

UNIVERSIDAD DE CHILE Doctorado en Nutrición y Alimentos

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE SUBPRODUCTOS PROVENIENTES DE LA INDUSTRIA DEL ACEITE DE OLIVA Y SU ESTABILIZACIÓN MEDIANTE MICROENCAPSULACIÓN

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de

Doctor en Nutrición y Alimentos

Programa Conjunto

Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias veterinarias y Pecuarias e Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos

Por

Inés Alejandra Cea Pavez

Director de Tesis Profesor Doctor:

Paz Robert Canales

Co-Director de Tesis Profesor:

Hugo Nuñez Kalasic

Santiago, 2020

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE SUBPRODUCTOS PROVENIENTES DE LA INDUSTRIA DEL ACEITE DE OLIVA Y SU ESTABILIZACIÓN MEDIANTE MICROENCAPSULACIÓN

Por

Inés Alejandra Cea Pavez

Tesis presentada y aprobada como parte de los requisitos para optar al Grado Académico de Doctor en Nutrición y Alimentos

COMITÉ DE TESIS

DIRECTORES DE TESIS

Prof. Paz Robert Canales

Prof. Hugo Nuñez Kalasic

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. María de la Luz Hurtado

Prof. Javier Morales Montecinos

Prof. Inés Urquiaga Reus

Prof. Víctor Escalona Contreras

INDICE DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN16
1.1. Métodos de extracción de compuestos fenólicos desde residuos de la industria del aceite de oliva
1.1.1. Extracción con líquidos presurizados17
1.2. Compuestos fenólicos de los subproductos de la industria del aceite de oliva18
1.3. Absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos20
1.4. Microencapsulación
1.4.1. Secado por atomización21
1.4.2. Agentes encapsulantes
1.5. Recubrimiento por lecho fluido24
1.6. Hipótesis
1.7. Objetivos
1.7.1. Objetivo General25
1.7.2. Objetivos específicos25
MATERIALES Y MÉTODOS26
2.1. Materiales
2.2. Métodos
2.2.1. Obtención y procesamiento de las materias primas orujo (O) y alpechín (Al)
2.2.2. Caracterización de materias primas orujo (O) y alpechín (Al)26
2.2.3. Elaboración de extractos a partir de los sub-productos de la industria del aceite de oliva (orujo y alpechín)27

2.2.3.1. Elaboración de extractos a partir del sub-producto orujo, usando extracción por líquidos presurizados27
2.2.3.2. Elaboración del extracto a partir del sub-producto alpechín, usando filtración
2.2.4. Caracterización física y químicamente de los extractos de orujo y alpechín, obtenidos bajo condiciones óptimas
2.2.5. Microencapsulación de compuestos fenólicos de orujo y alpechín de oliva28
2.2.5.1. Elaboración de micropartículas28
2.2.5.2. Diseño experimental para la encapsulación
2.2.5.3. Caracterización de las micropartículas
2.2.6. Recubrimiento de micropartículas de MD de orujo y alpechín de oliva30
2.2.6.1. Recubrimiento por lecho fluidizado
2.2.6.2. Caracterización de las micropartículas recubiertas
2.2.7. Estudio de la estabilidad de los compuestos fenólicos desde micropartículas de orujo y alpechín de oliva
2.2.7.1. Estudio de estabilidad a 60°C32
2.2.7.2. Caracterización de micropartículas almacenadas a 60°C en ensayo de estabilidad acelerada32
2.2.8. Estudio del perfil de liberación de compuestos fenólicos desde micropartículas de alpechín y orujo de oliva, en un sistema gastrointestinal simulado
2.2.8.1. Estudio de digestión gástrica e intestinal simulada
2.2.8.2. Caracterización de micropartículas de alpechín y orujo de oliva digeridas en fluidos gástrico e intestinal simulado
2.2.9. Análisis estadístico
RESULTADOS Y DISCUSIÓN
3.1.1. Caracterización de la materia prima orujo (O)
3.1.2. Obtención de un extracto de orujo por extracción con líquidos presurizados 37
3.1.3. Caracterización del extracto de orujo obtenido bajo condiciones óptimas44

3.1.4. Encapsulación del extracto de orujo por extracción con líquidos presurizados (EO-LP) por secado por atomización
3.1.4.1. Micropartículas de orujo con maltodextrina (O-MD)48
3.1.4.2. Micropartículas de orujo con inulina (O-In)50
3.1.4.3. Optimización de la microencapsulación de orujo por secado por atomización
3.1.5. Caracterización de las micropartículas de orujo, obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización
3.1.6. Caracterización de las micropartículas de orujo, recubiertas por lecho fluidizado
3.1.7. Estabilidad de los compuestos fenólicos de las micropartículas de orujo, almacenadas a 60°C59
3.1.8. Estudio de liberación de compuestos fenólicos desde las micropartículas de orujo, en un sistema gastrointestinal simulado
3.2.1. Caracterización de la materia prima alpechín (Al)66
3.2.2. Obtención un extracto de alpechín por filtración
3.2.3. Caracterización del extracto de alpechín
3.2.4. Encapsulación del extracto del alpechín filtrado por secado por atomización72
3.2.4.1. Micropartículas de alpechín con maltodextrina (Al-MD)72
3.2.4.2. Micropartículas de alpechín con inulina (Al-In)74
3.2.4.3. Optimización de la microencapsulación del apechín por secado por atomización
3.2.5. Caracterización de las micropartículas de alpechín, obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización77
3.2.6. Caracterización de las micropartículas de alpechín, recubiertas por lecho fluidizado
3.2.7. Estabilidad de los compuestos fenólicos de las micropartículas de alpechín, almacenadas a 60°C
3.2.8. Estudio de liberación de compuestos fenólicos desde las micropartículas de alpechín, en un sistema gastrointestinal simulado

SUGERENCIAS SOBRE PROYECCIONES DEL ESTUDIO90
CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA
ANEXOS
Anexo 1. Publicaciones, estadías y presentaciones en congresos
Anexo 2. Determinación del contenido de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965)
Anexo 3. Análisis de capacidad antioxidante ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno)100
Anexo 4. Metodología HPLC-DAD-ESI-TOF/MS102
Anexo 5. Metodología de liberación gastrointestinal simulada103
Anexo 6. Análisis estadístico del proceso extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva (var. Arbequina) por extracción con líquidos presurizados (ELP). 104
Anexo 7. Listado de compuestos fenólicos presentes en el EO-LP elaborado bajo condiciones óptimas
Anexo 8. Análisis estadístico del diseño de encapsulación del orujo con maltodextrina (O-MD), por secado por atomización108
Anexo 9. Análisis estadístico del diseño de encapsulación del orujo con inulina (O-In), por secado por atomización
Anexo 10. Listado de compuestos fenólicos presentes en el alpechín filtrado elaborado bajo condiciones óptimas112
Anexo 11. Análisis estadístico del diseño de encapsulación del alpechín con maltodextrina (Al-MD), por secado por atomización113
Anexo 12. Análisis estadístico del diseño de encapsulación del alpechín con inulina (Al-In), por secado por atomización115

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variables independientes y niveles en el diseño de composito central más punto axial,para el proceso de extracción por líquidos presurizados de compuestos fenólicos de orujo deoliva
Tabla 2. Variables independientes y niveles en el diseño de composito central más punto axial,para el proceso de encapsulación por atomización de orujo y alpechín, con los agentesencapsulantes MD e In
Tabla 3. Contenido de humedad, fenoles totales y capacidad antioxidante (ORAC) del orujo.
Tabla 4. Compuestos fenólicos identificados en orujo, fórmula molecular, tiempo de retención (Tr) y m/z.35
Tabla 5. Cuantificación de compuestos fenólicos identificados en el orujo. 36
Tabla 6. Contenido de compuestos fenólicos en extractos de orujo de oliva para los diferentestratamientos de extracción con líquidos presurizados del diseño composito central
Tabla 7. Rendimiento y cuantificación de compuestos fenólicos en los experimentos para los extractos de orujo de oliva (Var. Arbequina) por extracción con líquidos presurizados 40
Tabla 8. Cuantificación de compuestos fenólicos identificados en las muestras del extracto orujo obtenido bajo condiciones óptimas por líquidos presurizados (EO-LP) y en la materia prima de orujo (O). 46
Tabla 9. Diseño compuesto central 2 ² con puntos axiales para la encapsulación de extracto de orujo con maltodextrina (O-MD)
Tabla 10. Diseño compuesto central 2 ² con puntos axiales para la encapsulación de extracto de orujo con inulina (O-In)
Tabla 11. Condiciones óptimas de secado y caracterización de micropartículas óptimas de lossistemas elaborados con orujo (O-MD y O-In)
Tabla 12. Eficiencia de encapsulación (%) de los compuestos fenólicos presentes en las micropartículas de orujo (O-MD y O-In), obtenidas bajo condiciones óptimas
Tabla 13. Caracterización de micropartículas O-MD, elaboradas bajo condiciones óptimas y alas recubiertas por lecho fluido (O-MD-In y O-MD-Alg)

Tabla 14. Eficiencia de encapsulación de los compuestos fenólicos presentes en las micropartículas O-MD, elaboradas bajo condiciones óptimas y a las recubiertas por lecho fluido (O-MD-In y O-MD-Alg)
Tabla 15. Retención (%) de compuestos fenólicos en tiempo final para el extracto de orujo (O- PLE) y los sistemas de micropartículas O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg, obtenidas bajo condiciones óptimas y almacenadas a 60°C
Tabla 16. Bioaccesibilidad (%) de compuestos fenólicos en fluido gástrico simulado (FGS) yfluido intestinal simulado (FIS) de las micropartículas O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg,obtenidas bajo condiciones óptimas
Tabla 17. Contenido de humedad, fenoles totales y capacidad antioxidante (ORAC) del alpechín. 66
Tabla 18. Listado de compuestos, fórmula molecular, tiempo de retención (Tr) y masa de compuestos fenólicos identificados en el alpechín. 68
Tabla 19. Cuantificación de compuestos fenólicos identificados en el alpechín. 69
Tabla 20. Cuantificación de compuestos fenólicos identificados en las muestras de alpechínfiltrado (Al-filtrado) y en la materia prima de alpechín (Al-MP)
Tabla 21. Diseño compuesto central 2 ² con puntos axiales para la encapsulación de alpechín con maltodextrina (Al-MD)
Tabla 22. Diseño compuesto central 2 ² con puntos axiales para la encapsulación de alpechín con inulina (Al-In). 74
Tabla 23. Condiciones óptimas de secado y caracterización de micropartículas óptimas de los sistemas elaborados con alpechín (Al-MD y Al-In)
Tabla 24. Eficiencia de encapsulación (%) de los compuestos fenólicos presentes en lasmicropartículas de alpechín (Al-MD y Al-In), obtenidas bajo condiciones óptimas
Tabla 25. Caracterización de micropartículas Al-MD, elaboradas bajo condiciones óptimas y a las recubiertas por lecho fluido (Al-MD-In y Al-MD-Alg).80
Tabla 26. Eficiencia de encapsulación de los compuestos fenólicos presentes en las micropartículas Al-MD, elaboradas bajo condiciones óptimas y a las recubiertas por lecho fluido (Al-MD-In y Al-MD-Alg)
Tabla 27. Retención (%) de compuestos fenólicos en tiempo final para el extracto de alpechín y los sistemas de micropartículas Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg obtenidas bajo condiciones óptimas y almacenadas a 60°C
Tabla 28. Bioaccesibilidad (%) de compuestos fenólicos en fluido gástrico simulado (FGS) yfluido intestinal simulado (FIS) de las micropartículas Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg, obtenidas bajo condiciones óptimas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma HPLC-DAD-ESI-TOF/MS de orujo de oliva Var. Arbequina...... 34

Figura 2. Gráfica del contenido de compuestos fenólicos por clase, en los experimentos del diseño composito central para el extracto de orujo por extracción con líquidos presurizados. Compuestos fenólicos totales; Alcoholes fenólicos; Secoiridoides; Flavonoides y Lignanos
Figura 3. Gráficos de superficie de respuesta (GSR) para la extracción de compuestos fenólicos de orujo de oliva (var. Arbequina) por extracción con líquidos presurizados de las variables respuesta a) hidroxitirosol, b) hidroxi D-oleuropeína aglicona, c) hidroxi-oleuropeína, d) demetil oleuropeína, e) descarboximetil oleuropeína, f) oleuropeína y g) rendimiento
Figura 4. Optimización múltiple para la extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva (var. Arbequina) por extracción con líquidos presurizados
Figura 5. Cromatograma HPLC-DAD-ESI-TOF/MS del extracto de orujo obtenido bajo condiciones óptimas por ELP (EO-LP)
Figura 6. Ruta de degradación de oleósidos 46
Figura 7. Gráficos de superficie de respuesta (GSR) para el diseño de micropartículas de extracto de orujo con maltodextrina (O-MD), a) EE ácido quínico; b) EE alcoholes fenólicos; c) EE secoiridoides; d) EE lignanos y e) Rendimiento de proceso
Figura 8. Gráficos de superficie de respuesta (GSR) para el diseño de micropartículas de extracto de orujo con inulina (O-In), a) EE ácido quínico; b) EE alcoholes fenólicos; c) EE secoiridoides; d) EE lignanos y e) rendimiento de proceso
Figura 9. Optimización múltiple por MSR para el diseño de micropartículas de extracto de orujo, a) con maltodextrina (O-MD) y b) con inulina (O-In)
Figura 10. Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM) las micropartículas de orujo obtenidas bajo condiciones óptimas: O-MD y b) O-In y la distribución de tamaño de partículas: c) O-MD y d) O-In
Figura 11. Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM) las micropartículas de orujo obtenidas bajo condiciones óptimas: O-MD-In y b) O-MD-Alg, y la distribución de tamaño de partículas: c) O-MD-In y d) O-MD-Alg
Figura 12. Cinética de degradación de compuestos fenólicos: a) Hidroxitirosol, b) Oleuropeína, c) Luteolina y d) Verbascósido, para el extracto de Orujo O-PLE y los sistemas de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas: O-MD; O-In; O-MD-In y O-MD-Alg

Figura 14. Cromatograma HPLC-DAD-ESI-TOF/MS de alpechín de oliva Var. Arbequina.

ABREVIATURAS

O: orujo
Al: alpechín
b.h: base húmeda
b.s: base seca
EAG: equivalente a ácido gálico
ET: Equivalente a trolox
ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity.
Tr: tiempo de retención
MSR: Metodología de superficie de respuesta
GSR: gráfica de superficie de respuesta
ELP: Extracción con líquidos presurizados
EO-LP: Extracto de orujo obtenido por líquidos presurizados en condiciones óptimas
In: Inulina
MD: maltodextrina
Alg: Alginato de sodio
EE: Eficiencia de encapsulación
R: Rendimiento
FGS: Fluido gástrico simulado
FGI: Fluido intestinal simulado

RESUMEN

En Chile la industria del aceite de oliva ha crecido considerablemente en los últimos años, lo que trae consigo una importante producción de subproductos agroindustriales, dentro de éstos, destacan el orujo y alpechín, los cuales tienen un elevado contenido de compuestos fenólicos que están asociados a diversos efectos biológicos como la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Estos beneficios pueden presentarse como una oportunidad para utilizar estos subproductos como una materia prima para la elaboración de ingredientes alimentarios con propiedades funcionales y/o saludable.

En este contexto, se seleccionó la extracción de compuestos fenólicos con líquidos presurizados desde el orujo y la filtración para el alpechín, ambos métodos para la obtención de compuestos bioactivos, los que se encapsularon por secado por atomización para su protección y luego se recubrieron con lecho fluidizado para modificar la liberación de los compuestos fenólicos en el tracto gastrointestinal. De acuerdo con estos antecedentes, el objetivo de esta tesis fue desarrollar micropartículas de extractos de orujo y de alpechín con propiedades de liberación controlada en el tracto gastrointestinal.

Para la obtención del extracto de orujo se realizó una optimización de la extracción de hidroxitirosol y los compuestos fenólicos que lo contienen por extracción con líquidos presurizados, obteniendo un extracto óptimo (EO-LP), que presentó un contenido de compuestos fenólicos 5,8 veces mayor en comparación con la materia prima. En cuanto al alpechín por filtración (Al-filtrado), mostró un contenido de compuestos fenólicos 1,3 veces mayor a la materia prima. Ambos extractos mostraron diferencias en el perfil de compuestos fenólicos en comparación con la materia prima.

EO-LP y Al-filtrado se encapsularon mediante secado por atomización, utilizando Maltodextrina (MD) e Inulina (In) como agentes encapsulantes, de acuerdo a un diseño experimental Composito central más punto axial para cada sistema de micropartículas estudiado (O-MD, O-In, Al-MD y Al-In). La temperatura del aire de entrada al secador y la relación (EO-LP ó Al-filtrado)/agente encapsulante tuvieron un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación (EE) y el rendimiento del proceso. Las condiciones óptimas para la obtención de todas las micropartículas fueron características y exclusivas para cada sistema.

Los sistemas de micropartículas obtenidos bajo condiciones óptimas mostraron diferencias en las EE asociadas al agente encapsulante (MD e In) y a los distintos compuestos fenólicos presentes en los extractos, lo que podría explicarse por las interacciones electrostáticas y/o

formación de puentes de hidrógeno entre el activo encapsulado y el agente encapsulante utilizado. El rendimiento de proceso fue mayor a 82% en todos los sitemas.

Posteriormente, las micropartículas elaboradas con maltodextrina (O-MD y Al-MD), se recubrieron con inulina (In) y alginato de sodio (Alg) por lecho fluidizado, obteniendo micropartículas recubiertas (O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD-In y Al-MD-Alg), las que presentaron diferencias significativas asociadas a la solubilidad en agua, tamaño y morfología, al compararlas con las micropartículas sin recubrir.

