



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

“Microencapsulación de aceite de pescado mediante secado por atomización convencional y libre de agua: optimización y caracterización”

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

PATROCINANTE

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

DIRECTOR

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

DIRECTOR

Dra. Cristina Vergara Hinostroza
Center for Systems Biotechnology
Fraunhofer Chile Research

Claudia Paz Saavedra Aguilera

Santiago, Chile

2017

Tesis financiada por el proyecto FONDECYT N° 1151224

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todos los dones y días de vida que me ha dado.

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional durante todos mis años estudio. Por confiar en mis capacidades e incentivarlas a lo largo de mi vida. Por enseñarme a ser positiva frente a cualquier adversidad.

A mi patrocinante de memoria y directora de tesis, Dra. Paz Robert, por acogerme en su equipo de trabajo, por la confianza depositada en mí, su enseñanza, consejos, paciencia y tiempo.

A mi directora de tesis Dra. Cristina Vergara Hinostroza, por su disposición, empatía y ayuda desinteresada durante todo el desarrollo de mi tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Cristian Encina, Guibeth Morelo, Greys Lagos y Anita González por su apoyo y compañía durante todo este periodo.

A Dante, por su amor, compañía y comprensión en todos estos años de relación. Por creer en mí y apoyarme en todas mis decisiones, por celebrar los momentos felices y ver las dificultades de un modo más simple.

A mis amigas y compañeras de carrera Javiera Ávila, Camila Becerra, Camila Hernández, Camila Meza, Carolina Plaza y Catalina Urzúa, por su amistad y apoyo durante todos estos largos años de estudio. Por los consejos y anécdotas vividas, que quedarán en mi memoria para siempre.

A mis amigas del colegio Macarena Díaz, Javiera Bustamante, Magdalena Cifuentes, María Constanza Etchevers y Camila Zúñiga, por su amistad y compañía incondicional a lo largo de mi vida, sin importar la dirección que tomen nuestros caminos.

A mis familiares y parientes, por su interés y constante preocupación durante todos mis años de estudio.

A todos quienes de diferente manera colaboraron en el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica.....	2
2.1. Generalidades de los ácidos grasos del aceite de pescado.....	2
2.2. Microencapsulación.....	3
2.3. Secado por atomización.....	3
2.3.1. Secador por atomización convencional.....	4
2.3.1.1. Agentes encapsulantes.....	5
2.3.1.2. Emulsiones.....	6
2.3.2. Secador por atomización libre agua.....	7
3. Hipótesis.....	8
4. Objetivos.....	8
4.1. Objetivos generales.....	8
4.2. Objetivos específicos.....	8
5. Materiales y métodos.....	9
5.1. Lugar de trabajo.....	9
5.2. Materiales.....	9
5.3. Métodos.....	9
5.3.1. Caracterización química el aceite de pescado.....	9
5.3.1.1. Determinación de acidez libre.....	9
5.3.1.2. Determinación del índice de peróxidos.....	10
5.3.1.3. Determinación de compuestos polares.....	10
5.3.1.4. Composición en ácidos grasos por cromatografía de gases.....	10
5.3.2. Encapsulación de aceite de pescado por secado por atomización convencional (AP-HPC-C) y libre de agua (AP-HPC-AC), aplicando un diseño experimental compósito central más punto axial y la metodología de superficie de respuesta (MSR) para la optimización.....	11
5.3.2.1. Diseño experimental.....	11
5.3.2.2. Preparación de micropartículas.....	13
5.3.3. Caracterización física, química y morfológica las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización convencional y libre de agua.....	13
5.3.3.1. Aceite de pescado superficial.....	13

5.3.3.2. Aceite pescado total.....	14
5.3.3.3 Eficiencia de encapsulación (EE) del aceite de pescado y rendimiento del proceso.....	14
5.3.3.4. Morfología.....	14
5.3.3.5. Humedad.....	15
5.3.3.6. Actividad de agua.....	15
5.3.3.7. Higroscopicidad.....	15
5.3.3.8. Determinación de compuestos polares.....	15
5.3.3.9. Análisis estadístico.....	15
6. Resultados y discusión.....	16
6.1. Caracterización química del aceite de pescado.....	16
6.2. Encapsulación de aceite de pescado por secador por atomización.....	17
6.2.1. Diseño experimental para secado convencional.....	17
6.2.2. Diseño experimental para secado libre de agua.....	21
6.3. Caracterización física, química y morfológica de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización convencional y libre de agua.....	24
7. Conclusiones.....	30
8. Referencias.....	31
9. Anexos.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equipo de secado por atomización.....	4
Figura 2. Estructura química de la hidroxipropilcelulosa (HPC).....	5
Figura 3. Diagrama de Pareto para la EE del sistema AP-HPC-C.....	18
Figura 4. Diagrama de Pareto para el rendimiento del sistema AP-HPC-C.....	18
Figura 5. Gráfico superficie de respuesta para la optimización del sistema AP-HPC-C....	19
Figura 6. Diagrama de Pareto para la EE del sistema AP-HPC-AC.....	22
Figura 7. Diagrama de Pareto para el rendimiento del sistema AP-HPC-AC.....	22
Figura 8. Grafico superficie de respuesta para la optimización del sistema AP-HPC-AC.....	23
Figura 9. Mecansimo de interacción emulsión-polímero en sistemas AP-HPC-C y triglicérido-polímero en AP-HPC-AC.....	26
Figura 10. Microfotografías SEM para los sistemas AP-HPC-C. (A) Magnitud: 5.000x y (B) Magnitud: 20.000x.....	28
Figura 11. Microfotografías SEM para los sistemas AP-HPC-AC. (A) Magnitud: 5.000x y (B) Magnitud: 20.000x.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales del diseño composito central más punto axial para la elaboración de micropartículas de aceite de pescado por el método de secado por atomización convencional (AP-HPC-C).....	12
Tabla 2. Condiciones experimentales del diseño composito central más punto axial para la elaboración de micropartículas de aceite de pescado por el método de secado por atomización convencional (AP-HPC-AC).....	12
Tabla 3. Características químicas del aceite de pescado y composición en ácidos grasos.....	14
Tabla 4. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y rendimiento para el diseño composito central del sistema AP-HPC-C.....	17
Tabla 5. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y rendimiento para el diseño composito central del sistema AP-HPC-C.....	21
Tabla 6. Caracterización de las micropartículas de los sistemas AP-HPC-C y AP-HPC-AC, obtenidas bajo condiciones óptimas.....	24

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Determinación del porcentaje de compuestos polares por cromatografía en columna abierta (IUPAC 2000, Método 2.507).....	38
Anexo 2. Análisis de varianza para la eficiencia de encapsulación y el rendimiento del diseño experimental para el sistema AP-HPC-C.....	40
Anexo 4. Análisis de varianza para la eficiencia de encapsulación y el rendimiento del diseño experimental para el sistema AP-HPC-AC.....	41
Anexo 5. Análisis de varianza para caracterización de micropartículas para sistemas AP-HPC-C y AP-HPC-AC.....	42

RESUMEN

Los aceites de origen marino, como el aceite de pescado (AP), son la principal fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega 3 (AGPCL n-3), como el EPA y DHA. Múltiples estudios han confirmado sus efectos positivos en la salud de los seres humanos. No obstante, estos AGPCL son altamente susceptibles a oxidación, lo que genera sabores y olores no deseables.

La microencapsulación de AP, se presenta como una alternativa para retardar la oxidación de los AGPCL y así aumentar la vida útil del AP. Además, de esta manera, se puede limitar y controlar la liberación de sabores y olores desagradables hacia los alimentos que lo contienen. La literatura señala al secado por atomización convencional (C) como el método más utilizado para encapsular aceite de pescado. Sin embargo, presenta algunas desventajas, como el uso de altas temperaturas aumentaría la oxidación del AP. En este contexto, el secado por atomización libre de agua; acetona en esta tesis (AC) permite utilizar bajas temperaturas y nitrógeno como gas de secado.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la encapsulación del AP, utilizando hidroxipropilcelulosa (HPC) como agente encapsulante por secado por atomización convencional (AP-HPC-C) y secado por atomización libre de agua (AP-HPC-AC). Se aplicó un diseño experimental composito central más punto axial para la encapsulación de AP para el sistema AP-HPC-C y AP-HPC-AC. Las variables independientes fueron la temperatura del aire de entrada al secador y la relación AP/HPC, mientras que las variables dependientes fueron la eficiencia de encapsulación (EE) del aceite de pescado y el rendimiento del proceso. Para esto, se llevaron a cabo doce experimentos para cada sistema. Se aplicó metodología de superficie respuesta para determinar las condiciones óptimas de elaboración de las micropartículas. La temperatura del aire de entrada al secador óptima para el sistema AP-HP-C-C (200°C) fue significativamente mayor al sistema AP-HPC-AC (78°C), mientras que la relación AP/HPC fue de 1:4,3 en ambos sistemas.

Las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas fueron caracterizadas, evaluando los parámetros de EE, rendimiento, humedad, aw, higroscopicidad, compuestos polares y morfología por SEM. La EE fue significativamente mayor para el sistema AP-HPC-AC (90,5 %) respecto al sistema AP-HPC-C (69,3 %), indicando que el mecanismo de interacción triglicérido-HPC en el sistema AP-HPC-AC mejora la EE.

SUMMARY

"Microencapsulation of fish oil by conventional spray-drying and water free spray-drying: optimization and characterization"

Oils of marine origin, such as fish oil (FO), are the main source of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LCPUFA n-3), such as EPA and DHA. Multiple studies have confirmed its positive effects on the health of humans. However, these LCPUFAs are highly susceptible to oxidation, which generates undesirable flavors and odors.

The microencapsulation of the FO, is presented as an alternative to delay the oxidation of the LCPUFAs and thus increase the useful life of the product. In addition, in this way, the release of unpleasant flavors and odors can be limited and controlled towards the foods containing them. The literature points to conventional spray-drying (C) as the most widely used method for encapsulating fish oil. However, it has some disadvantages, as the use of high temperatures would increase the oxidation of the FO. In this context, spray-drying water free; acetone in this thesis (AC) allows to use low temperatures and nitrogen as drying gas.

The aim of this work was to study the encapsulation of AP using hydroxypropyl cellulose (HPC) as a conventional spray-drying (FO-HPC-C) and spray-drying water free (FO-HPC-AC) encapsulating agent. An experimental central composite design plus axial point for AP encapsulation for the FO-HPC-C and FO-HPC-AC systems was applied. The independent variables were the air inlet temperature and the FO/HPC ratio, while the dependent variables were the encapsulation efficiency (EE) of the fish oil and the yield of the process. For this, twelve experiments were carried out for each system. Surface response methodology was applied to determine optimal microparticle processing conditions. The optimum dryer air temperature for the AP-HPC-C system (200°C) was significantly higher than the AP-HPC-AC system (78°C), while the AP / HPC ratio was 1: 4.3 in both systems.

The microparticles obtained under optimum conditions were characterized, evaluating the parameters of EE, moisture, a_w , hygroscopicity, polar compounds and SEM morphology. The EE was significantly higher for the FO-HPC-AC system (90,5 %) than the FO-HPC-C system (69,3 %), indicating that the triglyceride-HPC interaction mechanism in the FO-HPC-AC improves the EE.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades crónicas no transmisibles, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, constituyen las primeras causas de muerte en el país (MINSAL, 2015). La alimentación cumple un rol fundamental en la salud y en la incidencia de estas patologías, es por esto, que las autoridades recomiendan mantener una dieta equilibrada en nutrientes y un estilo de vida saludable para reducir el riesgo de padecerlas (Socarrás y Bolet, 2010).

De acuerdo a lo anterior, se han realizado múltiples estudios que han confirmado los importantes beneficios que tiene el consumo de aceites de origen marino, en la salud de los seres humanos. El aceite de pescado es la principal fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega 3 (AGPICAL n-3), como el EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico), nutrientes esenciales responsables de la protección de la salud cardiovascular y de la función del sistema nervioso, respectivamente (Valenzuela y Sanhueza, 2009). Sin embargo, el aceite de pescado es susceptible a la oxidación lipídica por efecto de las condiciones del medio ambiente (luz, agua, temperatura y oxígeno) y condiciones del alimento (pH y enzimas), lo que provoca sabores y olores indeseados. Esto último, se ha transformado en uno de los principales problemas para la industria alimentaria.

