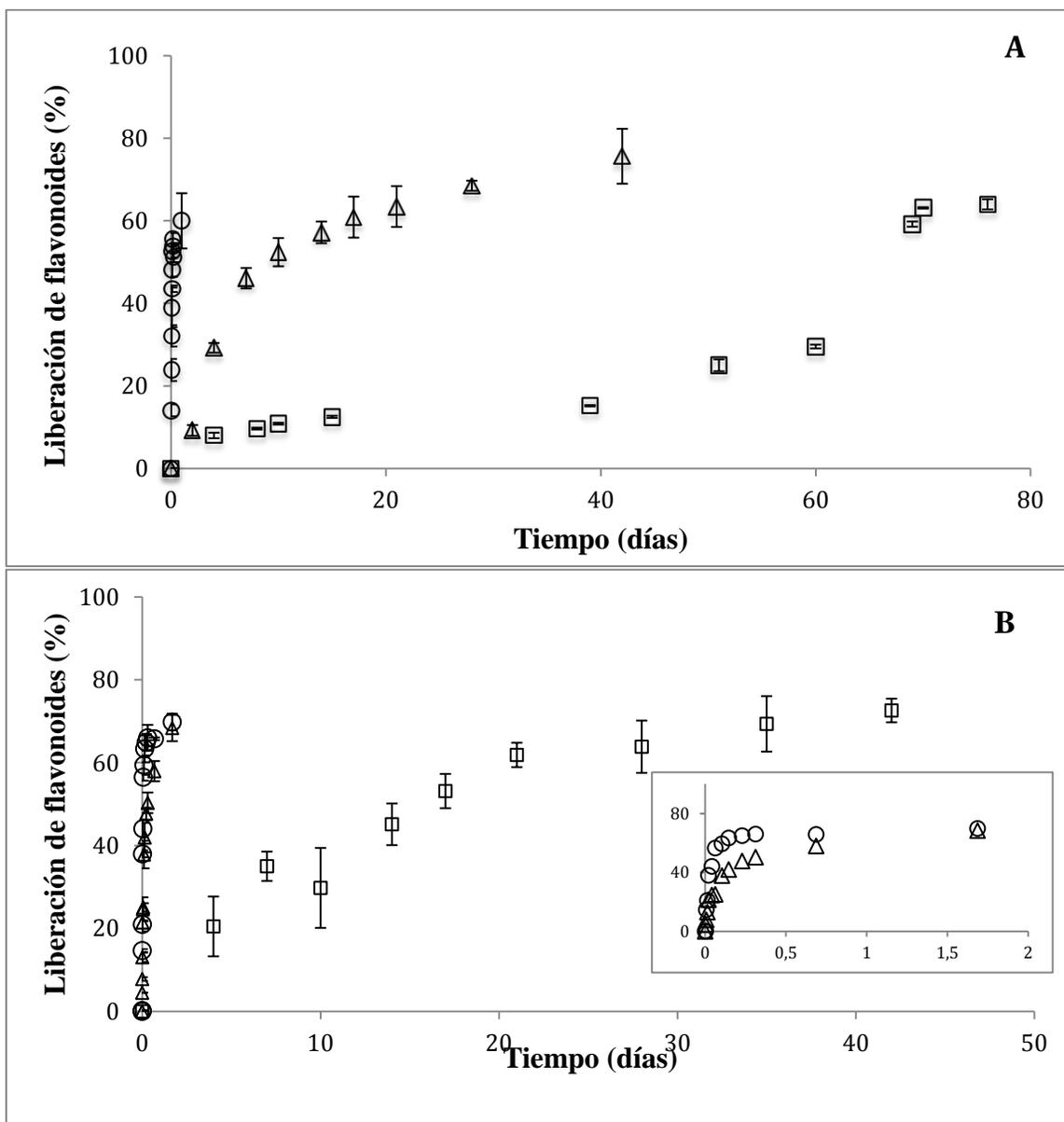
#### *3.3.1 Perfil de liberación de flavonoides desde micropartículas con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante en linoleato de metilo y hexano*

Para determinar el perfil de liberación de flavonoides desde micropartículas con inulina, sin y con agente canalizante, se utilizaron las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas (Tabla 6).

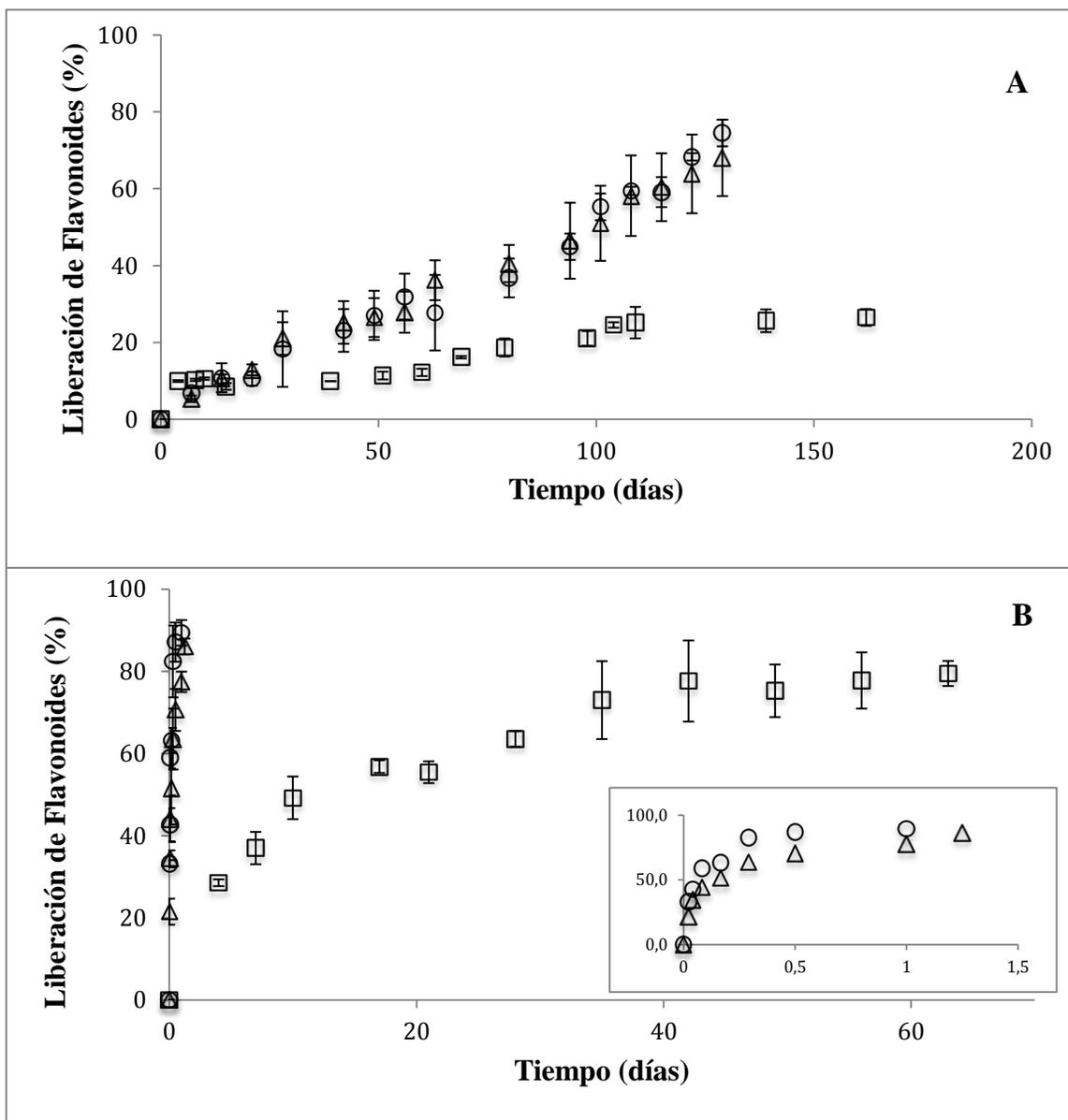
Las Figuras 18 y 19 muestran el perfil de liberación de flavonoides en linoleato de metilo y hexano, respectivamente, desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas sin agente canalizante (Q-IN, N-IN y E-IN) (Gráfico A) y con agente canalizante (Q-(IN-C), N-(IN-C) y E-(IN-C)) (Gráfico B).

Los gráficos de liberación de flavonoides (liberación vs. tiempo) desde las micropartículas, muestran un comportamiento bifásico para todos los sistemas estudiados en linoleato de metilo y en hexano. La primera zona se atribuye a los flavonoides que se encuentran en la superficie de la micropartícula (superficiales) y la segunda zona a los flavonoides que se encuentran encapsulados al interior de la micropartícula. El mismo comportamiento reportó

Robert *et al.*, (2012), para liberación de ácido gálico encapsulado con almidón de papa e inulina en agua a 25 °C.



**Figura 18.** Gráficos de liberación de flavonoides desde micropartículas con inulina como agente encapsulante en linoleato de metilo, sin agente canalizante (A) y con agente canalizante (B). Δ: quercetina; O: naringenina ; □ epicatequina



**Figura 19.** Gráficos de liberación de flavonoides desde micropartículas con inulina como agente encapsulante en hexano sin agente canalizante (A) y con agente canalizante (B). Δ: quercetina; O: naringenina ; □ epicatequina

En los ensayos de liberación de flavonoides en LM, las micropartículas sin agente canalizante (Figura 18A), alcanzaron valores de liberación de flavonoides superficiales superiores al 60% para N durante el primer día de almacenamiento, mientras que la liberación de Q y E superficiales, alcanzaron valores del 30% al día 4 y día 60, respectivamente. Para las micropartículas con agente canalizante (Figura 18B) se observa el mismo comportamiento que aquellas sin agente canalizante, pero con una liberación de

flavonoides superficiales a tiempos menores (60% a las 2,4 h para N, 30% a las 1,5 h para Q y 30% a los 10 días para E). En la segunda zona, asignada a la liberación de los flavonoides encapsulados, la liberación de Q y E desde las micropartículas sin agente canalizante (Figura 18A) alcanzaron valores de liberación de 75% y 70% a los 42 días y 70 días, respectivamente; mientras que, las con agente canalizante (Figura 18 B) alcanzaron valores de liberación de 68% y 69% a los 2 días y 40 días, respectivamente, mostrando el efecto del agente canalizante y del flavonoide (solubilidad) en el perfil de liberación de los flavonoides desde micropartículas en LM.

En los ensayos de liberación en hexano, las micropartículas de Q, N y E presentaron un comportamiento similar a las micropartículas en LM. Las micropartículas de N y Q sin agente canalizante (Figura 19A) alcanzaron valores de liberación de los flavonoides superficiales del 60% y 40% a los 115 y 80 días, respectivamente; mientras que, la liberación de E superficial alcanzó un porcentaje de liberación del 26% a los 160 días. Para las micropartículas con agente canalizante (Figura 19B), la liberación de los flavonoides superficiales se alcanzó en un corto tiempo (60% a las 3,8 h para N, 30% a las 0,9 h para Q y 30% a los 7 días para E). En la segunda zona de liberación, asignada a la liberación de los flavonoides encapsulados, la liberación de Q y N desde micropartículas sin agente canalizante (Figura 19A) alcanzó una liberación de 68% a los 130 días de almacenamiento y en el caso de E no hubo liberación de los flavonoides encapsulados, a diferencia de las micropartículas con agente canalizante (Figura 19B) que alcanzaron valores de liberación de 86% y 77% al día 1 y día 40 para Q y E, respectivamente, mostrando el efecto del agente canalizante y del flavonoide (solubilidad) como se encontró en los ensayos en LM.

El menor porcentaje de liberación de flavonoides desde micropartículas de IN sin agente canalizante en LM y en hexano, se podría atribuir a la baja interacción polímero-solvente, que favorecería la conformación ovillada, limitando la entrada del solvente al interior de la micropartícula, disminuyendo la difusión de los flavonoides desde el interior de la micropartícula al medio de disolución, como fue reportado previamente por García *et al.* (2013) para la liberación de  $\alpha$ -tocoferol desde micropartículas con inulina.

### 3.3.2 *Parámetros cinéticos y mecanismos de liberación de flavonoides desde micropartículas con inulina en linoleato de metilo y en hexano*

Se aplicaron dos modelos analíticos (Peppas e Higuchi) para explicar el mecanismo de liberación de los flavonoides desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas. Las Tablas 8 y 9 presentan los parámetros cinéticos obtenidos desde los datos de liberación para micropartículas sin agente canalizante (Q-IN, N-IN, E-IN) y con agente canalizante (Q-(IN-C), N-(IN-C), E-(IN-C)) en LM y hexano, respectivamente (Anexo 5).

Para las micropartículas sin y con agente canalizante, la constante de velocidad de liberación de N fue significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) respecto a las de Q y E en LM y en hexano. Mientras que la constante de velocidad de liberación de E fue significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) respecto a Q y N en LM y en hexano. Estos resultados sugieren que las diferencias en la solubilidad de los flavonoides en LM y en hexano y/o la interacción flavonoide-inulina podrían influir en la difusión del flavonoide desde el interior de la matriz al medio hidrofóbico, proyectándose como métodos para controlar la liberación.

Las micropartículas de flavonoides con Capsul<sup>®</sup>, presentaron constantes de velocidad de liberación significativamente más altas con respecto a las micropartículas sin Capsul<sup>®</sup> en LM y en hexano. Lo que indica que Capsul<sup>®</sup> puede actuar como agente canalizante en la micropartícula, formando canales en la superficie y al interior de la matriz como se observa en la Figura 20, lo que favorecería la difusión del flavonoide al medio de disolución (Song *et al.*, 2005).

Las constantes de velocidad de liberación de flavonoides fueron mayores en los sistemas estudiados en LM, en comparación a los ensayos realizados en hexano. Este comportamiento se debería a la distinta polaridad del solvente de disolución. La mayor polaridad de LM con respecto a hexano permite una mejor interacción y solubilidad de los flavonoides hacia el medio de disolución, facilitando su difusión.

**Tabla 8.** Parámetros cinéticos y mecanismos de liberación de flavonoides desde micropartículas con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante en linoleato de metilo†

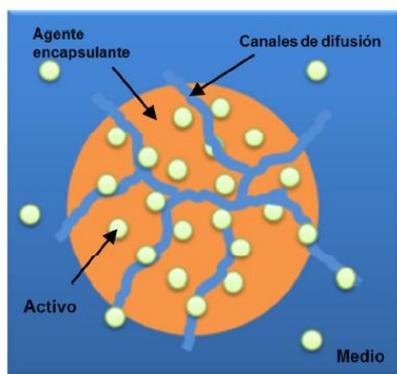
Sistemas	n	Peppas		Higuchi	
		$10^2 k_{obs} \pm 10^2 DS$ (días <sup>-n</sup> )	R <sup>2</sup>	$10^2 k_{obs} \pm 10^2 DS$ (días <sup>-0.5</sup> )	R <sup>2</sup>
Q-IN	0,7	8,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,818	9,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,926
N-IN	0,7	192 ± 11,8 <sup>a</sup>	0,989	171 ± 36,5 <sup>a</sup>	0,993
E-IN	0,7	2,3 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,821	7,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,739
Q-(IN-C)	0,4	80,0 ± 4,6 <sup>b</sup>	0,915	72,9 ± 4,9 <sup>b</sup>	0,905
N-(IN-C)	0,5	244 ± 11,2 <sup>a</sup>	0,922	226 ± 35,4 <sup>a</sup>	0,936
E-(IN-C)	0,5	12,8 ± 1,4 <sup>c</sup>	0,959	11,6 ± 1,8 <sup>c</sup>	0,936

† Valores son expresados como promedios ± DS (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas (p≤0.05) entre los sistemas. Q: quercetina; N: naringenina; E: epicatequina; IN: inulina; C: Capsul<sup>®</sup>; DS: desviación estándar

**Tabla 9.** Parámetros cinéticos y mecanismos de liberación de flavonoides desde micropartículas con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante en hexano†

Sistemas	n	Peppas†		Higuchi‡	
		$10^2 k_{obs} \pm 10^2 DS$ (días <sup>-n</sup> )	R <sup>2</sup>	$10^2 k_{obs} \pm 10^2 DS$ (días <sup>-0.5</sup> )	R <sup>2</sup>
Q-IN	0,8	1,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,983	7,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	0,958
N-IN	0,9	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,968	7,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,943
E-IN	0,9	0,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,897	1,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,937
Q-(IN-C)	0,3	84,9 ± 3,6 <sup>b</sup>	0,938	58,6 ± 2,1 <sup>b</sup>	0,903
N-(IN-C)	0,3	102,1 ± 6,0 <sup>a</sup>	0,931	62,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,870
E-(IN-C)	0,4	16,6 ± 0,8 <sup>c</sup>	0,949	11,2 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,940

† Valores son expresados como promedios ± DS (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas (p≤0.05) entre los sistemas. Q: quercetina; N: naringenina; E: epicatequina; IN: inulina; C: Capsul<sup>®</sup>; DS: desviación estándar



**Figura 20.** Esquema de formación de canales en la micropartícula

Existen escasos 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 y Robert *et al.* (2012) en micropartículas de ácido gálico con almidón nativo, almidón acetilado, inulina nativa e inulina acetilada, encontraron constantes de velocidad de liberación de polifenoles (modelo Peppas) diferentes a las de este estudio. Sin embargo, no se pueden 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 del activo al medio de disolución.