Se estudió la estabilidad de los compuestos fenólicos encapsulados (O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg) y compuestos fenólicos encapsulados (EO-LP y Al-filtrado) por 180 días a 60°C. Los resultados mostraron que la encapsulación pesentó una protección de los compuestos fenólicos durante el almacenamiento. Sin embargo, en los extractos y micropartículas algunos compuestos fenólicos aumentaron en el tiempo, lo que podría estar asociado a su formación por rutas de degradación y oxidación de compuestos secoiridoides y alcoholes fenólicos.

Finalmente, se estudió la bioaccesibilidad y el perfil de liberación de los compuestos fenólicos en el tractogastrintesinal simulado *in vitro* desde las micropartículas óptimas (O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg). Lo que mostró una disminución en la liberación de los compuestos fenólicos en condiciones gástricas y un aumento de la bioaccesibilidad a nivel intestinal simulado en las micropartículas recubiertas por lecho fluidizado, al compararlas con las obtenidas por secado por atomización elaboradas con maltodextrina.

Es importante destacar que las etapas de optimización de extracción y encapsulación, además de la caracterización en todas las actividades de la tesis, se realizó por HPLC-DAD-ESI-TOF/MS para la identificación y cuantificación de los distintos compuestos fenólicos estudiados.

ABSTRACT

In Chile, the olive oil industry has grown considerably in recent years, which brings with it an important production of agroindustry by-products, among them, the pomace and olive mill waste water, which have a high content of phenolic compounds that are associated with to diverse biological effects such as the prevention of diseases related to oxidative stress, cardiovascular diseases and cancer. The above can be presented as an opportunity to use these by-products as raw material for the preparation of food ingredients with functional and/or healthy properties.

In this context, the extraction of phenolic compounds with pressurized liquids from the pomace and filtration for olive wastewater were selected, both methods for obtaining bioactive compounds, which were encapsulated by spray drying for protection and then coated with bed fluidized to modify the release of phenolic compounds in the gastrointestinal tract. According to this background, the objective of this thesis was to develop microparticles of pomace and olive mill wastewater extracts with controlled release properties in the gastrointestinal tract.

To obtain the pomace extract, an optimization of the extraction of hydroxytyrosol and the phenolic compounds containing it by extraction with pressurized liquids was performed, obtaining an optimal extract (EO-LP), which presented a content of phenolic compounds of 5.8 times higher compared to the raw material. As for olive mill wastewater by filtration (Al-filtering), it showed a content of phenolic compounds of 1.3 times greater than the raw material. Both extracts showed differences in the profile of phenolic compounds compared to the raw material.

EO-LP and Al-filtered were encapsulated by spray drying, using Maltodextrin (MD) and Inulin (In) as encapsulating agents, according to an experimental design Central composite plus axial point for each microparticle system studied (O-MD, O-In, Al-MD and Al-In). The temperature of the air entering the dryer and the ratio (EO-LP or Al-filtering)/ encapsulating agent had a significant effect on encapsulation efficiency (EE) and process performance. It was observed that the optimal conditions for obtaining all the microparticles are characteristic and exclusive for each system.

The microparticle systems obtained under optimal conditions showed differences in EE associated with the encapsulating agent (MD and In) and the different phenolic compounds present in the extracts, which could be explained by electrostatic interactions and/or hydrogen bridge formation between the encapsulated asset and the encapsulating agent used. The process yield was greater than 82% in all cases.

Subsequently, the microparticles made with maltodextrin (O-MD and Al-MD) were coated with inulin (In) and sodium alginate (Alg) by fluidized bed, obtaining coated microparticles (O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD-In and Al-MD-Alg), which presented significant differences associated with water solubility, size and morphology, when compared with uncoated microparticles, made with maltodextrin.

The stability of encapsulated phenolic compounds (O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD-In and Al-MD-Alg) and uncapsulated phenolic compounds (EO-LP and Al-filtered) was studied, for 180 days at 60 °C. The encapsulation showed protecting of the polyphenols during storage demonstrating effective protection of most polyphenols with the encapsulation process. However, there is an increase in some phenolic compounds over time (both in the microparticles and in the extracts), which could be associated with their formation by degradation and oxidation pathways of secoiridoid compounds and phenolic alcohols.

Finally, the bioaccessibility and release profile of the phenolic compounds present in the optimal microparticles (O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD -In and Al-MD-Alg), it was studied in simulated gastric (SGF) and intestinal simulated (ISF) conditions. This showed a decrease in the release of phenolic compounds under gastric conditions and an increase in bioaccessibility at the simulated intestinal level in the coating microparticles, when compared to those obtained by spray drying made with maltodextrin.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del olivo y la producción de aceite de oliva es muy importante en países Mediterráneos (Roig *et al.*, 2006; Ziogas *et al.*, 2010; Rubio-Senent *et al.*, 2012; Kilic y Solmaz, 2013). Dentro de los mayores productores de aceite de oliva se encuentran España, Italia, Grecia y Turquía, los que en conjunto producen sobre el 90% de la producción mundial (Kilic y Solmaz, 2013). En Chile la industria olivícola ha crecido considerablemente en los últimos años, actualmente la superficie plantada alcanza 25.000 hectáreas (0,3% de la superficie mundial). Se estima que el 70% del total de la superficie se destina a la elaboración de aceite de oliva (Chile Oliva, 2018).

El contenido de aceite en los frutos del olivo es cercano a un 20% (Bellincontro *et al.*, 2012), lo que significa que un 80% de las olivas destinadas a la producción de aceite se convierten en subproductos de la industria (Rubio-Senent *et al.*, 2012; 2013), produciendo grandes volúmenes, que se destinan de forma incipiente a abono, compost o, en el caso del alpechín, se puede incorporar al agua de riego (Turano *et al.*, 2002; Roig *et al.*, 2006; Kapellakis *et al.*, 2008; Kilic y Solmaz, 2013 y Uribe *et al.*, 2014). El manejo de los subproductos es un problema ambiental debido a la presencia de compuestos orgánicos que son difíciles de biodegradar, tales como ácidos grasos de cadena larga y compuestos fenólicos (Kilic y Solmaz, 2013; Kapellakis *et al.*, 2008).

Actualmente, la extracción de aceite de oliva se realiza principalmente por centrifugación, en sistemas de dos o tres fases (Roig *et al.*, 2006; Rubio-Senent *et al.*, 2012). El sistema de tres fases utiliza grandes volúmenes de agua con el fin de facilitar la extracción de aceite, lo que genera dos tipos de subproductos: uno líquido, el cual se denomina alpechín, agua de vegetación u *olive mill wastewater* (contiene agua, pulpa de oliva, mucilago, pectina y aceite, entre otros compuestos) y uno sólido denominado orujo o pomasa de oliva, (Rubio-Senent *et al.*, 2012; Frankel *et al.*, 2013). El sistema de dos fases produce sólo un subproducto denominado alperujo, el cual es una combinación de los residuos líquidos y sólidos (Rubio-Senent *et al.*, 2012; Frankel *et al.*, 2013). El orujo y alperujo contienen la pulpa, piel, carozo de oliva y agua, se diferencian en su composición principalmente por el contenido de humedad, la cual varía entre 45 a 55% para el orujo y entre 65 y 75% para el alperujo (Papaioannou *et al.*, 2013; Frankel *et al.*, 2013).

Los distintos subproductos de la industria del aceite de oliva contienen un alto contenido de polifenoles; ya que, luego de la extracción de aceite en tres fases, un 98-99% de los compuestos fenólicos presentes en el fruto permanecen en los residuos (alpechín (53%) y orujo (45%)) (Rubio-Senent *et al.*, 2012; He *et al.*, 2012; Cardinali *et al.*, 2012).

1.1. Métodos de extracción de compuestos fenólicos desde residuos de la industria del aceite de oliva.

Para la extracción de compuestos fenólicos desde frutos y subproductos de la industria de aceite de oliva a escala de laboratorio, se han utilizado diferentes disolventes, como metanol-agua, acetato de etilo, propanol, acetona o acetonitrilo. Sin embargo, los efectos de estos compuestos en humanos y el medio ambiente están llamando la atención. Actualmente, hay una creciente conciencia pública de la salud, el medio ambiente y la seguridad, asociados con el uso de solventes orgánicos en la elaboración de alimentos y la posible contaminación en los productos finales. El elevado costo de los solventes orgánicos y las regulaciones ambientales cada vez más estrictas, junto con las nuevas exigencias médicas y de la industria de alimentos por productos de valor ultra-puros, fomentan la aplicación de tecnologías limpias (Mohamed y Mansoori, 2002).

Por lo tanto, la industria ha abordado su investigación para obtener extractos enriquecidos con compuestos bioactivos utilizando diferentes procesos. Los métodos para la extracción de compuestos fenólicos desde sub-productos del aceite de oliva son: extracción con solventes (Ryan *et al.*, 2001; McDonald *et al.*, 2001; Rubio-Senent *et al.*, 2012; Kalogerakis *et al.*, 2013; Uribe *et al.*, 20014), extracción hidrotérmica (Rubio-Senent *et al.*, 2013; Papaioannou *et al.*, 2013), reactor de vapor a alta presión y alta temperatura (Aliakbarian *et al.*, 2011), extracción con agua subcrítica (Japón-Luján *et al.*, 2007; Pérez-Serradilla *et al.*, 2008; Lozano-Sánchez *et al.*, 2014; Mustafa y Turner, 2011), extracción asistida por microondas y ultrasonido (Chanioti y Tzia, 2018; Morsi *et al.*, 2016) y resinas absorbentes o membrana separación (Agalias *et al.*, 2007; He *et al.*, 2012; Cardinali *et al.*, 2012). Sin embargo, el interés industrial se ha dirigido a desarrollar nuevos procesos basado en técnicas de extracción más selectivas, respetuosas con el medio ambiente y rentables. Bajo este contexto, en este estudio se seleccionó la extracción con líquidos presurizados para extraer los polifenoles desde el orujo y la filtración para el alpechín.

1.1.1. Extracción con líquidos presurizados.

La extracción con líquidos presurizados es una técnica basada en el uso de un determinado disolvente de extracción (generalmente agua) a una temperatura entre su punto de ebullición y la temperatura crítica y a una presión suficiente para mantener el disolvente en un estado líquido en un sistema sellado (Lu *et al.*, 2014). A una presión sobre la atmosférica (Cacace y Mazza, 2007; Japón-Luján y Luque De Castro, 2007; Pérez-Serradilla *et al.*, 2008; Plaza *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2014). Al modificar la temperatura y presión de los solventes varía la constante dieléctrica, densidad, miscibilidad, poder disolvente y las propiedades de transporte (viscosidad, coeficiente de difusión y movilidad de iones) (Turner e Ibañez, 2012; Pavlovic *et al.*, 2013). La extracción con líquidos presurizados presenta ventajas respecto a las técnicas tradicionales; es más rápida, se logran

mayores rendimientos y se reduce el uso de solventes considerablemente (Cacace y Mazza, 2007; Plaza *et al.*, 2010; Pavlovic *et al.*, 2013).

Al utilizar agua como solvente de extracción, el efecto más importante del aumento de la temperatura es la ruptura de los puentes de hidrógeno, lo que provoca una reducción de la constante dieléctrica del agua y de la polaridad (Turner e Ibañez, 2012), alcanzando valores similares a algunos disolventes orgánicos como etanol, metanol o acetonitrilo a temperatura ambiente (Cacace y Mazza, 2007; Plaza et al., 2010; Pavlovic et al., 2013). Así mismo, facilita la difusión del analito, disminuve la viscosidad y la tensión superficial, lo que permite una mejor penetración en la matriz. Otro efecto, menos deseable del aumento de la temperatura, es el mayor grado de degradación de compuestos termolábiles. En cuanto al tiempo y flujo, es posible afirmar que el flujo determina el rendimiento de extracción. Para compuestos térmicamente lábiles, se debe optimizar tiempo y flujo para lograr maximizar el rendimiento de extracción sin causar la degradación de los analitos y una dilución excesiva (Turner e Ibañez, 2012). El efecto de la presión tiene un efecto marginal en las propiedades de los solventes, sin embargo la presión es un requisito para lograr que el solvente permanezca en estado líquido a una temperatura por encima del punto de ebullición, aunque el uso de presión adicional podría ser capaz de permitir una mejor penetración del fluido en la matriz, lo que resultaría en una mayor eficacia de la extracción, pero, por lo general, se reconoce que para muchas materias primas pre-tratadas y/o molidas no se observan grandes efectos (Turner e Ibañez, 2012). Esta técnica, es una técnica eficaz no solo como herramienta de laboratorio, sino también para las industrias agroalimentarias (Cádiz-Gurrea et al., 2019).

La tecnología de extracción con líquidos presurizados se ha utilizado para extraer compuestos bioactivos desde un amplio rango de especies vegetales, como antioxidantes desde rosa mosqueta, antocianos de piel de uvas tintas, catequinas y epicatequinas desde hojas de té y de semillas de uva, aceites esenciales de orégano, lignanos de semillas de lino (Cacace y Mazza, 2007), oleuropeína de hojas de olivo (Taamalli *et al.*, 2012), y fenoles a partir de alperujo de oliva (Japón-Luján y Luque de Castro, 2007; Pérez-Serradilla *et al.*, 2008), entre otros. No hay trabajos sobre extracción con líquidos presurizados de polifenoles desde orujo, tópico que se incluyó en este trabajo.

1.2. Compuestos fenólicos de los subproductos de la industria del aceite de oliva.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas que abarcan más de 8000 compuestos, desempeñan diversas funciones fisiológicas, por su ubicuidad en los alimentos de origen vegetal forman parte habitual de la dieta (Bravo, 1998). Los compuestos fenólicos se clasifican de acuerdo a las características de su estructura química (número de anillos fenólicos y elementos estructurales unidos a los anillos); incluyen desde estructuras simples como los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoico y ácidos hidroxicinámicos) hasta estructuras condensadas

como estilbenos y lignanos (Manach *et al.*, 2004). Los compuestos fenólicos se han asociado con la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Esta acción antioxidante se debe a la donación de un átomo de hidrógeno a radicales libres y/o a su efecto como quelante de iones metálicos (Bravo, 1998).

En las oleáceas los compuestos fenólicos corresponden principalmente a derivados de los secoiridoides, seguidos por alcoholes fenólicos y flavonoides (Soler-Rivas *et al.*, 2000). La oleuropeína y demetil oleuropeína son los secoiridoides fenólicos presentes en los frutos de oliva, pero en los subproductos, solo se encuentran trazas de estos compuestos fenólicos debido a degradaciones enzimáticas y oxidaciones (He *et al.*, 2012; Kalogerakis *et al.*, 2013).

En extractos metanol-agua de frutos de oliva con color de piel verde, el principal compuesto encontrado es oleuropeína (Ryan *et al.*, 2001) y en extractos de alpechín es el hidroxitirosol (55 y 70 %) (He *et al.*, 2012; Frankel *et al.*, 2013; Kalogerakis *et al.*, 2013). Otros polifenoles reportados son: oleuropeína aglicona, ácido elenólico, luteolina-7-glucósido, quercetina, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido vainillinico y alcoholes fenólicos, verbascósidos, isoverbascósidos, β -hidroxiverbascosidos y otros compuestos fenólicos oxidados (Cardinali *et al.*, 2012; Frankel *et al.*, 2013).

Los trabajos sobre identificación de polifenoles en extractos desde subproductos como alpechín y orujo (considerados en este proyecto) son escasos (Kalogerakis *et al.*, 2013; Cardinali *et al.*, 2012; He *et al.*, 2012; Agalias *et al.*, 2007). En extractos de alpechín por extracción con solvente se identificó principalmente hidroxitirosol y tirosol, trazas de oleuropeína, ácido cafeico y ácido gálico (Kalogerakis *et al.*, 2013). En extractos de alpechín de coratina por separación por membrana no se encontró hidroxitirosol y tirosol, reportando una mayor proporción de verbascósidos e isoverbascósidos (Cardinali *et al.*, 2012). En extractos de alpechín obtenidos por separación con resinas poliméricas absorbentes los principales polifenoles fueron hidroxitirosol, tirosol y ácido elenólico, aunque no especifica la variedad de las aceitunas (He *et al.*, 2012; Agalias *et al.*, 2007). Por otro lado, en un extracto fenólico de orujo realizado por extracción con solventes se identificó oleuropeína, ligustrósido aglicona, oleuropeína aglicona, tirosol, ácido gálico, hidroxitirosol, ácido ferúlico y ácido vainillinico (Cioffi *et al.*, 2010). Estos trabajos muestras que el perfil de polifenoles depende del método de extracción o separación, variedad de aceituna y tipo de residuo (alpechín, orujo o alperujo), entre otros factores.

1.3. Absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos.

Es importante mencionar que los polifenoles más comunes en la dieta humana no son necesariamente los más activos en el organismo, debido a que tienen una menor actividad intrínseca, se absorben mal en el intestino, son altamente metabolizados o rápidamente eliminados. Además, los metabolitos de los compuestos fenólicos que se encuentran en la sangre o en los órganos diana son el resultado de la actividad digestiva o hepática, por lo que pueden ser diferentes a las sustancias nativas en términos de actividad biológica (Manach *et al.*, 2004).