Una alternativa para superar estas dificultades es la tecnología de encapsulación, que retarda la autooxidación de aceite de pescado, mejorando su estabilidad, prolongando su vida útil y enmascarando su sabor, además permite controlar la liberación del aceite una vez incorporado en los alimentos. Una de las técnicas comunes para elaborar productos encapsulados, es el secado por atomización, éste implica la conversión de aceites líquidos en forma de emulsiones en polvos.

La encapsulación de aceite de pescado mediante secado por atomización convencional requiere la preparación de emulsiones aceite en agua (O/W). Mientras que, el método de secado por atomización libre de agua utiliza solventes orgánicos (acetona en este proyecto) como medio dispersante del agente activo y nitrógeno como gas de secado. Cabe destacar, que el método de secado por atomización libre de agua emplea nitrógeno y bajas temperaturas del aire de entrada al secador, lo que reduce la oxidación de los lípidos durante el proceso.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades de los ácidos grasos del aceite de pescado.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (AGPICL n-3) son componentes dietarios que participan en múltiples procesos fisiológicos, donde cumplen un rol estructural en los fosfolípidos de las membranas celulares, y además, son sustratos para una serie de derivados lipídicos que ejercen importantes acciones en el metabolismo celular. Dentro de los AGPICL se encuentran dos grupos principales; los ácidos grasos omega-3 (n-3) y omega-6 (n-6) (Burr y Burr, 1930). La fuente nutricional de los ácidos grasos omega-3, ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3, EPA) y ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA) son de origen marino como pescados grasos (atún, jurel, salmón) y microalgas (Simopoulos, 2010; Valenzuela y Sanhueza, 2009). También se pueden obtener desde su precursor en el organismo, el ácido alfa-linolénico n-3 (ALA, C18:3 n-3), que a través de las enzimas desaturasas y elongasas se puede convertir en EPA y posteriormente, en DHA (Valenzuela *et al.*, 2011). No obstante, la conversión a partir de éste es muy baja (5-10% para EPA y 1-5% para DHA) (Kralovec *et al.*, 2012), por lo que, la ingesta de EPA y DHA a través de la dieta es fundamental.

El EPA y el DHA han sido el foco de interés de un gran número de investigaciones producto de sus bien caracterizados efectos antiinflamatorios y citoprotectores (Simopoulos, 2002; Trebble *et al.*, 2003; Wanten y Calder, 2007). La evidencia clínica y epidemiológica de varios estudios permite establecer que el consumo de EPA y DHA puede contribuir a la prevención y/o tratamiento de una serie de patologías, especialmente aquellas donde la inflamación juega un papel preponderante en su desarrollo (Valenzuela *et al.*, 2011). Los efectos antiinflamatorios de estos ácidos grasos incrementan el metabolismo de las grasas en el organismo del ser humano, disminuyendo los niveles de triglicéridos circulantes y aumentando los niveles de colesterol HDL (colesterol bueno) (Gatica, 2011). De manera individual, el DHA contribuye en la función sináptica (Coronado *et al.*, 2006) y tiene un efecto neuroprotector (Valenzuela *et al.*, 2011). Asimismo, el EPA posee efectos benéficos sobre enfermedades cardiovasculares (Valenzuela *et al.*, 2011).

Una característica importante de los ácidos grasos EPA y DHA, debido a su alto grado de insaturación, es su alta susceptibilidad a la oxidación, lo que produce rancidez y el indeseable “sabor a pescado” (Frankel *et al.*, 2002). Esto ha sido una limitante para el desarrollo masivo de alimentos enriquecidos en EPA y DHA. Es por ello, que la tecnología

de encapsulación de aceite de pescado, es una alternativa para superar estas dificultades (Gatica, 2011; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

2.2. Microencapsulación.

La microencapsulación es una técnica mediante la cual compuestos activos sólidos, líquidos o gaseosos se introducen en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de proteger los compuesto activos del medioambiente, de su interacción con otros componentes de los alimentos o bien para controlar su liberación (Yáñez *et al.*, 2002). A través de esta técnica, es posible incluir sustancias que originalmente no eran viables en ciertas matrices alimentarias. La cubierta proporciona una barrera física entre el material del núcleo y los compuestos presentes en el alimento en cuestión. Dicho revestimiento confiere protección y varias ventajas para la inclusión de ingredientes, como: proteger el material activo de la degradación producida por el medio ambiente (temperatura, oxígeno, luz, humedad), reducir la migración del material encapsulado hacia el exterior, proporcionar un manejo más fácil del ingrediente, transformar compuestos líquidos en sólidos, enmascarar el sabor y olor del material, entre otros (Astray *et al.*, 2009; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

En la actualidad existen diversas técnicas para microencapsular compuestos activos, donde la selección del método dependerá de la aplicación deseada para las micropartículas, tamaño de partícula requerido, los costos asociados, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y del activo (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Dichas técnicas de microencapsulación se pueden dividir en procesos químicos y físicos. Dentro de los primeros se encuentra la coacervación, co-cristalización, polimerización interfacial, gelificación iónica y atrapamiento por liposomas, entre otros. Mientras que en los métodos físicos está la extrusión, el secado por congelamiento/enfriamiento y el secado por atomización, entre otros (Madene *et. al.*, 2006; Yañez *et al.*, 2002), siendo este último el más utilizado en la industria de alimentos para encapsular compuestos activos y proteger materiales, de forma económica, simple y continua.

2.3. Secado por atomización.

El secado por atomización es una operación unitaria por la cual un líquido (solución, emulsión o dispersión) es atomizado en pequeñas gotas a través de un flujo de aire caliente, evaporando el solvente (agua), produciendo instantáneamente un polvo (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Gibbs *et al.*, 1999; Desai y Park, 2005). En la Figura 1 se muestra el equipo tipo que se utiliza en escala de laboratorio. Dentro de las variables que

se estudian en secado por atomización destacan por su importancia variables de proceso (temperatura de entrada y de salida del aire, y temperatura de alimentación) y de formulación (relación activo/agente encapsulante), que inciden en la propiedades y estabilidad de las micropartículas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).



Figura 1. Equipo de secado por atomización.

2.3.1 Secado por atomización convencional.

En el proceso de secado por atomización el agente encapsulante debe ser principalmente soluble en agua o al menos dispersables en agua, y la alimentación debe ser preparada de tal manera que el compuesto activo pueda solubilizarse, dispersarse o emulsificarse (Gouin, 2004; Gharsallaoui *et al.*, 2007). En el caso en que el compuesto activo es aceite de pescado, requiere de una etapa inicial de preparación de una emulsión aceite en agua (O/W), donde las gotas de aceite están dispersas en una fase continua de agua para poder ser alimentada en el secador por atomización (Aghbashlo *et al.*, 2013b; Drusch, 2006; Drusch *et al.*, 2006; Keogh *et al.*, 2001). En general, en secado por atomización como método de encapsulación se utilizan generalmente altas temperaturas y aire como gas de secado, por lo que compuestos bioactivos muy sensibles a la temperatura se degradan. Una alternativa que se presenta es la utilización de secado por atomización libre de agua, método en el cual se utilizan bajas temperaturas y nitrógeno como gas de secado.

2.3.1.1 Agentes encapsulantes.

Los agentes encapsulantes pueden seleccionarse a partir de una amplia gama de polímeros naturales y sintéticos, dependiendo del material a encapsular y de las características deseadas en el producto final. Frecuentemente, en el secado por atomización se utilizan dispersiones acuosas como alimentación, por lo tanto, el agente encapsulante (AE) debería tener un alto grado de solubilidad, una baja viscosidad en soluciones concentradas, buenas propiedades emulsificantes para activos hidrofóbicos, capacidad para formar films, y además debería ser inerte, de bajo costo y no higroscópico (Murúa-Pagola et al., 2009).

Para encapsulación de aceite de pescado por secado por atomización se han utilizado diferentes agentes encapsulantes, tales como maltodextrina (Mehrad et al., 2015; Aghbashlo et al., 2012a), goma arábica y carboximetilcelulosa (Patrick et al., 2013), jarabe de glucosa (Morales-Medina, 2016; Serfert et al., 2009), quitosano (Shaw et al., 2007), leche descremada en polvo (Aghbashlo et al., 2013b; Aghbahshlo et al. 2012a) y metilcelulosa (Kolanowski et al., 2006; Davidov-Pardo et al., 2008), entre otros.

El agente encapsulante seleccionado para este estudio es la hidroxipropilcelulosa (HPC) (Figura 2), un éter hidroxi-propil de celulosa tensioactivo no iónico, preparado por reacción de óxido de propileno y celulosa alcalina (Rowe et al., 2009). En la industria de los alimentos se utiliza principalmente como emulsificante, formador de películas, coloide protector, estabilizador, agente de suspensión o espesante, y posee aprobación de la FDA para consumo humano. La HPC es soluble en agua por debajo de 40 °C y en disolventes polares orgánicos (Furia, 1973). Debido a estas características y por sus propiedades de solubilidad, se utilizará en esta investigación para poder hacer una comparación entre el secado por atomización convencional y el libre de agua.

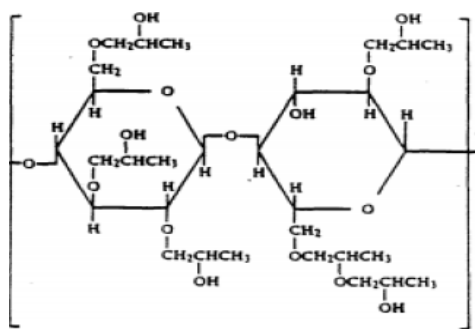


Figura 2. Estructura química de la hidroxipropilcelulosa (HPC).

2.3.1.2. Emulsiones.

Las emulsiones se definen como mezclas coloidales que constan de dos fluidos inmiscibles entre sí, donde uno de ellos se encuentra disperso en el otro en forma de gotas muy finas, y este sistema se encuentra estabilizado mediante un agente emulgente (McClements, 2005). La fase que está presente como finas gotas se conoce como fase dispersa y la fase en la cual están suspendidas las gotas se conoce como fase continua. Las emulsiones se dividen comúnmente en dos tipos: aceite en agua (O/W, por sus siglas en inglés y agua en aceite (W/O, por sus siglas en inglés). Las emulsiones O/W se forman cuando la fase oleosa está dispersa en la fase continua acuosa, en cambio, en las emulsiones W/O, la fase acuosa está dispersa y la fase oleosa sirve como fase continua (Gómez y Jiménez, 2014).

Se hace necesario el uso de un emulsificante, para crear una emulsión estable en el tiempo, dado que son moléculas de carácter anfipática y superficialmente activas capaces de ser absorbidas en la superficie de las gotas recién formadas en la homogenización, bajando la tensión superficial de éstas, lo que conlleva a facilitar la disminución del tamaño de la gota. Además, las moléculas emulsificantes ayudan a formar una película protectora que previene la agregación de las gotas (McClements, 2005). Al minimizar el tamaño de gota de la emulsión, aumenta la estabilidad de ésta, aumenta la retención de aceite y la eficiencia de encapsulación, mientras que, el aceite no encapsulado superficial, el cual tiende a sufrir deterioro oxidativo, disminuye (Drusch, 2006; Jafari *et al.*, 2008; Drusch *et al.*, 2006).

Las proteínas de la leche y la gelatina son comúnmente utilizadas para la microencapsulación de ingredientes funcionales de alimentos, como el aceite de pescado, mediante secado por pulverización (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Las dos principales proteínas de la leche, proteínas del suero y caseínas, son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria debido a su excelente actividad superficial y, a su capacidad para facilitar la formación y estabilización de emulsiones de aceite en agua (Dickinson, 1997). Durante la formación de la emulsión, las moléculas de proteína se adsorben rápidamente en la interface recién formada aceite-agua, y la capa de estabilización estérica resultante evita la coalescencia de las gotitas de aceite y proporciona estabilidad física a la emulsión (Vega y Ross, 2006).