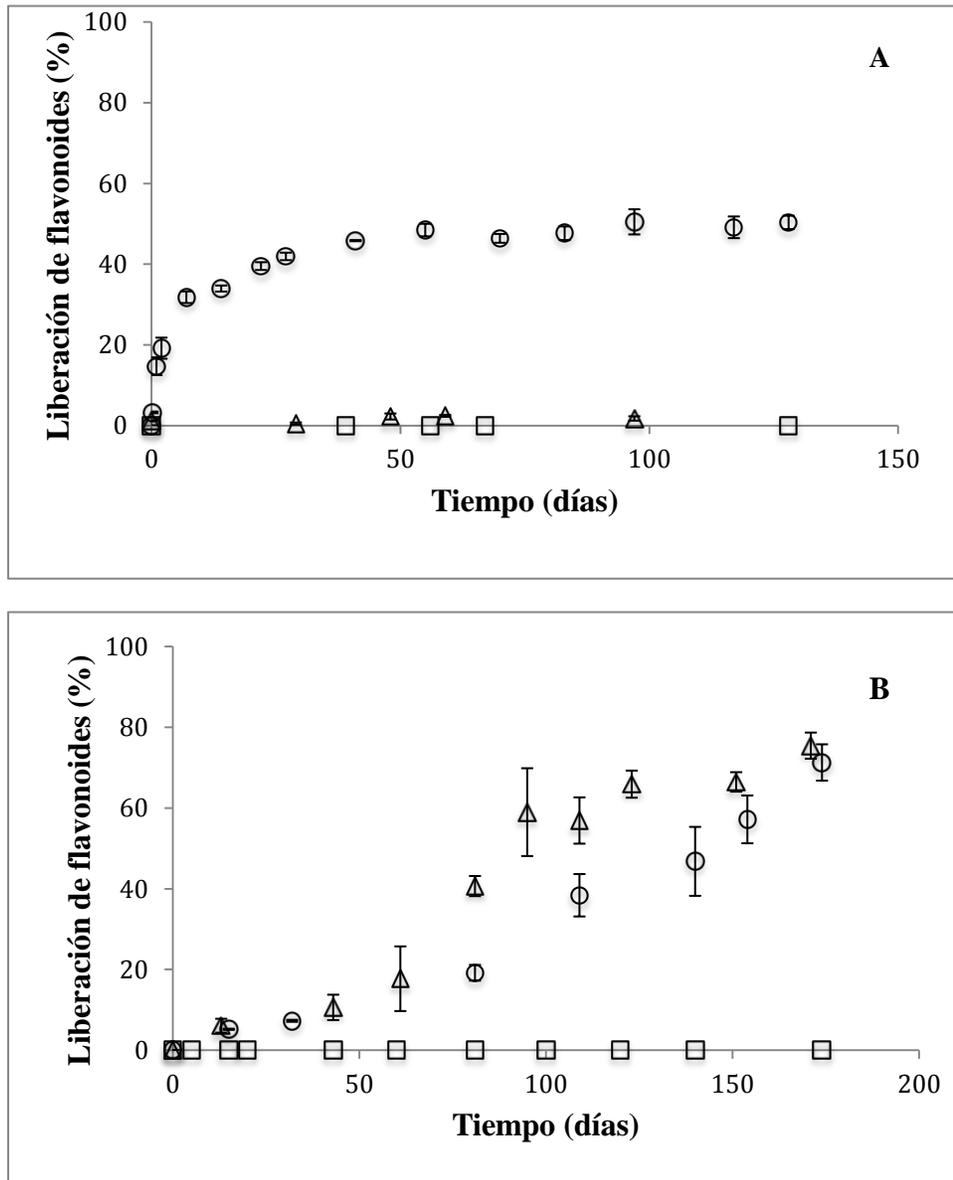
El parámetro “n” en el modelo de Peppas, puede tomar distintos valores, lo que indica el mecanismo de liberación del activo desde la micropartícula (Pothakamury y Barbosa-Canovas, 1995). En las micropartículas sin agente canalizante, la liberación de los flavonoides en LM y en hexano fue de tipo no fickiana o anómala, donde diferentes mecanismos, como son difusión y relajación de las cadenas del polímero, pueden ocurrir simultáneamente, como reportaron Robert *et al.*, (2012), Deladino *et al.*, (2008) y Hu *et al.*, (2008). Por otra parte, en las micropartículas con agente canalizante, el mecanismo de liberación de los flavonoides en LM fue de tipo fickiana o por difusión y en hexano por varios procesos simultáneos al fenómeno de difusión, siendo el proceso de difusión el más importante (Aragón-Fernández *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que el mecanismo de liberación de los flavonoides se atribuye principalmente a la presencia de agente canalizante, independiente de la naturaleza del flavonoide.

### 3.3.3 Perfil de liberación de flavonoides desde micropartículas con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante en linoleato de metilo y hexano

Para determinar el perfil de liberación de flavonoides desde micropartículas con hidroxipropilcelulosa, sin y con agente canalizante, se utilizaron las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas (Tabla 7).

En la Figura 21 se muestran los gráficos de liberación de flavonoides desde micropartículas con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante, en linoleato de metilo (Figura 21A) y en hexano (Figura 21B).

En LM (Figura 21A), las micropartículas de N-(HPC-C) alcanzaron valores de liberación del 50% a los 50 días de almacenamiento, permaneciendo constante hasta los 140 días de almacenamiento, sin liberación de la N encapsulada. Por otro lado, en los sistemas Q-(HPC-C) y E-(HPC-C) no se observó liberación de Q y E durante el período de almacenamiento estudiado. En hexano (Figura 21B), las micropartículas de N-(HPC-C) y Q-(HPC-C) presentaron dos zonas de liberación, la primera zona se atribuye a los flavonoides que se encuentran en la superficie de la micropartícula (superficiales) y la segunda zona a los flavonoides que se encuentran encapsulados al interior de la micropartícula, alcanzando valores de liberación de Q y N de 72% y 75%, respectivamente, a los 170 días de almacenamiento. Por otro lado, en el sistema E-(HPC-C) no se observó liberación de E durante el período de almacenamiento estudiado. Las diferencias en los perfiles de liberación de flavonoides se atribuirían a la solubilidad de los flavonoides (Chebil *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2002) y/o a la interacción polímero-flavonoide como se discutió en el punto 3.3.1, a diferencias en el medio por polaridad y tamaño molecular, que influiría en la interacción polímero-medio de disolución. Además, el sitio hidrofóbico de C interactuaría de mejor forma con hexano, que es mas apolar y de menor tamaño molecular que LM, permitiendo la formación de canales en la micropartícula.



**Figura 21.** Gráficos de liberación de flavonoides desde micropartículas con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante, en linoleato de metilo (A) y en hexano (B). Δ: quercetina; O: naringenina ; □ epicatequina

### 3.3.4 Parámetros cinéticos y mecanismo de liberación de flavonoides desde micropartículas con hidroxipropilcelulosa en linoleato de metilo y en hexano

Se aplicaron tres modelos analíticos (Peppas, Higuchi y Hixson-Crowell) para explicar el mecanismo de liberación de los flavonoides desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas. La Tabla 10 y 11 muestran los parámetros cinéticos obtenidos desde los datos de liberación de flavonoides desde micropartículas (Q-(HPC-C), N-HPC-C) y E-(HPC-C)) en linoleato de metilo y hexano, respectivamente (Anexo 6).

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos y mecanismo de liberación de flavonoides desde micropartículas con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante en linoleato de metilo †

Sistemas	n	Peppas†		Higuchi‡	
		$10^2 k_{obs} \pm 10^2 DS$ (días <sup>-n</sup> )	R <sup>2</sup>	$10^2 k_{obs} \pm 10^2 DS$ (días <sup>-0.5</sup> )	R <sup>2</sup>
Q-(HPC-C)	-	0,0 <sup>b</sup>	-	0,0 <sup>b</sup>	-
N-(HPC-C)	0,3	16,2 ± 2,3 <sup>a</sup>	0,960	3,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,829
E-(HPC-C)	-	0,0 <sup>b</sup>	-	0,0 <sup>b</sup>	-

† Valores son expresados como promedios ± DS (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05) entre los sistemas. Q: quercetina; N: naringenina; E: epicatequina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul<sup>®</sup>; DS: desviación estándar

En la Tabla 10 se observa que no hubo liberación de Q y E desde Q-(HPC-C) y E-(HPC-C), distinto a lo que ocurre con N, aunque solamente se liberó la N superficial en N-(HPC-C). El parámetro “n” en el modelo de Peppas para el sistema N-(HPC-C) en LM, muestra que el mecanismo de liberación de N superficial estaría compuesto por varios procesos simultáneos al fenómeno de difusión, siendo el proceso de difusión el más importante (Aragón-Fernández *et al.*, 2009).

**Tabla 11.** Parámetros cinéticos y mecanismo de liberación de flavonoides desde micropartículas con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante en hexano †

Sistemas	n	Peppas†		Higuchi‡		Hixson-Crowell†	
		$10^2 k_{obs} \pm 10^2 DS$ (días <sup>-n</sup> )	R <sup>2</sup>	$10^2 k_{obs} \pm 10^2 DS$ (días <sup>-0.5</sup> )	R <sup>2</sup>	$10^2 k_{obs} \pm 10^2 DS$ (días <sup>-0.5</sup> )	R <sup>2</sup>
Q-(HPC-C)	1,0	0,41 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,906	7,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,943	1,1 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,864
N-(HPC-C)	1,0	0,31 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,951	5,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	0,933	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,923
E-(HPC-C)	-	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-

† Valores son expresados como promedios ± DS (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05) entre los sistemas. Q: quercetina; N: naringenina; E: epicatequina; HPC: Hidroxipropilcelulosa; C: Capsul<sup>®</sup>; DS: desviación estándar

En la Tabla 11 se observa que no hubo liberación de E desde E-(HPC-C), distinto a lo que ocurre con N y Q que presentaron liberación de los flavonoides superficiales y encapsulados desde las micropartículas, sin mostrar diferencias significativas (p>0,05) entre las constantes de liberación. El parámetro “n” para los sistemas Q-(HPC-C) y N-(HPC-C) en hexano indica que en ambos casos la liberación fue de tipo transporte II que corresponde a una cinética de liberación de orden cero (Chiappetta *et al.*, 2006). La liberación tipo transporte II fue previamente reportado por Miranda *et al.* (2006), Khatri *et al.* (2014) y Shoaib *et al.* (2010) en ensayos de liberación de fármacos desde una matriz de hidroxipropilmetilcelulosa. El

mecanismo de erosión de la HPC, permitiría la liberación de Q y N, desde micropartículas con HPC en hexano.

Otro posible mecanismo que podría explicar la liberación de Q y N, sería la erosión de HPC, la cual se explica por el paso de un estado rígido (glass) a otro más gomoso (rubber) en la superficie de la micropartícula, liberando el flavonoide encapsulado (Chiappetta *et al.*, 2006; Reza *et al.*, 2003). Sin embargo, la liberación de E no se observó, sugiriendo que la E tiene una alta interacción con el polímero.

Las diferencias encontradas en las constantes de velocidad de liberación de flavonoides en hexano y en LM, se podrían atribuir a la distinta interacción flavonoide-polímero, interacción polímero-medio de disolución, la solubilidad de los flavonoides y mecanismo de liberación.

Se obtuvieron constantes de velocidad de liberación para las micropartículas de flavonoides con inulina significativamente mayores ( $p \leq 0,05$ ) que para las micropartículas de flavonoides con hidroxipropilcelulosa. Las diferencias se deberían a las diferentes características estructurales de los agentes encapsulantes que influyen en el mecanismo principal de liberación de flavonoides: hinchamiento para IN (Glibowski, 2010) y erosión para HPC (Miranda *et al.*, 2006; Khatri *et al.*, 2014; Shoaib *et al.*, 2010), la solubilidad y/o a la distinta fuerza de interacción entre los flavonoides y los agentes encapsulantes.

Las cinéticas de liberación de flavonoides son importantes para evaluar la aplicabilidad de las micropartículas en matrices lipídicas y/o alimentos ricos en grasas. En casos donde la liberación es muy lenta, las micropartículas pueden ser utilizadas para la formulación de materias grasas funcionales y/o saludables, como ocurre en los sistemas con E. En aquellos casos donde la liberación tiene una velocidad intermedia podrían ser aplicadas en materias grasas para su protección y/o efecto antioxidante. Por último, cuando la cinética de liberación es rápida, como ocurre en el caso de N, el flavonoide queda expuesto, perdiendo sus efectos protectores y podría ser utilizado para la formulación de alimentos instantáneos.

### **3.4 Efecto de los flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina libres o encapsulados sobre la estabilidad oxidativa de linoleato de metilo en condiciones aceleradas de oxidación**

Los flavonoides Q, N y E sin encapsular (200 mg/Kg) se adicionaron a linoleato de metilo para estudiar el efecto de la estructura de los flavonoides sobre la estabilidad oxidativa de linoleato de metilo en Rancimat y en estufa a 60 °C.

A partir de los ensayos con flavonoides sin encapsular, en base a los tiempos de inducción y factor de protección, se seleccionaron las micropartículas de flavonoides de los sistemas Q-IN, Q-(IN-C), Q-(HPC-C), E-IN, E-(IN-C) y E-(HPC-C) (200 mg/Kg) para evaluar su efecto sobre la estabilidad oxidativa de LM.

#### *3.4.1 Ensayos de estabilidad oxidativa de linoleato de metilo adicionado de flavonoides libres*

##### **3.4.1.1 Tiempo de inducción en Rancimat**

La Tabla 12 muestra el tiempo de inducción y factor de protección para linoleato de metilo con y sin la adición de 200 mg/Kg de los antioxidantes Q, N y E (Anexo 7).

En la Tabla 12 se observa que la adición de Q y E a LM mostró tiempos de inducción significativamente mayores ( $p \leq 0,05$ ) con respecto a LM, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre la estabilidad oxidativa de LM y LM-N, mostrando el efecto de la estructura de los flavonoides sobre la estabilidad oxidativa de LM. El mismo comportamiento de protección fue reportado por Proestos *et al.* (2006) al estudiar Q, E y N en aceite de girasol a 110° C.

**Tabla 12.** Tiempo de inducción y factor de protección de linoleato de metilo con la adición de flavonoides libres (200 mg/Kg) en Rancimat a 60 °C

<b>Sistemas</b>	<b>Tiempo de Inducción X ± DS (h)</b>	<b>Factor de Protección (FP)</b>
<b>LM</b>	9,7 ± 0,7 <sup>c</sup>	-
<b>LM-N</b>	9,0 ± 0,3 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
<b>LM-Q</b>	85,8 ± 1,1 <sup>b</sup>	8,9 <sup>b</sup>
<b>LM-E</b>	116,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	12,0 <sup>a</sup>

\*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los sistemas estudiados. LM: linoleato de metilo; N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; DS: desviación estándar; X: promedio; FP: factor de protección

Estudios previos encontraron que las características estructurales de los flavonoides definen su capacidad antioxidante en medios lipídicos (Michotte *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2009; Naz *et al.*, 2008; Tsimogianis y Oreopoulos, 2007; Pedrielli y Skibsted, 2002; Pekkarinen *et al.*, 1999; Wanasundara y Shahidi, 1994 Nieto *et al.*, 1993; Pereira y Das 1990), sin embargo, los resultados no son concluyentes.

Al evaluar la oxidación de linoleato de metilo a temperaturas inferiores a 60 °C, se encontró que la actividad antioxidante de los flavonoides dependió del número de grupos hidroxilo en el anillo B y aumentó si éstos estaban en posición orto o para, de la presencia del doble enlace 2,3 y de la glicosilación de la molécula (Pekkarinen *et al.*, 1999; Pedrielli y Skibsted, 2002). Pekkarinen *et al.* (1990), encontraron que los polifenoles retardan la formación de hidroperóxidos en el siguiente orden: miricetina > quercetina > alfa-tocoferol > (+)-catequina > kaempferol = rutina. Pedrielli y Skibsted (2002) encontraron que quercetina es más eficiente en inhibir la oxidación de linoleato de metilo que la (-)- epicatequina y (+)-catequina.

Cuando se estudiaron los flavonoides en aceites “in bulk”, Pereira y Das (1990) reportaron que flavonoides con grupos OH libres en la posición para-2,5 del anillo B mostraron mayor efecto antioxidante que aquellos en la posición orto-3,4 en el anillo B. Contrariamente, Tsimogiannis y Oreopoulou (2005) encontraron que el grupo orto-3,4 del anillo B es el más activo en donar su átomo de hidrógeno a los radicales libres, ya que la abstracción del primer hidrógeno produce un radical semiquinona que es estabilizado por resonancia, el segundo hidrógeno es susceptible de abstracción por un radical libre produciendo una diquinona estable (Zhang, 2000).

Se reportó que la presencia en el anillo C del grupo 3-OH, doble enlace 2,3 y grupo 4-carbonilo tienen un efecto protector frente a la oxidación lipídica (Michote *et al.*, 2011; Tsimogianis y Oreopoulos, 2007). La presencia del doble enlace 2,3 en el anillo C, mostró un aumento de la capacidad antioxidante para miricetina respecto a flavonoides que no tienen el doble enlace (Michotte *et al.*, 2011). Mientras que Nieto *et al.*, (1993) reportaron que el doble enlace no tuvo efecto sobre la actividad antioxidante. Por otro lado, valores similares en actividad antioxidante se reportaron para luteolina y taxifolina, con y sin el doble enlace 2,3, respectivamente (Tsimogianis y Oreopoulos, 2007).

Los flavonoides utilizados en este estudio Q, E y N presentan diferencias en su actividad antioxidante medida por tiempo de inducción, lo cual se puede atribuir a las diferencias en la estructura química entre los flavonoides. Q y E poseen dos grupos OH en el anillo B en posición orto presentando mayores tiempos de inducción respecto a N que contiene sólo un grupo OH (Tabla 12), así el número de grupos OH es un determinante en la capacidad antioxidante, como fue reportado previamente (Michote *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2009; Naz *et al.*, 2008; Wanasundara y Shahidi, 1994). En el presente estudio se esperaba que Q (grupo 3-OH, doble enlace 2,3 y grupo 4-carbonilo en el anillo C y orto-OH en el anillo B) presentara la mayor capacidad antioxidante. Sin embargo, se encontró que E presentó una mayor capacidad antioxidante respecto a Q, a pesar de que E no posee el grupo 4-carbonilo y el doble enlace 2,3. Estos resultados sugieren que otros factores distintos a la estructura química de los flavonoides, como la solubilidad y polaridad podrían explicar la mayor capacidad antioxidante de E.

La teoría de la paradoja polar (Porter, 1993) indica que la actividad de los antioxidantes depende de su constante de partición entre la interface aceite-agua en emulsiones o en la interface aceite-aire en sistemas “in bulk”, que son los lugares donde ocurre la oxidación. En sistemas lipídicos “in bulk” los antioxidantes hidrofílicos se distribuyen en la interface aceite-aire, mientras que los antioxidantes lipofílicos se disuelven en la fase lipídica. Los antioxidantes hidrofílicos son más efectivos en sistemas lipídicos “in bulk” que los antioxidantes lipofílicos (Shahidi y Zhong, 2011).