El metabolismo de los polifenoles es complejo, aunque se produce a través de una vía común. Las agliconas pueden ser absorbidas por el intestino delgado, sin embargo, la mayoría de los polifenoles que están presentes en los alimentos en la forma de ésteres, glicósidos, o polímeros no pueden ser absorbidos en su forma nativa. Estas sustancias deben ser hidrolizadas por enzimas intestinales o por la microflora del colon antes de que puedan ser absorbidos. Durante el curso de la absorción, los polifenoles se conjugan en el intestino delgado y más tarde en el hígado. Este proceso incluye principalmente metilación, sulfatación y glucuronidación como un mecanismo de desintoxicación metabólica, común a muchos xenobióticos, aumentando su carácter hidrófilo y facilitando así su eliminación biliar y urinaria. Los mecanismos de conjugación son altamente eficientes, por lo que las agliconas están generalmente ausentes en la sangre o presentes en bajas concentraciones después del consumo de dosis nutricionales. Los polifenoles y sus derivados se eliminan principalmente en la orina y bilis. Los polifenoles son secretados por vía biliar en el duodeno, donde son sometidos a la acción de enzimas bacterianas, especialmente glucuronidasa, en el segmento distal del intestino, después de lo cual pueden ser reabsorbidos. Este reciclado enterohepático puede conducir a una mayor presencia de polifenoles dentro del organismo. En este contexto, para mejorar la absorción de polifenoles es necesario preservar sus propiedades nutricionales durante el tracto gastrointestinal para dirigir la absorción de los polifenoles en el intestino (Manach et al., 2004).

Los extractos polifenólicos de orujo y alpechín pueden utilizarse como potenciales ingredientes de alimentos con efecto saludable (Frankel *et al.*, 2013; Uribe *et al.*, 2014). Sin embargo, los polifenoles se pueden degradar por efecto de las condiciones del medioambiente y/o durante su paso por el tracto gastrointestinal superior, afectando su efectividad, estabilidad, bioactividad y biodisponibilidad. Además, el sabor desagradable de algunos polifenoles limita su aplicación en alimentos. Para superar estas desventajas en este proyecto se planteó el uso de la tecnología de encapsulación que permitiría la protección de los polifenoles y su liberación controlada a un lugar específico del organismo donde es absorbido (Fang y Bhandari, 2010).

1.4. Microencapsulación.

La microencapsulación es una técnica mediante la cual compuestos activos sólidos, líquidos o gaseosos se introducen en una matriz o sistema pared polimérica con el fin de proteger los activos del medio ambiente y de influencias que pueden resultar deletéreas o bien para la liberación controlada de los compuestos activos, en un lugar y/o velocidad específica. Su objetivo principal es proteger el material núcleo de las condiciones medioambientales adversas (luz, temperatura, humedad y oxígeno, entre otros), contribuyendo de este modo a un aumento de la vida útil del producto y/o al control de la liberación del compuesto activo (Yáñez-Fernández *et al.*, 2002; Fang y Bhandari, 2010).

Algunas de los métodos utilizados para encapsulación son: secado por atomización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión, coacervación, gelificación iónica, atrapamiento de liposomas, complejos de inclusión, separación suspensión centrífuga, liofilización, cocristalización y emulsión, entre otros (Gibbs *et al.*, 1999; Fang y Bhandari, 2010). La elección de un método en particular depende del tamaño medio de partícula requerido, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de las características del agente activo, de las aplicaciones de las micropartículas, del mecanismo de liberación deseado y del costo (Ré, 1998). En este estudio se utilizó el secado por atomización y el recubrimiento por lecho fluidizado.

1.4.1. Secado por atomización.

Una de las tecnologías industriales más utilizados para la encapsulación es el secado por atomización o Spray drying. Es un procedimiento rápido, de bajo costo y reproducible (De Vos *et al.*, 2010; Onwulata, 2013; Fang y Bhandari, 2010). En este método un líquido (solución, dispersión o emulsión) es atomizado en un medio de secado que habitualmente es aire caliente, obteniendo instantáneamente un producto en polvo debido a la rápida evaporación del solvente (Vega y Roos, 2006; Fang y Bhandari, 2010; De Vos *et al.*, 2010; Onwulata, 2013). Las partículas se recogen después de que caen a la parte inferior del ciclón, con un tamaño entre 10 y 100 μ m (Fang y Bhandari, 2010; De Vos *et al.*, 2010). Una de las ventajas de esta técnica además de su simplicidad, es su utilidad para encapsular materiales termosensibles, debido al breve período de exposición a altas temperaturas (entre 5-30 segundos) (Gibbs *et al.*, 1999). Una desventaja del secado por atomización como método de encapsulación es que requiere el uso de biopolímeros solubles en agua o al menos dispersables en agua, que además permitan obtener una solución de alimentación con un alto contenido de sólidos y una baja viscosidad. Estos factores limitan el número de biopolímeros que se pueden utilizar (Desai y Park, 2005).

En la encapsulación de polifenoles por el método de secado por atomización se han utilizado diferentes tipos de extractos vegetales como: tuna púrpura (Sáenz *et al.*, 2009), zanahoria morada (Ersus y Yudargel, 2007) granadas (Robert *et al.*, 2010), semillas de uva

(Zhang *et al.*, 2007), pomasa de manzana y hojas de olivo (Kosaraju *et al.*, 2008); entre otros y en menor cantidad compuestos puros como naringenina y quercetina (Sansone *et al.*, 2011).

1.4.2. Agentes encapsulantes.

En encapsulación de polifenoles desde diferentes fuentes se han utilizado carbohidratos (maltodextrinas de diferentes equivalentes de dextrosa, inulina, quitosano y almidones modificados), proteínas (aislado proteico de soja, proteínas de leche y gelatinas) y gomas (goma guar y alginato de sodio) como agentes encapsulantes. La mayoría de estos estudios se han enfocado principalmente en la protección de los polifenoles frente a condiciones del medioambiente, logrando prolongar su vida útil (Ersus y Yudargel, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Kosaraju *et al.*, 2008; Sáenz *et al.*, 2009; Robert *et al.*, 2010). Sin embargo, existen escasos trabajos enfocados en la liberación de polifenoles "in *vitro*" simulando condiciones de pH y/o enzimas con el propósito de dirigir la liberación de polifenoles en el lugar donde son absorbidos (Sansone *et al.*, 2011; Beirão da Costa *et al.*, 2012; González *et al.*, 2019; 2020). En estos trabajos se utilizó como agentes encapsulantes ftalato acetato de celulosa y carboximetilcelulosa (Sansone *et al.*, 2011), almidón de arroz, inulina y una mezcla de gelatina y sacarosa (Beirão da Costa *et al.*, 2012), maltodextrina, inulina y alginato de sodio (González *et al.*, 2019; 2020).

La selección del material encapsulante depende del activo a encapsular y de las características deseadas en el producto final. Para secado por atomización, los agentes encapsulantes deben ser solubles en agua a un nivel aceptable (Desai y Park, 2005), tener buenas propiedades emulsificantes cuando el activo es hidrofóbico, baja viscosidad en soluciones concentradas, un carácter no higroscópico, sabor suave, no reactivo, bajo costo (Murúa-Pagola *et al.*, 2009) y que estén permitidos en la industria de alimentos (Gouin, 2004).

La mayoría del conocimiento acerca de la liberación dirigida de moléculas en el intestino se ha obtenido a partir de la investigación en relación a fármacos en lugar de alimentos, por lo que un número reducido de polímeros, procedentes de la investigación farmacéutica o biomédica, se puede utilizar para proteger los componentes bioactivos de las condiciones perjudiciales en el estómago y la parte superior del intestino delgado y permitir la entrega específica de moléculas bioactivas de los alimentos mediante el uso de la actividad enzimática en la microbiota (De Vos *et al.*, 2010).

Los polisacáridos con propiedades de liberación en el colon más utilizados son quitosano, alginato, pectina, dextranos, almidón e inulina (Sinha y Kumria, 2001; De Vos *et al.*, 2010). Estos polisacáridos pueden actuar como sustratos para la microbiota bacteriana habitante en el intestino. La degradación de las moléculas de la matriz de polisacárido depende principalmente de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos entre las moléculas y la posterior

liberación de los componentes bioactivos. Muchas de las bacterias de la microbiota contribuyen a la degradación, pero los principales organismos responsables de esta biodegradación son Bacteroides y Bifidobacterias (De Vos *et al.*, 2010).

En las micropartículas de compuestos bioactivos, el agente encapsulante debería permitir la protección del activo durante el almacenamiento del ingrediente; preservar las propiedades del activo en el alimento utilizado como *carrier* hasta que sea consumido (procesamiento y/o almacenamiento del alimento) y preservar el activo durante el paso por el tracto gastrointestinal superior hasta el lugar donde sea absorbido (De Vos *et al.*, 2010). En este contexto, es difícil encontrar un único biopolímero que cumpla con estos requisitos. Generalmente, los biopolímeros con propiedades de liberación en el colon tienen una alta viscosidad en soluciones acuosas y no pueden ser utilizados por secado por atomización a un nivel de sólidos aceptable.

En este trabajo se elaboraron micropartículas de orujo y alpechín por secado con atomización con inulina (polímero con propiedades colónicas) y maltodextrina. Como estrategia para otorgarle propiedades de liberación intestinal a las micropartículas de maltodextrina, estás se recubrieron por lecho fluidizado con inulina y alginato de sodio, ambos polímeros con propiedades de liberación intestinal.

- Maltodextrina

Las maltodextrinas son polímeros de D-glucosa unidas por enlaces α (1-4) y que tienen un equivalente de dextrosa (ED) menor que 20 (Kuntz, 1997). La maltodextrina es un agente encapsulante de bajo costo, alta efectividad, inodoro, incoloro y de baja viscosidad a altas concentraciones, además permiten la formación de polvos de libre flujo sin enmascarar el sabor original (García *et al.*, 2004; Robert, *et al.*, 2017), está disponible en diferentes pesos moleculares y son extensivamente utilizados en la industria de alimentos (Madene *et al.*, 2006; Sáenz *et al.*, 2009). Sin embargo, la maltodextrina no posee las propiedades necesarias para utilizase en liberación intestinal. Debido a que es un polímero digerible y los compuestos bioactivos encapsulados pueden liberarse rápidamente durante la digestión, dejándolos expuestos a las condiciones gastrointestinales (González *et al.*, 2020).

- Inulina

La inulina es un polisacárido de origen vegetal que se encuentra en muchas plantas, tales como cebolla, ajo, achicoria y alcachofa. Químicamente, posee moléculas de D-fructosa unidas con enlace β (2-1) con ramificaciones β (2-6) entre 1-5% (Sinha y Kumria, 2003; Stevens *et al.*, 2001). Aunque la inulina es moderadamente soluble en agua, sus enlaces glicosídicos β - (2-1) hacen que no sea digerible por humanos, en contraste con la maltodextrina, pero en gran medida digerible por algunos microorganismos de la microbiota intestinal (Barclay, Ginic-Markovic, Cooper, & Petrovsky, 2010).

La inulina es un fructooligosacárido (FOS) con propiedades prebióticas por lo que se puede utilizar como agente encapsulante para partículas de liberación dirigida al colon, debido a que pasa relativamente intacto a través de la parte superior del tracto gastrointestinal, llegando al colon donde se encuentra los compuestos bioactivos pueden ser liberados (De Vos *et al.*, 2010). Los microorganismos responsables de la degradación de la inulina son bifidobacterias, que constituyen hasta un 25% de la microbiota normal del intestino humano (Sinha y Kumria, 2003; De Vos *et al.*, 2010).

- Alginato

Los alginatos son polianiónicos polisacáridos provenientes de algas pardas, conformados por ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) (Sinha y Kumria, 2003; De Vos *et al.*, 2010; Lupo *et al.*, 2012). Tanto la distribución de sus monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxílicos confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido en G. Entre las sales de alginato más empleadas se encuentra la sal de sodio debido a su solubilidad en agua fría (Lupo *et al.*, 2012).

El alginato se contrae a pH bajo (condiciones gástricas) por lo que los compuestos encapsulados no se liberan. En el fluido gástrico, el alginato de sodio hidratado se convierte en una capa viscosa insoluble, llamada ácido algínico, pero una vez que pasa a un pH más alto (condiciones intestinales), la capa del ácido algínico se convierte en una capa viscosa soluble (George y Abraham, 2006). Este comportamiento dependiente del pH del alginato puede explotarse para modificar los perfiles de liberación al utilizarlo como agente encapsulante, ya que se pueden aplicar para facilitar la liberación de los componentes bioactivos en el íleon o colon (De Vos *et al.*, 2010). Sin embargo, el alginato se ha utilizado muy poco como agente encapsulante para compuestos bioactivos mediante secado por atomización (Yoo *et al.*, 2006), debido a que tiene una alta viscosidad a baja concentración.

1.5. Recubrimiento por lecho fluido.

El secado por lecho fluidizado se utiliza para la encapsulación de materiales de núcleo sólido, incluyendo líquidos absorbidos en sólidos porosos. Las partículas sólidas para encapsular se suspenden en una corriente de aire. El disolvente con el recubrimiento se atomiza a través de boquillas de pulverización en la cámara de aire y se deposita sobre las partículas de material de núcleo suspendido (Onwulata, 2013). El flujo constante de aire a través de la cámara permite que el material de revestimiento se adhiera a la superficie de la partícula por evaporación del disolvente o enfriamiento de la partícula encapsulada (Dubey *et al.*, 2009; Poshadri y Aparna, 2010; Sri *et al.*, 2012; Onwulata, 2013). Esta tecnología es útil para aplicar una capa adicional a micropartículas formuladas para la liberación específica en el intestino (De Vos *et al.*, 2010).

1.6. Hipótesis

Las micropartículas de extractos de orujo y de alpechín con maltodextrina, recubiertas por lecho fluidizado con alginato o inulina presentarán una mayor eficiencia de encapsulación, estabilidad de polifenoles y similares propiedades de protección en condiciones gástricas, con respecto a aquellas micropartículas elaboradas con inulina.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo General

Desarrollar micropartículas de extractos de orujo y de alpechín con propiedades de liberación controlada en el sistema gastrointestinal.

1.7.1. Objetivos específicos

- 1. Caracterizar las materias primas orujo (O) y alpechín (Al).
- 2. Elaborar los extractos de orujo por extracción con solventes presurizados aplicando un diseño experimental, optimizado por metodología de superficie respuesta (MSR) y el extracto de alpechín por filtración.
- 3. Caracterizar los extractos de orujo y alpechín obtenidos bajo condiciones óptimas.
- 4. Estudiar la relación extracto (O o Al)/agente encapsulante (MD o In) y temperatura del aire de entrada al secador sobre la eficiencia de encapsulación y recuperación de compuestos fenólicos, utilizando un diseño Composito central más punto axial optimizado por metodología de superficie respuesta (MSR).
- 5. Caracterizar química y morfológicamente las micropartículas de extractos de orujo y alpechín obtenidas bajo condiciones óptimas para cada extracto y agente encapsulante.
- 6. Recubrir y caracterizar las micropartículas de orujo y alpechín elaboradas con maltodextrina por lecho fluidizado.
- 7. Estudiar la estabilidad de polifenoles desde micropartículas de orujo y alpechín obtenidas bajo condiciones óptimas durante el almacenamiento a 60°C.
- 8. Estudiar el perfil de liberación de polifenoles desde micropartículas de orujo y alpechín obtenidas bajo condiciones óptimas en un sistema gastrointestinal simulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales.

Los sub-productos orujo y alpechín de frutos de oliva de la variedad arbequina se obtuvieron de la empresa Olivos Ruta del Sol S.A, de la almazara ubicada en Pumanque, VI Región del Libertador Bernardo O'Higgins, Chile. Los agentes encapsulantes: Maltodextrina (MD) e Inulina (In) se obtuvieron de Prinal S.A y Alginato de sodio (Alg), se obtuvo de Quimatic S.A.

Los solventes hexano, etanol, metanol e hidróxido de sodio se obtuvieron de Panreac (Barcelona, España). El ácido acético se adquirió de Fluka (Steinheim, Alemania). Los estándares de hidroxitirosol, ácido cafeico, luteolina, apigenina, ácido quínico y naringenina, (+) - el pinoresinol, oleuropeína y luteolina-7-O-glucósido fueron comprado a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

2.2. Métodos.

2.2.1. Obtención y procesamiento de las materias primas orujo (O) y alpechín (Al).

Las muestras de orujo y alpechín correspondieron a los productos en la salida de la línea de proceso del decanter de 3 fases. Las muestras se trasladaron inmediatamente al laboratorio de Ingredientes funcionales (Departamento de agroindustria y enología, Facultad de Ciencias Agronpomicas-Universidad de Chile) donde se homogenerizaron, congelaron (-20°C) y deshidrataron, utilizando un liofilizador (IIShinBioBase Co. Ltd. Modelo FD5508, Dongduchun City Kyunggi-do, Korea).

2.2.2. Caracterización de materias primas orujo (O) y alpechín (Al).

Para caracterizar las materias primas se realizaron los siguientes análisis:

- Humedad: se determinó de acuerdo con el método descrito en AOAC (1996).
- **Contenido de fenoles totales:** Se determinó por el método de Folin Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro UV/Vis Mecasys Optizen Pop (Korea). (Anexo 2)

- Capacidad antioxidante (ORAC): se determinó por el método desarrollado por Dávalos *et al.* (2003), mediante fluorescencia utilizando un Fluorímetro Biotek FLx800 (USA). (Anexo 3)
- **Perfil de compuestos fenólicos y su cuantificación:** se determinó de acuerdo con el método utilizado por Lozano *et al.* (2013), mediante HPLC-DAD-ESI-TOF/MS. (Anexo 4)

2.2.3. Elaboración de extractos a partir de los sub-productos de la industria del aceite de oliva (orujo y alpechín).

2.2.3.1. Elaboración de extractos a partir del sub-producto orujo, usando extracción por líquidos presurizados.

Previo a la extracción, se realizó un proceso de separación mecánica con el fin de separar el carozo, en una pulpadora de tornillo con tamiz de 1 mm. La materia prima resultante se secó por liofilización, utilizando un liofilizador IIShinBioBase Co. Ltd. Modelo FD5508 (Dongduchun City Kyunggi-do, Korea).