2.3.2 Secado por atomización libre de agua.

El secado por atomización libre de agua utiliza solventes orgánicos, como etanol, metanol, acetona, entre otros, para disolver las moléculas hidrofóbicas, evitando la preparación previa de una emulsión. Posteriormente, la disolución es secada a baja temperatura, utilizando nitrógeno como gas de secado (Duan *et al.*, 2013; Serfert *et al.*, 2009). Este método tiene una ventaja respecto al método convencional, ya que el uso de nitrógeno y las bajas temperaturas disminuyen la oxidación del aceite de pescado durante el proceso de encapsulación (Serfert *et al.*, 2009).

Además, los solventes cuyo punto de ebullición son bajos, son fáciles de evaporar, resultando mayor rendimiento de producción de sólido. La selección del solvente debe ser llevado a cabo bajo ciertos criterios, como: el punto de ebullición, la solubilidad del activo y polímero, la toxicidad y la constante dieléctrica. Este último es considerado uno de los más importantes y la adición de un co-disolvente puede aumentar la solubilidad de moléculas hidrofóbicas mediante la reducción de la constante dieléctrica, aumentando de esta forma la solubilidad de la alimentación (Patel *et al.*, 2014). Por otra parte, si el agente encapsulante y el compuesto activo son solubles en el solvente utilizado, permite evitar la preparación de una emulsión como solución de alimentación.

3. HIPÓTESIS

El aceite de pescado encapsulado mediante secado por atomización libre de agua (acetona) tiene una mayor eficiencia de encapsulación, respecto al aceite de pescado encapsulado por secado convencional.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Generales:

Encapsular aceite de pescado por secado por atomización convencional y libre de agua (acetona), utilizando hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante, optimizar y caracterizar ambos métodos.

4.2. Objetivos Específicos:

1. Caracterizar químicamente el aceite de pescado.
2. Estudiar la encapsulación de aceite de pescado por secado por atomización convencional (AP-HPC-C) y libre de agua (AP-HPC-AC), aplicando un diseño experimental compósito central más punto axial y la metodología de superficie de respuesta (MSR) para la optimización.
3. Caracterizar física, química y morfológicamente las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización convencional y libre de agua (acetona).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de trabajo:

La parte experimental de esta investigación se realizó en el Laboratorio de Química de Alimentos del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

5.2. Materiales:

- Agente encapsulante: Hidroxipropilcelulosa (HPC) (Klucel EF), adquirida en laboratorios Recalcine.
- Aceite de Pescado (AP), omega 3 línea funcional forte donada por la empresa Spes.
- Lecitina de Soya (Epikuron 145 V), adquirida en Cargill.

5.3. Métodos:

5.3.1. Caracterización química el aceite de pescado.

El aceite de pescado se caracterizó, determinando: acidez libre, índice de peróxidos, composición en ácidos grasos por cromatografía de gases y compuestos polares.

5.3.1.1. Determinación de acidez libre.

La determinación de la acidez libre en el aceite de pescado, se realizó de acuerdo al método Ca 5a-40 (AOCS, 1993). Se pesaron 10 g de aceite de pescado en un matraz erlenmeyer de 250 mL. Se agregaron 50 mL de etanol al 95% a 70°C (neutralizado previamente con NaOH 0,1 N). Luego, se agregaron gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0,1N, hasta la aparición del primer color rosado permanente durante 30 segundos. El resultado se expresó como porcentaje de ácido oleico, según la ecuación 1:

$$Acidez [\%] = \frac{V_{NaOH} [mL] \times N_{NaOH} \times 28,2}{P[g]} \quad (1)$$

Donde:

V: Volumen gastado de hidróxido de sodio en la titulación.

N: Normalidad del hidróxido de sodio.

P: Peso de la muestra [g].

5.3.1.2. Determinación del índice de peróxidos.

La determinación del índice de peróxido en el aceite de pescado, se realizó de acuerdo al método Cd 8-53 (AOCS, 1993). Se pesaron 5 g de aceite en un balón de 250 mL con tapa esmerilada. Luego, se añadió 30 mL de solución ácido acético-cloroformo (3:2), agitando suavemente. Posteriormente, se añadió KI (3 g) y H₂O destilada (0,5 mL), el balón se tapó y agitó en oscuridad por 1 min e inmediatamente se trató con 30 mL de agua destilada. Se le añadió 0,5 mL de almidón, como indicador, y se tituló con tiosulfato de sodio 0,01N, empleando micro bureta, hasta la desaparición del color azul. El resultado se expresó según la ecuación 2:

$$IP \left[\frac{mEq O_2 \text{ peróxido}}{kg \text{ materia grasa}} \right] = \frac{V_1[mL] - V_0[mL] \times N \times 1000}{P [g]} \quad (2)$$

Donde:

V₀: Volumen de tiosulfato de sodio usado para el blanco [mL].

V₁: Volumen de tiosulfato de sodio usado en la muestra [mL].

N: Normalidad del tiosulfato de sodio.

P: Peso de la muestra [g].

5.3.1.3. Determinación de compuestos polares.

La determinación de compuestos polares se realizó de acuerdo al método 2.507 (IUPAC, 2000). Este método se basa en el fraccionamiento de una materia grasa a través de una columna de sílica activada, mediante elución con distintos solventes orgánicos (éter de petróleo y éter etílico), obteniendo dos fracciones de compuestos. La primera fracción correspondió a los triglicéridos no alterados y la segunda a los triglicéridos alterados o compuestos polares (Anexo 1).

5.3.1.4. Composición en ácidos grasos por cromatografía de gases.

Se realizó la conversión previa de los ácidos grasos a ésteres metílicos mediante saponificación de la muestra de aceite de pescado, con KOH en metanol, empleando como catalizador de la metilación, una solución de trifluoruro de boro (BF₃) en metanol (12%), según la norma UNE-EN ISO 5509:2000 (AENOR, 2000). La identificación y cuantificación se determinó mediante un cromatógrafo de gases con detector de ionización por llama (Agilent Technologies 7890B) con columna capilar de sílica fundida H-88 (0,25 mm d.i. × 100 m largo, 0,20 μm de espesor de película, Supelco, USA). La temperatura del inyector y detector fue programada a 250 °C, mientras que la temperatura

del horno se fijó inicialmente a 180°C y se mantuvo por 20 minutos, luego se incrementó a 215°C con un ajuste de 2°C/min. La temperatura final se mantuvo por 20 minutos. Se inyectó 1 µL de muestra. La identificación de los picos se realizó por comparación de los tiempos de retención de la muestra con un patrón de referencia de ácidos grasos conocido (GCL 569, Nu-Check prep). El perfil del aceite de pescado se expresó como porcentaje de ésteres metílicos. La cuantificación de EPA y DHA g/100g se realizó utilizando ácido tricosanoico (C23:0) como estándar interno, de acuerdo al método oficial AOCS Ce 1j-07 (AOCS, 2007).

5.3.2. Encapsulación de aceite de pescado por secado por atomización convencional (AP-HPC-C) y libre de agua (AP-HPC-AC), aplicando un diseño experimental compósito central más punto axial y metodología de superficie de respuesta (MSR) para la optimización.

5.3.2.1. Diseño experimental.

Se aplicó un diseño experimental composito central más punto axial para la encapsulación de aceite de pescado con HPC por secado por atomización convencional (AP-HPC-C) y libre de agua (AP-HPC-AC). Las variables independientes fueron la temperatura del aire de entrada al secador (154 - 196°C para secado convencional y 80 - 130°C para secado libre de agua) y la relación AP/HPC (1:1 - 1:4). Se consideró como variables de respuesta: la eficiencia de encapsulación (EE) del aceite de pescado y el rendimiento (Y) del proceso. Se realizaron doce experimentos para cada sistema. Las condiciones experimentales para la elaboración de micropartículas de los sistemas AP-HPC-C y AP-HPC-AC, se muestran en la Tabla 1 y en la Tabla 2, respectivamente. La optimización se realizó aplicando metodología de superficie respuesta obteniendo 2 óptimos.

Tabla 1. Condiciones experimentales del diseño composito central más punto axial para la elaboración de micropartículas de aceite de pescado por el método de secado por atomización convencional (AP-HPC-C).

Experimento	Temperatura [°C]	Relación AP/HPC
1	154	1:1
2	196	1:1
3	154	1:4
4	196	1:4
5	150	1:2,5
6	200	1:2,5
7	175	1:0,7
8	175	1:4,3
9	175	1:2,5
10	175	1:2,5
11	175	1:2,5
12	175	1:2,5

AP: aceite de pescado; HPC: hidroxipropilcelulosa.

Tabla 2. Condiciones experimentales del diseño composito central más punto axial para la elaboración de micropartículas de aceite de pescado por el método de secado por atomización convencional (AP-HPC-AC).

Experimento	Temperatura [°C]	Relación AP/HPC
1	80	1:1
2	130	1:1
3	80	1:4
4	130	1:4
5	75	1:2,5
6	135	1:2,5
7	105	1:0,7
8	105	1:4,3
9	105	1:2,5
10	105	1:2,5
11	105	1:2,5
12	105	1:2,5

AP: aceite de pescado; HPC: hidroxipropilcelulosa.

5.3.2.2. Preparación de las micropartículas.

Para el secado convencional (AP-HPC-C), se disolvió la HPC (2,5 - 10 g) en agua (87,5 – 95 g) y se dejó en agitación constante durante 24 horas. Por otra parte, se utilizó como agente emulsificante lecitina de soya, para todas las corridas del diseño experimental, se pesaron 0,11 g y se disolvieron en 20 mL de agua a 40°C con agitación constante hasta disolución. Se agregó al aceite de pescado (2,5 g) a la solución recién preparada y se homogeneizó con un Polytron PT 2100 (Kinematica AG, Suiza) durante 3 minutos a 26000 rpm. A continuación, la pre-emulsión de aceite de pescado con lecitina de soya, se adicionó a la solución de HPC con agua, se homogeneizó nuevamente con el equipo mencionado anteriormente, bajo las mismas condiciones.

Para el secado libre de agua (AP-HPC-AC), la HPC (2,5-10 g) se disolvió en acetona (87,5 – 95 g) y se dejó en agitación constante durante 72 horas. Posteriormente, se adicionó el aceite de pescado (2,5 g) y la solución se homogeneizó con un Polytron PT 2100 durante 5 minutos a 13000 rpm.

Finalmente, las soluciones de de los sistemas (AP-HPC-C y AP-HPC-AC) se alimentaron al equipo Mini Spray-dryer B-290 (Büchi, Suiza), con alimentación y flujo de aire de secado en paralelo. El equipo operó a una temperatura del aire de entrada, de acuerdo al diseño experimental. Se programó una alimentación de 5% y aspiración a 100%, con una presión de atomización de 5 bar, parámetros determinados previamente de manera experimental. Adicionalmente, sólo para el secado por atomización libre de agua, se dispuso de un equipo Inert loop B-295 (Büchi, Suiza), que controla la ausencia de oxígeno y condensa el solvente. Al finalizar el secado por atomización, ya sea convencional o libre de agua, las micropartículas resultantes se almacenaron en envases plásticos con sellos a -20 °C hasta su análisis.

Objetivo 5.3.3. Caracterización física, química y morfológica de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización convencional y libre de agua.

5.3.3.1. Aceite de pescado superficial.

Para extraer el aceite superficial, se pesaron 0,2 g de micropartículas en un matraz aforado de 10 mL, se aforó con hexano y se agitó el matraz 10 veces de manera suave. Se dejó reposar 1,5 minutos y con una pipeta Pasteur se extrajo el hexano cuidadosamente, evitando el arrastre de las micropartículas precipitadas. El hexano se

traspasó a un tubo de ensayo, el cual se centrifugó a 1000 RPM durante 1 minuto. Finalmente, se traspasó el sobrenadante a un tubo de ensayo, pesado previamente, y concentró con nitrógeno hasta sequedad. El tubo se pesó y el aceite superficial se determinó gravimétricamente (Bustamante *et al.* 2016).