Cuvelier *et al.* (2000) al medir la polaridad de distintos compuestos por cromatografía en

capa fina encontraron un factor de apolaridad de 5, 19 y 53 para E, Q y N, respectivamente. E al ser un compuesto de mayor polaridad que Q y N tendría una mayor capacidad antioxidante al distribuirse con mayor facilidad en la interfase aceite-aire, mientras que N al ser un compuesto de mayor apolaridad no se localizaría en la interfase aceite-aire y es esperable que no ejerza un efecto protector en sistemas lipídicos “in bulk”, por lo tanto, los resultados de este estudio están en concordancia con la paradoja polar.

La efectividad de los antioxidantes utilizados en este estudio dependería de su polaridad y de las características estructurales (Shahidi y Zong, 2011), aunque también se reportó que influye la habilidad y rapidez de donar átomos de hidrógeno en sistemas in bulk (Zhu *et al.*, 2013) y en emulsiones (Yang *et al.*, 2009; di Mattia *et al.*, 2009).

#### 3.4.1.2 Evolución de la formación de compuestos de oxidación y retención de antioxidantes durante los ensayos de oxidación acelerada de linoleato de metilo en Rancimat a 60° C

La evolución de la oxidación lipídica en LM, sin y con la adición de flavonoides libres (Q, E y N) se estudió en un equipo Rancimat bajo condiciones aceleradas de oxidación a 60 °C. Se tomaron alícuotas a intervalos de tiempo definidos para seguir el progreso de la oxidación y cuantificar la formación de compuestos de oxidación (monómeros oxidados, dímeros y polímeros) mediante HPSEC. Los resultados de formación de compuestos de oxidación de LM se presentan en la Tabla 13 y corresponden a triplicados de experimentos con una desviación estándar  $\leq 8\%$ . En la Figura 22 se presentan los cromatogramas con los picos correspondientes a los compuestos de oxidación de LM detectados mediante HPSEC.

La Tabla 13 muestra que la aparición de monómeros oxidados, característicos de los estados iniciales de la oxidación, alcanzaron un porcentaje de 9,4% a las 4 h de estudio. A las 6 h de estudio comenzaron a ser detectados los dímeros oxidados en un porcentaje de 2,7% y a las 9 h de estudio aparecieron los polímeros. La aparición de polímeros en la muestra es indicativo de oxidación avanzada y de aceleración de la misma. También se observa que en la medida que fueron aumentando los compuestos de oxidación, el porcentaje de linoleato de metilo sin alterar fue disminuyendo. A las 24 horas de estudio el porcentaje de compuestos de oxidación detectados fue de un 53,7% divididos en monómeros oxidados (31,6%), dímeros (16,5%) y polímeros (5,5%), mientras que el LM sin oxidar correspondió a un

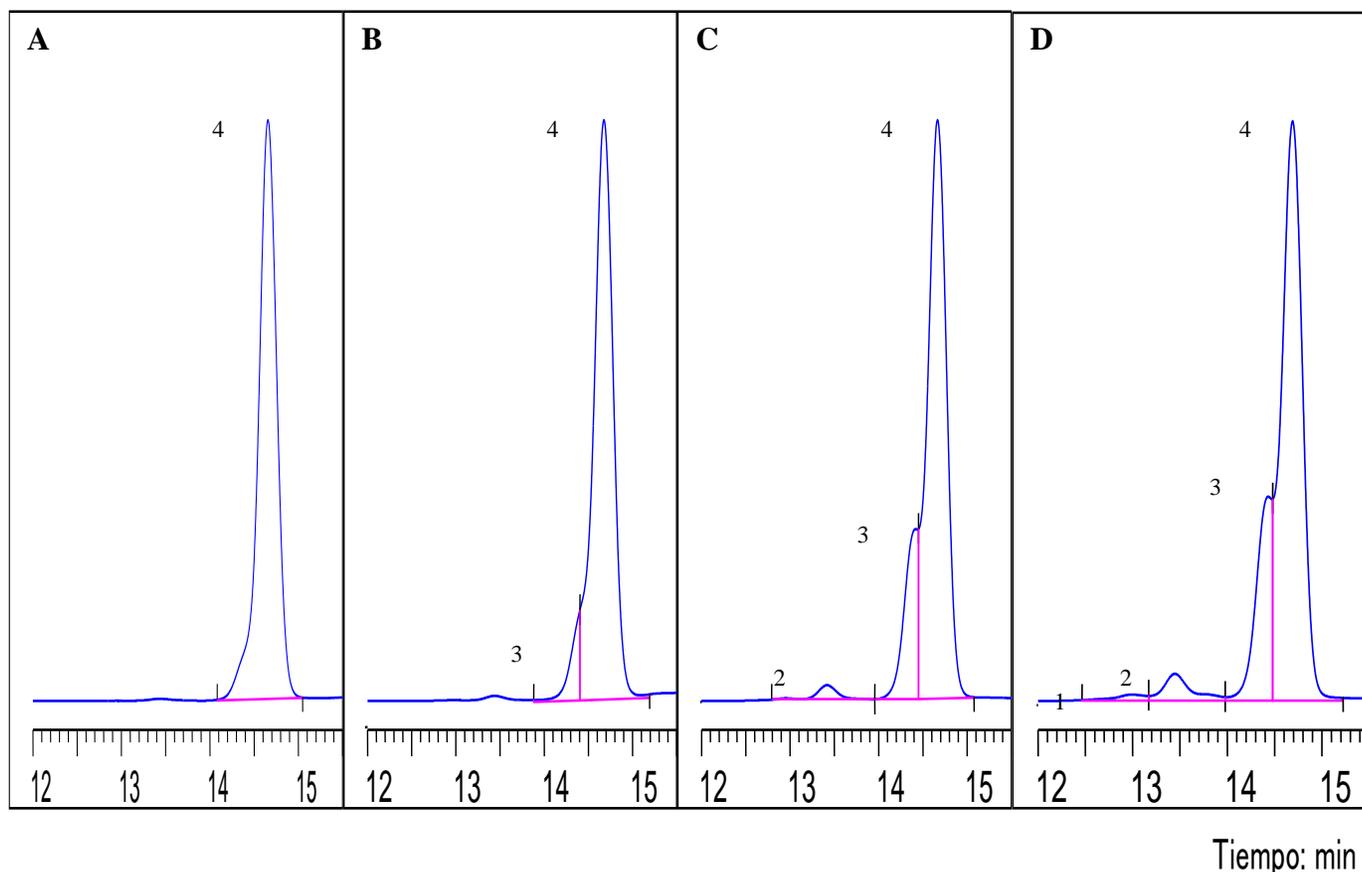
46,3%.

**Tabla 13.** Formación de compuestos de oxidación bajo condiciones aceleradas de oxidación de linoleato de metilo en Rancimat a 60 °C

Tiempo (h)	Polímeros	Dímeros	Monómeros (%)	LM
0	0	0	0	100
1	0	0	0	100
2	0	0	0	100
3	0	0	0	100
4	0	0,0	9,4	90,6
6	0	2,7	12,2	85,1
7	0	1,5	15,1	83,4
8	0	2,4	17	80,6
9	1,2	4,4	18,6	75,9
10	1,4	5,1	24,4	69,1
11	1,8	6,1	27,8	64,3
12	2,5	8,1	31,3	57,9
24	5,5	16,5	31,6	46,3

\*Las muestras corresponden a triplicado de experimentos con una desviación estándar  $\leq 8\%$ . LM: linoleato de metilo

La Figura 22 (A-D) muestra los cromatogramas de metil linoleato analizado mediante HPSEC a distintos tiempos de oxidación. La Figura 22A ilustra el LM inicial, que no contiene compuestos de oxidación. La Figura 22B fue tomada durante los estados tempranos de la oxidación (4 h), antes de la rancidez en el sustrato oxidable, en ella se observa un pico (pico 3) adicional al del LM sin oxidar que corresponde a moléculas monoméricas oxidadas de LM (8%). El LM no oxidado y los monómeros oxidados eluyen a distinto tiempo de retención, ya que ellos tienen distinto peso molecular. Cuando se analiza la oxidación de LM, las muestras pueden ser analizadas directamente por HPSEC, mientras que en el caso de los triglicéridos o aceites se requiere una separación preliminar mediante cromatografía de adsorción (SPE), ya que un solo pico podría contener tanto a monómeros oxidados como a sustrato no oxidado (Márquez-Ruiz *et al.*, 2003; Márquez-Ruiz *et al.*, 1996). La Figura 22C corresponde al momento previo al tiempo de inducción (8 h) que indica el inicio de la formación de polímeros, detección de rancidez y pérdida de los antioxidantes, con un 17% (pico 3) de monómeros oxidados y 2,4% (pico 2) de dímeros. En la Figura 22D (12 h) la muestra se tomó en un tiempo posterior al tiempo de inducción, con un 31,3% (pico 3) de monómeros oxidados, 8,1% (pico 2) de dímeros y 2,5% (pico 1) de polímeros.



**Figura 22.** Cromatogramas de metil linoleato analizado mediante HPSEC a las 0 h (A), 4 h (B), 8 h (C) y 12 h (D) durante la oxidación de linoleato de metilo bajo condiciones aceleradas de oxidación en Rancimat a 60 °C. Los picos en orden de incremento en el tiempo de retención corresponden a 1: polímeros; 2: dímeros; 3: monómeros oxidados; 4: sustrato no oxidado

La Figura 23 (A, B, C y D) muestra la evolución de la formación de compuestos polares (monómeros oxidados (ox MON), dímeros (DIM) y polímeros (POL)) y la retención de flavonoides para los sistemas LM, LM-N, LM-Q y LM-E, respectivamente, en condiciones aceleradas de oxidación. Los resultados corresponden a triplicados de experimentos con una desviación estándar  $\leq$  a 8% para la formación de compuestos de oxidación y  $\leq$  a 10% para la retención de flavonoides durante el periodo de estudio.

En la Figura 23 (A-D) se observa que los monómeros oxidados fueron el único grupo detectado durante los estados tempranos de la oxidación, apareciendo a las 4 h para los sistemas LM y LM-N, 78 h para LM-Q y 111 h para LM-E. Estos resultados indican que N no ejerció ningún efecto protector sobre la oxidación de LM. La formación de polímeros ocurrió a altos niveles de monómeros oxidados (14-19%), distinto a lo reportado por

Márquez-Ruiz *et al.* (2007) donde la formación de polímeros comenzó a niveles más bajos de monómeros oxidados durante la oxidación de linoleato de metilo en estufa a 60 °C, indicando que la aparición de los compuestos de oxidación dependen de la temperatura de estudio, condiciones experimentales, sustrato oxidable y antioxidantes utilizados, entre otros. El final de la fase lag e inicio de la propagación fue claramente marcado por la desaparición de Q y E (Figura 23 C y D, respectivamente), la iniciación de la formación de polímeros coincide con el tiempo de inducción (Tabla 12) tal como fue reportado previamente por Márquez-Ruiz *et al.* (2003) en trilinoleina con alfa-tocoferol y por Martín-Polvillo *et al.* (2004) en aceite de girasol con alfa-tocoferol. En el caso del sistema ML-N, la N no disminuyó su contenido durante el período de estudio, indicando que no ejerció un efecto antioxidante, presentando el mismo tiempo de inducción que LM.

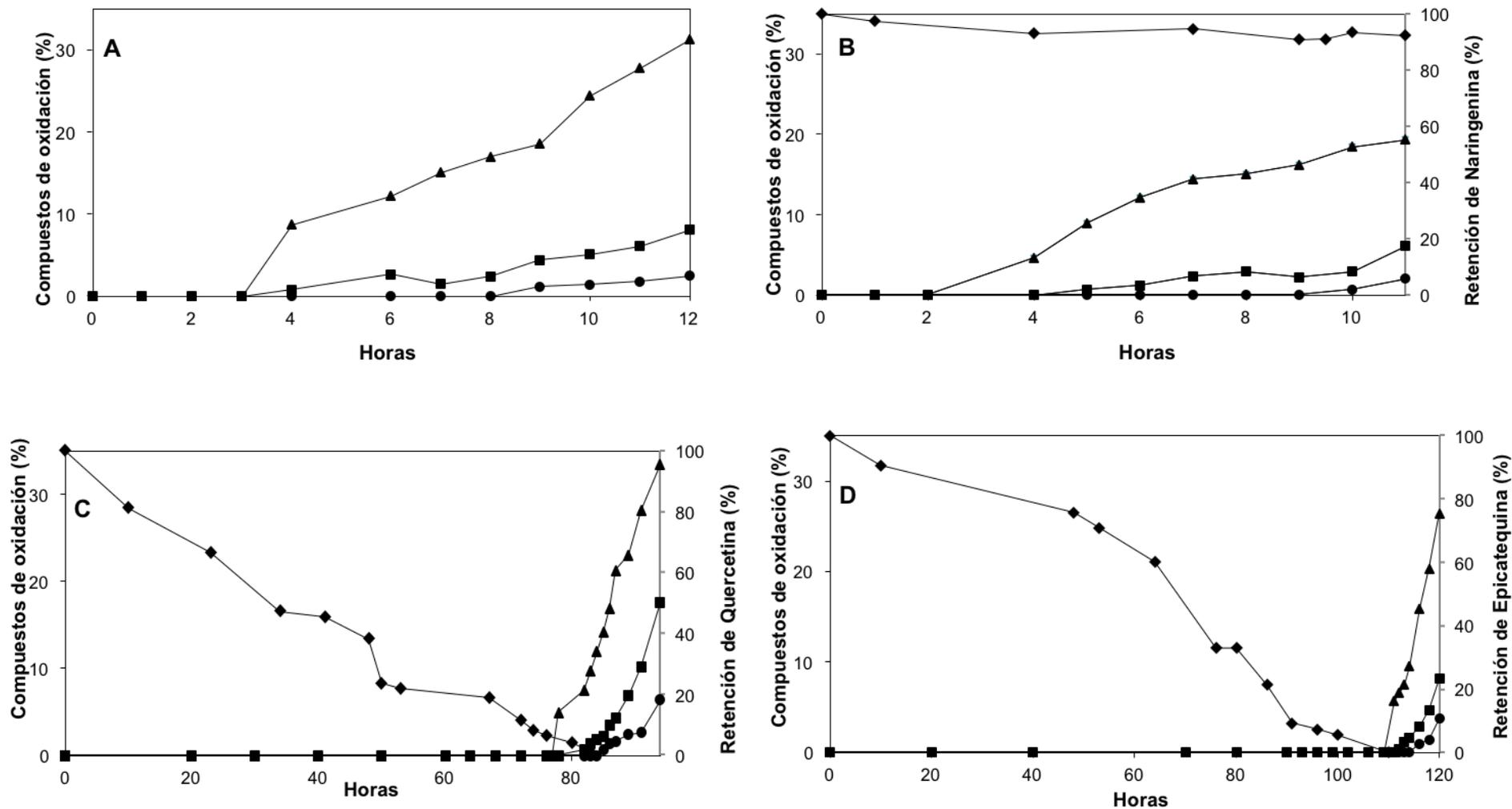
#### 3.4.1.3 Ensayos de estabilidad oxidativa en estufa a 60 °C

La Figura 24 (A, B, C y D) muestra la evolución de la formación de compuestos polares (monómeros oxidados (ox MON), dímeros (DIM) y polímeros (POL)) y la retención de antioxidantes durante la oxidación de linoleato de metilo en estufa a 60 °C (relación S/V 11,5) para los sistemas LM, LM-N, LM-Q y LM-E, respectivamente. Los resultados corresponden a triplicados de experimentos con una desviación estándar  $\leq$  a 8% para la formación de compuestos de oxidación. La separación cromatográfica de los compuestos de oxidación se realizó por HPSEC.