La extracción se realizó a 5 g de muestra seca mezclada con arena en relación 1:2 en una celda de extracción de acero inoxidable de 35 mL, utilizando un equipo extractor de fluidos presurizados Dionex ASE 350, Thermo Fisher Scientific Inc. (USA), la cual se dividió en 2 etapas:

- Extracción de la materia grasa: previo a la extracción de compuestos fenólicos se extrajo la materia grasa, para esto se realizaron 3 extracciones sucesivas de 5 min cada una a temperatura ambiente a 1500 psi, utilizando hexano.
- Extracción de compuestos fenólicos: se realizó una extracción por 20 min a 1500 psi, la temperatura de proceso y la mezcla de solventes utilizados (mezcla de etanol:agua) se optimizaron de acuerdo a un diseño experimental Composito central con punto axial 2^2 , con 12 experimentos (4 puntos experimentales, 4 puntos axiales y 4 puntos centrales). Las variables independientes fueron la temperatura (X₁) y contenido de etanol (X₂) (Tabla 1). Las variables dependientes correspondieron al contenido de hidroxitirosol, hidroxi D-oleuropeína aglicona, hidroxi-oleuropeína, demetil oleuropeína, descarboximetil oleuropeína y de oleuropeína y el rendimiento de proceso (R).

Tabla 1. Variables independientes y niveles en el diseño de composito central más punto
axial, para el proceso de extracción por líquidos presurizados de compuestos fenólicos de
orujo de oliva.

Variables independientes		Niveles					
		-α	-1	0	1	α	
Temperatura (°C)	X_{I}	40	51	108	164	176	
Etanol (%)	X_2	0	10	50	90	100	

2.2.3.2. Elaboración del extracto a partir del sub-producto alpechín, usando filtración. El alpechín se centrifugó y se filtró en papel (Whatman 1).

2.2.4. Caracterización física y químicamente de los extractos de orujo y alpechín, obtenidos bajo condiciones óptimas.

Para caracterizar los extractos orujo y alpechín, obtenidos bajo condiciones óptimas se realizaron los siguientes análisis:

• **Perfil de compuestos fenólicos y su cuantificación:** se determinó de acuerdo con el método utilizado por Lozano *et al.* (2013), mediante HPLC-DAD-ESI-TOF/MS. (Anexo 4)

2.2.5. Microencapsulación de compuestos fenólicos de orujo y alpechín de oliva.

2.2.5.1. Elaboración de micropartículas

Las micropartículas de extracto de orujo (O) y alpechín (Al) se prepararon por secado por atomización, utilizando maltodextrina (MD) e inulina (In) como agentes encapsulantes (O-MD, O-In, Al-MD y Al-In).

Para la elaboración de las micropartículas se consideraron 100 g de dispersión de alimentación. MD (5,1-32,4 g) e In (2,5-10,8 g) se disolvieron en agua destilada con agitación constante y temperatura (a temperatura ambiente para MD y 70°C para inulina). Luego, se enfrió hasta 30°C (para evitar la degradación de los compuestos fenólicos) y se agregó O o Al (15 y 5 g, para MD e In, respectivamente). Finalmente, la dispersión se homogeneizó por 5 minutos con un homogeneizador Ultra Turrax, IKA T25 (Alemania) a 15000 rpm. Las soluciones resultantes se alimentaron a un secador 4M8-TriX (Bélgica), con alimentación y flujo de aire en paralelo. Las condiciones de secado fueron: temperatura del aire de entrada al secador 134,8-195,3°C para ambos sistemas. El diámetro de la boquilla, flujo de aire, la razón de alimentación y el aire de la boquilla fueron 0,6 mm, 200 L/min, 2 mL/min (10%) y 13 L/min, respectivamente para todos los sistemas estudiados. Las micropartículas obtenidas fueron almacenadas en oscuridad y a -20°C hasta ser analizadas.

2.2.5.2. Diseño experimental para la encapsulación.

Se aplicó un diseño Composito central 2^2 más punto axial con un total de 12 experimentos (4 puntos experimentales, 4 puntos axiales y 4 puntos centrales) para cada sistema estudiado (O-MD, O-In, Al-MD y Al-In). Las variables independientes fueron la temperatura del aire de entrada al secador (X₁) y la relación (O o Al)/agente encapsulante (MD o In) (X₂) (Tabla 2). Las variables dependientes correspondieron a la eficiencia de encapsulación (EE) de ácido quínico, secoiridoides, verbascósidos, flavonoides y lignanos y el rendimiento (R). Para la optimización se utilizó MSR, aplicando la función deseabilidad. Esta función permite asignar un puntaje entre 0 y 1 a un set de variables respuestas donde 1 representa la maximización de cada variable (en el caso de este estudio 1 representaría 100% de eficiencia de encapsulación de cada familia de compuesto fenólico y del rendimiento del proceso).

Tabla 2. Variables independientes y niveles en el diseño de composito central más punto axial, para el proceso de encapsulación por atomización de orujo y alpechín, con los agentes encapsulantes MD e In.

Variables independientes				Niveles		
		-α	-1	0	1	α
Temperatura (°C)	\mathbf{X}_1	134,8	140	165	190	195,3
Relación extracto O o Al)/AE (MD o In)	X_2	1:0,34	1:0,5	1:1,25	1:2	1:2,15

2.2.5.3. Caracterización de las micropartículas.

La caracterización de los cuatro sistemas de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas (O-MD, O-In, Al-MD y Al-In) se realizó de acuerdo con los parámetros que se describen a continuación:

- Humedad y actividad de agua: se realizaron de acuerdo con AOAC, (1996).
- Higroscopicidad: Se determinó de acuerdo con el método descrito por Cai y Corke (2000). Las micropartículas de cada sistema (Al-MD, Al-In, O-MD y O-In) (2 g), se colocaron en vidrios reloj y en un desecador sellado herméticamente, que contenía una solución saturada de Na₂SO₄, a 25°C y una humedad relativa de 93 %. Después de una semana se pesó cada uno de los seis sistemas. Los resultados se expresaron como g de humedad por 100 g de sólidos secos (g/100 g).
- Contenido compuestos fenólicos totales: se pesaron micropartículas (300 mg) de los sistemas Al-MD, Al-In, O-MD y O-In y se adicionaron 0,75 mL de agua:ácido acético (99:1 v/v), se agitó en un vortex (1 min), se sonicó por 20 min y luego se centrifugo a 130 RPM por 5 min a 4°C, se separó el sobrenadante y se repitió la extracción una vez más, los 2 sobrenadantes se juntaron y la solución se filtró por 0,22 μm. El contenido de los distintos compuestos fenólicos se determinó de

acuerdo con el método utilizado por Lozano *et al.* (2013), mediante HPLC-DAD-ESI-TOF/MS. (Anexo 4)

- Contenido de compuestos fenólicos superficiales: se pesaron micropartículas (300 mg) de los sistemas Al-MD, Al-In, O-MD y O-In y se adicionó 1 mL de etanol:metanol (1:1 v/v), la solución fue mezclada suavemente hasta dispersar las micropartículas en la mezcla de solvente y luego centrifugada a 1000 RPM por 1 min a 4°C, finalmente la solución se filtró a 0,22 μm. El contenido de los distintos compuestos fenólicos se determinó de acuerdo con el método utilizado por Lozano *et al.* (2013), mediante HPLC-DAD-ESI-TOF/MS. (Anexo 4)
- Eficiencia de encapsulación (EE) de compuestos fenólicos: EE de los compuestos fenólicos se calcularon de acuerdo con la ecuación 1.

 $Eficiencia de encapsulación (EE)(\%) = \frac{polifenoles totales \exp - polifenoles superficiales}{polifenoles totales exp}$ Ec.1

- **Capacidad antioxidante (ORAC):** se determinó por el método desarrollado por Dávalos *et al.* (2003), mediante fluorescencia utilizando un Fluorímetro Biotek FLx800 (USA). (Anexo 2)
- **Morfología de las micropartículas:** la estructura externa de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se cubrieron con oro/paladio utilizando un 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).
- **Tamaño de partícula:** el tamaño de las partículas se midió mediante difracción de luz láser (DLL) en un equipo MastersizerX (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), con un lente de 300 mm. Las muestras se dispersaron en propilenglicol antes de medir el patrón de difracción.

2.2.6. Recubrimiento de micropartículas de MD de orujo y alpechín de oliva.

2.2.6.1. Recubrimiento por lecho fluidizado.

Las micropartículas de maltodextrina, obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización (O-MD y Al-MD) se recubrieron con Inulina (10% p/v) y Alginato de sodio (2% p/v) por 2 horas a 50°C, utilizando un lecho fluidizado (VFC-LAB MICRO FLO-COATER®).

2.2.6.2. Caracterización de las micropartículas recubiertas.

Las micropartículas recubiertas (O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD-In y Al-MD-Alg) se caracterizaron de acuerdo con los parámetros que se describen a continuación:

- Humedad y actividad de agua: se realizaron de acuerdo con AOAC, (1996).
- **Higroscopicidad:** Se determinó de acuerdo con el método descrito por Cai y Corke (2000). Las micropartículas de cada sistema (O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD-In y Al-MD-Alg) (2 g), se colocaron en vidrios reloj y en un desecador sellado herméticamente, que contenía una solución saturada de Na₂SO₄, a 25°C y una humedad relativa de 93 %. Después de una semana se pesó cada uno de los seis sistemas. Los resultados se expresaron como g de humedad por 100 g de sólidos secos (g/100 g).
- Contenido compuestos fenólicos totales: se pesaron micropartículas (300 mg) de los sistemas O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD-In y Al-MD-Alg y se adicionó 0,75 mL de agua:ácido acético (99:1 v/v), se agitó en un vortex (1 min), se sometió al ultrasonido por 20 min y luego se centrifugo a 130 RPM por 5 min a 4°C, se separó el sobrenadante y se repitió la extracción una vez más, los 2 sobrenadantes se juntaron y la solución se filtró por 0,22 μm. El contenido de los distintos compuestos fenólicos se determinó de acuerdo con el método utilizado por Lozano *et al.* (2013), mediante HPLC-DAD-ESI-TOF/MS. (Anexo 4)
- Contenido de compuestos fenólicos superficiales: se pesaron micropartículas (300 mg) de los sistemas O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD-In y Al-MD-Alg y se adicionó 1 mL de etanol:metanol (1:1 v/v), la solución fue mezclada suavemente hasta dispersar las micropartículas en la mezcla de solvente y luego centrifugada a 1000 RPM por 1 min a 4°C, finalmente la solución se filtró a 0,22 µm. El contenido de los distintos compuestos fenólicos se determinó de acuerdo con el método utilizado por Lozano *et al.* (2013), mediante HPLC-DAD-ESI-TOF/MS. (Anexo 4)
- **Capacidad antioxidante (ORAC):** se determinó por el método desarrollado por Dávalos *et al.* (2003), mediante fluorescencia utilizando un Fluorímetro Biotek FLx800 (USA). (Anexo 3)
- Morfología de las micropartículas: la estructura externa de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se cubrieron con oro/paladio utilizando un 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).

• **Tamaño de partícula:** el tamaño de las partículas se midió mediante difracción de luz láser (DLL) en un equipo Mastersizer*X* (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), con un lente de 300 mm. Las muestras se dispersaron en propilenglicol antes de medir el patrón de difracción.

2.2.7. Estudio de la estabilidad de los compuestos fenólicos desde micropartículas de orujo y alpechín de oliva.

2.2.7.1. Estudio de estabilidad a 60°C.

Las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en los 8 sistemas (O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg) se almacenaron por 180 días a 60°C en estufa con aire forzado (Memmert modelo Memmert modelo UFE 500, Alemania) y en oscuridad. Se pesaron 300 mg de las micropartículas de cada sistema estudiado en tubos de ensayo de vidrio sin tapa (16 x 100 mm).

2.2.7.2. Caracterización de micropartículas almacenadas a 60°C en ensayo de estabilidad acelerada.

La caracterización de las micropartículas (O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg) almacenadas a 60°C se realizó de acuerdo con los parámetros que se describen a continuación:

Contenido compuestos fenólicos totales: se pesaron micropartículas (300 mg) de cada sistema (O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg) y se adicionó 0,75 mL de agua:ácido acético (99:1 v/v), se agitó en un vortex (1 min), se sometió a ultrasonido por 20 min y luego se centrifugo a 130 RPM por 5 min a 4°C, se separó el sobrenadante y se repitió la extracción una vez más, los 2 sobrenadantes se juntaron y la solución se filtró por 0,22 μm. El contenido de los distintos compuestos fenólicos se determinó de acuerdo con el método utilizado por Lozano *et al.* (2013), mediante HPLC-DAD-ESI-TOF/MS. (Anexo 4)

La estabilidad de los distintos compuestos se expresó como el porcentaje de retención final, calculado de acuerdo con la ecuación 2.

$$Retención (\%) = \left[\frac{fenoles \ totales_{Tf}}{Fenoles \ totales_{Ti}}\right] \times 100$$
Ec.2

Donde: tf: tiempo final; ti: tiempo inicial

2.2.8. Estudio del perfil de liberación de compuestos fenólicos desde micropartículas de alpechín y orujo de oliva, en un sistema gastrointestinal simulado.

2.2.8.1. Estudio de digestión gástrica e intestinal simulada.

Para la liberación de polifenoles desde las micropartículas de orujo y alpechín obtenidas bajo condiciones óptimas (O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg) se pesó 0,5 g de micropartículas de cada sistema y se sometieron a condiciones gástricas (FGS) por 2 horas y en condiciones intestinales (FIS) por 4 horas, en un aparato tipo I USP/NF 1 (canastillo) (Pharma Test Type PTW SIII) a 25°C, utilizando las condiciones de fluido gastrointestinal simulado con uso de enzimas, de acuerdo a la farmacopea (2011) (Anexo 5).

Se tomaron alícuotas en distintos tiempos para realizar las cinéticas de liberación (0, 10, 30, 60 y 120 min para FGS y 0, 10, 30, 60, 120, 180 y 240 min para FIS.

2.2.8.2. Caracterización de micropartículas de alpechín y orujo de oliva digeridas en fluidos gástrico e intestinal simulado.

La alícuotas de los fluidos gástrico e intestinal de las digestiones de las micropartículas (O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg) se caracterizaron de acuerdo con:

Contenido compuestos fenólicos: a las distintas alícuotas de FG y FI de los sistemas O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg se les determinó el contenido de los distintos compuestos fenólicos, de acuerdo al método utilizado por Lozano *et al.* (2013), mediante HPLC-DAD-ESI-TOF/MS. (Anexo 4)

2.2.9. Análisis estadístico.

Las condiciones óptimas para cada diseño experimental (extracción con líquidos presurizados del orujo y microencapsulación por secado por atomización para los extractos de alpechín y orujo) se obtuvieron mediante Metodología de Superficie Respuesta (MSR). Por otro lado, para determinar diferencias entre las micropartículas de los distintos sistemas (O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg) se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de rango múltiple de Duncan. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software Statgraphics* versión 5.1 plus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.1. Caracterización de la materia prima orujo (O).

En la tabla 3, se presenta el contenido de humedad, fenoles totales y la capacidad antioxidante del orujo (O).

Tabla 3. Contenido de humedad, fenoles totales y capacidad antioxidante (ORAC) del orujo.

Muestra	Humedad	F	enoles totales		ORAC		
	(g/100g)	(mg EAG/kg)	(µmol ET/100g)			
		(b.h)	(b.s)	(b.h)	(b.s)		
Orujo (O)	$49,4 \pm 0,5$	$1450 \pm 90,3$	2865,7 ± 178,5	$6648,2 \pm 958,5$	13138,7 ± 1894,3		

EAG: equivalente de ácido gálico; ET: Equivalente de trolox; b.h: base húmeda; b.s: base seca.

En la tabla 3 se observa la humedad del O, la que presenta un valor similar a los reportados por Papaioannou *et al.* (2013) y Frankel *et al.* (2013) de 45 y 55%, respectivamente. En cuanto al contenido de fenoles totales (FT), se obtuvo un valor mayor (1450 mg EAG/kg) a los encontrados por Cioffi *et al.* (2010) de 207 mg EAG/kg b.h. y Rubio-Senent *et al.* (2012) de 650 mg EAG/kg b.h.

En la Figura 1 se presenta el cromatograma HPLC-DAD-ESI-TOF/MS para orujo y en la tabla 4 se presenta el listado de los compuestos fenólicos propuestos en la identificación de cada pico cromatográfico de orujo.



Figura 1. Cromatograma HPLC-DAD-ESI-TOF/MS de orujo de oliva var. Arbequina.

En O es posible identificar distintas familias de compuestos fenólicos como: secoiridoides (oleuropeína, ligustrósido y derivados fenólicos, presentes exclusivamente en Olearaceae); flavonoides (apigenina, luteolina y sus formas glicosiladas) y lignanos (pinoresinol y acetoxipinoresinol), la mayoría de estos compuestos se han descrito previamente en aceite de oliva y sus orujo (Tripoli *et al.*, 2005; Pérez-Serradilla *et al.*, 2010; Cioffi, *et al.*, 2010; Peralbo-Molina *et al.*, 2012; Skaltsounis *et al.*, 2015; Lozano-Sánchez *et al.*, 2017). Los compuestos fenólicos de la oliva se han asociados a propiedades beneficiosas para la salud como actividad antioxidante y efectos antiinflamatorio, antimicrobiano e hipoglicémico (Obied y Robards, 2013).

Tabla 4. Compuestos fenólicos identificados en orujo, fórmula molecular, tiempo de retención (Tr) y m/z.