5.3.3.2. Aceite de pescado total.

Para determinar el aceite total, se pesaron 0,6 g de micropartículas en un tubo centrífuga, se disolvieron en 15 mL de acetona y se dejaron en agitación constante durante 24 horas. Se adicionaron 5 mL de agua destilada, 5 mL de hexano y 0,1 g de cloruro de sodio, y se dejó por 30 minutos a una temperatura de -23°C. Luego, el tubo se centrifugó a 5000 RPM durante 4 minutos. La fase orgánica se traspasó con una pipeta Pasteur a un matraz de pera. El procedimiento se repitió dos veces pero sólo con 5 mL de hexano. La fase orgánica recolectada en el matraz de pera se concentró en un rotavapor (Büchi R-210A) hasta dejar unos 2 mL. Finalmente, se traspasó la muestra a un tubo de ensayo, previamente pesado, y se concentró con nitrógeno hasta peso constante. El aceite total se determinó gravimétricamente (Bustamante *et al.* 2016).

5.3.3.3. Eficiencia de encapsulación (EE) del aceite de pescado y rendimiento (Y) del proceso.

Estos parámetros se calcularon de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 (Encina *et al.*, 2016):

$$EE(\%) = \frac{\text{aceite total experimental} - \text{aceite superficial experimental}}{\text{aceite total experimental}} \times 100 \quad (3)$$

$$Y(\%) = \frac{\text{peso del polvo después del seado por atomización}}{\text{sólidos totales antes del secado por atomización}} \times 100 \quad (4)$$

5.3.3.4. Morfología.

La estructura externa de las micropartículas de los sistemas AP-HPC-C y AP-HPC-AC se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se cubrieron con oro/paladio utilizando un equipo Varian Vacuum Evaporator PS 10E y se analizaron utilizando un microscopio LEO 1420VP (LEO Microscopía Electrónica Ltd., Cambridge, UK) operado a 20 kV. Las imágenes se obtuvieron digitalmente utilizando un software EDS 7424 (Oxford Instruments, Oxford, UK) (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005).

5.3.3.5. Humedad.

Se determinó el contenido de humedad utilizando una balanza infrarrojo para medición de humedad (Radwag PMC 50) hasta alcanzar un peso constante (AOAC, 1990).

5.3.3.6. Actividad de agua.

La actividad de agua se midió en un equipo Dew Point Water Activity Meter 4tev (Aqua Lab, USA).

5.3.3.7. Higroscopicidad.

La higroscopicidad se midió utilizando el método descrito por Cai y Corke (2000). Se pesaron 0,5 g de micropartículas de cada sistema (AP-HPC-C y AP-HPC-AC) en vidrios reloj y se dejaron en un desecador que contenía una solución de sulfato de sodio (80% de humedad relativa). Al cabo de una semana, los vidrios reloj se retiraron del desecador y se pesaron. El resultado se calculó según la ecuación 5 y se expresó como g de humedad por 100 g de sólidos secos.

$$\text{Higroscopicidad} \left[\frac{g}{100 g} \right] = \frac{\text{peso mcps final} - \text{peso mcps inicial}}{\text{peso de mcps inicial}} \times 100$$

Donde:

Peso mcps inicial: Peso de micropartículas inicial.

Peso mcps final: Peso de micropartículas después de una semana.

5.3.3.8. Determinación de compuestos polares.

Se extrajo el aceite de las micropartículas de los sistemas AP-HPC-C y AP-HPC-AC, de acuerdo al método de aceite total descrito anteriormente. Posteriormente, los compuestos polares se determinaron por cromatografía en columna de adsorción, de acuerdo al método método 2.507 (IUPAC, 2000) (Anexo 1).

5.3.3.9. Análisis estadístico.

Para determinar diferencias estadísticas entre los sistemas (AP-HPC-C y AP-HPC-AC), para cada uno de los parámetros de caracterización, se aplicó un análisis de varianza y la prueba de rango múltiple de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics version 7.0 (Manugistics Inc., Statistical Graphics Corporation, 1993, Rockville, MA, USA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización química del aceite de pescado.

En la Tabla 3 se muestra la acidez libre, el índice de peróxidos, el contenido inicial de compuestos polares y la composición en ácidos grasos del aceite de pescado utilizado en este estudio.

Tabla 3. Características químicas, compuestos polares y composición en ácidos grasos del aceite de pescado.

Parámetros	Aceite de pescado X±DE
Acidez libre [% ácido oleico]	0,1 ± 0,0
Índice de peróxidos [mEq O ₂ peróxido/kg grasa]	2,9 ± 0,1
Compuestos polares [%]	4,7 ± 0,0
C20:5 n-3 EPA [% ésteres metílicos]	18,3 ± 0,0
C22:6 n-3 DHA [% ésteres metílicos]	11,7 ± 0,0

X: promedio; DE: desviación estándar (n=3)

La acidez libre del aceite de pescado fue de 0,1% expresado como ácido oleico y el índice de peróxidos fue de 2,9 mEq de oxígeno peróxido/kg de aceite. Ambos parámetros son indicadores de la calidad de un aceite o materia grasa. Según el RSA (2011), la acidez libre no debe superar el 0,25%, mientras que el índice de peróxido no debe superar los 10 mEq de oxígeno peróxido/kg de grasa en su período de vida útil y almacenamiento. Por lo tanto, ambos parámetros de calidad, se encuentran dentro de los valores permitidos por el RSA (2011). El bajo valor de compuestos polares indicó que el aceite de pescado se encontraba con un bajo contenido de productos de oxidación secundarios (Suaterna, 2009).

La composición en ácidos grasos del aceite de pescado, está en concordancia con lo de descrito por la literatura para un aceite de salmón, siendo el ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3) y el ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3), los principales componentes en este aceite (Frankel *et al.*, 2002; Patrick *et al.* 2013).

6.2. Encapsulación de aceite de pescado por secado por atomización.

6.2.1. Diseño experimental para secado convencional.

Para obtener micropartículas con características deseadas, por secado por atomización convencional, es necesario aplicar un diseño estadístico para optimizar las variables de proceso (temperatura del aire de entrada al secador) y formulación de la solución de alimentación (relación AP/HPC) (Gharsallaoui et al., 2007). En la Tabla 4 se presentan las condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y rendimiento para el sistema AP-HPC-C, utilizando un diseño composito central más punto axial.

Tabla 4. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y rendimiento para el diseño composito central del sistema AP-HPC-C.

Experimento	Temperatura [°C]	Relación AP/HPC	EE [%] X ± DE	Rendimiento [%] X ± DE
1	154	1:1	14,9 ± 1,7	32,2 ± 2,3
2	196	1:1	24,1 ± 1,1	20,4 ± 1,1
3	154	1:4	54,5 ± 7,8	17,1 ± 1,7
4	196	1:4	52,2 ± 3,3	32,9 ± 0,7
5	150	1:2,5	29,7 ± 2,3	23,5 ± 2,1
6	200	1:2,5	44,7 ± 1,5	25,0 ± 0,4
7	175	1:0,7	8,3 ± 5,5	35,2 ± 1,8
8	175	1:4,3	55,1 ± 1,5	21,4 ± 3,2
9	175	1:2,5	36,8 ± 0,7	26,3 ± 4,1
10	175	1:2,5	36,8 ± 3,2	26,3 ± 2,2
11	175	1:2,5	36,8 ± 3,9	26,3 ± 1,2
12	175	1:2,5	36,8 ± 0,8	26,3 ± 0,9

AP: aceite de pescado; HPC: hidroxipropilcelulosa; X: promedio; DE: desviación estándar (n=3)

La eficiencia de encapsulación (EE) del AP fluctuó entre 8,3 y 55,1%. A partir de la tabla, se observó que un aumento en el contenido de sólidos totales permitió mejorar la eficiencia de encapsulación, lo cual se atribuye a que un mayor contenido de sólidos permite una rápida formación de la costra sobre la gota atomizada (Gharsallaoui et al., 2007). El análisis de varianza para la EE del AP en el sistema AP-HPC-C, indicó que la relación AP/HPC y la temperatura del aire de entrada al secador, ambos en su forma lineal, presentaron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la EE de AP, con un R^2 ajustado de 95,92% (Anexo 2), como se representa en el gráfico de Pareto (Figura 3).

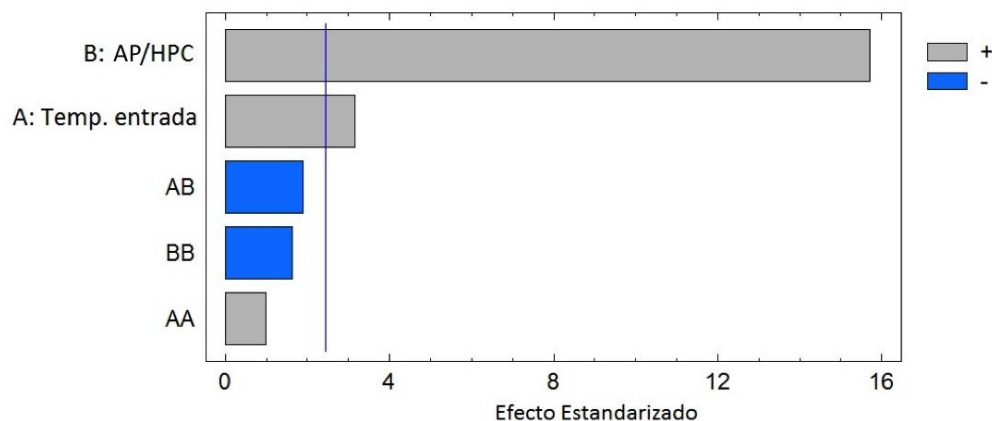


Figura 3. Diagrama de Pareto para la eficiencia de encapsulación del sistema AP-HPC-C.

El rendimiento para las micropartículas del sistema AP-HPC-AC, fluctuó entre 17,1 y 35,2%. El análisis de varianza para el rendimiento del proceso para AP-HPC-C con R^2 ajustado 73,84% (Anexo 3), indicaron que la relación de AP/HPC en su forma lineal, y la interacción entre la relación AP/HPC y la temperatura del aire de entrada al secador, presentaron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre el rendimiento de proceso, como se representa en el gráfico de Pareto (Figura 4).

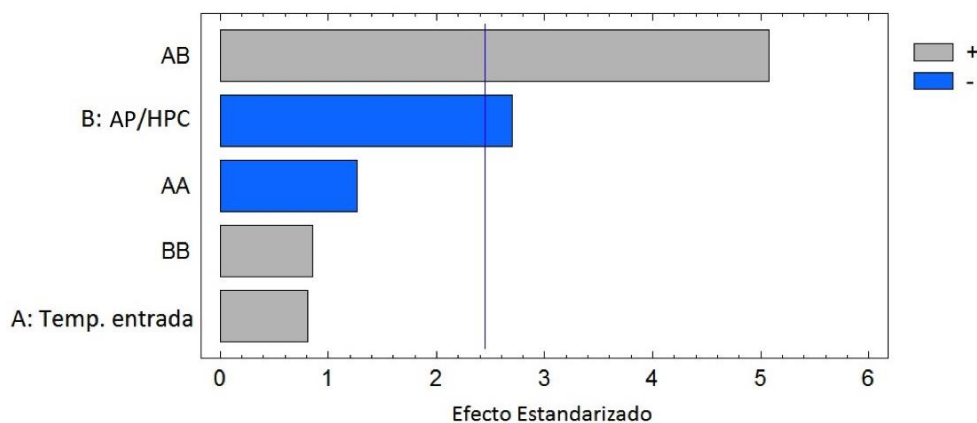


Figura 4. Diagrama de Pareto para el rendimiento del proceso para el sistema AP-HPC-C.

Para la optimización del sistema AP-HPC-C, se aplicó la función deseabilidad, donde se consideró la maximización de la eficiencia de encapsulación del AP y la maximización del rendimiento del proceso, como se representa en la Figura 5. Las condiciones óptimas obtenidas para la elaboración de micropartículas del sistema AP-HPC-C correspondieron a 1:4,3 de relación AP/HPC y 200 °C de temperatura del aire de entrada al secador.