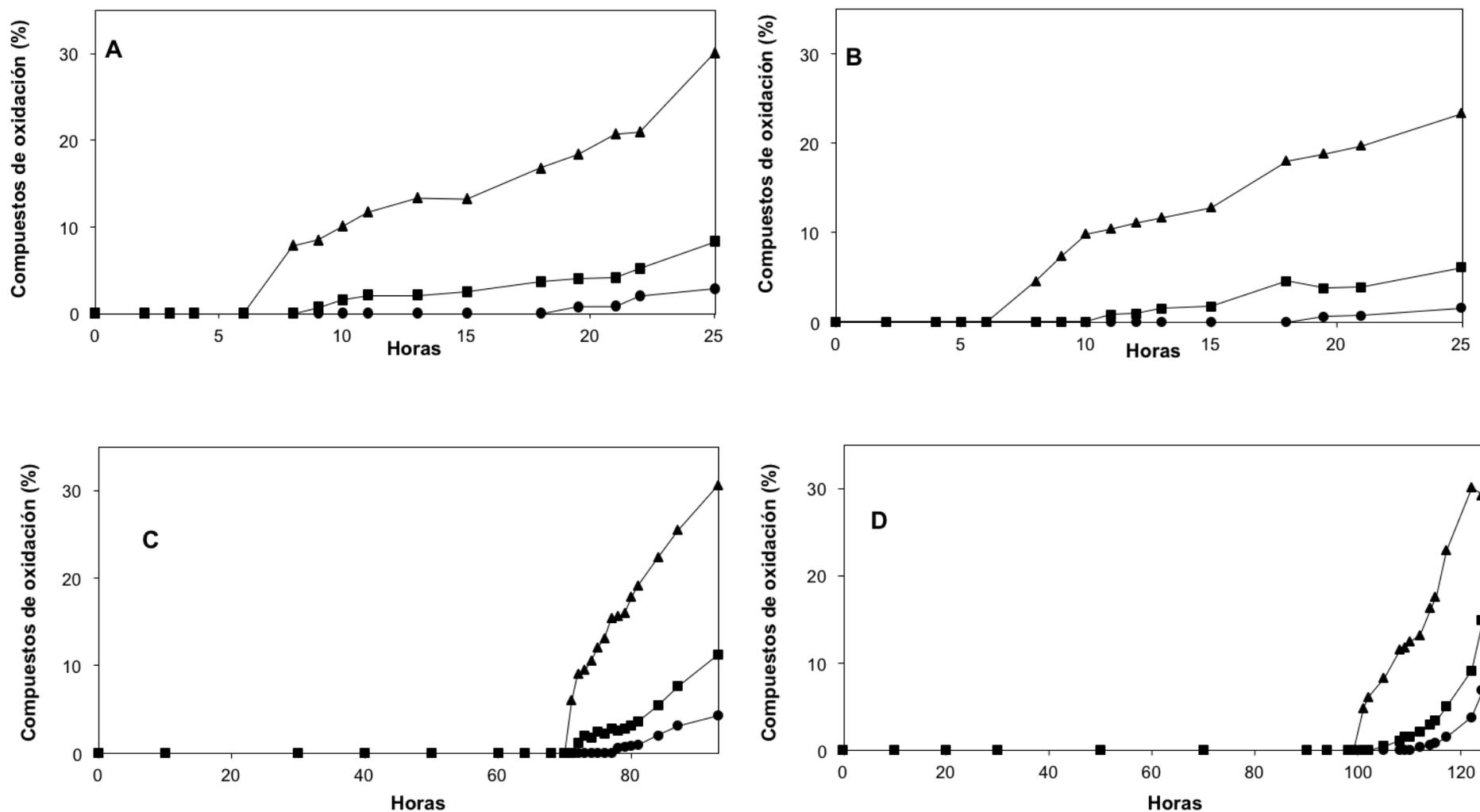
Se observó el mismo comportamiento en la aparición de compuestos de oxidación respecto a los ensayos realizados en Rancimat y el mismo orden de protección. Sin embargo, los monómeros oxidados aparecieron a las 8 h para LM y LM-N, 72 h para LM-Q y 101 h para LM-E. Se observó un retardo en la aparición de monómeros oxidados en las muestras de LM y LM-N colocadas en estufa, con respecto a las de Rancimat, lo cual puede ser explicado por una menor difusión del oxígeno en el sistema, lo que disminuyó la velocidad de oxidación. Un factor a considerar al momento de abordar el estudio de la oxidación es la concentración del oxígeno en el sistema, la cual es dependiente de la presión de oxígeno. Si la superficie de contacto con el agente oxidante es pequeña, incluso a presiones de oxígeno suficientemente altas, la velocidad de difusión del oxígeno por si sola debe ser significativa al comienzo de la oxidación, por lo que se puede hablar de oxidación controlada por la

difusión, en el caso de sistemas en capa fina o burbujeando oxígeno o aire a través de la muestra, como ocurre en los ensayos de oxidación acelerada en Rancimat, se asegura que el proceso se realice a máxima velocidad debido a la difusión del oxígeno en todo el sustrato oxidable (Yanishlieva, 2005), por esta razón la aparición de compuestos de oxidación en LM sin la adición de antioxidantes y con la adición de N fue más temprana en los ensayos realizados en Rancimat que en estufa. Contrariamente, en los sistemas LM-Q y LM-E almacenados en estufa, la aparición de monómeros oxidados y de polímeros fue más temprana que en los ensayos realizados en Rancimat, lo cual se debería a que los sistemas no estaban en agitación constante, lo que limitó la difusión de Q y E hacia la interfase aceite-aire, por lo tanto, la cantidad de flavonoides que llegaban a la interfase no lograban reemplazar a los que estaban siendo degradados, lo que aceleró el proceso de oxidación con respecto a los ensayos en el equipo de Rancimat. El movimiento constante de los flavonoides en el sistema de Rancimat facilitaría la difusión de los flavonoides hacia la interfase aceite-aire y mejoraría su capacidad antioxidante.

La actividad antioxidante de los flavonoides Q, E y N también se estudió en aceites marinos, aceite de maní, manteca de cerdo, aceite de canola, aceite de linaza y aceite de maíz, donde se evaluó la oxidación por diferentes métodos como: formación de peróxidos (Michote *et al.*, 2011; Naz *et al.*, 2008; Zandi y Gordon, 1999; Wanasundara y Shahidi, 1994; Nieto *et al.*, 1993), porcentaje de ácidos grasos residual (Michote *et al.*, 2011), valor *p*-anisidina e índice de yodo (Naz *et al.*, 2008), tiempo de inducción por Rancimat (Yang *et al.*, 2009. Ho *et al.*, 1992), TBARS (Wanasundara y Shahidi, 1994; Nieto *et al.*, 1993) y compuestos polares por cromatografía en columna (Zandi y Gordon, 1999), entre otros. También se han utilizado estos flavonoides como antioxidantes en sistemas alimentarios, demostrando que reducen el deterioro oxidativo en emulsiones o/w (di Mattia *et al.*, 2009; Kiokias *et al.*, 2005). Las condiciones experimentales en las que se llevaron a cabo estos estudios son diversas (concentración de polifenoles, origen e insaturación de la materia grasa, temperatura y método para la determinación de la oxidación de la materia grasa) lo que contribuye a la variabilidad de los resultados encontrados.



**Figura 23.** Gráficos que muestran la evolución de la formación de compuestos de oxidación y retención de flavonoides durante los ensayos de oxidación acelerada de linoleato de metilo en Rancimat a 60° C para los sistemas LM (A), LM-N (B), LM-Q (C) y LM-E (D) ▲: monómeros oxidados; ■: dímeros; ●: polímeros; ◆ □ flavonoides. Los resultados corresponden a triplicados de experimentos con una desviación estándar  $\leq$  a 8% para los compuestos de oxidación y  $\leq$  a 10% para la pérdida de flavonoides



**Figura 24.** Gráficos que muestran la evolución de la formación de compuestos de oxidación y retención de flavonoides durante los ensayos de oxidación acelerada de linoleato de metilo en estufa a 60° C (relación S/V 11,5) para los sistemas LM (A) y LM-N (B), LM-Q (C) y LM-E (D) ▲: monómeros oxidados; ■: dímeros; ●: polímeros; ◆ □ flavonoides. Los resultados corresponden a triplicados de experimentos con una desviación estándar  $\leq 8\%$  para los compuestos de oxidación.

### 3.4.2 Ensayos de estabilidad oxidativa de linoleato de metilo adicionado de flavonoides encapsulados

En la Tabla 14 se presenta la caracterización de las micropartículas Q-IN, Q-(IN-C), E-IN, E-(IN-C), Q-(HPC-C) y E-(HPC-C), utilizando la misma relación flavonoide/AE para tener el mismo contenido de sólidos y condiciones óptimas de temperatura del aire de entrada al secador óptimas, informadas en el objetivo 1 (Tabla 5) (Anexo 9).

En el caso de las micropartículas de flavonoides con IN se elaboraron micropartículas sin y con agente canalizante (5%) para evaluar el efecto del agente canalizante y el tipo de flavonoides sobre la estabilidad oxidativa del linoleato de metilo. Las micropartículas con HPC, se elaboraron con 3,5% de agente canalizante debido a la nula liberación del flavonoide encapsulado cuando C no estaba presente.

**Tabla 14.** Caracterización de las micropartículas de flavonoides encapsuladas utilizando inulina o hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante, utilizadas en los ensayos de estabilidad oxidativa de linoleato de metilo

Sistemas	Relación F/AE	Capsul <sup>®</sup> (%)	Temperatura del aire de entrada (° C)	Flavonoides totales después del secado (mg/g powder)	Eficiencia de encapsulación (%)	Recuperación (%)
Q-IN	1:45	0	160	20,2 ± 0,3 <sup>ab</sup>	61,0 ± 0,5 <sup>cd</sup>	93 ± 0,2 <sup>a</sup>
E-IN	1:45	0	145	18,8 ± 0,3 <sup>ab</sup>	70,8 ± 1,1 <sup>ab</sup>	87 ± 1,2 <sup>b</sup>
Q-(IN-C)	1:45	5	160	20,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	58,2 ± 3,4 <sup>d</sup>	96 ± 0,9 <sup>a</sup>
E-(IN-C)	1:45	5	145	17,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	76,8 ± 1,2 <sup>a</sup>	83 ± 1,4 <sup>b</sup>
Q-(HPC-C)	1:45	3,5	110	20,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	70,7 ± 2,1 <sup>ab</sup>	95 ± 2,1 <sup>a</sup>
E-(HPC-C)	1:45	3,5	92	14,9 ± 0,1 <sup>c</sup>	66,6 ± 0,5 <sup>bc</sup>	69 ± 0,4 <sup>c</sup>

\* Valores son expresados como promedios ± DS (n=3). F: flavonoide; AE: agente encapsulante; Q: quercetina; N: naringenina; E: epicatequina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul<sup>®</sup>

Los valores obtenidos de flavonoides totales después del proceso de secado, eficiencia de encapsulación y recuperación, fueron similares a los valores obtenidos para las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas con IN y HPC (Tabla 6 y Tabla 7).

#### 3.4.2.1 Tiempo de inducción en Rancimat

En la Tabla 15 se presentan los resultados del tiempo de inducción y factor de protección obtenidos para LM con la adición de 200 mg/Kg de flavonoides encapsulados, estudiadas bajo condiciones aceleradas de oxidación en Rancimat a 60 °C.

**Tabla 15.** Tiempo de inducción y factor de protección de linoleato de metilo con la adición de flavonoides encapsulados (200 mg/Kg), en Rancimat a 60 °C

<b>Sistemas</b>	<b>Tiempo de Inducción X ± DS (h)</b>	<b>Factor de Protección (FP)</b>
<b>LM</b>	9,7 ± 0,7 <sup>f</sup>	-
<b>LM-E-IN</b>	13,8 ± 1,1 <sup>e</sup>	1,4 <sup>e</sup>
<b>LM-Q-IN</b>	90,8 ± 2,9 <sup>b</sup>	9,4 <sup>b</sup>
<b>LM-E-IN-C</b>	15,0 ± 1,7 <sup>e</sup>	1,5 <sup>e</sup>
<b>LM-Q-IN-C</b>	99,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	10,2 <sup>a</sup>
<b>LM-E-HPC-C</b>	20,0 ± 1,3 <sup>d</sup>	2,1 <sup>d</sup>
<b>LM Q-HPC-C</b>	36,7 ± 0,5 <sup>c</sup>	3,8 <sup>c</sup>

\*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los sistemas estudiados. LM: linoleato de metilo; E: epicatequina; Q: quercetina; IN: inulina; HPC: hidroxipropilcelulosa; DS: desviación estándar; X: promedio; FP: factor de protección

En la Tabla 15 se observa que la adición de flavonoides encapsulados al LM produjo un aumento significativo en el tiempo de inducción, respecto al LM, mostrando el efecto protector de las micropartículas de flavonoides en la estabilidad oxidativa de LM.

El sistema LM-Q-(IN-C) presentó un tiempo de inducción y factor de protección significativamente mayor en relación al sistema LM-Q-IN, indicando que el agente canalizante permitió la formación de canales en la micropartícula, controlando la liberación y aumentando la estabilidad oxidativa de LM. Sin embargo, este efecto no se observó cuando se comparan los sistemas LM-E-(IN-C) y LM-E-IN.

El sistema LM-Q-(HPC-C) presentó tiempos de inducción significativamente menores con respecto a LM-Q-(IN-C), mostrando el efecto del agente encapsulante. La fuerte interacción entre el flavonoide y HPC no permitió la liberación del antioxidante encapsulado. Contrariamente, el sistema LM-E-(HPC-C) mostró un efecto protector similar al sistema LM-E-(IN-C), no observándose un efecto del agente encapsulante. En los sistemas con E el efecto protector de las micropartículas frente a la oxidación de LM se debería principalmente a la liberación de los flavonoides superficiales en la micropartícula.

Por otro lado, los sistemas con Q (LM-Q-(IN-C) y LM-Q-IN) presentaron tiempos de inducción significativamente mayores a los sistemas con E (LM-E-(IN-C) y ML-E-IN). Así, la mayor solubilidad de Q respecto a E hacia el medio de disolución (solubilidad 0

mmol.L<sup>-1</sup> y 5,4 mmol.L<sup>-1</sup> en acetonitrilo para E y Q, respectivamente (Chebil *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2002)) y la relajación de las cadenas del polímero permitieron la liberación de la Q encapsulada. La menor protección encontrada para la E encapsulada en comparación a Q se debería a su mayor interacción con IN a través de puentes de hidrógeno y/o a la mayor polaridad de E, tal como fue reportado por Cuvelier *et al.* (2000), lo que disminuiría la liberación del flavonoide al medio de disolución.

Por lo tanto, las diferencias encontradas en tiempo de inducción del linoleato de metilo adicionado de micropartículas de flavonoides, corresponde a una matriz compleja de efectos, donde intervienen la solubilidad de los flavonoides en LM y/o polaridad y/o la interacción flavonoide-polímero y/o características estructurales del agente encapsulante y del flavonoide y/o agente canalizante.

#### 3.4.2.2. *Evolución de la formación de compuestos de oxidación y retención de antioxidantes encapsulados durante los ensayos de oxidación acelerada de linoleato de metilo en Rancimat a 60° C*

La Figura 25 (A, B y C) muestra la evolución de la formación de compuestos polares (monómeros oxidados (ox MON), dímeros (DIM) y polímeros (POL)) y la retención de Q en linoleato de metilo de los sistemas LM-Q-IN, LM-Q-(IN-C) y LM-Q-(HPC-C), en condiciones aceleradas de oxidación a 60 °C.

La aparición de monómeros oxidados en el LM con la adición de 200 mg/Kg de Q encapsulada fue a las 87, 86 y 23 h para los sistemas LM-Q-IN, LM-Q-(IN-C) y LM-Q-(HPC-C), respectivamente. Mientras que, la desaparición de Q en los sistemas LM-Q-IN y LM-Q-(IN-C) fue a las 90 y 97 h, respectivamente, que coincidió con la aparición de polímeros en el LM y coincide con el tiempo de inducción (Tabla 15).

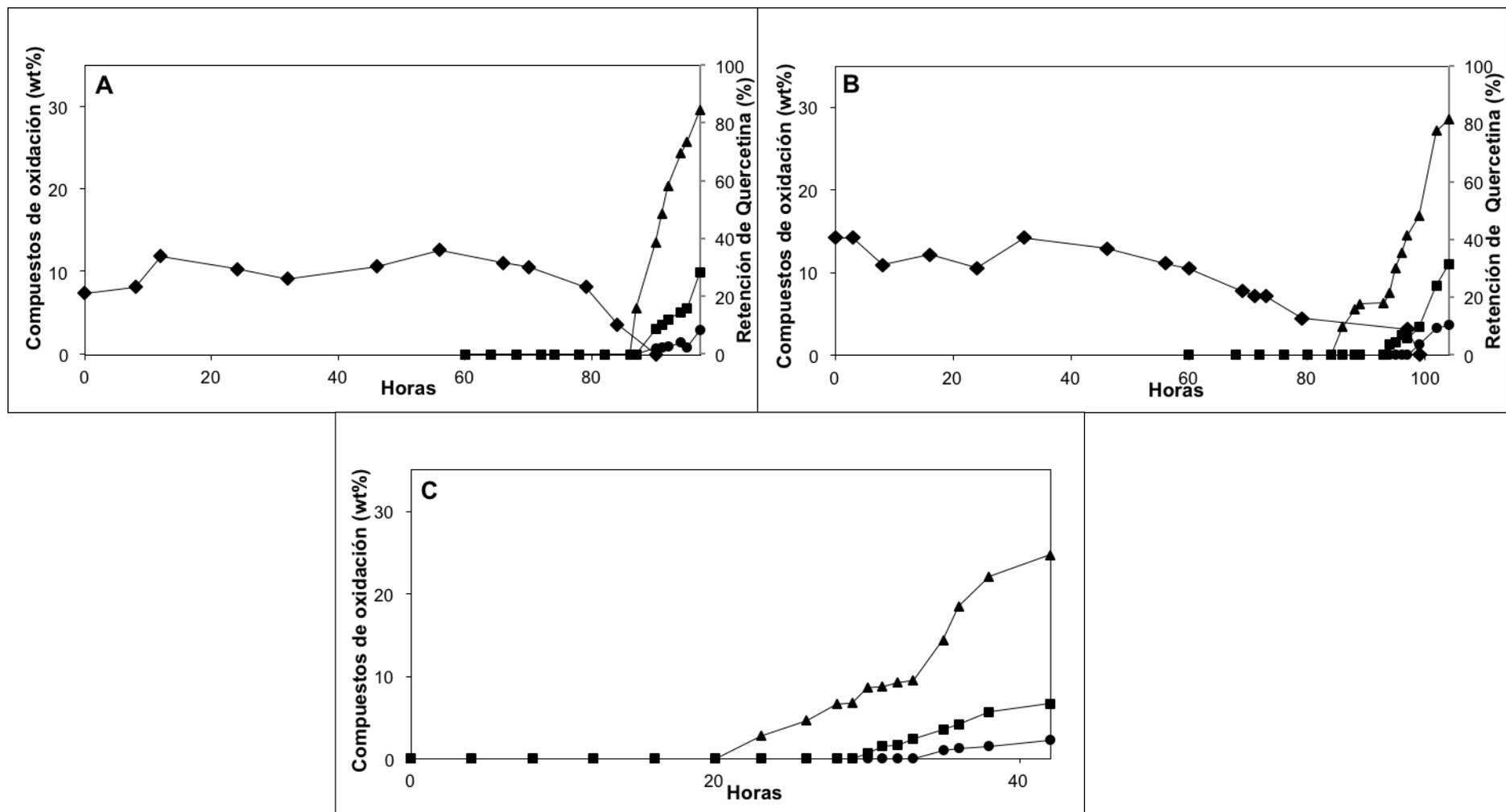
En el perfil de retención de Q para los sistemas LM-Q-IN (Figura 25A) y LM-Q-(IN-C) (Figura 25B), se observan 3 zonas, la primera zona de liberación de los flavonoides superficiales en la micropartícula, la segunda zona corresponde a la zona de equilibrio, donde la liberación de los flavonoides encapsulados está en equilibrio con la degradación de los mismos y una tercera zona que corresponde a la zona de degradación de quercetina, donde la liberación de los flavonoides encapsulados es inferior a la velocidad de

degradación. No se detectó Q por HPLC en el sistema LM-Q-(HPC-C) (Figura 24C), sugiriendo que la Q superficial se liberó rápidamente, sin posterior liberación de la Q encapsulada, debido a una alta interacción Q-HPC.