		Fórmula	Tr	
Peak	Compuesto propuesto	molecular	(min)	m/z
1	Ácido quínico	$C_7H_{12}O_6$	3,3	191,0561
2	No identificado	$C_{16}H_{26}O_{11}$	8,3	393,1428
3	Oleósido/secologanósido o isómero 1	$C_{16}H_{22}O_{11}$	10,5	389,1114
4	No identificado	$C_{16}H_{24}O_{10}$	10,7	375,1318
5	No identificado	$C_{15}H_{26}O_9$	10,8	349,1526
6	Derivado secoiridoide 1	$C_{17}H_{28}O_{11}$	11,2	407,1604
7	D-OH-EA	$C_{10}H_{14}O_5$	11,9	213,0768
8	Glucósido de ácido elenólico isómero 1	$C_{17}H_{24}O_{11}$	12,5	403,1298
9	Oleósido/secologanósido o isómero 2	$C_{16}H_{22}O_{11}$	14,3	389,1089
10	Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$C_9H_{12}O_4$	14,3	183,0663
11	Oleuropeína aglicona	$C_{16}H_{26}O_{10}$	16,3	377,1493
12	Demetil oleuropeína	$C_{24}H_{30}O_{13}$	17,7	525,1614
13	Glucósido de ácido elenólico isómero 2	$C_{28}H_{20}O_3$	17,7	403,1313
14	Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$C_{10}H_{16}O_5$	18,2	215,0925
15	No identificado	$C_{17}H_{18}O_{7}$	18,6	333,0980
16	No identificado	$C_{36}H_{42}O_{14}$	19,6	685,2469
17	Luteolina-7-glucosido	$C_{21}H_{20}O_{11}$	20,1	447,0933
20	No identificado	C38H26O6	21,9	577,1657
21	Oleuropeína	C25H32O13	22,9	539,1770
22	Luteolina-7-glucosido	$C_{21}H_{20}O_{11}$	20,1	447,0933
23	Pinoresinol	$C_{20}H_{22}O_{6}$	24,4	357,1344
24	Acetoxipinoresinol	$C_{22}H_{24}O_8$	25,3	415,1390
25	Ligustrósido	$C_{25}H_{32}O_{12}$	26,3	523,1821
26	*Naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$	28,9	271,0893
27	Luteolina	$C_{15}H_{10}O_{6}$	30,1	285,0405
28	Apigenina	$C_{15}H_{10}O_5$	31,7	269,0451

*Estándar interno

Por otro lado, en la tabla 5 se presenta la cuantificación de los compuestos fenólicos del O.

Commente monte	Orujo (b.s)			
Compuesto propuesto	(mg/kg)	%		
Ácido quínico	$40,2 \pm 0,2$	$14,1 \pm 0,9$		
Oleósido/secologanósido o isómero 1	$4,8 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,1$		
Derivado secoiridoide 1	$47,6 \pm 2,0$	$16{,}9\pm0{,}9$		
D-OH-EA	$2,9 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,1$		
Derivado de oleuropeína aglicona	$23,7 \pm 1,0$	$8,6 \pm 0,4$		
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$15,1 \pm 1,8$	$5,7 \pm 0,5$		
Demetil oleuropeína	$2,4 \pm 0,4$	$0,8\pm0,1$		
Forma aldehídica de decarboximetil de ácido elenólico	$13,1 \pm 1,3$	$4,7 \pm 0,3$		
Glucósido de ácido elenólico	$0,7 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$		
Luteolina-7-O-glucósida	$2,5 \pm 0,2$	$0,9\pm0,0$		
Oleuropeína	$21,8 \pm 3,3$	$7,7 \pm 0,9$		
Pinoresinol	$4,7 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,1$		
Acetoxipinoresinol	$18,2 \pm 1,5$	$6,5 \pm 0,3$		
Ligustrósido o isómero 1	$19,7 \pm 2,5$	$7,0 \pm 0,6$		
Luteolina	$49,7 \pm 1,4$	$17,7 \pm 0,4$		
6-O-[(2E)-2	$0,9 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,0$		
Apigenina	$12,4 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,2$		
Total	$281,7\pm12,2$	100		
Secoiridoides	$154,5 \pm 9,4$	$54,8 \pm 1,1$		
Flavonoides	$64,6 \pm 2,0$	$23,0\pm0,5$		
Lignanos	$23,0 \pm 1,7$	8,1 ± 0,3		

Tabla 5. Cuantificación de compuestos fenólicos identificados en el orujo.

b.s: base seca

Los principales compuestos fenólicos en O correspondieron a ácido quínico (14,1%), polifenoles pertenecientes a la clase secoiridoide (54,8%), siendo los principales compuestos en esta clase: el derivado secoiridoide 1 (16,9%), derivado de oleuropeína aglicona (8,6%), oleuropeína (7,7%) y ligustrósido (7,0%). Los flavonoides (23%) son los segundos en importancia, siendo la luteolina (17,7%) el principal de esta clase. Estos resultados coinciden con otros estudios, donde los principales compuestos fenólicos en orujo correspondieron a oleuropeína y flavonoides (Cioffi et al., 2010).
3.1.2. Obtención de un extracto de orujo por extracción con líquidos presurizados.

En la Tabla 6 se presenta la cuantificación de compuestos fenólicos individuales para cada tratamiento de extracción con líquidos presurizados (ELP), aplicando un diseño composito central y la Figura 2 muestra una gráfica de los compuestos fenólicos totales y el contenido total de secoiridoides, alcoholes fenólicos, flavonoides y lignanos. El contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos varió entre 241,1 y 1141,3 mg/kg (b.s) de orujo. Los secoiridoides fueron los principales, polifenoles en el extracto de orujo alcanzando valores entre 103,4 y 517 mg/kg (b.s.) de orujo (42,9–57,6%, respectivamente), encontrándose secoiridoides como: derivado secoiridoide (m/z 407), hidroxi oleuropeína (m/z 535) y oleuropeína (m/z 539).

Con respecto a los alcoholes fenólicos, el contenido varió entre 0 y 675,6 mg/kg de orujo (b.s), identificándose hidroxitirosol (m/z 153; 0 - 258,3 mg/kg de orujo (b.s)) e hidroxitirosol oxidado (m/z 151; 0 - 457,8). El contenido más alto de alcoholes fenólicos (Figura 3) se obtuvo en los tratamientos T₄, T₅ y T₁₂, los cuales correspondieron a experimentos realizados con las condiciones de mayor temperatura y mayor contenido de agua. Este resultado podría explicarse porque altas temperaturas de extracción y la presencia de agua en la extracción favorecerían la hidrólisis de secoiridoides a alcoholes fenólicos, comportamiento que concuerda con lo reportado por Obied *et al.* (2008).

Por otro lado, los flavonoides variaron entre 3,1 y 199,9 mg/kg de orujo (b.s) (1,2–22,6%), siendo la luteolina el flavonoide encontrado en mayor cantidad en todos los tratamientos (3,1- 157,8 mg/kg de orujo (b.s)). En cuanto a los lignanos (17,6 a 48,7 mg/kg (p.s) de orujo (1,7–6%)), diferentes cantidades de pinoresinol y acetoxipinoresinol se cuantificaron en los extractos, siendo el acetoxipinoresinol el lignano principal.

		T ₁	T_2	T ₃	T_4	T ₅	T_6	T ₇	T ₈	T9	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂
Idontificación tonto	ativa	108°C	108°C	108°C	164°C	176°C	51°C	108°C	40°C	164°C	108°C	51°C	108°C
	auva	50%EtOH	50%EtOH	100%EtOH	10%EtOH	50%EtOH	90%EtOH	50%EtOH	50%EtOH	90%EtOH	50%EtOH	10%EtOH	0%EtOH
							(mg/kg b	o.s)					
Ácido quínico		$127{,}5\pm6.9$	$137,2\pm3,4$	$145,8\pm0,9$	$217,8 \pm 11,5$	$231,6\pm1,3$	$71,4 \pm 1,1$	$118,7\pm0,9$	$56{,}3\pm1{,}4$	$215{,}5\pm10{,}9$	$107,3\pm0,0$	$68{,}4\pm0{,}8$	$89,2\pm2,8$
Hidroxitirosol oxidado		$93{,}5\pm9{,}4$	$100{,}4\pm7{,}4$	-	$457,\!8\pm27,\!5$	$148,\!4\pm0,\!5$	-	$176{,}2\pm{3{,}6}$	-	-	$131,3\pm0,0$	$10{,}3\pm0{,}7$	$363,1\pm12,4$
Oleósido/secologanósido o is	ómero 1	$61,1\pm1,0$	$60,1\pm1,8$	$44,5\pm0,\!6$	$12{,}6\pm0{,}4$	$32,1\pm0,5$	$28,\!6\pm0,\!9$	$61,7\pm0,8$	$10{,}2\pm0{,}1$	$77,9\pm0,6$	$49,1\pm0,0$	$32{,}4\pm1{,}2$	$44,\!4 \pm 1,\!7$
Ácido logánico		-	-	$8,3\pm0,3$	$9,0\pm0,4$	$6,9\pm0,2$	$11,1\pm0,2$	-	$8,4\pm0,2$	$6,4 \pm 1,3$	-	$12,8\pm0,\!4$	$8,6\pm0,6$
Hidroxitirosol		$28,5 \pm 2,4$	$24,0 \pm 1,5$	$51,1 \pm 1,7$	$217,8\pm1,5$	$258,3\pm5,0$	-	$23,2 \pm 1,2$	-	$55,5 \pm 3,2$	$22{,}4\pm0{,}0$	-	$6,9\pm0,0$
Derivado Secoiridoide		$98,9\pm0,5$	$95,3 \pm 1,3$	$67,5 \pm 1,4$	$119,1\pm2,\!6$	$143,0\pm4,5$	$74,2\pm0,3$	$99,6 \pm 1,6$	$62,0\pm0,2$	$84,4 \pm 2,8$	$97{,}2\pm4{,}0$	$83,3\pm0,2$	$73,2 \pm 2,2$
D-OH-EA		$2,9\pm0,2$	$2,6\pm0,1$	$1,7\pm0,0$	-	-	$6,8\pm0,5$	$2,7\pm0,2$	-	-	$0,6\pm0,0$	$1,7 \pm 0,2$	-
Hidroxo D-oleuropeína aglic	ona	$70,5 \pm 1,4$	$70,0 \pm 2,3$	$12,1 \pm 0,2$	-	-	$3,8 \pm 0,1$	$72,6 \pm 1,8$	$1,1\pm0,0$	$9{,}9\pm0{,}5$	$61,0\pm1,8$	$3,3 \pm 0,4$	$65,8 \pm 2,7$
Hidroxi oleuropeína		$123,2 \pm 2,1$	$124,6\pm4,0$	$22,3\pm0,7$	$25,5\pm0,9$	$62,0 \pm 2,7$	$2,3 \pm 0,3$	$105{,}4\pm 2{,}5$	$0,4\pm0,0$	$33,6 \pm 0,3$	$101,\!6\pm0,\!1$	$6,6\pm0,5$	$133,2 \pm 1,5$
Dimetil oleuropeína		$19,7\pm0,6$	$19,5\pm0,8$	$21,\!6\pm0,\!9$	-	-	-	$15,3\pm0,5$	-	$20{,}9\pm0{,}5$	$10.9\pm0,1$	-	$5,0 \pm 0,5$
Forma Aldehdica de decarboximetil de ácido elenólico		$9{,}4\pm0{,}7$	$9{,}5\pm0{,}8$	$3,2\pm0,2$	-	-	-	-	$5,1\pm0,1$	-	$7{,}6\pm0{,}0$	$\textbf{8,8} \pm \textbf{0,1}$	$3,0\pm0,1$
Luteolina-7-glucosido		$19,2\pm0,6$	$10{,}0\pm0{,}9$	$21,\!0\pm0,\!3$	-	-	$2,\!6\pm0,\!3$	$8,3\pm0,3$	-	$35{,}2\pm1{,}0$	$37{,}5\pm0{,}0$	-	-
Decarboximetil oleuropeína a	aglicona	$19,1\pm0,8$	$18,1\pm0,7$	$9,8 \pm 1,1$	-	-	$0,5\pm0,0$	$13{,}9\pm0{,}6$	-	$4{,}9\pm0{,}1$	$12,\!4\pm2,\!8$	-	$4,8\pm0,3$
Oleuropeína		$80,0\pm0,3$	$81,0\pm4,7$	$78,9 \pm 1,1$	$15{,}4\pm1{,}5$	$63,2\pm0,9$	$15,2 \pm 0,3$	$67,5\pm0,7$	$6{,}0\pm0{,}3$	$113,\!4\pm2,\!6$	$60,0\pm0,3$	$3,7\pm0,2$	$55{,}6\pm2{,}4$
Pinoresinol		$11{,}4\pm0{,}5$	$10{,}9\pm0{,}3$	$10{,}7\pm0{,}8$	$3,7\pm0,3$	-	$7,8\pm0,2$	$8,3\pm0,4$	$4{,}6\pm0{,}0$	$10{,}9\pm0{,}0$	$6{,}9\pm0{,}0$	-	$1,4\pm0,0$
Acetoxypinoresinol		$33{,}6\pm0{,}5$	$\textbf{37,8} \pm \textbf{0,8}$	$30,1\pm0,5$	$28,9\pm0,2$	$17,\!6\pm0,\!2$	$33,7\pm0,8$	$28,0\pm0,\!4$	$29,3\pm0,4$	$27{,}5\pm0{,}3$	$24{,}9\pm1{,}5$	$17,\!8\pm0,\!4$	$23{,}4\pm1{,}0$
Ligustrósido		$32,2\pm1,2$	$30{,}7\pm1{,}0$	$29{,}4\pm0{,}5$	-	$8,5 \pm 0,4$	$19,8\pm0,4$	$24,\!4\pm0,\!1$	$10,\!2\pm0,\!3$	$24,0\pm0,4$	$22,1\pm0,3$	-	$19{,}4\pm0{,}5$
Luteolina		$66,5\pm1,0$	$68,1\pm2,0$	$127{,}5\pm0{,}8$	$33,7\pm1,3$	$67{,}4\pm0{,}7$	$71,\!3\pm1,\!1$	$74,0\pm0,5$	$41,0\pm0,\!6$	$157,8\pm1,5$	$67,9\pm0,0$	$3,1\pm0,0$	$12{,}7\pm0{,}1$
Apigenina		-	-	-	-	-	$17,4\pm0,2$	-	$6{,}5\pm0{,}2$	$6{,}9\pm0{,}3$	$0,5\pm0,0$	-	-
Secoiridoides	(mg/kg)	$517,0\pm1,\!4$	$511,\!4\pm10,\!0$	$299,3\pm2,5$	$181,\!6\pm5,\!1$	$315,7\pm0,5$	$162,3\pm2,7$	$463,1\pm0,4$	$103{,}4\pm1{,}1$	$375,\!4\pm3,\!1$	$422,5\pm0,1$	$152,\!6\pm1,\!3$	$413,0\pm6,3$
	(%)	$57{,}6\pm0{,}2$	$56{,}8\pm0{,}9$	$43,7\pm0,4$	$15{,}9\pm0{,}4$	$30{,}4\pm0{,}0$	$44{,}3\pm0{,}7$	$51{,}5\pm0{,}0$	$42{,}9\pm0{,}5$	$42,\!4\pm0,\!4$	$51{,}4\pm0{,}0$	$60{,}5\pm0{,}5$	$45{,}4\pm0{,}7$
Alcoholes fenólicos	(mg/kg)	$122,0\pm4,2$	$124,4\pm1,2$	$51,1\pm0,5$	$675,6\pm11,3$	$406,7\pm6,7$	-	$199,4\pm2,2$	-	$55{,}5\pm3{,}2$	$153,7\pm0,0$	$10{,}3\pm0{,}8$	$370,0\pm2,7$
	(%)	$13,6\pm0,5$	$13,\!8\pm0,\!6$	$7,5 \pm 0,1$	$59,2\pm1,0$	$39,1\pm0,6$	-	$22,\!2\pm0,\!2$	-	6.3 ± 0.4	$18{,}7\pm0{,}0$	$4,1\pm0,3$	$40,7\pm0,3$
Flavonoides	(mg/kg)	$85,7\pm0,5$	$78,1\pm1,7$	$148,5\pm1,8$	$33,7\pm1,5$	$67{,}4\pm0{,}7$	$91,3\pm0,1$	$82{,}3\pm0{,}9$	$47{,}5\pm0{,}3$	$199,9\pm0,0$	$105{,}9\pm0{,}0$	$3,1\pm0,0$	$12{,}7\pm0{,}1$
	(%)	$9,6 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,1$	$21,7\pm0,3$	$3,0 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,1$	$24{,}9\pm0{,}0$	$9,1 \pm 0,1$	$19,7\pm0,1$	$22,6\pm0,0$	$12{,}9\pm0{,}0$	$1,2\pm0,0$	$1,4 \pm 0,0$
Lignanos	(mg/kg)	$45,0 \pm 1,6$	$48,7\pm1,1$	$40,\!8\pm1,\!2$	$32{,}6\pm2{,}0$	$17,\!6\pm0,\!2$	$41{,}5\pm0{,}9$	$36{,}3\pm0{,}8$	$33,9\pm0,4$	$38{,}4\pm0{,}1$	$31,8\pm1,5$	$17,\!8\pm0,\!3$	$24{,}8\pm1{,}2$
	(%)	$5,0 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,1$	$6,0\pm0,2$	$2,9 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,0$	$11,3 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,1$	$14,1 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,0$	$3,9 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$
Compuestos fenólicos totales	(mg/kg)	897,2 ± 3,3	889,8 ± 12,6	$685,5 \pm 8,7$	$1141,3 \pm 10,5$	1039,0 ± 11,6	$366,5 \pm 2,1$	899,8 ± 18,2	$241,1 \pm 6,7$	$884,7 \pm 9,2$	$821,0 \pm 0.1$	$252,2 \pm 3,2$	909,7 ± 1,9
	(%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabla 6. Contenido de compuestos fenólicos en extractos de orujo de oliva para los diferentes tratamientos de extracción con líquidos presurizados del diseño composito central.