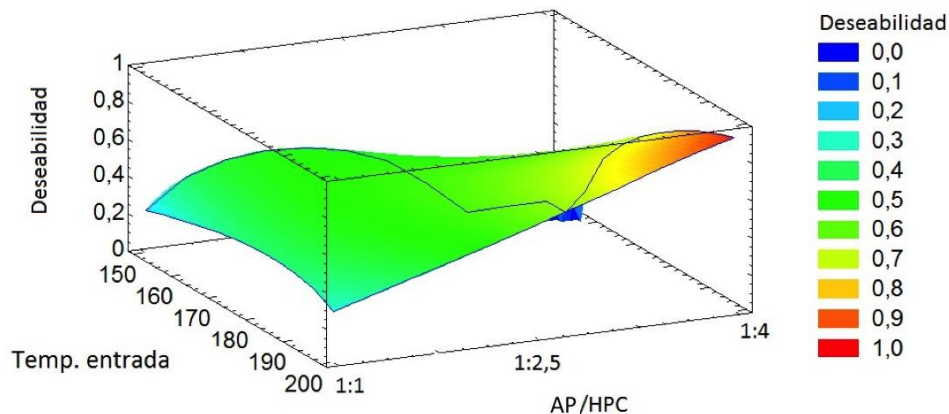


Figura 5. Gráfico superficie de respuesta para la optimización del sistema AP-HPC-C.

Los estudios de encapsulación de aceite de pescado por secado por atomización convencional, donde se apliquen diseños experimentales para obtener las condiciones óptimas de encapsulación, son escasos. En algunos estudios, se ha optimizado la preparación de la emulsión (Drusch, 2007; Keogh *et al.*, 2001; Aghbashlo *et al.*, 2012c) y en sólo unos pocos trabajos se ha optimizado la formulación de la solución de alimentación y las condiciones del proceso de secado (Encina *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2011). En este estudio, el sistema AP-HPC-C, requirió la elaboración previa de una emulsión O/W.

Para encapsular aceite de pescado, en general, se pueden distinguir dos alternativas (Encina *et al.*, 2016):

- 1) Un biopolímero con propiedades emulsionantes y encapsulantes en la misma estructura (por ejemplo, goma arábica, almidones modificados y pectina de betarraga).
- 2) Un biopolímero (proteína, goma o polisacárido modificado) o un surfactante natural (lecitina) o sintético como agente emulsionante, junto con un agente de relleno (carbohidrato de bajo peso molecular) o un biopolímero con propiedades de film.

El sistema AP-HPC-C corresponde a la segunda clasificación, donde se preparó una emulsión utilizando lecitina como agente emulsionante y HPC como biopolímero. Se obtuvo un valor óptimo de eficiencia de encapsulación de 57% con una relación AP/HPC de 1:4,3. En la literatura se reportó para AP/AE un rango entre 1:1 y 1:3, donde a medida

que aumenta el contenido de AE, disminuye el contenido de aceite de pescado superficial (Drusch, 2006) y aumenta la eficiencia de encapsulación (Aghbashlo *et al.*, 2012c) (Kolanowski *et al.*, 2006).

La eficiencia de encapsulación representa la emulsión retenida dentro de las micropartículas, y usualmente, se evalúa indirectamente considerando el aceite de pescado superficial y total (Encina *et al.*, 2016). Los valores de EE de aceite de pescado para el sistema AP-HPC-C son menores a los reportados en la literatura, cuando se utilizan éteres de celulosa como agentes encapsulantes. Así, en micropartículas con 1 y 2,6% AP (emulsión con lecitina) y mezcla de metilcelulosa y maltodextrina se reportaron valores de EE de 86,5% y 84,5%, respectivamente (Kolanowski *et al.*, 2006). Por otra parte, Patrick *et al.* (2013) encapsularon AP utilizando goma arábica y carboximetil celulosa sódica, obteniendo micropartículas con eficiencias de encapsulación de 75,2% y 82,8%, respectivamente. En otra investigación, se encapsuló AP con tween 20 como emulsificante y con leche descremada en polvo sin y con maltodextrina, lactosa ó sacarosa (30%), reportando un rango de EE entre 77,2 y 85,1% (Aghbashlo *et al.*, 2012c). Los menores valores de EE encontrados en el presente estudio se deberían a la baja capacidad de encapsulación de la HPC. (Encina *et al.*, 2016).

6.2.2. Diseño experimental para secado libre de agua.

En la Tabla 5 se presentan las condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y rendimiento para el sistema AP-HPC-C, utilizando un diseño composito central más punto axial.

Tabla 5. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y rendimiento del proceso para el sistema AP-HPC-AC para la optimización de las microparticulas óptimas.

Experimento	Temperatura [°C]	Relación AP/HPC	EE [%] X ± DE	Rendimiento [%] X ± DE
1	80	1:1	28,5 ± 0,2	14,0 ± 2,3
2	130	1:1	31,5 ± 5,5	15,2 ± 3,1
3	80	1:4	95,8 ± 1,7	43,4 ± 1,3
4	130	1:4	89,7 ± 1,1	20,6 ± 2,6
5	75	1:2,5	78,2 ± 1,7	26,6 ± 0,9
6	135	1:2,5	75,0 ± 2,0	22,2 ± 1,2
7	105	1:0,7	27,9 ± 4,6	22,2 ± 3,1
8	105	1:4,3	97,5 ± 2,7	37,5 ± 0,6
9	105	1:2,5	79,9 ± 3,6	24,1 ± 0,3
10	105	1:2,5	72,2 ± 4,7	22,9 ± 1,3
11	105	1:2,5	85,2 ± 8,0	26,7 ± 1,7
12	105	1:2,5	79,0 ± 1,8	25,5 ± 3,5

AP: aceite de pescado; HPC: hidroxipropilcelulosa; X: promedio; DE: desviación estándar (n=3)

La eficiencia de encapsulación del AP fluctuó entre 27,9 y 97,5%. A partir de la tabla 5, se observó que un aumento en el contenido de sólidos totales permitió mejorar la EE, como se discutió para el sistema AP-HPC-C. El análisis de varianza para la EE del diseño AP-HPC-AC con R^2 ajustado 96,77% (Anexo 3), indicaron que la relación AP/HPC, en su forma lineal y cuadrática, presentó un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la eficiencia de encapsulación de aceite de pescado, como se representa en el gráfico de Pareto (Figura 6).

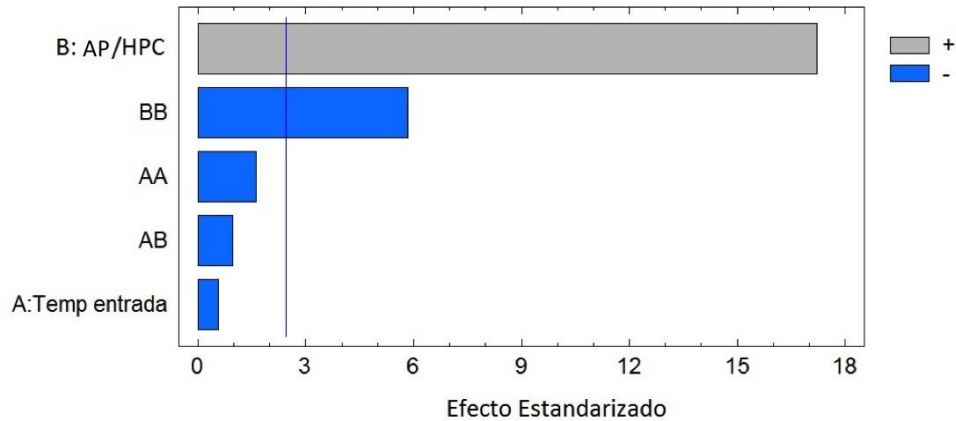


Figura 6. Diagrama de Pareto para la eficiencia de encapsulación del sistema AP-HPC-AC.

El rendimiento fluctuó entre 14,0 y 43,3 %, el cual dependió de la temperatura y del contenido de HPC. El análisis de varianza para el rendimiento del proceso del diseño AP-HPC-AC, indicaron que la relación AP/HPC en su forma lineal y la temperatura del aire de entrada al secador en su forma lineal, así como la interacción entre ambas, presentaron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre el rendimiento de encapsulación de aceite de pescado con un R^2 ajustado 83,37% (Anexo 4), como se representa en el gráfico de Pareto (Figura 7).

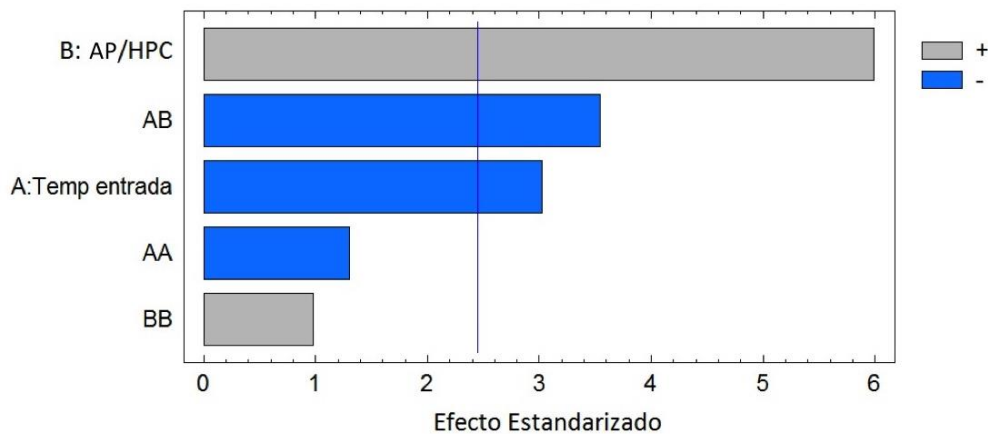


Figura 7. Diagrama de Pareto para el rendimiento del sistema AP-HPC-AC.

Para la optimización del sistema AP-HPC-AC, se aplicó la función deseabilidad, donde se consideró la maximización de la eficiencia de encapsulación del aceite de pescado y la maximización del rendimiento del proceso, tal como lo muestra representa en la Figura 8.

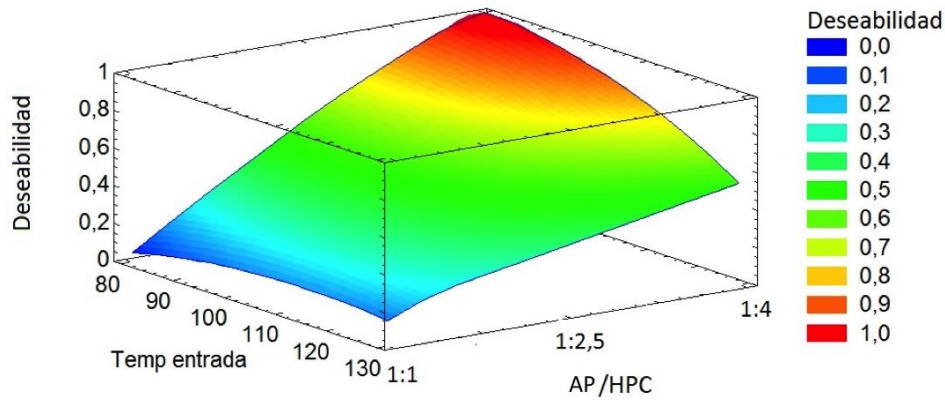


Figura 8. Grafico superficie de respuesta para la optimización del sistema AP-HPC-AC.

Las condiciones óptimas obtenidas para la elaboración de micropartículas del sistema AP-HPC-AC, correspondieron a 1:4,3 de relación AP/HPC y 78°C de temperatura del aire de entrada al secador. La optimización estimó una eficiencia de encapsulación del aceite de pescado de 97,1% y un rendimiento del proceso de 46,3%.

Los estudios de encapsulación de moléculas bioactivas por secado por atomización libre de agua son utilizados principalmente en la industria farmacéutica, sin embargo son escasos en la industria alimentaria. Serfet *et al.* (2009) determinó que la presencia de oxígeno en la solución de alimentación fue más importante que la utilización de nitrógeno como gas de secado en la disminución de hidroperóxidos. En este trabajo, la EE de AP para secado por atomización libre de agua fue significativamente mayor al método convencional, lo que se discutirá más adelante.

6.3. Caracterización física, química y morfológica de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización convencional y libre de agua.

La Tabla 6 resume, de manera comparativa, las condiciones óptimas para la elaboración de micropartículas, los resultados experimentales para eficiencia de encapsulación del aceite de pescado y rendimiento del proceso, junto con los parámetros de humedad, actividad de agua, higroscopicidad y compuestos polares obtenidos de las micropartículas de ambos sistemas. Las variables de proceso (temperatura del aire de entrada al secador) y de formulación (contenido de agente encapsulante) óptimas fueron características de cada sistema de micropartículas.