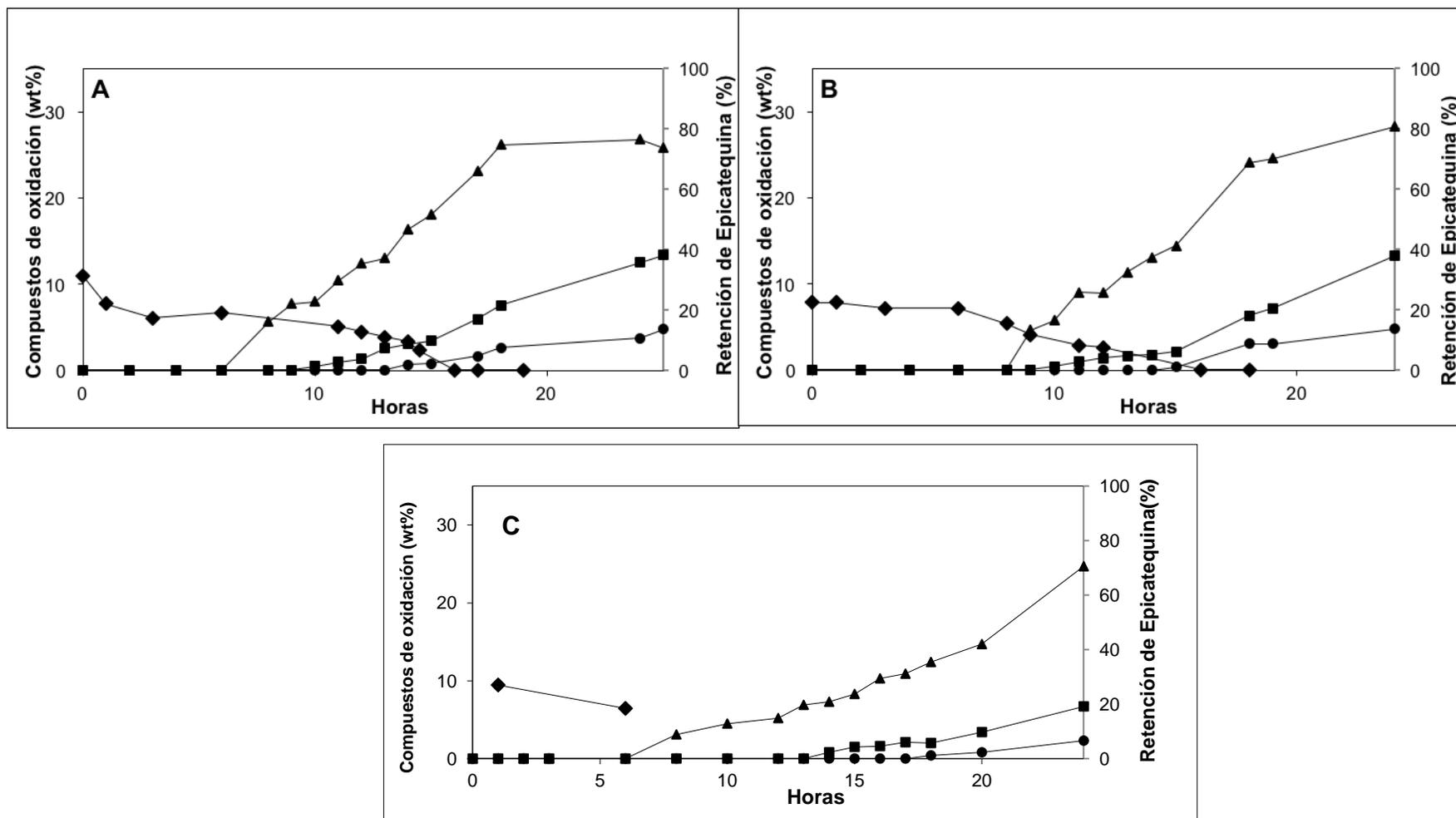
La Figura 26 (A, B y C) muestra la evolución de la formación de compuestos polares (monómeros oxidados (ox MON), dímeros (DIM) y polímeros (POL)) y la retención de E en linoleato de metilo con la adición de micropartículas de E (LM-E-IN, LM-E-(IN-C) y LM-E-(HPC-C)), en condiciones aceleradas de oxidación a 60° C.

La aparición de monómeros oxidados en el LM fue a las 8, 9 y 8 h para los sistemas LM-E-IN, LM-E-(IN-C) y LM-E-(HPC-C), respectivamente. La desaparición de E en los sistemas LM-E-IN y LM-E-(IN-C) fue a las 14 h, este tiempo coincidió con la aparición de los polímeros en el LM y con el tiempo de inducción (Tabla 15). En los sistemas de LM-E-IN, LM-E-(IN-C) y LM-E-(HPC-C) se observa un efecto limitado sobre la estabilidad oxidativa de LM, el que se atribuyó a que sólo se liberó la E superficial.

Los resultados obtenidos permiten establecer que los sistemas LM-Q-IN y LM-Q-(IN-C) fueron excelentes para prolongar la estabilidad oxidativa de LM. Los sistemas con E encapsulada no ejercieron los efectos deseados, sin embargo, en los ensayos con E sin encapsular, ésta mostró una potente actividad antioxidante que superó a Q, por esta razón, la E encapsulada con IN o HPC podría utilizarse para funcionalizar aceites, ya que tanto IN como HPC no liberarían los flavonoides en el sistema gástrico, pero son fermentadas en el intestino (Sharma *et al.*, 2013; Stevens *et al.*, 2001) permitiendo la liberación del flavonoide, el cual al ser absorbido ejercerá efectos benéficos en la salud.



**Figura 25.** Gráficos que muestran la evolución de la formación de compuestos de oxidación y retención de flavonoides durante la oxidación de linoleato de metilo con la adición de micropartículas de Q, en condiciones aceleradas de oxidación en Rancimat a 60° C, para los sistemas LM-Q-IN (A), LM-Q-(IN-C) (B) y LM-Q-(HPC-C) (C). ▲: monómeros oxidados; ■: dímeros; ●: polímeros; ◆ □ flavonoides. Los resultados corresponden a triplicados de experimentos con una desviación estándar  $\leq$  a 8% para los compuestos de oxidación y  $\leq$  a 10% para la pérdida de flavonoides



**Figura 26.** Gráficos que muestran la evolución de la formación de compuestos de oxidación y retención de flavonoides durante la oxidación de linoleato de metilo con la adición de micropartículas de E, en condiciones aceleradas de oxidación en Rancimat a 60° C, para los sistemas LM-E-IN (A), LM-E-(IN-C) (B) y LM-E-(HPC-C) (C). ▲: monómeros oxidados; ■: dímeros; ●: polímeros; ◆ □ flavonoides. Los resultados corresponden a triplicados de experimentos con una desviación estándar  $\leq$  a 8% para los compuestos de oxidación y  $\leq$  a 10% para la pérdida de flavonoides

### 3.4.3 Análisis de formación de compuestos de oxidación por HPSEC y pérdida de sustrato por GLC

Las Tablas 16, 17 y 18 muestran los compuestos totales de oxidación obtenidos mediante el método HPSEC y pérdida de sustrato determinada indirectamente por GLC, para la oxidación de LM con micropartículas de epicatequina, con micropartículas de quercetina y con flavonoides libres, respectivamente, en condiciones aceleradas de oxidación en Rancimat a 60 °C.

Los compuestos totales de oxidación se calcularon por la sumatoria de los monómeros oxidados, dímeros y polímeros cuantificados por HPSEC, mientras que la pérdida de sustrato se calculó desde los niveles remanentes de LM no oxidado determinado por GLC, para muestras con niveles de oxidación entre 0 y 40%. Se observa que la sensibilidad de la técnica GLC para pérdida de sustrato fue mucho más baja que HPSEC y los cambios son detectados a un alto nivel de oxidación, siendo la sensibilidad de ambos métodos similares sólo a altos niveles de oxidación. La alta sensibilidad del método por HPSEC fue reportada previamente por Caponio *et al.* (2007) y Márquez-Ruiz *et al.* (2007) y permite cuantificar compuestos de oxidación en estados tempranos del deterioro oxidativo, lo que la transforma en una metodología idónea para la detección del estado oxidativo de grasas y aceites.

**Tabla 16.** Compuestos totales de oxidación y pérdida de sustrato, en linoleato de metilo con micropartículas de epicatequina, en condiciones aceleradas de oxidación en Rancimat a 60 °C

Muestras	Compuestos de oxidación totales (%)			Pérdida de sustrato (%)		
	E-IN	E-(IN-C)	E-(HPC-C)	E-IN	E-(IN-C)	E-(HPC-C)
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	7,7	6,1	5,2	4,1	8,4	26,2
3	19,9	16,9	12	29,7	20,4	29,4
4	30,6	34,3	18,8	43,9	40,0	33,2
5	43,0	46,2	34	43,6	45,3	47,0

Los resultados corresponden a triplicados de experimentos con una desviación estándar  $\leq$  a 8%. E: epicatequina; IN: inulina; C: Capsul<sup>®</sup>; HPC: hidroxipropilcelulosa

**Tabla 17.** Compuestos totales de oxidación y pérdida de sustrato, en linoleato de metilo con adición de micropartículas de quercetina, en condiciones aceleradas de oxidación en Rancimat a 60 °C

Muestras	Compuestos de oxidación totales (%)			Pérdida de sustrato (%)		
	Q-IN	Q-(IN-C)	Q-(HPC-C)	Q-IN	Q-(IN-C)	Q-(HPC-C)
1	0	0	0	0	0	0
2	5,6	6,4	9,3	0,0	3,4	8,8
3	17,3	16,1	11	19,0	11,1	0,0
4	28,4	26	18,9	33,9	26,2	5,4
5	42,4	38,8	29,2	36,4	35,6	22,7

Los resultados corresponden a triplicados de experimentos con una desviación estándar  $\leq$  a 8% . Q: quercetina; IN: inulina; C: Capsul<sup>®</sup>; HPC: hidroxipropilcelulosa

**Tabla 18.** Compuestos totales de oxidación y pérdida de sustrato, en linoleato de metilo con adición de micropartículas de flavonoides libres, en condiciones aceleradas de oxidación en Rancimat a 60 °C

Muestras	Compuestos de oxidación totales (%)				Pérdida de sustrato (%)			
	LM	Q	E	N	LM	Q	E	N
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	9,2	9,7	8,6	9,6	0,0	16,2	11,9	7,8
3	15,7	16,9	19,7	18,4	18,5	14,4	19,4	17,1
4	28,1	27,2	26,2	21	40,4	31,5	33,0	17,3
5	41,3	40,8	38,2	27,4	51,5	42,5	29,9	22,3

Los resultados corresponden a triplicados de experimentos con una desviación estándar  $\leq$  a 8% . LM: linoleato de metilo; Q: quercetina; E: epicatequina; N: naringenina

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio, confirman la hipótesis para el sistema de micropartículas Q-(IN-C) ya que se logró controlar la liberación de Q en el medio lipídico y aumentar la estabilidad oxidativa. Las micropartículas de N no ejercieron los efectos deseados. Las micropartículas de E presentaron una alta interacción E-polímero lo que limitó su liberación y su efecto antioxidante sobre la estabilidad oxidativa de LM.

La EE dependió del agente encapsulante y de la estructura del flavonoide. N presentó la menor EE por su menor número de grupos OH y la menor interacción polímero-flavonoide con respecto a Q y E. El C actuó como agente canalizante y no participó como agente encapsulante como se demostró en la EE entre los ensayos con IN sin y con C. En general las recuperaciones fueron altas, mostrando que la temperatura de entrada al secador utilizadas, no tuvieron un efecto importante sobre la estabilidad de los flavonoides.

El mecanismo de liberación de flavonoides desde micropartículas en LM fue determinado por el agente canalizante (difusión) independiente de la naturaleza del flavonoide en micropartículas con IN y por las características estructurales del agente encapsulante (hinchamiento para IN y erosión para HPC). Sin embargo, las constantes de velocidad de liberación dependieron del agente canalizante, interacción polímero-flavonoide y de la solubilidad del flavonoide.

El perfil de liberación de los flavonoides encapsulados determinaría la aplicabilidad de las micropartículas en sistemas alimentarios. De este modo, los sistemas con Q encapsulada podrían ser utilizados para prolongar la estabilidad oxidativa de sistemas lipídicos y los sistemas de E encapsulada podrían ser utilizados para funcionalizar aceites.

Las micropartículas de Q-IN y Q-(IN-C) presentaron la mayor protección frente a la estabilidad oxidativa del LM con respecto a las micropartículas de E-IN y E-(IN-C). Las micropartículas con HPC no mostraron un efecto protector significativo debido a la alta interacción flavonoide-polímero. El efecto antioxidante dependió de las características estructurales del agente encapsulante y del flavonoide (interacción flavonoide-polímero y solubilidad de los flavonoides) y de la presencia del agente canalizante.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J., Jiménez-Aparicio, A., Gutiérrez-López, G. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*, **67**: 179-184.
2. Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**: 183-198.
3. Antoshina, S., Selishcheva, A., Sorokoumova, G.M., Utkina, E.A., Degtyarev, N.S., Shvets, V.I. 2005. Effects of flavonoides of various structures on peroxidation of neutral lipids of animal origin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **41**:18-23.
4. Aragón-Fernández, J., González, R., Brizuela, N., Oliver, L. 2009. Estudio cinético de liberación in vitro en un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO<sub>3</sub>. *Revista Iberomaericana de Polímeros*, **10** (2): 119-130.
5. Arts, I., van de Putte, B., Hollman, P. 2000. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 1746-1751.
6. Augustín, M., y Hemar, Y. 2009. Nano and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, **38**: 902-912.
7. Banerjee, S., y Bhattacharya, S. 2012. Food gels: Gelling process and new applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**: 334-346.
8. Barclay L., y Vinquist, M.R. 2003. Phenols as antioxidants. In Z. Rappoport (ed), *The chemistry of phenols*. pp: 839-908. Nva York, USA.
9. Brannon-Peppas, L. 1995. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, **116**: 1-9.
10. Brannon-Peppas, L., y Peppas, N. 1989. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. IX. The mechanism of drug release from ph-sensitive swelling-controlled systems. *Journal of Controlled Release*, **8** (3): 267-274.
11. Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56**: 317-333.
12. Bruneton, J. 1999. Pharmacognosy. Phytochemistry. Medicinal plants. Springer (eds). Paris, Francia.
13. Cao, G., Sofic, E., Prior, R. 1997. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, **22** (5): 749-760.
14. Cao, G., y Prior, R. 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in Enzymology*, **299**: 350-362.
15. Caponio, F., Gomes, T., Pasqualone, A., Summo, C. 2007. Use of the high performance size exclusion chromatography analysis for the measurement of the degree of hydrolytic and oxidative degradation of the lipid fraction of biscuits. *Food Chemistry*, **102**: 232-236.
16. Chaiyasit, W., Elías, R., McClements, D., Decker, E. 2007. Role of physical structures in buks oils on lipid oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **47**: 299-317.
17. Chebil, L., Humeau, C., Anthoni, J., Dehez, F., Engasser, J., Ghoul, M. 2007. Solubility of flavonoids in organic solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **52** (5): 1552- 1556.
18. Cheftel, J.C. 1992. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. pp

- 265-269. Acribia, Zaragoza, España.
19. Chiappetta, D., Gergic, E., Legaspi, M., Cantarelli, G., García, M., Bregni, C. 2006. Comprimidos bioadhesivos formulados con excipientes hidrofílicos para uso bucofaríngeo. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **25** (3): 360-365.
  20. Choe, E., y Min, D. 2007. Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*, **72** (5): 77-86.
  21. Cook, N., y Samman, S. 1996. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **7** (2): 66-76.
  22. Cuvelier, M., Bondet, V., Berset, C. 2000. Behavior of Phenolic Antioxidants in a Partitioned Medium: Structure-Activity Relationship. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, **77** (8): 819-824.
  23. Daniher, D., y Zhu, J. 2008. Dry poder platform for pulmonary drug delivery. *Particuology*, **6** (4): 225-238.
  24. De Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M., Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, **20** (4): 292-302.
  25. Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A., Martino, M. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, **71** (1): 126-134.
  26. Deng, Z.Y., y YU, Y. 2004. Process for Producing Oil-soluble Microencapsulated Tea Polyphenols. *Fine and Speciality Chemicals*, **16**: 8-15.
  27. Desai, K. y Park, H. 2005. Recent development in microencapsulation of foods ingredients. *Drying Technology*, **23** (7): 1361-1394.
  28. Di Mattia, C., Sacchetti, G., Mastrocola, D., Pittia, P. 2009. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Research International*, **42**: 1163-1170.
  29. Dimakou, C., Kiokias, S., Tsaprouni, I., Oreopoulou, V. 2007. Effect of processing and storage parameters on the oxidative deterioration of oil-in-water emulsion. *Food Biophysic*, **2**: 38-45.
  30. Dobarganes, M., y Márquez-Ruiz, G. 2007. Formation and analysis of oxidized monomeric, dimeric and higher oligomeric triglycerides. In AOCS (eds), *Deep Frying: Chemistry Nutrition and Practical Applications*, pp 87-110. Champaign, IL, USA.
  31. Dobarganes, M.C., Velasco, J., Dieffenbacher, A. 2000. The determination of polar compounds, polymerized triacylglycerols, oxidized triacylglycerols and diacylglycerols in fats and oils. *Pure and Applied Chemistry*, **72**: 1563-1575.
  32. Dziezak, J.D. 1988. Microencapsulation and encapsulation ingredients. *Food Technology*, **42**: 136-151.
  33. Engelmann, M., Hutcheson, R., Cheng, I. 2005. Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxyflavone (chrysin), and 3,4-dihydroxyflavone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (8): 2953-2960.
  34. Ersus, S., y Yurdagel, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, **80**: 805-812.
  35. Fang, Z., y Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends in Food Science and Technology*, **21** (10): 510-523.
  36. Farhoosh, R., y Tavassoli, M. 2011. Simultaneous monitoring of the conventional qualitative indicators during frying of sunflower oil. *Food Chemistry*, **125**: 209-213.