Figura 2. Gráfica del contenido de compuestos fenólicos por clase, en los experimentos del diseño composito central para el extracto de orujo por extracción con líquidos presurizados. □Compuestos fenólicos totales; □Alcoholes fenólicos; □ Secoiridoides; □ Flavonoides y □ Lignanos.

Los resultados mostraron que, aunque el perfil de compuestos fenólicos fue similar para todos los tratamientos del diseño de extracción desde orujo con líquidos presurizados, el contenido de los compuestos fenólicos individuales fue diferente entre los experimentos. Este comportamiento es característico del método de extracción con líquidos presurizados, ya que presenta diferencias por la selectividad de la extracción (Rubio-Senent *et al.*, 2013). Los factores de extracción como la temperatura y la relación agua-etanol se asocia con la reducción de la constante dieléctrica (Turner e Ibañez, 2012), lo que genera que el agua alcance valores similares a los de algunos disolventes orgánicos como etanol, metanol o acetonitrilo a temperatura ambiente (Cacace y Mazza, 2007; Plaza *et al.*, 2010; Pavlovic *et al.*, 2013).

Por último, es importante resaltar que la presencia de algunos compuestos fenólicos identificados en los extractos obtenidos por extracción con líquidos presurizados como: hidroxitirosol oxidado (m/z 151), hidroxitirosol (m/z 153), forma hidroxilada de ácido descarboximetil elenólico (m/z 199), hidroxi oleuropeína (m/z 555) y luteolina-7-*O*-rutinosido (m/z 593) provienen de reacciones de oxidación y/o hidrólisis de compuestos fenólicos complejos propiciadas por las condiciones de extracción utilizadas (Obied *et al.*, 2008), los cuales no están presentes en la materia prima.

Al caracterizar el perfil de compuestos fenólicos de los diferentes tratamientos por extracción con líquidos presurizados se observó la presencia de hidroxitirosol en algunos

extractos de orujo de oliva (compuesto no encontrado en la materia prima). Es importante destacar que el hidroxitirosol presenta ventajas comparativas sobre otros compuestos fenólicos presentes en los sub-productos de la oliva, debido a su mayor capacidad antioxidante y a efectos biológicos como la prevención de enfermedades cardíacas, tumores y efectos antitrombóticos, entre otros (Japón-Luján *et al.*, 2007 y Bouallagui, *et al.*, 2011). Además, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aprobó declaraciones de propiedades saludables asociadas al consumo de hidroxitirosol. En este contexto, el contenido de hidroxitirosol y sus derivados se utilizaron como variables respuesta para el diseño experimental de extractos de orujo de oliva por extracción con líquidos presurizados.

En la Tabla 7 se presentan las condiciones experimentales (valores de variables independientes: contenido de etanol y temperatura de extracción) y las variables dependientes (rendimiento de extracción, contenido de hidroxitirosol, hidroxi D-oleuropeína aglicona, hidroxi-oleuropeína, dimetil oleuropeína, descarboximetil oleuropeína aglicona y oleuropeína).

CΛL	extractos de orujo de oriva (var. Arbequina) por extracción con inquidos presurizados.										
	Tratamient	OS	НҮТҮ	Hidroxi D- Ole agli	Hidroxi- Ole	Demetil Ole	Descaboxi metil Ole	Ole	R		
	Temperatura (°C)	Etanol (%)	-		(mg/kg	g b.s)			(%)		
T_1	108(0)	50(0)	$28,5 \pm 2,4$	$70,5 \pm 1,4$	$123,2 \pm 2,1$	$19,7 \pm 0,6$	$19,1 \pm 0,8$	$80,0 \pm 0,3$	10,2		
T_2	108(0)	50(0)	$24,0\pm1,5$	$70,0 \pm 2,3$	$124,4 \pm 4,0$	$19,5\pm0,8$	$18,1\pm0,7$	$81,0 \pm 4,7$	13,3		
T_3	108(0)	100(α)	$51,1 \pm 1,7$	$12,1\pm0,2$	$22,\!3\pm0,\!7$	$21,\!6\pm0,\!9$	$9,8 \pm 1,1$	$78,9 \pm 1,1$	5,5		
T_4	164(1)	10(-1)	$217,8 \pm 11,5$	-	$25,5 \pm 0,9$	-	-	$15,4 \pm 1,5$	21,7		
T_5	176(α)	50(0)	$258,3\pm5,0$	-	$62,0\pm2,7$	-	-	$63,2\pm0,9$	25,7		
T_6	51(-1)	90(1)	-	$3,8 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,3$	-	$0,5\pm0,0$	$15,2 \pm 0,3$	3,7		
T_7	108(0)	50(0)	$23,2 \pm 1,2$	$72,6 \pm 1,8$	$105{,}4\pm 2{,}5$	$15,3\pm0,5$	$13,9\pm0,6$	$67,5\pm0,7$	10,7		
T_8	39(-α)	50(0)	-	$1,1 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,0$	-	-	$6,0 \pm 0,3$	5,9		
T9	164(1)	90(1)	$55,5 \pm 3,2$	$9,9 \pm 0,5$	$33,6 \pm 0,3$	$20,9\pm0,5$	$4,9 \pm 0,1$	$113,4 \pm 2,6$	11,8		
T_{10}	108(0)	50(0)	$22,\!4\pm0,\!0$	$61,0\pm1,8$	$101,6\pm0,1$	$10,9\pm0,1$	$12,4 \pm 2,8$	$60,0\pm0,3$	11,0		
T ₁₁	51(-1)	10(-1)	-	$3,3 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,5$	-	-	$3,7 \pm 0,2$	6,1		

Tabla 7. Rendimiento y contenido de compuestos fenólicos en los experimentos para los extractos de orujo de oliva (Var. Arbequina) por extracción con líquidos presurizados.

T: tratamientos; R (rendimiento); HYTY: hidroxitirosol; Hidroxi D-O aglicona: Hidroxi D-oleuropeína aglicona; Hidroxi- Ole: Hidroxi- oleuropeína; Demetil Ole: Demetil oleuropeína; Descaboximetil Ole: Descarboximetil oleuropeína y Ole: Oleuropeína; b.s: base seca.

 $5,0 \pm 0,5$

 4.8 ± 0.3

 55.6 ± 2.4

9.5

 $65,8 \pm 2,7$ $133,2 \pm 1,5$

T12

108(0)

 $0(-\alpha)$

 6.9 ± 0.0

De esta manera, se empleó la metodología de superficie de respuesta (MSR) en el diseño estadístico, considerando las formas lineales, cuadráticas e interacción entre las variables independientes a un nivel del 95 % de confianza, para encontrar las condiciones óptimas de elaboración del extracto de fenólico de orujo de oliva por extracción con líquidos presurizados.

Los términos no significativos se eliminaron de la ecuación, pero cuando la forma cuadrático o interacciones de las variables independientes fueron significativas, las formas lineales de las variables independientes fueron consideradas en la ecuación cuadrática, porque son elementos fundamentales del modelo matemático. En la figura 3 se presentan los gráficos de superficie de respuesta para cada variable respuesta estudiada.



Figura 3. Gráficos de superficie de respuesta (GSR) para la extracción de compuestos fenólicos de orujo de oliva (var. Arbequina) por extracción con líquidos presurizados de las variables respuesta a) hidroxitirosol, b) hidroxi D-oleuropeína aglicona, c) hidroxioleuropeína, d) dimetil oleuropeína, e) descarboximetil oleuropeína, f) oleuropeína y g) rendimiento.

En relación con el **hidroxitirosol**, en el GSR (figura 3a) se observa un aumento en la extracción con el uso de mayor temperatura y menor contenido de etanol como solvente de extracción. Además, el contenido de extracción varió entre 6,9 y 258,3 mg/kg de orujo (b.s) (tabla 7). Por otro lado, se observa que en las condiciones experimentales donde se obtuvo el mayor contenido de hidroxitirosol (tratamientos con mayores temperaturas de extracción (T_4 y T_5)), no se detectó hidroxi-D-oleuropeína aglicona, demetil-oleuropeína y descarboximetil-oleuropeína, mientras que hidroxi-D-oleuropeína aglicona, se detectó en aquellos tratamientos a bajas temperaturas (T_6 , T_8 y T_{11}), donde el hidroxitirosol no se detectó. Estos resultados muestran que altas temperaturas de extracción podrían causar la ruptura de secoiridoides a alcoholes fenólicos (Obied *et al.*, 2008). Finalmente, el análisis estadístico mostró que la temperatura de extracción y el porcentaje de etanol, ambas en su forma lineal, cuadrática y la interacción entre ellas fueron significativos sobre el contenido de hidroxitirosol, con un ajuste al modelo de un 78,8% (Anexo 6, tabla 31).

Respecto a hidroxi D-oleuropeína aglicona (figura 3b), hidroxi-oleuropeína (figura 3c) y descarboximetil oleuropeína (figura 3e) en las GSR se observa una mayor extracción con una temperatura de extracción y contenido de etanol intermedio en el rango de trabajo. En el diseño de extracción (tabla 7) se observa un contenido de estos compuestos que fluctuó entre 1,1-95 mg/kg de orujo (b.s), 0,4-134,6 mg/kg de orujo (b.s) y 0-19,1 mg/kg de orujo (b.s), respectivamente. En cuanto al análisis estadístico, la forma cuadrática de la temperatura de extracción tuvo un efecto significativo sobre el contenido de hidroxi D-oleuropeína aglicona e hidroxi-oleuropeína, con un ajuste al modelo de un 75,1 % y 64,7 %, respectivamente (Anexo 6, tabla 32 y 32). Mientras que, la forma cuadrática de la temperatura de extracción y del contenido de etanol afectaron significativamente el contenido de descarboximetil oleuropeína, con un ajuste al modelo de un 83,6 % (Anexo 6-tabla 36).

En cuanto a **dimetil oleuropeína** (figura 3d) y **oleuropeína** (figura 3f) en las GSR se observa una mayor extracción de estos compuestos con temperaturas altas y mayor contenido de etanol. Además, en la tabla 7 se encontró un rango en el contenido de dimetil oleuropeína y oleuropeína de 5 y 21,6 mg/kg de orujo (b.s) y 3,7 y 113 mg/kg de orujo (b.s), respectivamente. En relación con el análisis estadístico de dimetil oleuropeína se encontró un efecto significativo en la forma lineal y cuadrática del contenido de etanol, forma cuadrática de la temperatura de extracción y la interacción de la temperatura de extracción con el contenido del solvente, con un ajuste del modelo de un 80,6% (Anexo 6, tabla 35). El análisis estadístico de la oleuropeína mostró un efecto significativo en las formas lineales de temperatura de extracción y contenido de etanol, en la forma cuadrática de la temperatura de extracción y contenido de etanol, en la forma cuadrática de la temperatura de extracción y contenido de etanol, en la forma cuadrática de la temperatura de extracción y contenido de etanol, en la forma cuadrática de la temperatura de extracción y contenido de etanol, en la forma cuadrática de la temperatura de extracción y contenido de etanol, en la forma cuadrática de la temperatura de extracción y contenido de etanol, en la forma cuadrática de la temperatura de extracción y contenido de etanol, en la forma cuadrática de la temperatura de extracción y contenido de etanol, en la forma cuadrática de la temperatura de extracción y en la interacción entre ambos factores, con un ajuste al modelo de un 88,6% (Anexo 6, tabla 36).

Finalmente, en el **rendimiento** la GSR (figura 3g) muestra valores mayores con alta temperatura y niveles bajo de etanol en la extracción. El rendimiento fluctuó entre 3,7 y 25,7% (Tabla 7). En relación con el análisis estadístico, se encontró un efecto significativo en las formas lineales y cuadráticas de ambas variables estudiadas y en la interacción entre ellas, con un ajuste al modelo de un 93,6% (Anexo 6, tabla 37).

Para la optimización múltiple, todas las variables de respuesta se maximizaron de forma conjunta (función de deseabilidad). La figura 5 muestra el gráfico de superficie respuesta para la extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva mediante un sistema de extracción de líquido presurizados. Las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos y el rendimiento fueron: una temperatura de extracción de 136,5 °C y un porcentaje de etanol de 52,3%, los cuales se encuentran dentro del dominio estudiado. En el gráfico de la superficie de respuesta, el óptimo está en la zona amarilla con una deseabilidad de 0,7. Como se muestra, la deseabilidad se maximizó a valores intermedios de la temperatura del proceso y de contenido de etanol.

El extracto de orujo obtenido por líquidos presurizados (EO-LP), bajo condiciones optimizadas logró un rendimiento de proceso de 17,2%, valor mayor a los obtenidos en extractos de oliva, producidos por el mismo método (Mulinacci *et al.*, 2005; Japón-Luján y Luque de Castro, 2007).



Figura 4. Optimización múltiple para la extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva (var. Arbequina) por extracción con líquidos presurizados.

3.1.3. Caracterización del extracto de orujo obtenido bajo condiciones óptimas.

En la figura 5 y tabla 8 se presenta el perfil de compuestos fenólicos del extracto de orujo EO-LP, elaborado bajo condiciones óptimas por extracción con líquidos presurizados.



Figura 5. Cromatograma HPLC-DAD-ESI-TOF/MS del extracto de orujo obtenido bajo condiciones óptimas por ELP (O-ELP), Identificación de cada peak en Anexo 7, tabla 40.

En el EO-LP obtenido bajo condiciones optimizadas, la principal clase de compuesto fenólico son los alcoholes fenólicos con 42,5%, seguido de secoiridoides (26,4%) y flavonoides (16,4%), siendo la luteolina el principal compuesto encontrado (13,2%). Al comparar los resultados con los compuestos encontrados en la materia prima orujo (tabla 8), en el EO-LP se encontraron polifenoles que no estaban antes del proceso con líquidos presurizados, estos corresponden a: alcoholes fenólicos (hidroxitirosol y su forma oxidada) y algunos derivados de secoiridoides (glucósido de ácido elenólico o isómero 2, hidroxi Doleuropeína aglicona, hidroxi-oleuropeína, ligustrósido aglicona hidratado, comselogosido). La aparición de alcoholes fenólicos y el aumento de los derivados del ácido elenólico en EO-LP resultan de reacciones de degradación de secoiridoides seguidas de varias reacciones, como la oxidación, hidratación y pérdida de los grupos carboxílico y carboximetilo debido a las altas temperaturas utilizadas en el método de extracción (Antolovich et al., 2004; Cermola et al., 2004; Lozano-Sánchez et al., 2011; Obied y Robards, 2013). En la figura 6 se presenta un esquema de la ruta de degradación de la oleuropeína bajo proceso de maduración de las olivas, procesamiento, extracción y manipulación de las muestras, propuesta por Obied et al, (2007).



Figura 6. Ruta de degradación de oleósidos como se ilustra para oleuropeína (R = hidroxitirosol) durante la maduración (biotransformación), procesamiento, extracción y manipulación de muestras. Los compuestos son identificados como: (I) oleuropeindial, forma enol, (II) oleuropeína aglicona, (III) oleuropeína, (IV) dimetiloleuropeína aglicona, (VI) forma enol de dimetiloleuropeína aglicona, (VII) demetiloleuropeína dialdehído aglicona, (VII) 4-noroleuropeína aglicona (3,4-dihidroxifenil alcohol etílico descarboximetil ácido dialdehído o 3,4-DHPEA-EDA), (IX) 3,4-DHPEAEDA acetal, (X) éster metílico de oleósido, (XI) ácido elenólico, (XII) oleuropeindial (forma ceto), (XIII) Producto similar a cannizzaro de oleuropeindial, (XIV) lactona de XIII, (XV) oleuropeindial (monohidrato), (XVI) dialdehído de ácido elenólico, (XVII) oleósido, (XVIII) acetal de XIX, (XIX) dialdehído de ácido descarboximetil elenólico DEDA, (XX) acetil acetil demetiloleuropeína, (XXI) Producto similar al Cannizzaro de XIX, (XXII) forma de lactona de XXI, (XXIII) ácido dimetil elenólico, monoaldehído de ácido elenólico (XXIV) (producto de reordenamiento), (XXV) hidroxitirosol elenolato (forma aldehído oleuropeína aglicona o 3,4-DHPEA-EA).