Tabla 6. Caracterización de las micropartículas de los sistemas AP-HPC-C y AP-HPC-AC, obtenidas bajo condiciones óptimas.

Parámetro	Sistema AP-HPC-C	Sistema AP-HPC-AC
	X ± DE	X ± DE
Temperatura [°C]	200	78
Relación AP/HPC	1:4,3	1:4,3
Eficiencia de encapsulación [%]	69,3 ± 1,1 b	90,5 ± 1,7 a
Rendimiento [%]	30,9 ± 3,9 a	30,3 ± 4,8 a
Humedad [%]	1,5 ± 0,1 a	1,8 ± 0,2 a
aw a 25°C	-----	0,3 ± 0,0
Higroscopicidad [g/100g sólidos secos]	21,7 ± 0,6 a	21,6 ± 0,2 a
Compuestos polares [%]	7,7 ± 0,6 a	5,1 ± 0,2 b

AP:aceite de pescado; HPC: hidroxipropilcelulosa; C secado por atomización convencional; AC: secado por atomización con acetona; X: promedio; DE: desviación estándar (n=3)

El primer parámetro expuesto en la Tabla 6 es la temperatura del aire de entrada al secador, cuyo óptimo obtenido para el sistema AP-HPC-C, fue de 200°C, mientras que para el sistema AP-HPC-AC fue de 78°C. Cabe destacar, que los puntos de ebullición de los solvente son muy distintos, siendo éstos 56°C para la acetona y 100°C para el agua, lo que explicaría la evidente diferencia entre los valores óptimos de temperatura del aire de entrada al secador. En la literatura, para el sistema de secado por atomización convencional, se han determinado temperaturas del aire de entrada al secador próximas al valor óptimo obtenido en este estudio por el sistema AP-HPC-C. Por ejemplo, se ha utilizado una temperatura del aire de entrada al secador de 180°C cuando se encapsuló aceite de pescado con jarabe de glucosa (Morales-Medina *et al.*, 2016), maltodextrina

(Mehrad *et al.*, 2015), goma arábica (Patrick *et al.*, 2013), fibra de soja (Anwar y Kunz, 2011), pectina de azúcar de betarraga (Polavarapu *et al.*, 2011) y quitosano (Shen *et al.*, 2010). Por lo tanto, el valor óptimo obtenido para la temperatura de entrada al secador (200°C) al utilizar hidroxipropilcelulosa como agente encapsulante, es mayor comparado con los antecedentes encontrados en la literatura. Sin embargo, Baik *et al.* (2004), encapsularon aceite de pescado con jarabe de maíz, caseinato de sodio y lecitina a una temperatura del aire de entrada al secador de 210°C, siendo este valor el más cercano al óptimo obtenido en este estudio.

En general, altas temperaturas del aire de entrada al secador, favorecen las reacciones oxidativas del AP (Encina *et al.*, 2016). El método de secado por atomización libre de agua permite disminuir la oxidación del AP por la aplicación de condiciones inertes (nitrógeno) y el uso de solvente que disminuye la temperatura del aire de secado.

La optimización de la razón AP/AE es fundamental, ya que afecta la eficiencia de encapsulación y el contenido de aceite de pescado superficial (Aghbashlo *et al.*, 2012c; Kolanowski *et al.*, 2006). En este trabajo, para las micropartículas de los sistemas AP-HPC-C y AP-HPC-AC, la relación AP/HPC fue la misma, de 1:4,3 (11 g HPC), mostrando que el solvente utilizado (agua o acetona) no afecta la relación AP/HPC. Por otro lado, la eficiencia de encapsulación para el sistema convencional (AP-HPC-C) fue de 69,3%, significativamente menor que para el sistema libre de agua (AP-HPC-AC), de 90,5%. Estos resultados en la EE se podrían explicar por la diferencia en el mecanismo de encapsulación del aceite de pescado. En el caso de AP-HPC-C, la EE representa la retención de la emulsión de aceite de pescado (O/W) en la matriz de la micropartícula. En cambio, para el sistema AP-HPC-AC, el mecanismo de encapsulación es la interacción triglicéridos-polímero por interacciones hidrofóbicos y/o fuerzas de Van der Waals. Los resultados de este estudio mostraron que la eficiencia de encapsulación aumenta cuando el mecanismo principal es la interacción triglicérido-polímero, como se muestra en la Figura 9.

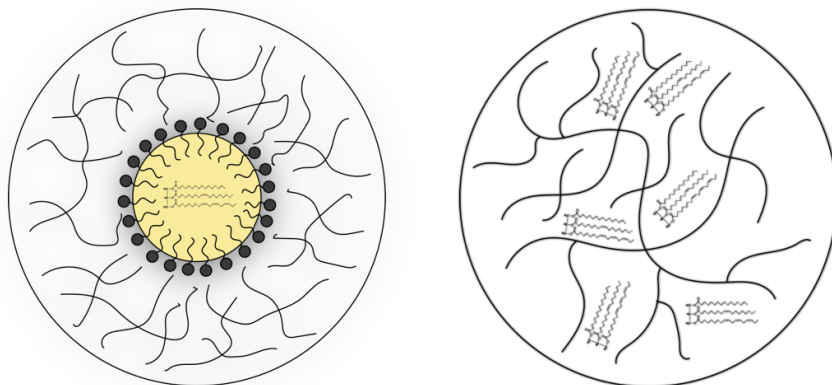


Figura 9. Mecanismo de interacción emulsión-polímero en sistemas AP-HPC-C y triglicérido-polímero en AP-HPC-AC.

El siguiente parámetro a analizar fue el rendimiento, que se define como la relación de los sólidos en la solución de alimentación antes del secado por atomización y los sólidos obtenidos después del secado por atomización (Encina *et al.*, 2016). El rendimiento obtenido para el sistema AP-HPC-C y AP-HPC-AC fueron de 30,9% y 30,3%, respectivamente. Estos valores de rendimiento son prácticamente iguales, lo que se podría atribuir a la alta adherencia de las micropartículas en la cámara de secado y/o al tamaño de la partícula del polvo, debido a que la HPC formaría polvos muy finos que no serían capaces de ser separados en el ciclón. El rendimiento del sistema AP-HPC-C fue menor al reportado por Patrick *et al.*, (2013) para micropartículas de aceite de pescado con goma arábica y carboximetil celulosa sódica, donde los rendimientos fueron de 72,7% y 76,7% respectivamente.

Los valores de humedad obtenidos en los sistemas AP-HPC-C ($1,5 \pm 0,1\%$) y AP-HPC-AC ($1,8 \pm 0,2\%$) no presentaron diferencias significativas. La baja humedad del sistema AP-HPC-C se atribuye a la alta temperatura del aire de entrada al secador, mientras que para el sistema AP-HPC-AC a la utilización de acetona. Los valores de humedad reportados en la literatura están sobre el valor obtenido en este estudio para el secado por atomización convencional, lo cual se puede atribuir a la naturaleza de los agentes encapsulantes y a las temperaturas de aire de entrada al secador. Al respecto, para el secado por atomización convencional, Aghbashlo *et al.* (2013a) encapsularon aceite de pescado con leche descremada en polvo y obtuvieron un contenido de humedad que varió entre 2,1% y 5,7%. En cambio, al encapsular aceite de pescado con goma arábica y carboximetil celulosa sódica, el contenido de humedad fue de $4,8 \pm 1,6\%$ y $6,0 \pm 1,9\%$,

respectivamente (Patrick *et al.*, 2013). Por otra parte, microparticulas que utilizaron jarabe de glucosa y trehalosa como agente encapsulante, tenían un contenido de humedad dentro de un rango de 2,4 - 3,6% y 2,0 - 3,0%, respectivamente (Drusch *et al.*, 2006). Es fundamental que la humedad y la actividad de agua de las microparticulas sean bajas, para disminuir el desarrollo de microorganismos en los polvos (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Los valores de higroscopicidad obtenidos en los sistemas AP-HPC-C y AP-HPC-AC no presentaron diferencias significativas y son menores a los reportados por Patrick *et al.* (2013) en microparticulas de aceite de pescado encapsuladas con goma arábica y carboximetil celulosa sódica ($30,0 \pm 0,6$ y $28,9 \pm 0,5$ g/100g de sólidos secos, respectivamente). La higroscopicidad es la capacidad para contener la humedad ocluida y es una característica especialmente importante al ser considerada durante el almacenamiento de estos productos, ya que determina el tipo de envase a utilizar (Nadeau y Puiggali, 1995). Su valor se ve influenciado por la humedad relativa, ya que la higroscopicidad aumenta con el incremento de la humedad (Cai y Corke, 2000). Una alta higroscopicidad de las microparticulas es muy importante en aquellos compuestos activos que se degradan en presencia de agua, como en éste caso donde el agua puede hidrolizar los triglicéridos del AP y aumentar la acidez libre.

El valor de compuestos polares en las microparticulas del sistema AP-HPC-C ($7,7 \pm 0,6\%$) y AP-HPC-AC ($5,1 \pm 0,2\%$) fueron significativamente mayores al AP inicial (4,7%), mostrando el efecto del proceso de secado sobre la oxidación del aceite. El sistema AP-HPC-C fue sometido a una temperatura del aire de entrada al secador más elevada que el sistema AP-HPC-AC, aumentando el valor de los compuestos polares.

Las Figuras 10 y 11 muestran las microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para las micropartículas del sistema AP-HPC-C y AP-HPC-AC, respectivamente. En general, las micropartículas de ambos sistemas, AP-HPC-C y AP-HPC-AC, son irregulares en forma y tamaño, además de estar aglomeradas y presentar hendiduras. Una morfología similar se describió para micropartículas con HPC (Sun-Waterhouse *et al.*, 2012). Las micropartículas de aceite con HPC se prepararon con etanol, lo que permitió utilizar temperaturas de secado menores, pero con tendencia a formar aglomerados (Quek *et al.*, 2007). La rápida evaporación de la acetona 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.

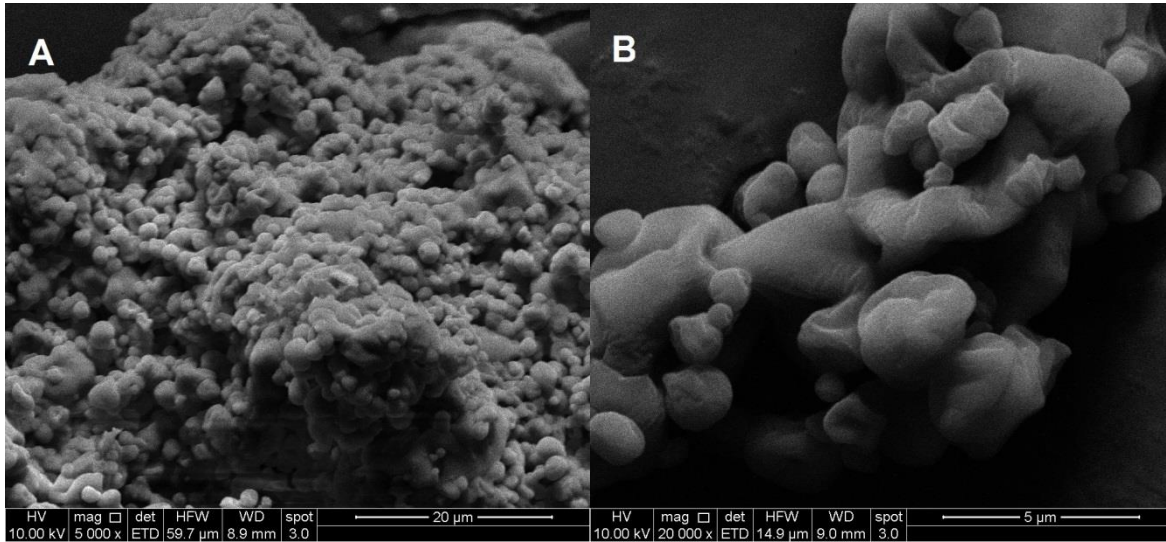


Figura 10. Microfotografías SEM para los sistemas AP-HPC-C. (A) *Magnitud: 5.000x* y (B) *Magnitud: 20.000x*.