37. Fennema, O.R. 1996. Food Chemistry. Fennema (eds), Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
38. Finotelli, P. y Rocha, M. 2005. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and Capsul using spray drying. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 1-11.
39. Frank, A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, **87** (2): 287-291.
40. Frankel, E. 1998. Free radical oxidation, In "Lipid oxidation". E.N. Frankel (ed), The Oily Press. pp 13-22. Dundee, UK
41. Frankel, E., 2005. "Lipid Oxidation", The Oily Press. Bridgwater, England.
42. Fukui, E., Uemura, K., Kobayashi, M. 2000. Studies of applicability of press-coated tablets using hydroxypropylcellulose (HPC) in the outer shell for timed-release preparations. *Journal of Controlled Release*, **68** (2): 215-223.
43. Gafourian, T., Safari, A., Adibkia, K., Parviz, F., Nokhodchi, A. 2007. A drug release study from hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) matrices using QSPR modeling. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **96** (12): 334-3351.
44. Galey, J.B. 1997. Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Advances in Pharmacology*, **38**: 167-203.
45. García, P., Vega, J., Jiménez, P., Santos, J., Robert, P. 2013. Alpha-tocopherol microspheres with cross-linked and acetylated inulin and their release profile in a hydrophilic model. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **115** (7): 811-819.
46. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, **40**: 1107-1121.
47. Gibbs, B., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, N. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **50**: 213-224.
48. Glibowski, P. 2010. Effect of thermal and mechanical factors on rheological properties of high performance inulin gels and spread. *Journal of Food Engineering*, **99**: 106-113.
49. Gromadzka, J., y Wardencki, W. 2011. Trends in edible vegetable oils analysis. Part B. Applications of different analytical techniques. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, **61** (2): 89-99.
50. Halliwell, B., Murcia, M., Chirico, S., Aruoma, O. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **35**: 7-20.
51. Harborne J.B. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. In *Methods in plant biochemistry*, vol I, Plant Phenolic. Dey, P.M., y Harborne, J.B. (eds). Pp: 1-28. Academic Press, London.
52. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *The Journal of Nutritional and Biochemistry*, **13**: 572-84.
53. Henning, S., Fajardo, C., Lee, H., Youssefian, A., Go, V., Heber, D. 2003. Catechin content of 18 teas and Green teas extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutrition and Cancer*, **45** (2): 226-235.
54. Hertog, M., Hollman, P., Katan, M., Kromhout, D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands.

- Nutrition and Cancer*, **20**: 21-29.
55. Higuchi, T. 1961. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **50**: 874-879.
  56. Higuchi, T. 1963. Mechanism of sustained-action medication. *Journal of Pharmaceutical Science*, **52**: 1145-1149.
  57. Ho, C., Chen, C., Wanasundara, U., Shahidi, F. 1997. Natural antioxidants from tea. In: Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications. Shahidi (ed.) F. pp: 213-223. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.
  58. Ho, C., Chen, Q., Shi, H., Zhang, K., Rosen, R. 1992. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Preventive Medicine*, **21**: 520-525.
  59. Hodgson, J. 2008. Tea flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **17**: 288-290.
  60. Holgado, F. 2011. Comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados: Influencia de las condiciones de preparación en sistemas modelos y estudios específicos en alimentos. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
  61. Houhoula, D., Oreupoulou, V., Tzia, C.J. 2003. Antioxidant efficiency of oregano during frying and storage of potato chips. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**: 1499-1503.
  62. Hu, B., Pan, C., Hou, Z., Ye, H., Hu, B., Zeng, X. 2008. Optimization of fabrication parameters to produce chitosantripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 7451-7458.
  63. Huber, G., Vasantha, H., Shahidi, F. 2009. Inhibition of oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acid and fish oil by quercetin glycosides. *Food Chemistry*, **17**: 290-295.
  64. Iqbal, S., y Bhangar, M. 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food chemistry*, **10**: 246-254.
  65. Ito, N., Fukushima, S., Tamano, S., Hirose, M., Hagiwara, A. 1986. Dose Response in Butylated Hydroxyanisole Induction of Forestomach Carcinogenesis in F334 Rats. *Journal of the National Cancer Institute*, **77**: 1261-1265.
  66. Ito, N., Fukushima, S., Tsuda, H. 1985. Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response by BHA, BHT, and Other Antioxidants. *CRC Critical Review in Toxicology*, **15**: 109-150.
  67. Jafari, S., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B. 2008. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, **26**: 816-835.
  68. Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **275**: 218-221.
  69. Jonsdottir, R., Bragadottir, M., Arnarson, G. 2005. Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). *Journal of Food Science*, **70** (7): 433-440.
  70. Kalogeropoulos, N., Yannakopoulou, K., GiOXari, A., Chiou, A. 2010. Polyphenol characterization and encapsulation in  $\beta$ -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John`s wort) extract. *Food Science and Technology*, **43**: 882-889.
  71. Kampa, M., Alexaki, V., Notas, G., Nifli, A., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., Castanas, E. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acid on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast*

- Cancer Research*, **6** (2): 63-74.
72. Kang, J., Chung, S., Row, K. 2002. Comparison of experimental and calculated solubilities of (+)-catechin in Green tea. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **8** (4): 354-358.
  73. Kenyon, M. M. 1995. Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. In Risch S.J., y Reineccius G.A. (Eds.), Encapsulation and controlled release of food ingredients. ACS symposium series (Vol. 590, pp. 42–50). Washington, DC: American Chemical Society.
  74. Khatri, N., Bilandi, A., Kataria, M. 2014. Formulation and evaluation of floating matrix tablet of levofloxacin hemihydrate. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, **2** (3): 203-214.
  75. Kiokias, S. 2002. In vitro and in vivo antioxidant properties of natural carotenoid mixtures. PhD Diss. School of Food Biosciences, The University of Readings, UK.
  76. Kiokias, S., Kiokias, S., Lampa, K., Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V. 2005. Inhibition of oxidative deterioration in food emulsions. *Proceedings of INTRAFODEFFoST Conference*, **2**: 1237-1240.
  77. Klucel, Ficha técnica: Hydroxypropylcellulose. 2001 (en línea) <[http://www.brenntagsspecialties.com/en/downloads/Products/Multi Market Principals/Aqualon/Klucel HPC Booklet.pdf](http://www.brenntagsspecialties.com/en/downloads/Products/Multi_Market_Principals/Aqualon/Klucel_HPC_Booklet.pdf)> (consulta: 6 mayo 2014).
  78. Kolanowski, W., Laufenberg, G., Kunz, B. 2004. Fish oil stabilisation by microencapsulation with modified cellulose. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **55** (4): 333-43.
  79. Korsmeyer, R. W. y Peppas, N. A. 1983. Swelling-Controlled delivery systems for pharmaceutical application: macromolecular and modeling consideration. *Controlled Release Delivery Systems*. Roseman T.J. y Mansdorf S.Z. (ed.). Marcel Dekker. New York, USA
  80. Kosaraju, S., Labbett, D., Emin, M., Konczak, I., Lundin, L. 2008. Delivering polyphenols for healthy ageing. *Nutrition and Dietetics*, **65**: 48-52.
  81. Kosaraju, S.L., D'ath, L., Lawrence, A. 2006. Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers*, **64**: 163-167.
  82. Kou, J., Amidon, G., Lee, P. 1988. pH dependent swelling and solute diffusion characteristics of poly(hydroxy ethyl methacrylate-comethacrylic acid) hydrogels. *Pharmaceutical Research*, **5**: 592-597.
  83. Krishnan, S., Bhosale, R., Singhal, R. 2005a. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum Arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate polymers*, **61**: 95-102.
  84. Krishnan, S., Kshirsagar, A., Singhal, R. 2005b. The use of gum Arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate polymers*, **62**: 309-315.
  85. Lauro, M., de Simone, F., Sansone, F., Ianelli, P., Aquino, R. 2007. Preparation and release characteristics of naringin and naringenin gastro-resistant microparticles by spray-drying. *Journal of drug del Science Technology*, **17** (2): 119-124.
  86. Lee, H.K., Park J.H., Know, K.C. 1997. Double-walled microparticles for single shot vaccine. *Journal of Controlled Release*, **44**: 283–293.
  87. Lee, J., Lee, Y., Choe, E. 2008. Effect of sesamol, sesamin and sesamol extracted from roasted sesame oil on the thermal oxidation of methyl linoleate. *LWT - Food Science and Technology*, **41** (10): 1871-1875.

88. Lokuwan, J. 2007. Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, **21**: 928-935.
89. Maestro-Durán, R., y Borja-Padilla, R. 1993. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*, **44**: 101-106.
90. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79** (5): 727-747.
91. Mancuso, J., McClements, D., Decker, E. 2000. Iron accelerated cumene hydroperoxide decomposition in hexadecane and trilaurin emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 213-219.
92. Marmesat, S., Morales, A., Velasco, J., Ruiz-Méndez, V., Dobarganes, M. 2009. Relation between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *Grasas y aceites*, **60** (2): 155-160.
93. Márquez-Ruiz, G, Velasco, J, Dobarganes, M. 2010. Preventing oxidation during frying of foods In: Decker E, Elías R, Mc Clements D (eds) Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications, Woodhead Publishing Limited Copenhagen, Denmark.
94. Márquez-Ruiz, G, Velasco, J, Dobarganes, M. 2010. Preventing oxidation during frying of foods In: Decker E, Elías R, Mc Clements D (eds) Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications, Woodhead Publishing Limited Copenhagen Denmark
95. Márquez-Ruiz, G., Holgado, F., García-Martínez, M., Dobarganes, M. 2007. A direct and fast method to monitor lipid oxidation progress in model fatty acid methyl esters by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1165**: 122-127.
96. Márquez-Ruiz, G., Jorge, N., Martín-Polvillo, M., Dobarganes, M. 1996. Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard. *Journal of Chromatography A*, **749**: 55-60.
97. Márquez-Ruiz, G., Martín-Polvillo, M., Dobarganes, M. 2003. Effect of temperature and addition of  $\alpha$ -tocopherol on the oxidation of triolein model system. *Lipids*, **38**: 233-240.
98. Márquez-Ruiz, G., y Dobarganes, M. 2006. HPSEC in lipid analysis. In: Lipid Analysis and Lipidomics: New Techniques and Applications. AOCS (eds). pp 205-238. Champaign, IL, USA.
99. Martín-Polvillo, M., Márquez-Ruiz, G., Dobarganes, M. 2004. Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long-term storage at room temperature. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, **81** (6): 577-583.
100. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, **6**: 271-278.
101. McClements, D., y Decker, A. 2000. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *Journal of Food Science*, **65** (8): 1270-1282.
102. Mei, L., McClements, D., Wu, J., Decker, E. 1998. Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsions as affected by surfactant, pH and NaCl. *Food Chemistry*, **61**: 307-312.

103. Michotte, D., Rogez, H., Chirinos, R., Mignolet, E., Campos, D., Larondelle, Y. 2011. Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. *Food Chemistry*, **129**: 1228-1231.
104. Michotte, D., Rogez, H., Chirinos, R., Mignolet, E., Campos, D., Larondelle, Y. 2011. Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. *Food Chemistry*, **129**: 1228-1231.
105. Min, D., y Boff, J. 2002. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **1** (2): 58-72.
106. Minemoto, Y., Adachi, S., Matsuno, R. 1999. Autoxidation of linoleic acid encapsulated with polysaccharides of differing weight ratio. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **63** (5): 866-869.
107. Mira, L., Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M., Jennings, K. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*, **36**: 1199-1208.
108. Miranda, A., Millán, M., Caraballo, I. 2006. Study of the critical points of HPMC hydrophilic matrices for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **311**: 75-81.
109. Moreira, E., Barbosa, J., Gomes, T., Oliveira, R. 2002. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *Thermochimica Acta*, **392-393**: 79-84.
110. Mozafari, M., Khosravi, K., Borazan, G., Cui, J., Pardakhty, A., Yurdugul, S. 2008. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, **11**: 833-844.
111. Munin, A., y Edwards F. 2011. Encapsulation of natural polyphenolic compounds: a review. *Pharmaceutics*, **3**: 793-829.
112. Nahringbauer, I. 1995. Dynamic surface tensión of aqueous polymer solution, I: Ethyl(hydroxyethyl)cellulose (BERMOCOLL cst-103). *Journal of Colloid and Interface Science*, **176** (2): 318-328.
113. Nawar, W.W. 1993. Lípidos. In Fenemma O., (ed), *Química de los Alimentos*. pp. 230-239. Acribia, Zaragoza, España.
114. Naz, S., Siddiqi, R., Sayeed, S. 2008. Effect of flavonoids on the oxidative stability of corn oil during deep frying. *International Journal of Food Science and Technology*, **43**: 1850-1854.
115. Nicoli, M., Calligaris, S., Manzocco, L. 2000. Effect of enzymatic and chemical oxidation on the antioxidant capacity of catechin model systems and apple derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** (10): 4576-4580.
116. Nieto, S., Garrido, A., Sanhueza, J., Loyola, L.A., Morales, G., Leighton, F., Valenzuela, A. 1993. Flavonoids as stabilizers in fish oil: an alternative to synthetic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, **70**: 773-778.
117. O'Brien, R.D. 2004. *Fats and Oil: Formulating and Processing for Applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
118. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 4619-4626.
119. Pace-Asciak, C.R., Hahn, S., Diamandis E.P., Soleas, G., Goldberg, D.M. 1995. The red wine phenolic trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoic synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta*, **235**: 207-219.
120. Panos, I., Acosta, N., Heras, A. 2008. New drug delivery systems based on chitosan.

- Current Drug Discovery Technologies*, **5**: 333-341.
121. Papadopulos, G., y Boskou, D. 1991. Antioxidant effect of natural phenols in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **68** (9): 669–672.
  122. Papas, M. A. 1999. Diet and antioxidant status. In *Antioxidants in human health and disease*. Basu, K.T., Temple, J. N., and Gerg, L. M. CABI Publishing, New York.
  123. Pedrielli, P., y 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.
  124. Pekkarinen, S., Heinonen, M., Hopia, A. 1999. Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**: 499-506.
  125. Peppas, N.A. y Sahlin, J.J. 1986. A simple equation for the description of solute release III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, **57**: 169-172.
  126. Pereira, T.A. y Das, N.P. 1990. The effects of flavonoids on the thermal autoxidation of palm oil and other vegetable oils determined by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, **165**: 129-137.
  127. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. 2005. Antioxidantes de los alimentos, aplicaciones prácticas. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
  128. Pool, H., Quintanar, D., Figueroa, J., Marinho, C., Bechara, J., Godínez, L., Mendoza, S. 2012. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, **1**: 1-12.
  129. Porter, W.L. 1993. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicology and Industrial Health*, **9** (1-2): 93-122.
  130. Pothakamury, U. R. y Barbosa-Cánovas, G. V. Fundamental aspect of controlled release in foods. 1995. *Trends in Food Science and Technology*, **6** (12): 397-406.
  131. Proestos, C., Boziaris, I., Nychas, G., Komaitis, M. 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acid in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, **95**: 664-671.
  132. Quek, S.Y., Chok, N.K., Swedlund, P., 2007. The physicochemical properties of spray dried watermelon powder. *Chemical Engineering and Processing*, **46** (5): 386-392.
  133. Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., Kawakishi, S. 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology*, **6**: 75-82.
  134. Ré, I. 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, **16** (6): 1195-1236.
  135. red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in
  136. Rein, D., Paglieroni, T., Pearson, D., Wun, T., Schmitz, H., Gosselin, R., Keen, C. 2000. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *Journal of Nutrition*, **130** (8): 2120-2126.
  137. Reineccius, G. 1991. Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology*, **45**: 144-146.
  138. Reische D., Lilliard D., Eitenmiller R. 1998. Antioxidants. In Akoh CC, Min D.B., (eds). pp 423-448. *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*. New York: Marcel Dekker.