	EO-LP	(b.s.)	Orujo	(b.s.)
Compuesto fenólico	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)
Ácido quínico	$222,6\pm2,0^{\rm b}$	$13,6 \pm 0,4^{a}$	$40,2 \pm 0,2^{a}$	$14,1 \pm 0,9^{a}$
Hidroxitirosol oxidado	$637,7\pm15,9^{\mathrm{b}}$	$38,5\pm0,2^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$
Oleósido/secologanósido o isómero 1	$\textbf{33,9} \pm 0, 2^{b}$	$2,1\pm0,0^{b}$	$\textbf{4,8} \pm \textbf{0,3}^{a}$	$1,7\pm0,1^{a}$
Glucósido de ácido elenólico isómero 1	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$23,7\pm1,0^{\rm b}$	$8{,}6\pm0{,}4^{b}$
Hidroxitirosol	$67,1\pm2,5^{\rm b}$	$4,0\pm0,1^{\rm b}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$
Derivado secoiridoide 1	$9,7 \pm 0,4^{a}$	$0,6\pm0,0^{a}$	$47,\!6\pm2,\!0^{\mathrm{b}}$	$16,9\pm0,9^{\rm b}$
D-OH-EA	$60,2\pm1,0^{\mathrm{b}}$	$3{,}6\pm0{,}1^{b}$	$2,9\pm0,4^{a}$	$1,1\pm0,1^{\mathrm{a}}$
Descarboximetil de ácido elenólico hidroxilado	$17,2\pm0,3^{\rm b}$	$1,1\pm0,1^{\rm b}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$45{,}5\pm0{,}4^{b}$	$2,8\pm0,1^a$	$15,1 \pm 1,8^{a}$	$5{,}7\pm0{,}5^{\mathrm{b}}$
Dimetil oleuropeína	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$2,\!9\pm0,\!4^{\rm b}$	$0{,}8\pm0{,}1^{\rm b}$
Derivado de oleuropeína aglicona	$11,1 \pm 1,2^{a}$	$0,6\pm0,1^{a}$	$23,7 \pm 1,0^{\rm b}$	$8,\!6\pm0,\!4^{\rm b}$
Glucósido de ácido elenólico isómero 2	$33{,}4\pm0{,}5^{\mathrm{b}}$	$2,0\pm0,1^{\rm b}$	$0,7 \pm 0,2^{a}$	$0,3\pm0,1^{a}$
Hidroxi D-oleuropeína aglicona	$9,0\pm0,1^{b}$	$0,6\pm0,1^{b}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$
Hidroxi oleuropeína	$100,3\pm1,4^{\rm b}$	$5{,}9\pm0{,}2^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$
Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$13,1\pm1,3^{b}$	$4,7\pm0,3^{\rm b}$
Luteolina-7-O-rutinosido	$2,3\pm0,1^{b}$	$0,1\pm0,0^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$
Luteolina-7-O-glucósido	$20{,}6\pm2{,}5^{\mathrm{b}}$	$1,3\pm0,1^{\rm b}$	$2,5\pm0,2^{a}$	$0,9\pm0,0^{\mathrm{a}}$
Oleuropeína	$93,7\pm1,5^{\rm b}$	$5,6\pm0,0^{a}$	$21,8\pm3,3^{\rm a}$	$7,7\pm0,9^{b}$
Ligustrósido aglicona hidratado	$15{,}2\pm0{,}5^{\mathrm{b}}$	$0{,}8\pm0{,}1$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$
Ligustrósido	$16{,}5\pm0{,}8^{a}$	$1,0\pm0,1^{a}$	$19,7\pm2,5^{\rm a}$	$7,0\pm0,\!6^{\rm b}$
Pinoresinol	$2,9\pm0,3^{a}$	$0,2\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$4,7\pm0,3^{\rm b}$	$1,7\pm0,1^{b}$
Acetoxipinoresinol	$14,\!8\pm0,\!4^{a}$	$0,9\pm0,0^{a}$	$18,2\pm1,5^{\rm b}$	$6,5\pm0,3^{a}$
Comselogoside (p-coumaroyl-6-secologanoside)	$5{,}6\pm0{,}3^{\mathrm{b}}$	$0,\!3\pm0,\!0$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$
Luteolina	$220{,}9\pm4{,}4^{b}$	$13{,}2\pm0{,}2$	$49,7\pm1,4^{\rm a}$	$17,7\pm0,\!4$
6-O-[(2E)-2	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,\!9\pm0,\!1^{\rm b}$	$0,\!3\pm0,\!0$
Apigenina	$29{,}8\pm0{,}1^{b}$	$1{,}9\pm0{,}1$	$12,4\pm0,5^{a}$	$4,\!4\pm0,\!2$
Total polifenoles	$1659,0\pm30,6^{\mathrm{b}}$	100 ^a	$\textbf{281,7} \pm \textbf{12,2^a}$	100 ^a
Alcoholes fenólicos	$701,8\pm14,0^{\rm b}$	$42{,}5\pm0{,}2^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0 \pm 0,0^{a}$
Secoiridoides	$435,\!4\pm9,\!8^{b}$	$26{,}4\pm0{,}3^{a}$	$154,5\pm9,4^{a}$	$54{,}8\pm1{,}1^{\rm b}$
Flavonoides	$271,0\pm6,\!6^{\mathrm{b}}$	$16,4\pm0,1^{a}$	$64,6\pm2,0^{\mathrm{a}}$	$23,0\pm0,5^{\rm b}$
Lignanos	$17,6\pm0,6^{a}$	$1,1\pm0,0^{a}$	$23,0\pm1,7^{b}$	$8,1\pm0,3^{\rm b}$

Tabla 8. Cuantificación de compuestos fenólicos identificados en las muestras del extracto orujo obtenido bajo condiciones óptimas por líquidos presurizados (EO-LP) y en la materia prima de orujo (O).

EO-LP: extracto de orujo por líquidos presurizados, elaborado bajo condiciones optimizadas; bs: base seca.

Valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (por extracto) (p-valor < 0,05). Análisis ANDEVA y *test* de rango múltiple *Duncan*.

En la tabla 8 se observa un contenido total de compuestos fenólicos en EO-LP de 1659 mg/kg orujo (b.s.) v 281,7 mg/kg orujo (b.s) en el orujo (materia prima). Logrando 5,8 veces más de compuestos fenólicos en EO-LP. Esta relación es mayor a lo reportado anteriormente (2 a 2,5 veces) por Cioffi et al, (2010). Este resultado puede atribuirse a la alta temperatura y presión utilizada en el método de extracción con líquidos presurizados, condiciones de proceso que mejoran la capacidad de interacción entre los compuestos fenólicos y el solvente de extracción (mezcla de etanol y agua). Por otro lado, la tensión superficial y la viscosidad del solvente de extracción disminuye por el incremento de la temperatura, lo que conduce a una mejor humectación y penetración en la matriz (orujo de oliva), lo que aumenta la transferencia de masa y por lo tanto la extracción de compuestos fenólicos (Aliakbarian, et al., 2011; Peralbo-Molina et al., 2012; Morsi et al., 2016; Lozano-Sánchez et al., 2017; Chanioti et al., 2018). Sin embargo, el perfil de compuestos cambió, reflejándose principalmente en una disminución de secoiridoides (del 54,8% al 26,4 para orujo materia prima y EO-LP, respectivamente) y a la aparición de alcoholes fenólicos (desde 0 a 42,5%, para orujo materia prima y EO-LP, respectivamente), debido a la degradación de los secoiridoides.

El contenido de hidroxitirosol en EO-LP alcanzó un valor de 67,1 mg de hidroxitirosol/kg de orujo (b.s.), el cual fue menor al reportado para un extracto de orujo de oliva (var. Picual) de hidroxitirosol de 2800 mg de hidroxitirosol/kg orujo (b.s.), utilizando etanolagua como solvente en un proceso estático-dinámico (Mulinacci *et al.*, 2005; Japón-Luján y Luque de Castro, 2007). Las diferencias en el contenido de compuestos fenólicos se pueden atribuir a factores agronómicos (cultivar, maduración, ubicación geográfica y riego, entre otros), así como factores tecnológicos como la temperatura del proceso y el contenido de agua (Frankel *et al.*, 2013; Cioffi *et al.*, 2010; Servili *et al.*, 2015).

3.1.4. Encapsulación del extracto de orujo por extracción con líquidos presurizados (EO-LP) por secado por atomización.

3.1.4.1. Micropartículas de orujo con maltodextrina (O-MD).

En la tabla 9 se presentan los tratamientos y variables respuestas del diseño experimental para la encapsulación de EO-LP con maltodextrina y en la figura 7 se presentan los gráficos superficie de respuesta para cada variable estudiada.

	5		, FF	DE	ББ	ЪБ	FF	
	Tratamiento		ÉÉ Ácido quínico	EE Alcoholes fenólicos	EE Secoiridoides	EE Lignanos	EE Flavonoides	R
	Temperatura (°C)	Relación O/MD				(%)		
T 1	140(-1)	1:0,5(-1)	$90{,}4\pm4{,}4$	$100,0\pm0,0$	$92{,}6\pm0{,}7$	$93{,}6\pm1{,}5$	$100,0\pm0,0$	74,8
T_2	165(0)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100{,}0\pm0{,}0$	$93{,}7\pm0{,}5$	$100{,}0\pm0{,}0$	$100,0\pm0,0$	75,6
T 3	134,75(-α)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100{,}0\pm0{,}0$	$92{,}7\pm0{,}5$	$90,7\pm0,7$	$100,0\pm0,0$	86,9
T 4	190 (1)	1:0,5(-1)	$94{,}0\pm1{,}4$	$96{,}8\pm3{,}2$	$93,\!3\pm0,\!8$	$74,1\pm1,\!8$	$100,0\pm0,0$	62,6
T 5	165(0)	1:0,34(-α)	$91,\!4\pm1,\!1$	$86{,}7\pm1{,}3$	$92,\!4\pm0,\!4$	$49,3\pm2,3$	$100,0\pm0,0$	73,7
T ₆	190 (1)	1:2(1)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$95{,}6\pm2{,}5$	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	91,9
T 7	195,25(α)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100{,}0\pm0{,}0$	$95{,}2\pm0{,}6$	$97{,}5\pm0{,}0$	$100,0\pm0,0$	84,7
T 8	165(0)	1:2,15(a)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$98,7\pm0,4$	$100{,}0\pm0{,}2$	$100,0\pm0,0$	91,3
T9	140(-1)	1:2(1)	$100,0\pm0,0$	$100{,}0\pm0{,}0$	$98,7\pm0,2$	$100{,}0\pm0{,}0$	$100,0\pm0,0$	91,7
T_1	165(0)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$94{,}4\pm0{,}7$	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	91,3
T_1	165(0)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100{,}0\pm0{,}0$	$96,0\pm0,3$	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	91,2
T_1	165(0)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100{,}0\pm0{,}0$	$95,1\pm0,6$	$100{,}0\pm0{,}0$	$100,0\pm0,0$	86,8

Tabla 9. Diseño compuesto central 2^2 con puntos axiales para la encapsulación de extracto de orujo con maltodextrina (O-MD).

O: orujo; MD: maltodextrina; R: rendimiento; EE: eficiencia de encapsulación.

En la tabla 9 se observa que las eficiencias de encapsulación (EEs) del ácido quínico, alcoholes fenólicos, secoiridoides y lignanos fluctuaron entre 90,4-100%, 86,7-100%, 92,4-98,7% y 49,3-100%, respectivamente. El rendimiento de proceso varió entre 62,6 y 91,7%. La EE de los flavonoides fue de 100% para todos los tratamientos del diseño de micropartículas O-MD, por lo que se eliminó de la optimización estadística. En general, se observan mayores valores de EE y rendimiento al utilizar contenidos de MD más altos. Esto puede ser atribuido a la rápida formación de la costra sobre la superficie de las gotas atomizadas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

En relación con el **ácido quínico**, en el GSR (figura 7a) se observa un aumento en la eficiencia de encapsulación con el uso de mayor temperatura de entrada al secador y valores intermedios de la relación O/MD. Además, el análisis estadístico mostró que la relación O/MD en sus formas lineal y cuadrática, además de la interacción con la temperatura de entrada al secador fueron significativas sobre la EE de ácido quínico, con un ajuste al modelo de 96,6% (Anexo 8, tabla 39).



Figura 7. Gráficos de superficie de respuesta (GSR) para el diseño de micropartículas de extracto de orujo con maltodextrina (O-MD), a) EE ácido quínico; b) EE alcoholes fenólicos; c) EE secoiridoides; d) EE lignanos y e) Rendimiento de proceso.

Respecto a los **alcoholes fenólicos**, en el GSR (figura 7b) se observa una mayor EE con valores valores bajos de temperatura de entrada al secador y mayores contenido de MD. En relación con el análisis estadístico se observa que ninguna variable presentó un efecto significativas sobre la EE de alcoholes fenólicos (Anexo 8, tabla 40)).

En cuanto a los **secoiridoides**, en el GSR (figura 7c) se observa una mayor EE con una menor temperatura de entrada al secador y un mayor contenido de MD como polímero encapsulante. Con respecto al análisis estadístico la forma lineal de la relación O/MD mostró un efecto significativo sobre EE de secoiridoides, con un ajuste del modelo de un 71,5% (Anexo 7, tabla 41).

Finalmente, en los **lignanos** y el **rendimiento**, la GSR (figura 7d y e) muestra que menores temperaturas de entrada al secador y mayores contenidos de MD influyeron positivamente en la EE de lignanos y en el rendimiento del proceso. Con relación al análisis estadístico, se observa un efecto significativo en la forma lineal y cuadrática de la relación O/MD para EE de lignanos, con un ajuste del modelo de un 57% y solo la forma lineal de la relación O/MD para el rendimiento de proceso, con un ajuste del modelo de un 61% (Anexo 8, tablas 42 y 43).

3.1.4.2. Micropartículas de orujo con inulina (O-In).

En la tabla 10 se presentan los tratamientos y variables respuestas del diseño experimental para la encapsulación de EO-LP con inulina y en la figura 8 se presentan los gráficos de superficie de respuesta para cada variable estudiada.

			EE	EE	EE	EE	ЕЕ	
	Tratamien	ito	Ácido quínico	Alcoholes	Secoiridoides	Lignanos	Flavonoides	R
				fenólicos				
	Temperatura	Relación			(%			
	(°C)	O/In			()0	·)		
T_1	140(-1)	1:0,5(-1)	$0,0 \pm 0,0$	$5,6 \pm 0,0$	$69,3 \pm 3,0$	$0,0 \pm 0,0$	$100,0\pm0,0$	66,4
T_2	165(0)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$50{,}0\pm0{,}0$	$88,0 \pm 1,6$	$47,3 \pm 2,7$	$100,0\pm0,0$	75,3
T 3	134,75(-α)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$91,9 \pm 1,2$	$57,2 \pm 3,6$	$100,0\pm0,0$	81,4
T_4	190(1)	1:0,5(-1)	$0,0\pm0,0$	$83,6 \pm 1,4$	$89,2 \pm 1,9$	$75,6 \pm 1,0$	$100,0\pm0,0$	37,9
T5	165(0)	1:0,34(-α)	$0,0\pm0,0$	$71,1\pm0,9$	$86,3 \pm 2,8$	$22,5 \pm 2,9$	$100,0\pm0,0$	46,3
T 6	190(1)	1:2(1)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$86,0\pm0,7$	$79,2\pm0,9$	$100,0\pm0,0$	82,5
T 7	195,25(α)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$95,1 \pm 1,5$	$38,2 \pm 5,0$	$100,0\pm0,0$	68,7
T 8	165(0)	1:2,15(a)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$99,3 \pm 0,2$	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	76,7
T9	140(-1)	1:2(1)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$99,3 \pm 0,1$	$96,9 \pm 1,2$	$100,0\pm0,0$	82,6
T 10	165(0)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$98,6\pm0,4$	$89,7 \pm 1,0$	$100,0\pm0,0$	75,1
T ₁₁	165(0)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$87,0\pm1,1$	$83,3 \pm 2,1$	$100,0\pm0,0$	77,9
T ₁₂	165(0)	1:1,25(0)	$100,0\pm0,0$	$100,0\pm0,0$	$86,5 \pm 1,7$	$80{,}9\pm3{,}8$	$100,0\pm0,0$	76,4

Tabla 10. Diseño compuesto central 2^2 con puntos axiales para la encapsulación de extracto de orujo con inulina (O-In).

O: orujo; In: maltodextrina; R: rendimiento; EE: eficiencia de encapsulación.

Las eficiencias de encapsulación (EE) del ácido quínico, alcoholes fenólicos, secoiridoides y lignanos fluctuaron entre 0-100%, 5,6-100%, 69,3-99,3% y 0-100%, respectivamente y el rendimiento de proceso varió entre 37,9 y 82,6%. Por otro lado, la EE de los flavonoides fue de 100% para todos los tratamientos del diseño de micropartículas O-In, por lo que se eliminó de la optimización estadística. En general se observan altas EE en los compuestos fenólicos analizados. Sin embargo, los valores más bajos coinciden con contenidos de In menores, el mismo comportamiento ocurre con el rendimiento de proceso.

En relación con el **ácido quínico**, en el GSR (figura 8 a) se observa que no hay un efecto de la temperatura de entrada al secador sobre la EE sin embargo un mayor contenido de inulina en la relación O/In aumenta la EE. Además, el análisis estadístico mostró que la relación O/In en sus formas lineal y cuadrática fueron significativas sobre la EE de ácido quínico, con un ajuste al modelo de 96,2% (Anexo 9, tabla 44).

Respecto a los **alcoholes fenólicos**, **secoiridoides** y **lignanos**, en el GSR (figura 8 b, c y d) se encontró una mayor EE con una temperatura de entrada al secador alta y bajo contenido de inulina como agente encapsulante. En relación con el análisis estadístico se observa que ninguna variable presentó diferencias significativas para alcoholes fenólicos. la forma lineal de la variable temperatura de entrada al secador y la interacción de temperatura entrada al secador con O/In tuvieron un efecto significativo sobre la EE de secoiridoides, con un

ajuste al modelo de 52,8%. Solamente la forma lineal de la temperatura de entrada al secador fue significativa sobre la EE de lignanos, con un ajuste al modelo de un 60,3% (Anexo 9, tablas 45, 46 y 47).

Finalmente, en el **rendimiento**, la GSR (figura 8e) muestra que baja temperatura de entrada al secador y valores intermedio de In influyen positivamente en el rendimiento del proceso. Con respecto con el análisis estadístico, se observa un efecto significativo en la forma lineal y cuadrática de la relación O/In, la forma lineal de la temperatura de entrada y en la interacción de ambas variables independientes estudiadas con un ajuste del modelo de un 97,7% (Anexo 9, tabla 48).