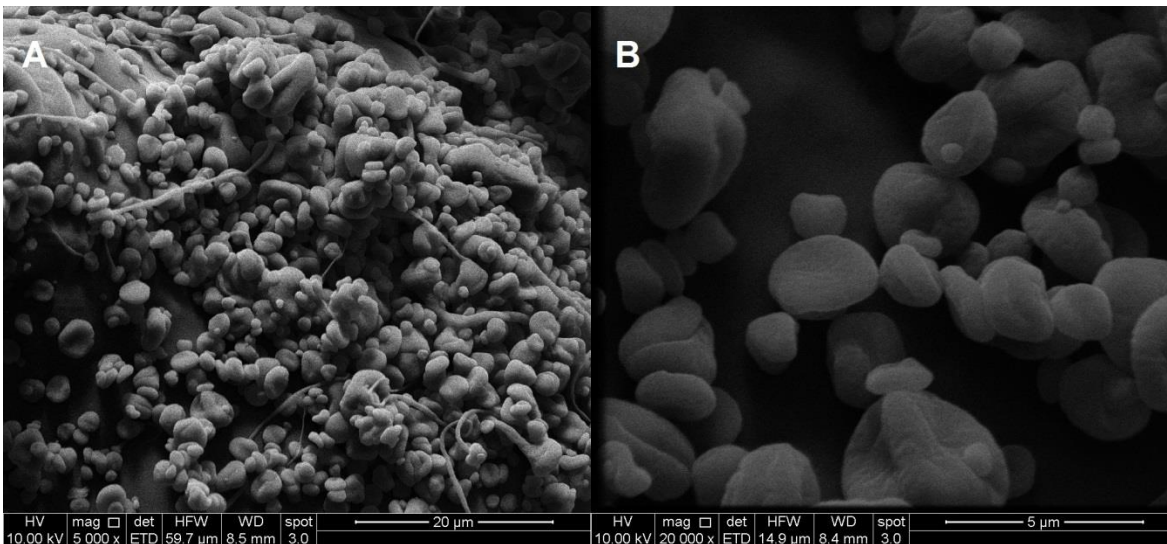


Figura 11. Microfotografías SEM para los sistemas AP-HPC-AC. (A) *Magnitud: 5.000x* y (B) *Magnitud: 20.000x*.

La formación de micropartículas con abolladuras en una característica usual del secado por atomización y se puede producir a altas temperaturas de secado, como en el sistema AP-HPC-C (200°C), o a bajas temperaturas de secado, como en el sistema AP-HPC-AC (78°C), (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005). A bajas temperaturas de secado, 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; Zakarian y King, 1982).

El efecto de disolventes orgánicos no ha sido estudiado en la encapsulación de compuestos bioactivos en el área de los alimentos, abriendo un importante campo de investigación (Encina *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

En este trabajo se encapsularon micropartículas de aceite de pescado con hidroxipropilcelulosa, por secado por atomización convencional y libre de agua (acetona). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio la hipótesis y los objetivos se cumplieron.

La aplicación de un diseño experimental composito central más punto axial para la encapsulación de aceite de pescado por el método convencional y libre de agua (acetona), permitió determinar las condiciones óptimas para maximizar la EE y rendimiento. La temperatura del aire de entrada al secador óptima para el sistema AP-HP-C-C (200°C) fue significativamente mayor al sistema AP-HPC-AC (78°C), mientras que la relación AP/HPC fue de 1:4,3 en ambos sistemas.

La eficiencia de encapsulación del sistema AP-HPC-AC (90,5%) fue significativamente mayor al sistema AP-HPC-C (69,3%), sugiriendo que las diferencias se deben al mecanismo de encapsulación del AP en la micropartícula. En secado convencional hay una retención de la emulsión de AP, mientras que la interacción triglicérido-polímero es el mecanismo en secado con acetona.

La humedad e higroscopicidad en las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas no presentaron diferencias significativas, mostrando que no hubo un efecto del método de secado. Sin embargo, en aquellas obtenidas por secado convencional los compuestos polares fueron significativamente mayores, lo cual se atribuye a la mayor temperatura del aire de entrada utilizada. Además, la morfología indicó que las micropartículas de ambos sistemas presentaron forma irregular con hendiduras y aglomeraciones.

REFERENCIAS

AENOR, (2000). Asociación Española de Normalización. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Preparación de esteres metílicos de ácidos grasos. Norma UNE-EN ISO 5509:2000

Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A. y Rafiee, S. (2012a). The correlation of Wall material composition with flow characteristics and encapsulation behaviour of fish oil emulsion. *Food Research International*, 49, 379-388.

Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A. y Rafiee, S. (2012c). Optimization of emulsification procedure for mutual maximizing the encapsulation and exergy efficiencies of fish oil microencapsulation. *Powder Technology*, 225, 107-117.

Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A. y Rafiee, S. (2013a). Fish oil microencapsulation as influenced by spray dryer operational variables. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1707-1713.

Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A. & Rafiee, S. (2013b). Influence of wall material and inlet drying air temperature on the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1561-1569.

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

Anwar, S. H. y Kunz, B. (2011). The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray-drying, and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 105, 367-378.

AOAC, (1990). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (15th ed.). Gaythersburg, USA.

AOCS, (1993). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society*, 3th edition. AOCS, Champaign, Illinois.

AOCS, (2007b). Official method Ce 1j-07: Determination of cis-, trans-, saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids in extracted fats by capillary GLC.

Official methods and recommended practices of the AOCS. 6th Ed. AOCS, Champaign, IL, USA.

Astray, G., González-Barreiro, C., Mejuto, J., Rial-Otero, R. y Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids* 23(7):1631-1640.

Baik, M.-Y., Suhendro, E. L., Nawar, W. W., McClements, D. J., Decker, E. A. y Chinachoti, P. (2004). Effects of antioxidants and humidity on the oxidative stability of microencapsulated fish oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(4), 355-360.

Burr, G. y Burr, M. (1930). On the nature and role of fatty acids essential in nutrition. *Journal of Biological Chemistry* 86:587-621.

Bustamante, A., Masson, L., Velasco, J., del Valle J. y Robert, P. 2016. Microencapsulation of *H. pluvialis* oleoresins with different fatty acid composition: Kinetic stability of astaxanthin and alpha-tocopherol. *Food Chemistry* 190:1013–1021.

Cai, Y.Z. y Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Amaranthus betacyanin* pigments. *Journal of Food Science* 65:1248–1252.

Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., García, B. y Díaz, G. (2006). Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X). *REB* 25:72-79.

Davidov-Pardo, P., Roccia, P., Salgado, D., León, A. E. y Pedroza-Islas, R. (2008). Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil evaluation of its behavior in bread products. *American Journal of Food Technology*, 3, 384-393.

Desai, K. y Park, H (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* 23:1361-1294.

Dickinson, E. (1997). Properties of emulsions stabilized with milk proteins: Overview of some recent developments. *Journal of Dairy Science*, 80, 2607-2619.

Drusch, S. (2006). Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloids*.

Drusch, S., Serfert, Y., Van Den Heuvel, A. y Schwarz, K. (2006). Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Research International* 39:807–815.

Duan, J., Vogt, F., Li, X., Hayes, D. y Mansour, H. (2013). Design, characterization, and aerosolization of organic solution advanced spray-dried moxifloxacin and ofloxacin dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) microparticle/nanoparticulate powders for pulmonary inhalation aerosol delivery. *International Journal of Nanomedicine* 8:3489-3505.

Encina, C., Vergara, C., Giménez, B., Oyarzún-Ampuero, F. y Robert, P. (2016). Conventional spray-drying and future trends for microencapsulation of fish oil. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 46-60.

Frankel, E., Satué-Gracia, T., Meyer, A. y German, J. (2002). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:2094-2099.

Furia, E. (1973). *CRC Handbook of Food Additives*. Second Edition, 1:323.

García, G., González, M., Ochoa, M. y Medrano, H., (2004). Microencapsulación del jugo de cebada verde mediante secado por aspersion. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 4:262-266.

Gatica, A. (2011). Ácidos grasos EPA y DHA y su vital importancia en la nutrición humana. *Revista Industrial* 58-60.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. y Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International* 40:1107–1121.

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

Gómez, N. y Jiménez, M. (2014). Métodos de secado de emulsiones alimentarias. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 8(2):23-33.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Sciences and Technology*, 1:55-61.

IUPAC, (2000). The determination of polar compounds, polymerised and oxidised tricylglycerols and diacylglycerols in oils and fats. *Pure and Applied Chemistry*, 72:1563-1575.

Jafari, S., Assadpoor, E., Bhandari, B. y He, Y. (2008). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International* 41:172-183.

Keogh, M. K., O'Kennedy, B. T., Kelly, J., Auty, M. A., Kelly, P. M., Fureby, A. y Haahr, A.-M. (2001). Stability to oxidation of spray-dried fish oil powder microencapsulated using milk ingredients. *Journal of Food Science* 66:217-224.

Kolanowski, W., Ziolkowski, M., Weißbrodt, J., Kunz, B. y Laufenberg, G. (2006). Microencapsulation of fish oil by spray drying-impact on oxidative stability. Part 1. *European Food Research and Technology* 222:336-342.

Kralovec, J., Zhang, S., Zhang, W. y Barrow, C. (2012). A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry* 131:639-644.

Lee, H., Park J. y Know, K. (1997). Double-walled microparticles for single shot vaccine. *Journal of Controlled Release*, 44: 283–293.

Madene, A., Scher, J. y Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 41:1-21.

McClements, D. (2005). *Food emulsions, principles, practices and techniques* (2a ed.). Florida, E.U.A: CRC Press.

Mehrad, B., Shabanpour, B., Jafari, S. M. y Pourashouri, P. (2015). Characterization of dried fish oil from Menhaden encapsulated by spray drying. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation - International Journal of the Bioflux Society* 8(1), 57-69.

MINSAL, (2015). *Enfermedades no transmisibles*. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile.

Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A. M., Guadix, E. M. y Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chemistry*, 194, 1208-1216.

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

Nadeau, J.P. y Puiggali, J.R. (1995). *Drying: Physical Processes to Industrial Processes*. Lavoisier Tec and Doc Editors, Paris.

Patel, B., Patel, J., Chakraborty, S. y Shukla, D. (2014). Revealing facts behind spray-dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. Article in Press. *Saudi Pharmaceutical Journal*.

Patrick, K. E., Lv, Y., Muhamyankaka, V., Denis, O., Ntsama, I. S. B. y Zhang, X. (2013). Development of EPA-DHA microcapsules supplemented probiotic fermented milk. *Akademik Gıda*, 11, 6-15.

Polavarapu, S., Oliver, C. M., Ajlouni, S., y Augustin, M. A. (2011). Physicochemical characterisation and oxidative stability of fish oil and fish oil extra virgin olive oil microencapsulated by sugar beet pectin. *Food Chemistry*, 127, 1694-1705.

Quek, S., Chok, N. y Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray dried watermelon powder. *Chemical Engineering and Processing*, 46: 386-392.

Rodrigues, R. A., Rodrigues, M. V., Oliveira, T. I., Bueno, C. Z., Souza, I. M., Sartoratto, A., *et al.* (2011). Docosahexaenoic acid ethyl ester (DHAEE) microcapsule production by spray-drying: Optimization by experimental design. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 31, 589-596.

Rowe, C., Sheskey, P. y Quinn, M. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Sixth edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington, USA.

Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA), (2011). Decreto Supremo N° 977/996, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile.

Serfert, S., Drusch, S., Schmidt-Hansberg, B., Kind, M. y Schwarz, K. (2009). Process engineering parameters and type of n-octenylsuccinate-derivatised starch affect oxidative stability of microencapsulated long chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Food Engineering* 95:386–392.

Shaw, L., McClements, D. y Decker, E. (2007). Spray-dried multilayered emulsions as a delivery method for w-3 fatty acids into food systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:3112-3119.

Shen, Z., Augustin, M. A., Sanguansri, L. y Cheng, L. J. (2010). Oxidative stability of microencapsulated fish oil powders stabilized by blends of chitosan, modified starch, and glucose. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 4487-4493.

Simopoulos, A. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune disease. *Journal of the American College of Nutrition* 21:495-505.