139. Reza, M., Quadir, M., Haid, S. 2003. Comparative evaluation of plastic hydrophobic and hydrophilic polymers as matrices for controlled release drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **6** (2): 274-91.
140. Rice-Evans, C., Miller, J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**: 933-956.
141. Richards, M., Chaiyasit, W., McClements, D., Decker, E. 2002. Ability of surfactant micelles to alter the partitioning of phenolic antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** (5): 1254-1259.
142. Robert, P., García, P., Reyes, N., Chávez, J., Santos, J. 2012. Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behavior in a hydrophilic system. *Food Chemistry*, **134**: 1-8.
143. 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.
144. Ronkart, S., Deroanne, C., Paquot, M., Fougny, C., Lambrechts, J., Blecker, C. 2007. Characterization of the physical state of spray-dried Inulin. *Food Biophysics*, **2**: 83-92.
145. Rosenberg, M., Kopelman, J., Talmon, Y. 1990. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**: 1288-1294.
146. Russin, T.A., Boye, J.I., Pham, H.M., Arcand, Y. 2006. Antioxidant properties of genistein in a model edible oil system. *Journal of Food Science*, **71**: 395-399.
147. Rusu, G., Bandur, G., Manovicu, I., Rusnac, L., Plesu, N. 2006. Solubility and viscosity studies on inulin modified with methacryloyl and palmitoyl chlorides. *Chemical Bulletin of POLITEHNICA, University of Timisoara*, **51**: 83-86.
148. Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. 2009. Microencapsulacion by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, **114** (2): 616-622.
149. Samotyja, U., y Malecka, M. 2007. Effects of blackcurrant seeds and rosemary extracts on oxidative stability of bulk and emulsified lipid substrates. *Food Chemistry*, **104**: 317-323.
150. Sánchez-Muniz, F., Bodega, D., Di Lorenzo, L., Marmesat, S., Bastida, S., Pérez-Olleros, L., Ruiz-Roso, B. 2007. A non-extractable condensed-tannins fiber reduced thermal oxidation in oils at frying temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109** (12): 1218-1225.
151. Sansone, F., Picerno, P., Mencherini, T., Vилlecco, F., D` Ursi, A., Aquino, R., Lauro, M. 2011. Flavonoid microparticle by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability. *Journal of Food Engineering*, **103**: 188-196.
152. Scarfato, P., Avallone, E., Iannelli, P., Aquino, R., Lauro, M., Rossi, A., Acierno, D. 2008. Quercetin microspheres by solvent evaporation: preparation, characterization and release behavior. *Journal of Applied Polymer Science*, **109**: 2994-3001.
153. Schneider, C. 2009. An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Molecular Nutrition and Food Research*, **53** (3): 315-321.
154. Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L., Gardner, P., Heinonen, M., Hopia, A.,

- Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L. 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, **212** (3): 319-328).
155. Seppanem, C., Song, Q., Csallany, A. 2010. The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats and food systems. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, **87** (5): 469-481.
156. Shahidi F., y Zhong Y. 2005. Lipid oxidation: measurement methods. Shahidi F., (ed). pp 357-385. Bailey,s Industrial Oil and Fat Products.
157. Shahidi, F. y Han, X. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **33** (6): 501-547.
158. Shahidi, F. y Zhong, Y. 2011. Revisiting the polar paradox theory: A critical overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59** (8): 3499-3504.
159. Shaikh, J., Bhosale, R., Singhal R. 2006. Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chemistry*, **94**: 105-110.
160. Sharma, P., Chawla, A., Pawar, P. 2013. Design, Development, and Optimization of Polymeric Based-Colonic Drug Delivery System of Naproxen. *The ScientificWorld Journal*, 2013: 1-12.
161. Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Pen, G., Long, S. and Yang, Ch. 2007. Yeast-cell-based microencapsulation of chlorogenic acid as a water-soluble antioxidant. *Journal of Food Engineering*, **80**: 1060-1067.
162. Shoaib, M., Siddiqi, S., Yousuf, R., Zaheer, K., Hanif, M., Rehana, S., Jabeen, S. 2010. Development and Evaluation of Hydrophilic Colloid Matrix of Famotidine Tablets. *Journal of the American Association Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, **11** (2): 708-718.
163. Siepmann, J., y Peppas, N.A. 2001, Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, **48**: 139–157
164. Sinha, D., y Rohera, D. 2002. Comparative evaluation of rate of hydration and matrix erosion of HEC and HPC and study of drug release from their matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **16**: 193-199.
165. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner, A., Simoncic, M., Knez, Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant material and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **89**: 191-198.
166. Skinner, G., Harcum, W., Barnun, P., Guo, J. 1999. The evaluation of fine-particle hydroxypropylcellulose as a roller compaction binder in pharmaceutical applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **25** (10): 1121-1128.
167. Song, M., Li, N., Sun, S., Tiedt, L.R., Liebenberg, W., Villiers, M.M. 2005. Effect of viscosity and concentration of wall former, emulsifier and pore-inducer on the properties of amoxicillin microcapsules prepared by emulsion solvent evaporation. *IL Farmaco*, **60**: 261-267.
168. Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, **579**: 200-213.
169. Stevens, C., Meriggi, A., Booten, C. 2001. Chemical modification of inulin a valuable renewable resource and its industrial applications. *Biomacromolecules*, **2**: 1-16.

170. Su, Y., Xu, J., Ng, Ch., Leung, L., Huang, Y., Chen, Z. 2004. Antioxidant activity of tea theaflavins and methylated catechins in canola oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **81**: 269-274.
171. Su, Y., Fu, Z., Zhang, J., Wang, W., Wang, H., Wang, Y., Zhang, Q. 2008. Microencapsulation of radix *Salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. *Powder Technology*, **184**: 114-121.
172. Suja, K., Abraham, J., Thamizh, S., Jayalekshmy, A., Arumughan, C. 2004. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry*, **84**: 393-400.
173. Sun-Waterhouse, D., Wadhwa, S., Waterhouse, G. 2012. Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: A comparative study using different natural fibre polymers as encapsulant. *Food and Bioprocess Technology*, **6**: 2376-2388.
174. Taghvaei, M., y Jafari, S. 2013. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal of Food Science and Technology*, DOI 10.1007/s13197-013-1080-1
175. Tripodo, G., Pitarresi, G., Palumbo F, Craparo E., Giammona, G. 2005. UV-Photocrosslinking of Inulin Derivatives to Produce Hydrogels for Drug Delivery Application. *Macromolecular Bioscience*, **5**: 1074-1084.
176. Tsimogiannis, D., y Oreopoulou, V. 2006. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **7** (1-2): 140-146.
177. Tsimogiannis, D., y Oreopoulou, V. 2007. Defining the role of flavonoid structure on cottonseed oil stabilization: study of A-and C-ring substitution. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **84**: 129-136.
178. Wanasundara, U., y Shahidi, F. 1996. Stabilization of seal blubber and menhaden oils with green tea catechins. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **73**: 1183-1190.
179. Wanasundara, U. y Shahidi F. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, **63**: 335-342.
180. Wanasundara, U., y Shahidi, F. 1994. Stabilization of canola oil with flavonoids. *Food Chemistry*, **50**: 393-396.
181. Wu, C, Chen, L., Li, W. 2005. Preparation of microencapsulation quercetin and its antioxidative properties in oils. *The Food Industry*, **3**: 27-29.
182. Wu, C., Chen, L., Li, J. 2006. Microencapsulation of semen cuscuteae flavonoids and releasing property. *Transaction of the Chine Society of Agricultural Engineering*, **22** (9): 264-266.
183. Wu, C., Chen, L., Li, W. 2006. Study on Antioxidation of microencapsulation Semen Cuscuteae Flavonoids for Oil. *Chemistry and Adhesion*, **4**: 17-20.
184. Yang, J., Liu, B., Liang, G., Ning, Z. 2009. Structure-activity relationship of flavonoids active against lard oil oxidation base don quantum chemical analysis. *Molecules*, **14**: 46-52.
185. Yanishlieva-Maslarova, N. 2001. Inhibiting oxidation. *In antioxidants in food. Practical Applications*. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., (eds). pp 22-70. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.
186. Yanishlieva, N., y Marinova, E. 2001. Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **103**: 752-767.

187. Yanishlieva, N.V. 2005. Inhibición de la oxidación. In Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (eds) 2005. Antioxidantes de los alimentos, aplicaciones prácticas, Zaragoza, España.
188. Young, S. L., Sarda, X., Rosenberg, M. 1993. Microencapsulation properties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. *Journal of Dairy Science*, **76**: 2868-2877.
189. Zandi, P., y Gordon, M. 1999. Antioxidant activity of extracts from old tea leaves. *Food Chemistry*, **64**:285–288.
190. Zhang L., Mou D., Du Y. 2007. Procyanidins: Extraction and microencapsulation. *Journal of the Science Food and Agriculture*, **87**: 2192-2197.
191. Zhang, H. Y. 2000. Theoretical Investigation on Free Radical Scavenging Activity of 6,7-Dihydroxyflavone. *Quantitative Structure Activity Relationships*, **19**: 50-53.
192. Zhu, Y., Long, Q., Zhou, B., Prenzler, P., Zhong, H. 2013. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Bulk Camellia Oil and Corresponding Oil in Water (O/W) Emulsions. *Advance Journal of Food Science and Technology*, **5** (9): 1238-1243.

## ANEXOS

### ANEXO 1

**Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación (EE) y liberación de flavonoides en hexano (t<sub>14</sub>), para el diseño Box-Behnken de Q, N y E con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante**

**Tabla 1.1** Análisis de Varianza de eficiencia de encapsulación para el diseño Box-Behnken de quercetina con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	2,645	1	2,645	0,35	0,5815
B:Relación	138,611	1	138,611	18,18	<b>0,0080</b>
C:Capsul	282,031	1	282,031	36,99	<b>0,0017</b>
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	<b>0,0074</b>
CC	315,923	1	315,923	41,44	<b>0,0013</b>
Error total	38,1225	5	7,6245		
Total (corr.)	984,884	14			

R-cuadrada = **96**,1292 porciento

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

Error estándar del est. = **2**,76125

Error absoluto medio = **1**,31667

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

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,14675

**Tabla 1.2** Análisis de Varianza de liberación en hexano (t<sub>14</sub>) para el diseño Box-Behnken de quercetina con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	178,605	1	178,605	3,67	0,1135
B:Relación	143,651	1	143,651	2,95	0,1463
C:Capsul	4090,6	1	4090,6	84,11	<b>0,0003</b>
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	<b>0,0012</b>
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

**Tabla 1.3** Análisis de Varianza de eficiencia de encapsulación para el diseño Box-Behnken de naringenina con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	2,18405	1	2,18405	1,13	0,3991
B:Relación	240,024	1	240,024	124,21	0,0080
C:Capsul	6,88205	1	6,88205	3,56	0,1998
AA	19,5535	1	19,5535	10,12	0,0862
AB	2,29523	1	2,29523	1,19	0,3896
AC	1,19902	1	1,19902	0,62	0,5134
BB	63,3229	1	63,3229	32,77	0,0292
BC	0,087025	1	0,087025	0,05	0,8516
CC	37,8979	1	37,8979	19,61	0,0474
Falta de ajuste	30,642	3	10,214	5,29	0,1632
Error puro	3,8648	2	1,9324		
Total (corr.)	415,22	14			

R-cuadrada = 91,6895 por ciento  
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 76,7306 por ciento  
 Error estándar del est. = 1,39011  
 Error absoluto medio = 1,34667  
 Estadístico Durbin-Watson = 1,87221 (P=0,2174)  
 Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,0169698

**Tabla 1.4** Análisis de Varianza de liberación en hexano (t<sub>14</sub>) para el diseño Box-Behnken de naringenina con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,55125	1	0,55125	0,02	0,9099
B:Relación	158,42	1	158,42	4,70	0,1624
C:Capsul	10146,0	1	10146,0	301,13	0,0033
AA	31,951	1	31,951	0,95	0,4329
AB	28,6225	1	28,6225	0,85	0,4540
AC	0,04	1	0,04	0,00	0,9756
BB	3,81641	1	3,81641	0,11	0,7685
BC	3,0625	1	3,0625	0,09	0,7915
CC	3650,14	1	3650,14	108,33	0,0091
Falta de ajuste	230,827	3	76,9425	2,28	0,3190
Error puro	67,3867	2	33,6933		

Total (corr.) 14293,8 14

R-cuadrada = 97,9137 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 94,1583 por ciento

Error estándar del est. = 5,8046

Error absoluto medio = 3,58111

Estadístico Durbin-Watson = 2,2481 (P=0,4638)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,251755

**Tabla 1.5** Análisis de Varianza de eficiencia de encapsulación para el diseño Box-Behnken de epicatequina con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	3,08761	1	3,08761	0,09	0,7790
B:Relación	184,128	1	184,128	5,23	0,0709
C:Capsul	1510,58	1	1510,58	42,91	0,0012
AA	88,9843	1	88,9843	2,53	0,1728
AB	6,83823	1	6,83823	0,19	0,6778
AC	0,1681	1	0,1681	0,00	0,9476
BB	49,641	1	49,641	1,41	0,2884
BC	13,727	1	13,727	0,39	0,5597
CC	237,738	1	237,738	6,75	0,0483
Error total	176,037	5	35,2074		
Total (corr.)	2228,81	14			

R-cuadrada = 92,1017 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 77,8849 por ciento

Error estándar del est. = 5,93358

Error absoluto medio = 3,01711

Estadístico Durbin-Watson = 1,74485 (P=0,1547)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,0982355

**Tabla 1.6** Análisis de Varianza de liberación en hexano ( $t_{14}$ ) para el diseño Box-Behnken de epicatequina con inulina como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	539,726	1	539,726	48,67	0,0199
B:Relación	171,125	1	171,125	15,43	0,0591
C:Capsul	5485,76	1	5485,76	494,71	0,0020
AA	275,948	1	275,948	24,89	0,0379
AB	0,112225	1	0,112225	0,01	0,9290
AC	3,0276	1	3,0276	0,27	0,6534
BB	341,88	1	341,88	30,83	0,0309
BC	331,786	1	331,786	29,92	0,0318
CC	303,413	1	303,413	27,36	0,0347
Falta de ajuste	355,845	3	118,615	10,70	0,0867

Error puro	22,1778	2	11,0889
Total (corr.)	7884,99	14	

R-cuadrada = 95,2058 por ciento  
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 86,5762 por ciento  
Error estándar del est. = 3,33  
Error absoluto medio = 4,449  
Estadístico Durbin-Watson = 2,08887 (P=0,3506)  
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,166963

## ANEXO 2

**Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación (EE) y liberación de flavonoides ( $t_{28}$ ) para el diseño Box-Behnken de Q, N y E con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante**

**Tabla 2.1** Análisis de Varianza de eficiencia de encapsulación para el diseño Box-Behnken de quercetina con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	6,125	1	6,125	1,21	0,3217
B:Relación	1,05125	1	1,05125	0,21	0,6679
C:Capsul	3,25125	1	3,25125	0,64	0,4595
AA	134,033	1	134,033	26,44	0,0036
AB	0,4225	1	0,4225	0,08	0,7844
AC	0,1225	1	0,1225	0,02	0,8825
BB	245,252	1	245,252	48,39	0,0009
BC	3,61	1	3,61	0,71	0,4372
CC	165,748	1	165,748	32,70	0,0023
Error total	25,3425	5	5,0685		
Total (corr.)	514,173	14			

R-cuadrada = 95,0712 por ciento  
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 86,1994 por ciento  
Error estándar del est. = 2,25133  
Error absoluto medio = 1,14  
Estadístico Durbin-Watson = 2,58884 (P=0,7098)  
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,398448

**Tabla 2.2** Análisis de Varianza de liberación en hexano ( $t_{28}$ ) para el diseño Box-Behnken de quercetina con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Relación	5,78	1	5,78	20,69	0,0061
B:Capsul	7,605	1	7,605	27,23	0,0034
C:Temperatura	1,28	1	1,28	4,58	0,0852
AA	2,10006	1	2,10006	7,52	0,0407
AB	0,1225	1	0,1225	0,44	0,5371
AC	0,9025	1	0,9025	3,23	0,1322
BB	2,96314	1	2,96314	10,61	0,0225
BC	0,5625	1	0,5625	2,01	0,2151
CC	0,0877564	1	0,0877564	0,31	0,5993
Total error	1,39667	5	0,279333		
Total (corr.)	23,2293	14			

R-cuadrada = 93,9875 percent

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 83,165 percent

Error estándar del est. = 0,52852

Error absoluto medio = 0,255556

Estadístico Durbin-Watson = 3,27302 (P=0,9809)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,674722

**Tabla 2.3** Análisis de Varianza de eficiencia de encapsulación para el diseño Box-Behnken de naringenina con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	142,13	1	142,13	27,79	0,0033
B:Relación	24,0818	1	24,0818	4,71	0,0821
C:Capsul	0,03645	1	0,03645	0,01	0,9360
AA	76,0485	1	76,0485	14,87	0,0119
AB	54,3169	1	54,3169	10,62	0,0225
AC	40,1956	1	40,1956	7,86	0,0378
BB	21,3268	1	21,3268	4,17	0,0966
BC	46,5124	1	46,5124	9,09	0,0296
CC	0,272503	1	0,272503	0,05	0,8266
Error total	25,5703	5	5,11406		
Total (corr.)	426,765	14			

R-cuadrada = 94,0083 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 83,2233 porciento

Error estándar del est. = 2,26143

Error absoluto medio = 1,18578

Estadístico Durbin-Watson = 1,55754 (P=0,0854)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,196909

**Tabla 2.4** Análisis de Varianza de liberación en hexano ( $t_{28}$ ) para el diseño Box-Behnken de naringenina con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Relación	2,645	1	2,645	1,01	0,3614
B:Capsul	69,0313	1	69,0313	26,32	<b>0,0037</b>
C:Temperatura	0,06125	1	0,06125	0,02	0,8845
AA	0,107756	1	0,107756	0,04	0,8474
AB	6,76	1	6,76	2,58	0,1693
AC	1,96	1	1,96	0,75	0,4269
BB	32,0416	1	32,0416	12,22	<b>0,0174</b>
BC	0,7225	1	0,7225	0,28	0,6221
CC	2,10006	1	2,10006	0,80	0,4119
Total error	13,1142	5	2,62283		
Total (corr.)	129,909	14			

R-cuadrada = **89,9051** percent

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **71,7344** percent

Error estándar del est. = **1,61952**

Error absoluto medio = **0,767778**

Estadístico Durbin-Watson = 2,84896 (P=0,8595)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,498937

**Tabla 2.5** Análisis de Varianza de eficiencia de encapsulación para el diseño Box-Behnken de epicatequina con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Relación	45,125	1	45,125	3,32	0,1281
B:Capsul	53,5613	1	53,5613	3,94	0,1039
C:Temperatura	136,951	1	136,951	10,08	<b>0,0247</b>
AA	7,5416	1	7,5416	0,55	0,4899
AB	0,01	1	0,01	0,00	0,9794
AC	2,89	1	2,89	0,21	0,6641
BB	17,8031	1	17,8031	1,31	0,3043
BC	44,2225	1	44,2225	3,25	0,1311
CC	380,079	1	380,079	27,96	<b>0,0032</b>
Total error	67,9642	5	13,5928		
Total (corr.)	758,177	14			

R-cuadrada = **91,0358** percent

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **74,9004** percent

Error estándar del est. = **3,68685**

Error absoluto medio = **1,91222**

Estadístico Durbin-Watson = 2,75358 (P=0,8107)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,455387

**Tabla 2.6** Análisis de Varianza de liberación en hexano ( $t_{28}$ ) para el diseño Box-Behnken de epicatequina con hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul<sup>®</sup> como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Relación	2,88	1	2,88	12,69	0,0162
B:Capsul	0,5	1	0,5	2,20	0,1979
C:Temperatura	0,02	1	0,02	0,09	0,7785
AA	0,360577	1	0,360577	1,59	0,2632
AB	4,6225	1	4,6225	20,36	0,0063
AC	0,2025	1	0,2025	0,89	0,3883
BB	0,360577	1	0,360577	1,59	0,2632
BC	0,0025	1	0,0025	0,01	0,9205
CC	0,0467308	1	0,0467308	0,21	0,6690
Total error	1,135	5	0,227		
Total (corr.)	10,0493	14			

R-cuadrada = 88,7057 percent

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 68,376 percent

Error estándar del est. = 0,476445

Error absoluto medio = 0,22

Estadístico Durbin-Watson = 2,86344 (P=0,8662)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,449339

### ANEXO 3

#### Análisis estadísticos de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando inulina como agente encapsulante con y sin la adición de agente canalizante

**Tabla 3.1** Análisis de Varianza para la eficiencia de encapsulación de los sistemas de micropartículas de flavonoides (Q, N y E) obtenidos bajo condiciones óptimas, utilizando inulina como agente encapsulante con y sin la adición de agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2066,01	5	413,202	165,64	0,0000
Intra grupos	14,9674	6	2,49457		
Total (Corr.)	2080,98	11			

**Tabla 3.2** Test de Tukey para comparar las diferencias en la eficiencia de encapsulación de los sistemas de micropartículas de flavonoides (Q, N y E) obtenidos bajo condiciones óptimas, utilizando inulina como agente encapsulante con y sin la adición de agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
N-(IN-C)	2	35,845	e
N-IN	2	42,855	d
Q-(IN-C)	2	61,75	c
Q-IN	2	63,55	bc
E-IN	2	69,365	ab
E-(IN-C)	2	69,935	a

N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; IN: inulina; C: Capsul® . \* Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 3.3** Análisis de Varianza para flavonoides totales de los sistemas de micropartículas de flavonoides (Q, N y E) obtenidos bajo condiciones óptimas, utilizando inulina como agente encapsulante con y sin la adición de agente canalizante

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	36,9731	5	7,39461	25,27	0,0006
Intra grupos	1,756	6	0,292667		
Total (Corr.)	38,7291	11			

**Tabla 3.4** Test de Tukey para comparar las diferencias en los flavonoides totales de los sistemas de micropartículas de flavonoides (Q, N y E) obtenidos bajo condiciones óptimas, utilizando inulina como agente encapsulante con y sin la adición de agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
N-IN	2	16,81	c
N-(IN-C)	2	17,59	bc
E-(IN-C)	2	19,65	ab
Q-(IN-C)	2	20,55	a
E-IN	2	20,78	a
Q-IN	2	21,7	a

N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; IN: inulina; C: Capsul® . \* Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 3.5** Análisis de Varianza para el porcentaje de recuperación de los sistemas de micropartículas de flavonoides (Q, N y E) obtenidos bajo condiciones óptimas, utilizando inulina como agente encapsulante con y sin la adición de agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	251,301	5	50,2602	6,96	0,0175
Intra grupos	43,3483	6	7,22472		
Total (Corr.)	294,649	11			

**Tabla 3.6** Test de Tukey para comparar las diferencias en el porcentaje de recuperación de los sistemas de micropartículas de flavonoides (Q, N y E) obtenidos bajo condiciones óptimas, utilizando inulina como agente encapsulante con y sin la adición de agente canalizante

Sistemas	Casos	Media	Grupos Homogéneos
N-IN	2	85,725	a
E-(IN-C)	2	85,75	a
E-IN	2	86,55	a
N-(IN-C)	2	94,115	a
Q-(IN-C)	2	94,6	a
Q-IN	2	96,4	a

N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; IN: inulina; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

#### ANEXO 4

##### Análisis estadísticos de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul como agente canalizante

**Tabla 4.1** Análisis de Varianza para la eficiencia de encapsulación de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	412,779	2	206,39	379,85	0,0002
Intra grupos	1,63005	3	0,54335		
Total (Corr.)	414,409	5			

**Tabla 4.2** Test de Tukey para comparar las diferencias en la eficiencia de encapsulación de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
N-(HPC-C)	2	55,535	c
E-(HPC-C)	2	68,33	b
Q-(HPC-C)	2	75,6	a

N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 4.3** Análisis de Varianza para flavonoides totales obtenidos después del proceso de secado de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	117,177	2	58,5884	804,42	0,0001
Intra grupos	0,2185	3	0,0728333		
Total (Corr.)	117,395	5			

**Tabla 4.4** Test de Tukey para comparar las diferencias en los flavonoides totales obtenidos después del proceso de secado de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
E-(HPC-C)	2	13,605	c
Q-(HPC-C)	2	17,1	b
N-(HPC-C)	2	24,225	a

N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 4.5** Análisis de Varianza para el porcentaje de recuperación de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	1267,24	2	633,62	409,63	0,0002
Intra grupos	4,64045	3	1,54682		
Total (Corr.)	1271,88	5			

**Tabla 4.6** Test de Tukey para comparar las diferencias en el porcentaje de recuperación de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
E-(HPC-C)	2	63,3	c
Q-(HPC-C)	2	88,5	b
N-(HPC-C)	2	97,675	a

N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

## ANEXO 5

### Análisis estadísticos de los ensayos de liberación en linoleato de metilo y en hexano de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando inulina como agente encapsulante y Capsul como agente canalizante

**Tabla 5.1** Análisis de Varianza para la constante de velocidad de liberación en linoleato de metilo del modelo de Peppas de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando inulina

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	37,5489	2	18,7744	359,51	0,0000
Intra grupos	0,313333	6	0,0522222		
Total (Corr.)	37,8622	8			

**Tabla 5.2** Test de Tukey para la constante de velocidad de liberación en linoleato de metilo del modelo de Peppas de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando inulina

Sistemas	Casos	Media	Grupos Homogéneos
N-IN	3	0,8	b
Q-IN	3	1,23333	b
E-IN	3	5,33333	a

N: naringenina; Q:quercetina; E: epicatequina; IN: inulina. \* Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 5.3** Análisis de Varianza para la constante de velocidad de liberación en linoleato de metilo del modelo de Higuchi de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando inulina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	66,6467	2	33,3233	315,69	0,0000
Intra grupos	0,633333	6	0,105556		
Total (Corr.)	67,28	8			

**Tabla 5.4** Test de Tukey para la constante de velocidad de liberación en linoleato de metilo del modelo de Higuchi de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando inulina

Sistemas	Casos	Media	Grupos Homogéneos
E-IN	3	1,36667	c
Q-IN	3	6,33333	b
N-IN	3	7,7	a

N: naringenina; Q:quercetina; E: epicatequina; IN: inulina

**Tabla 5.5** Análisis de Varianza para la constante de velocidad de liberación en hexano del modelo de Peppas de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando inulina como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12267,6	2	6133,79	366,66	0,0000
Intra grupos	100,373	6	16,7289		
Total (Corr.)	12367,9	8			

**Tabla 5.5** Test de Tukey para la constante de velocidad de liberación en hexano del modelo de Peppas de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando inulina como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
E-(IN-C)	3	16,6333	c
Q-(IN-C)	3	84,9	b
N-(IN-C)	3	102,133	a

N: naringenina; Q:quercetina; E: epicatequina; IN: inulina; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 5.6** Análisis de Varianza para la constante de velocidad de liberación en hexano del modelo de Higuchi de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando inulina como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	5246,24	2	2623,12	268,61	0,0000
Intra grupos	58,5935	6	9,76559		
Total (Corr.)	5304,83	8			

**Tabla 5.7** Test de Tukey para la constante de velocidad de liberación del modelo de Higuchi de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando inulina como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
E-(IN-C)	3	11,23	b
Q-(IN-C)	3	58,6667	a
N-(IN-C)	3	65,5333	a

N: naringenina; Q:quercetina; E: epicatequina; IN: inulina; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

## ANEXO 6

**Análisis estadísticos de los ensayos de liberación en linoelato de metilo de metilo y en hexano de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul como agente canalizante**

**Tabla 6.1** Análisis de Varianza para la constante de velocidad de liberación en linoelato de metilo del modelo de Peppas de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	356,43	2	178,215	1320,11	0,0000
Intra grupos	0,405	3	0,135		
Total (Corr.)	356,835	5			

**Tabla 6.2** Test de Tukey para la constante de velocidad de liberación en linoelato de metilo del modelo de Peppas de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<i>Sistemas</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Q-(HPC-C)	2	0,0	b
E-(HPC-C)	2	0,0	b
N-(HPC-C)	2	16,35	a

N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas.

**Tabla 6.3** Análisis de Varianza para la constante de velocidad de liberación en linoelato de metilo del modelo de Higuchi de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	12,4033	2	6,20167	45,94	0,0056
Intra grupos	0,405	3	0,135		
Total (Corr.)	12,8083	5			

**Tabla 6.4** Test de Tukey para la constante de velocidad de liberación en linoleato de metilo del modelo de Higuchi de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
Q-(HPC-C)	2	0,0	b
E-(HPC-C)	2	0,0	b
N-(HPC-C)	2	3,05	a

N: naringenina; Q:quercetina; E: epicatequina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 6.5** Análisis de Varianza para la constante de velocidad de liberación en hexano del modelo de Peppas de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	0,184033	2	0,0920167	15,25	0,0268
Intra grupos	0,0181	3	0,00603333		
Total (Corr.)	0,202133	5			

**Tabla 6.6** Test de Tukey para la constante de velocidad de liberación en hexano del modelo de Peppas de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
E-(HPC-C)	2	0,0	b
N-(HPC-C)	2	0,325	a
Q-(HPC-C)	2	0,405	a

N: naringenina; Q:quercetina; E: epicatequina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 6.7** Análisis de Varianza para la constante de velocidad de liberación en hexano del modelo de Higuchi de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	68,11	2	34,055	385,53	0,0002
Intra grupos	0,265	3	0,0883333		
Total (Corr.)	68,375	5			

**Tabla 6.8** Test de Tukey para la constante de velocidad de liberación en hexano del modelo de Higuchi de los sistemas de micropartículas de flavonoides obtenidos bajo condiciones óptimas utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante y Capsul® como agente canalizante

Sistemas	Casos	Media	Grupos Homogéneos
E-(HPC-C)	2	0,0	b
N-(HPC-C)	2	6,8	a
Q-(HPC-C)	2	7,45	a

N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

## ANEXO 7

### Efecto de los flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina sobre la estabilidad oxidativa de un modelo lipídico (linoleato de metilo) en condiciones aceleradas de oxidación

**Tabla 7.1** Análisis de Varianza para tiempo de inducción de linoleato de metilo con la adición de flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina (200 mg/Kg) en Rancimat a 60 °C

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	17675,3	3	5891,78	6105,47	0,0000
Intra grupos	3,86	4	0,965		
Total (Corr.)	17679,2	7			

**Tabla 7.2** Test de Tukey para tiempo de inducción de linoleato de metilo con la adición de flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina (200 mg/Kg) en Rancimat a 60 °C

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
N-LM	2	9,0	c
LM	2	9,7	c
Q-LM	2	85,8	b
E-LM	2	116,0	a

N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; LM: linoleato de metilo.

\* Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 7.3** Análisis de Varianza para factor de protección de linoleato de metilo con la adición de flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina (200 mg/Kg) en Rancimat a 60 °C

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	231,474	3	77,1579	12345,27	0,0000
Intra grupos	0,025	4	0,00625		
Total (Corr.)	231,499	7			

**Tabla 7.4** Test de Tukey para factor de protección de linoleato de metilo con la adición de flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina (200 mg/Kg) en Rancimat a 60 °C

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
LM	2	0,0	c
N-LM	2	0,0	c
Q-LM	2	8,95	b
E-LM	2	12,1	a

N: naringenina; Q: quercetina; E: epicatequina; LM: linoleato de metilo.

\* Letras distintas indican diferencias significativas

## ANEXO 8

### Efecto de los flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina encapsulados sobre la estabilidad oxidativa de un modelo lipídico (linoleato de metilo) en condiciones aceleradas de oxidación

**Tabla 8.1** Análisis de Varianza para tiempo de inducción de linoleato de metilo con la adición de flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina encapsulados (200 mg/Kg) en Rancimat a 60 °C

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	17464,0	6	2910,67	1149,49	0,0000
Intra grupos	17,725	7	2,53214		
Total (Corr.)	17481,8	13			

**Tabla 8.2** Test de Tukey para tiempo de inducción de linoleato de metilo con la adición de flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina encapsulados (200 mg/Kg) en Rancimat a 60 °C

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
LM	2	9,7	e
E-IN-LM	2	13,75	d
E-(IN-C)-LM	2	15,0	d
E-(HPC-C)-LM	2	19,85	d
Q-(HPC-C)-LM	2	36,65	c
Q-IN-LM	2	90,75	b
Q-(IN-C)-LM	2	99,25	a

N: naringenina; Q:quercetina; E: epicatequina; LM: linoleato de metilo; IN: inulina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 8.3** Análisis de Varianza para factor de protección de linoleato de metilo con la adición de flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina encapsulados (200 mg/Kg) en Rancimat a 60 °C

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	199,439	6	33,2398	1107,99	0,0000
Intra grupos	0,21	7	0,03		
Total (Corr.)	199,649	13			

**Tabla 8.4** Test de Tukey para factor de protección de linoleato de metilo con la adición de flavonoides quercetina, naringenina o epicatequina encapsulados (200 mg/Kg) en Rancimat a 60 °C

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
LM	2	0,0	e
E-IN-LM	2	1,45	d
E-(IN-C)-LM	2	1,55	d
E-(HPC-C)-LM	2	2,1	d
Q-(HPC-C)-LM	2	3,8	c
Q-IN-LM	2	9,4	b
Q-(IN-C)-LM	2	10,2	a

N: naringenina; Q:quercetina; E: epicatequina; LM: linoleato de metilo; IN: inulina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \* Letras distintas indican diferencias significativas

## ANEXO 9

### Análisis estadísticos de los sistemas de micropartículas de flavonoides utilizados en los ensayos de estabilidad oxidativa de linoleato de metilo

**Tabla 9.1** Análisis de Varianza para flavonoides totales después del proceso de secado (Q y E) utilizando inulina ó hidroxipropilcelulosa como agentes encapsulantes y Capsul® como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	50,0442	5	10,0088	67,86	0,0000
Intra grupos	0,885	6	0,1475		
Total (Corr.)	50,9292	11			

**Tabla 9.2** Test de Tukey para comparar las diferencias en los flavonoides totales después del proceso de secado, utilizando inulina ó hidroxipropilcelulosa como agentes encapsulantes y Capsul® como agente canalizante

Sistemas	Casos	Media	Grupos Homogéneos
E-(HPC-C)	2	14,9	c
E-(IN-C)	2	17,9	b
E-IN	2	18,8	ab
Q-IN	2	20,2	ab
Q-(HPC-C)	2	20,6	a
Q-(IN-C)	2	20,8	a

E: epicatequina; Q: quercetina; IN: inulina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \*Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 9.3** Análisis de Varianza para eficiencia de encapsulación de flavonoides (Q y E) utilizando inulina ó hidroxipropilcelulosa como agentes encapsulantes y Capsul® como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	419,634	5	83,9268	31,72	0,0003
Intra grupos	15,875	6	2,64583		
Total (Corr.)	435,509	11			

**Tabla 9.4** Test de Tukey para comparar las diferencias en eficiencia de encapsulación de flavonoides (Q y E), utilizando inulina ó hidroxipropilcelulosa como agentes encapsulantes y Capsul® como agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
Q-(IN-C)	2	58,35	d
Q-IN	2	61,05	cd
E-(HPC-C)	2	66,7	bc
Q-(HPC-C)	2	70,35	ab
E-IN	2	70,8	ab
E-(IN-C)	2	75,6	a

E: epicatequina; Q. quercetina; IN: inulina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \*Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 9.5** Análisis de Varianza para recuperación de flavonoides (Q y E) utilizando inulina ó hidroxipropilcelulosa como agentes encapsulantes y Capsul® como agente canalizante

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	1072,23	5	214,447	142,41	0,0000
Intra grupos	9,035	6	1,50583		
Total (Corr.)	1081,27	11			

**Tabla 9.6** Test de Tukey para comparar las diferencias en recuperación de flavonoides (Q y E), utilizando inulina ó hidroxipropilcelulosa como agentes encapsulantes y Capsul® como agente canalizante

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
E-(HPC-C)	2	69,0	c
E-(IN-C)	2	83,3	b
E-IN	2	87,4	b
Q-IN	2	92,95	a
Q-(HPC-C)	2	95,65	a
Q-(IN-C)	2	96,45	a

E: epicatequina; Q. quercetina; IN: inulina; HPC: hidroxipropilcelulosa; C: Capsul®. \*Letras distintas indican diferencias significativas

## ANEXO 10

### Actividades realizadas durante el desarrollo de la tesis doctoral.

10.1.- Pasantía Doctoral en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAN-CSIC), Madrid España (Noviembre 2013 a Marzo 2014).

10.2.- Publicaciones en revistas científicas

- Manuel Palma, Gloria Márquez-Ruiz, Francisca Holgado, Paz Robert. Effect of flavonoids on the oxidative stability of methyl linoleate under accelerated oxidation conditions (Trabajo enviado)

- Manuel Palma, Paula García, Gloria Márquez-Ruiz, Cristina Vergara, Paz Robert. 2014. Release kinetics of flavonoids in methyl linoleate from microparticles designed with inulin and channelizing agent. Food Research International, 64: 99-105. (Se adjunta trabajo).

- Robert P., García P., Palma M. 2013. Microencapsulación en la industria alimentaria. Tendencias, desafíos y mercado. Revista Indualimentos, volumen 82.

10.3.- Publicaciones en reuniones científicas

- Manuel Palma, Paula García, Paz Robert. Micropartículas de naringenina como antioxidante en sistemas lipídicos: cinética de liberación. XIX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 27-30 Octubre de 2013. Antofagasta Chile.

- Manuel Palma, Paula García, Paz Robert. Effect of the flavonoids structure, pore inducer and dissolution medium over the realease profile in different hydrophobic matrices. VI International Conference on polyphenols and health. 16-19 Octubre de 2013. Buenos Aires, Argentina.

- Manuel Palma, Paula García, Paula Jiménez, Aury Rodríguez, Paz Robert. Micropartículas de quercetina como antioxidante en sistemas hidrofóbicos. XV Congreso Latinoamericano y Exhibición sobre grasas y aceites. 20-23 Agosto de 2013. Santiago, Chile.