Simopoulos, A. (2010). Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 235:785-95.

Socarrás, M. y Bolet, M. (2010). Alimentación saludable y nutrición en las enfermedades cardiovasculares. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 29:353-363.

Suaterna, A., (2009). La fritura de los alimentos: el aceite de fritura. *Perspectivas en Nutrición Humana* 11:39-53.

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.

Treble, T., Wooten, S., Miles, E., Mullee, M., Arden, N. y Ballinger, A. (2003). Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant co-supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition* 78:376-82.

Valenzuela, A. y Sanhueza, J. (2009). Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y en la ciencia de los alimentos. *Revista Chilena de Nutrición* 36:246-257.

Valenzuela, R., Tapia, G., González, M. y Valenzuela, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Revista Chilena de Nutrición* 38:356-367.

Vega, C. y Ross, Y. H. (2006). Invited review: Spray-dried dairy and dairy-like emulsions-compositional considerations. *Journal of Dairy Science*, 89, 383-401.

Yañez, J., Salazar, J., Chaires, L., Jimenez, J., Marquez, M. y Ramos, E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista Avance y Perspectiva* 21:313-319.

Zakarian, A., y King, C. (1982). Volatiles loss in the zone during spray drying of emulsions. *Industrial Engineering Chemistry Process Design and Development*, 21:107–113.

ANEXOS

Anexo 1. Determinación de compuestos polares por cromatografía en columna abierta (IUPAC 2000, Método 2.507).

Reactivos:

- 1-. Éter de petróleo:éter etílico (87:13 v/v).
- 2-. Éter etílico.
- 3-. Silica gel 60 (tamaño de partícula: 0,063-0,2 mm), Merck ajustada a un contenido de humedad de 5%.
- 4-. Arena de mar.
- 5-. Algodón.

Materiales:

Mini columna de vidrio, vaso precipitado (5 y 200 mL), embudo de decantación (250 ml), embudo analítico, pipetas pasteur, probeta (100 mL), bagueta, matraces de boca esmerilada (100 mL).

Procedimiento:

Preparar la muestra:

- Pesar 1,0g de aceite.

Preparación de material:

- Se activó la sílica gel a 160 °C por 4 h, luego se ajustó la humedad a un 5% (m/m), con agua destilada.
- Etiquetar dos matraces de 100 ml y dejarlos en la estufa, durante 30 minutos.
- Dejar enfriar en desecador, utilizar pinzas en todo momento, y registrar su peso dos veces.
- Pesar 5,0 g y algo más de sílica (5% humedad) en un vaso precipitado de 50ml.

Preparación de la columna:

- Se puso algodón en la base de la columna.
- Se ambientó la columna con éter de petróleo:éter etílico (87:13) y se cerró cuando quedaban 2 cm de la columna con este reactivo.

- Se midieron 20 ml en la probeta y se disolvió la sílica para traspasarla a la columna. No debe quedar seca, es decir, siempre debe haber al menos un dedo de solvente sobre la sílica.
- Se reutilizó el éter con una pipeta Pasteur de plástico y se arrastró la sílica que quedó en el balón de la columna hasta compactarla, golpeando suavemente con una paleta de plástico.
- Se agregaron 3 cucharaditas de arena de mar.
- Se esperó que dejara de gotear, y cuando quedaron 2 cm de fase móvil sobre la columna, se cerró la columna y se añadió la muestra lentamente, rodeando las paredes de la columna, haciendo círculos.
- Apenas se terminó de agregar el aceite, se añadieron 60 ml de éter de petróleo:éter etílico, se abrió la columna y se ubicó el matraz de 100 ml, previamente pesado y etiquetado como Fracción 1.
- La fase móvil se dejó escurrir con un ritmo de goteo cada 3 segundos.
- Finalmente, cuando quedan 2 cm de fase móvil, se añadieron 50 ml de éter etílico y se cambió rápidamente el matraz de 100 ml, por el segundo matraz ya pesado y etiquetado como Fracción 2.
- Se concentraron ambos balones en un rotavapor (Büchi R-210A), a 40°C.
- Se pesaron ambos balones dos veces y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener los compuestos polares.

Análisis de la muestra

La primera fracción (Fracción I) corresponde a los triglicéridos no alterados y la segunda (Fracción II) a los triglicéridos alterados o compuestos polares totales. La determinación del contenido de CP se obtiene mediante la siguiente ecuación.

$$CP [\%] = \frac{(\text{peso balón con fracción II} - \text{peso balón vacío})[g]}{\text{peso muestra [g]}} * 100$$

Anexo 2. Análisis de varianza para la eficiencia de encapsulación y el rendimiento del diseño experimental para el sistema AP-HPC-C.

Tabla 7. Análisis de varianza para EE (sistema AP-HPC-C).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	90,1504	1	90,1504	9,96	0,0197
B:HPC	2231,89	1	2231,89	246,57	0,0000
AA	8,59267	1	8,59267	0,95	0,3675
AB	32,547	1	32,547	3,60	0,1067
BB	23,836	1	23,836	2,63	0,1558
Error total	54,3132	6	9,05187		
Total (corr.)	2442,32	11			

R-cuadrada = 97,7753 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 95,9215 porciento

Error estándar del est. = 3,00863

Error absoluto medio = 1,55893

Estadístico Durbin-Watson = 2,03859 (P=0,4682)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,157308

Tabla 8. Análisis de varianza para Y (sistema AP-HPC-C).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	4,80592	1	4,80592	0,65	0,4506
B:HPC	53,844	1	53,844	7,29	0,0356
AA	11,857	1	11,857	1,61	0,2521
AB	190,44	1	190,44	25,79	0,0023
BB	5,34742	1	5,34742	0,72	0,4274
Error total	44,3061	6	7,38435		
Total (corr.)	310,6	11			

R-cuadrada = 85,7353 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 73,8481 porciento

Error estándar del est. = 2,71742

Error absoluto medio = 1,37973

Estadístico Durbin-Watson = 2,10431 (P=0,5132)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,124732

Anexo 3. Análisis de varianza para la eficiencia de encapsulación y el rendimiento del diseño experimental para el sistema AP-HPC-AC.

Tabla 9. Análisis de varianza para EE (sistema AP-HPC-AC).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	7,01608	1	7,01608	0,33	0,5882
B:HPC	6362,74	1	6362,74	296,54	0,0000
AA	56,1856	1	56,1856	2,62	0,1567
AB	20,7025	1	20,7025	0,96	0,3639
BB	729,641	1	729,641	34,01	0,0011
Error total	128,741	6	21,4568		
Total (corr.)	7305,03	11			

R-cuadrada = 98,2376 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 96,769 por ciento

Error estándar del est. = 4,63215

Error absoluto medio = 2,44479

Estadístico Durbin-Watson = 2,30229 (P=0,6463)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,186301

Tabla 10. Análisis de varianza para Y (sistema AP-HPC-AC).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	103,855	1	103,855	9,11	0,0235
B:HPC	408,71	1	408,71	35,85	0,0010
AA	19,3956	1	19,3956	1,70	0,2399
AB	142,802	1	142,802	12,52	0,0122
BB	10,9126	1	10,9126	0,96	0,3657
Error total	68,4113	6	11,4019		
Total (corr.)	754,087	11			

R-cuadrada = 90,9279 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 83,3679 por ciento

Error estándar del est. = 3,37667

Error absoluto medio = 1,88166

Estadístico Durbin-Watson = 1,50114 (P=0,1547)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,241131

Anexo 4. Análisis de varianza para caracterización de micropartículas para sistemas AP-HPC-C y AP-HPC-AC.

- Análisis ANOVA para humedad de los sistemas AP-HPC-C y AP-HPC AC.

Se obtuvo un Valor-P igual a 0,1494, mayor que 0,05. Por lo tanto, no existe una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 11. Pruebas de múltiples rangos para la humedad por sistema.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Sistemas	Casos	Media	Grupos homogéneos
AP-HPC-AC	3	1,76	X
AP-HPC-C	3	1,53	X

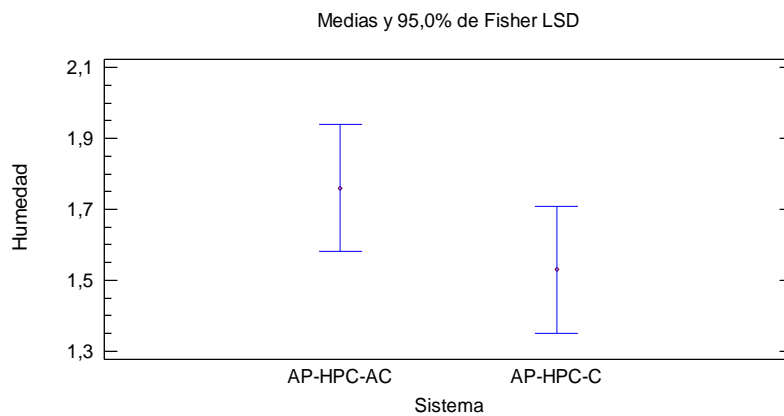


Figura 12. Gráfico de medias para la humedad.

- Análisis ANOVA para higroscopicidad de los sistemas AP-HPC-C y AP-HPC AC.

Se obtuvo un Valor-P igual a 0,8012, menor que 0,05. Por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 12. Pruebas de múltiples rangos para humedad por sistema.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Sistemas	Casos	Media	Grupos homogéneos
AP-HPC-AC	3	21,5796	X
AP-HPC-C	3	21,6767	X

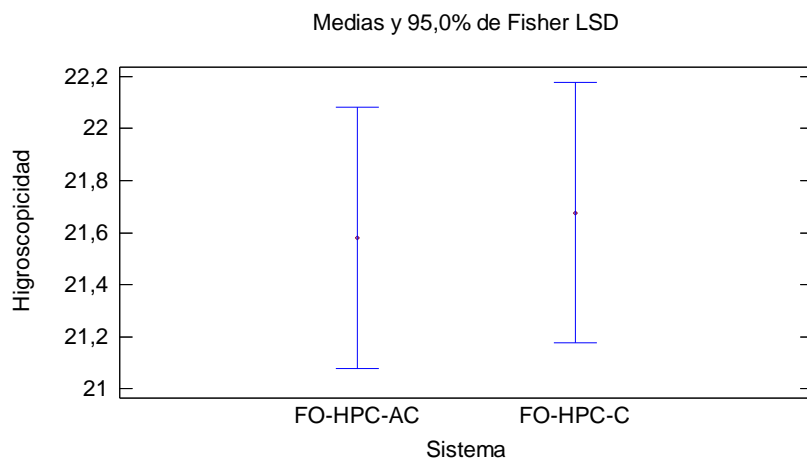


Figura 13. Gráfico de medias para la higroscopicidad.

- Análisis ANOVA para los compuestos polares de los sistemas AP-HPC-C y AP-HPC AC.

Se obtuvo un Valor-P igual a 0,0021, menor que 0,05. Por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 13. Pruebas de múltiples rangos para los compuestos polares por sistema.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Sistemas	Casos	Media	Grupos homogéneos
AP-HPC-AC	3	5,10	X
AP-HPC-C	3	7,72	X

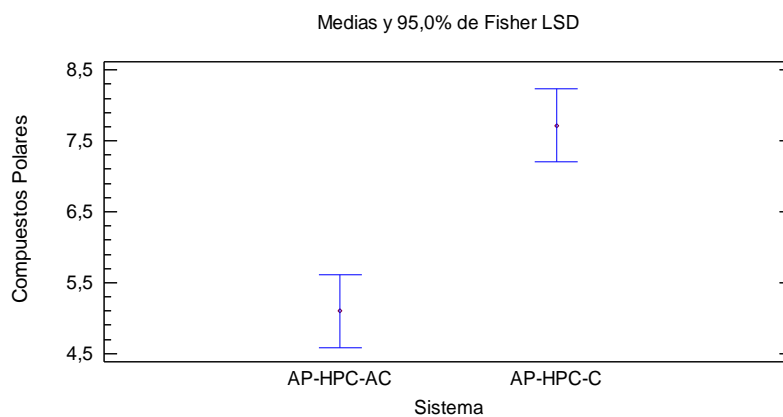


Figura 14. Gráfico de medias para los compuestos polares.