Figura 8. Gráficos de superficie de respuesta (GSR) para el diseño de micropartículas de extracto de orujo con inulina (O-In), a) EE ácido quínico; b) EE alcoholes fenólicos; c) EE secoiridoides; d) EE lignanos y e) rendimiento de proceso

Al comparar los tratamientos de ambos diseños (O-MD y O-In), se observa que las EEs de los distintos compuestos fenólicos analizados fueron mayores en aquellos sistemas de micropartículas con MD con respecto a In, mostrando el efecto del tipo de polímero como agente encapsulante. A pesar de que ambos polímeros (maltodextrina e inulina) son polisacáridos, la MD es un polímero compuesto de D-glucosa (Kuntz, 1997) mientras que la In es un polímero compuesto por D-fructosa (Sinha y Kumria, 2003; Stevens *et al.*, 2001), estas diferencias estructurales pueden explicar los mayores valores de EE de compuestos fenólicos en O-MD, debido al mayor número de grupos hidroxilos disponibles en la maltodextrina, que favorece la interacción polifenoles-MD por puentes de hidrógeno (Lauro *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2010 y Sun-Waterhouse *et al.*, 2013).

3.1.4.3. Optimización de la microencapsulación de orujo por secado por atomización.

La figura 9 muestra el gráfico de superficie respuesta para el diseño de micropartículas de extracto orujo con maltodextrina (O-MD) e inulina (O-In). Las condiciones óptimas para la obtención de micropartículas del sistema O-MD corresponde a una temperatura de aire de entrada de 140,1 °C y una relación de O/MD de 1:2,07; y para O-In una temperatura de aire de entrada de 145,7°C y una relación de O/In de 1:1,9. Ambas condiciones óptimas se encuentran dentro de la zona de dominio estudiada. Finalmente, se observa en los gráficos de superficie de respuesta, que los óptimos se ubican en la zona roja con una deseabilidad para ambos sistemas de 0,99.



Figura 9. Optimización múltiple por MSR para el diseño de micropartículas de extracto de orujo, a) con maltodextrina (O-MD) y b) con inulina (O-In).

3.1.5. Caracterización de las micropartículas de orujo, obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización.

En la tabla 11 se presenta la caracterización de las micropartículas de orujo (O-MD y O-In), obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización.

Tabla 11. Condiciones óptimas de secado y caracterización de micropartículas óptimas de los sistemas elaborados con orujo (O-MD y O-In).

Parámetros	O-MD	O-In	p-valor
Relación E/AE	1:2,1	1:1,9	-
Temperatura de entrada (°C)	140	145	-
Rendimiento (%)	$89,2 \pm 0,3^{a}$	$89,5 \pm 0,3^{a}$	0,3702
Fenoles totales (mgEAG/g)	$1,6 \pm 0,0^{a}$	$1,6 \pm 0,0^{a}$	0,3739
Capacidad antioxidante ORAC (uMTrolox/100g)	$43,6 \pm 3,9^{a}$	$46,7 \pm 3,9^{a}$	0,3845
Humedad (%)	$8,8 \pm 0,3^{a}$	$7,3\pm0,8^{a}$	0,1361
a_w	$0,18 \pm 0,0^{a}$	$0,22 \pm 0,01^{b}$	0,0150
Higroscopicidad (g/100 g)	$38,0 \pm 0,3^{b}$	$30,3 \pm 0,5^{a}$	0,0028
Solubilidad (g/100 g)	$96,4 \pm 0,7^{a}$	$96,4 \pm 0,8^{a}$	0,7962
Tamaño de partícula D _(4.3) (µm)	$10,8\pm0,1^{\mathrm{b}}$	$6,2 \pm 0,1^{a}$	0,0000

O: orujo; MD: Maltodextrina; In: Inulina; E/AE: Extracto/agente encapsulante, EE: Eficiencia de encapsulación, EAG: Equivalente de ácido gálico, a_w : actividad de agua. X: promedios (n=3) ± DS: desviación estándar. Valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (por extracto) (p-valor < 0.05). Análisis ANDEVA y test de rango múltiple *Duncan*.

En general, las condiciones óptimas de temperatura del aire de entrada al secador y relación extracto/agente encapsulante para las micropartículas de O-MD y O-In, dependieron del tipo de polímero utilizado como agente encapsulante, mostrando que las condiciones óptimas fueron características de cada sistema, como reportó Gharsallaoui *et al.* (2007).

El rendimiento de las micropartículas de O-MD y O-In fue cercano al 90%, sin diferencia significativa entre tipo de polímero (MD o In). Un comportamiento similar se encontró para el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante.

En cuanto a la higroscopicidad, ésta fue significativamente mayor en las micropartículas elaboradas con maltodextrina, respecto a aquellas con In. Sin embargo, para ambos sistemas la higroscopicidad es alta, por lo que el almacenamiento de éstas debe realizarse en zonas de baja humedad relativa y/o en envases impermeables al agua. Por otro lado, aunque, el contenido de humedad en las micropartículas O-MD y O-In no presentaron diferentes significativas, las micropartículas O-MD presentaron una humedad mayor y un tamaño de partículas significativamente mayor respecto a O-In. Estos resultados están de acuerdo con Ronkart *et al.* (2007) quienes reportaron que una mayor humedad de las micropartículas facilitan la aglomeración de las micropartículas, ocasionando así un tamaño de partícula mayor D_(4,3). La actividad de agua estuvo es baja en ambos sistemas (entre 0,18 y 0,22), lo que permitiría reducir los costos de almacenamiento y transporte, y aumentar la estabilidad microbiológica de los productos en polvo (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Gouin, 2004).

La solubilidad de las micropartículas O-MD y O-In, alcanzaron valores de 96,4 %, sin diferencias significativas. Una alta solubilidad mostraría que estas micropartículas se podrían utilizar como un ingrediente para formulaciones en polvos como jugos y sopas, las que requieren alta solubilidad para su preparación.

En la figura 10 se presentan las fotografías SEM y las gráficas de distribución de tamaño de las micropartículas de orujo, elaboradas bajo condiciones óptimas (O-MD y O-In), los sistemas mostraron forma esférica, con superficie abollada en el caso de las elaboradas con maltodextrina y con superficie lisa para las micropartículas de inulina. La formación de abolladuras ha sido atribuida al encogimiento de las partículas durante el proceso de secado y se puede producir a bajas o altas temperaturas de entrada al secador. A bajas temperaturas, existe una menor difusión del agua y las partículas tienen más tiempo para encogerse, mientras que, a altas temperaturas, la rápida evaporación del agua y la alta presión en el interior de las partículas también produce encogimiento. (Alamilla-Beltrán, 2005). En este caso pudo ocurrir por un efecto a la baja temperatura del proceso de secado.

En relación con el tamaño de partícula, se observa una forma unimodal, con una distribución de tamaño entre 1 y 10 μ m, para ambos los sistemas.



Figura 10. Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM) para las micropartículas de orujo obtenidas bajo condiciones óptimas: O-MD y b) O-In y la distribución de tamaño de partículas: c) O-MD y d) O-In.

En la tabla 12 se presentan las EEs de los distintos compuestos fenólicos presentes en las micropartículas de orujo (O-MD y O-In), obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización. Es importante indicar que, la EE representa la interacción entre los compuestos fenólicos y el polímero, la que en este caso corresponde a puentes de hidrógeno (Lauro et al., 2007; Robert et al., 2010 y Sun-Waterhouse et al., 2013). Los valores de EE fueron significativamente mayores en los sistemas de micropartículas con MD respecto a aquellos con In para Ác. quínico, oleosido-secolonanosido-o-isómero 1, ácido elenólico glucósido-isómero 2, luteolina 7-glucósido, descarboximetil-oleuropeína aglicona, oleuropeína, p-cumaril-6-secologanosido, luteolina, apigenina y demetiloleuropeína. Estos resultados muestran el efecto del tipo de polímero como agente encapsulante sobre la EE. Este efecto podría deberse al mayor número de grupos hidroxilo presentes en la glucosa (monosacárido de la MD), al compararlo con la fructosa (monosacárido de la In). Por otro lado, una mayor eficiencia de encapsulación también se explicaría por la rápida formación de la costra durante el secado por atomización, que permite una mayor retención de los compuestos. La formación de la costra sobre la superficie de la gota atomizada se favorece con altas temperaturas del aire de entrada o un mayor contenido de sólidos (Gharsallaoui et al., 2007), en este caso se debería al mayor contenido de sólidos en la solución de alimentación del sistema O-MD.

Tabla 12. Eficiencia de encapsulación (%) de los compuestos fenólicos presentes en las micropartículas de orujo (O-MD y O-In), obtenidas bajo condiciones óptimas.

Compuesto propuesto	O-MD	O-In	p-valor
Ácido quínico	$97,1 \pm 0,4^{b}$	$94,5 \pm 0,4^{a}$	0,0227
Oleósido/secologanósido o isómero 1	$98,0\pm0,3^{\rm b}$	$91,8 \pm 1,0^{a}$	0,0151
Hidroxitirosol-hexosa o isómero a	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Derivado secoiridoide 1	$98,9\pm0,1^a$	$98,7 \pm 0,1^{a}$	0,3118
Hidroxitirosol	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	1,0000
D-OH-EA	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9998
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico isómero 1	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9998
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico isómero 2	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Glucósido de ácido elenólico isómero 1	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Oleuropeína aglicona	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9998
Glucósido de ácido elenólico isómero 2	$98,3\pm0,0^{\rm b}$	$96,2 \pm 0,2^{a}$	0,0048
Acetoxipinoresinol	$97,2 \pm 0,9^{a}$	$94,8 \pm 1,0^{\mathrm{a}}$	0,1330
Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Hidroxitirosol-hexosa o isómero b	$90,4 \pm 1,1^{a}$	$89,6 \pm 3,1^{a}$	0,7589
Luteolina 7-glucósido	$95,5 \pm 1,5^{b}$	$81,0 \pm 1,6^{a}$	0,0074
Decarboximetil oleuropeína aglicona	$99,1\pm0,0^{\rm b}$	$96,3 \pm 0,7^{a}$	0,0304
Pinoresinol	$91,8 \pm 0,4^{a}$	$87,8 \pm 2,4^{a}$	0,1425
Oleuropeína	$77,5 \pm 2,4^{b}$	$59,5\pm4,5^{\mathrm{a}}$	0,0374
p-cumaril 6-secologanosido	$83,8 \pm 2,1^{b}$	$68,7 \pm 1,3^{a}$	0,0132
Ligustrósido	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Luteolina	$88,9 \pm 2,1^{b}$	$11,7 \pm 0,8^{a}$	0,0005
Apigenina	$85,0 \pm 2,2^{b}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,0004
Demetil oleuropeína	$59{,}4\pm3{,}4^{b}$	$31,6\pm5,2^{a}$	0,0241

O: Orujo; MD: Maltodextrina; In: Inulina

Promedios $(n=3) \pm$ desviación estándar, valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (por extracto) (p-valor < 0,05). Análisis ANDEVA y test de rango múltiple *Duncan*.

3.1.6. Caracterización de las micropartículas de orujo, recubiertas por lecho fluidizado.

En la tabla 13 se presenta la caracterización de las micropartículas de orujo recubiertas por lecho fluidizado (O-MD-In y O-MD-Alg). En esta se observa que las micropartículas O-MD recubiertas con alginato (O-MD-Alg) presentaron un contenido de polifenoles significativamente menor, respecto a aquellas recubiertas con inulina (O-MD-In) y a las sin recubrir (O-MD). Aunque, la capacidad antioxidante no tuvo un efecto significativo entre O-MD, O-MD-In y O-MD-Alg, aquellas con recubrimiento presentaron una capacidad antioxidante ligeramente menor, lo cual se puede atribuir al proceso recubrimiento por del lecho fluidizado (50°C por dos horas). El contenido de humedad e higroscopicidad fue similar para las micropartículas sin recubrir y recubiertas. Se esperaba un cambio en la higroscopicidad en las micropartículas recubiertas, característico de cada polímero. Este comportamiento se podría explicar porque el principal polímero es MD y la higroscopicidad correspondió al de las micropartículas O-MD. Las micropartículas recubiertas presentaron una disminución en la solubilidad, pero sobre un 91%, en línea con un mayor tamaño de partícula para estos sistemas. Por lo tanto, el lecho fluidizado permite recubrir las micropartículas con polímeros que les entregarían propiedades de liberación sitio-específica.

	•			
Parámetros	O-MD	O-MD-In	O-MD-Alg	p-valor
Fenoles totales (mgEAG/g)	$1,6 \pm 0,0^{b}$	$1,5 \pm 0,2^{b}$	$1,4 \pm 0,0^{a}$	0,0292
Capacidad antioxidante ORAC (uMTrolox/100g)	$43,6 \pm 3,9^{a}$	$37,4\pm8,9^{a}$	$37,1\pm 5,0^{a}$	0,1948
Humedad (%)	$8,8 \pm 0,3^{a}$	$8,9\pm0,3^{a}$	$8,6 \pm 0,3^{a}$	0,0796
a _w	$0,18 \pm 0,0^{a}$	$0,\!40\pm0,\!0^{\mathrm{d}}$	$0,37 \pm 0,0^{\circ}$	0,0000
Higroscopicidad (g/100 g)	$38,0 \pm 0,3^{b}$	$38,6 \pm 0,1^{b}$	$38,1 \pm 0,5^{b}$	0,0001
Solubilidad (g/100 g)	$96,4 \pm 0,7^{b}$	$91{,}5\pm1{,}7^{\mathrm{a}}$	$91,5 \pm 1,8^{a}$	0,0002
Tamaño de partícula D _(4.3) (µm)	$10,8 \pm 0,1^{\rm b}$	$23,7\pm0,8^{\circ}$	$32,\!4\pm2,\!2^{d}$	0,0000

Tabla 13. Caracterización de micropartículas O-MD, elaboradas bajo condiciones óptimas y a las recubiertas por lecho fluido (O-MD-In y O-MD-Alg).

O: Orujo; MD: Maltodextrina; In: Inulina y Alg: alginato de sodio; E/AE: extracto/agente encapsulante, EE: Eficiencia de encapsulación, EAG: Equivalente de ácido gálico, Aw: actividad de agua.

Promedios $(n=3) \pm$ desviación estándar, valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (por extracto) (p-valor < 0,05). Análisis ANDEVA y test de rango múltiple *Duncan*.

En la figura 11 se presentan las fotografías SEM y las gráficas de distribución de tamaño de las micropartículas de orujo recubiertas por lecho fluido (O-MD-In y O-MD-Alg), en estas se aprecian pequeñas partículas que recubren las micropartículas esféricas y aglomeraciones. En relación con el tamaño de partícula, se observa una forma unimodal con más de un peak característico, con una distribución de tamaño entre 1 y 100 μ m, para todos los sistemas. El tamaño promedio y su distribución presentan un cambio importante al comparar los resultados con las micropartículas sin recubrir. Estos cambios morfológicos y de tamaño se atribuyen al efecto del proceso de recubrimiento por lecho fluido.



Figura 11. Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM) las micropartículas de orujo obtenidas bajo condiciones óptimas: O-MD-In y b) O-MD-Alg, y la distribución de tamaño de partículas: c) O-MD-In y d) O-MD-Alg.

En la tabla 14 se presentan las eficiencias de encapsulación de cada compuesto fenólico, de las micropartículas O-MD, elaboradas bajo condiciones óptimas y las recubiertas por lecho fluidizado (O-MD-In y O-MD-Alg), en esta se observa que los valores de EE para los distintos compuestos fenólicos es diferente entre las muestras con y sin recubrimiento. Sin embargo, en general, no se observan diferencias significativas entre los polímeros de recubrimiento (O-MD-In y O-MD-Alg).

La encapsulación por secado por atomización no es una encapsulación verdadera, ya que quedan polifenoles en la superficie de la micropartícula. Por lo que, el uso de lecho fluidizado permite recubrir los polifenoles superficiales y aumentar la EE, lo que se observa en la EE de algunos compuestos fenólicos como la acetoxipinoresinol, pinoresinol, oleuropeína y p-cumaril-6-secologanosido. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la EE disminuye, principalmente en la EE de hidroxitirosol-hexosa o isómero a hidroxitirol, ligustrosido, dimetil oleuropeína, lo que se podría explicar por un aumento de ciertos compuestos fenólicos en la superficie de las micropartículas (formación de estructuras oxidadas o derivadas) por rutas de degradación de secoiridoides o de hidroxitirosol (Obied y Robards, 2013), formados durante el proceso de recubrimiento.

Tabla	14.	Eficiencia	de	encapsulación	de lo	os c	ompuestos	fenólicos	presentes	en	las
microp	artíc	ulas O-MD	, ela	aboradas bajo c	ondic	ione	es óptimas y	a las recu	ubiertas po	r le	cho
fluido (O-N	1D-In y O-N	۸D-	-Alg).							

Compuesto propuesto	O-MD	O-MD-In	O-MD-Alg	p-valor
Ácido quínico	$97,1 \pm 0,4^{a}$	$93,1 \pm 2,0^{a}$	$95{,}4\pm0{,}8^{a}$	0,0980
Oleósido/secologanósido o isómero 1	$98,0\pm0,3^{\rm b}$	$97,7 \pm 2,3^{b}$	$95{,}9\pm0{,}4^{\rm b}$	0,0215
Hidroxitirosol-hexosa o isómero a	$100,0 \pm 0,0^{\rm c}$	$11,4 \pm 0,2^{a}$	$33,2 \pm 0,7^{b}$	0,0000
Derivado secoiridoide 1	$98{,}9\pm0{,}1^{\rm b}$	$91,7\pm1,0^{\mathrm{a}}$	$92,4\pm0,7^{\mathrm{a}}$	0,0006
Hidroxitirosol	$100,0 \pm 0,0^{\rm c}$	$28,5 \pm 3,0^{a}$	$38,6 \pm 0,1^{b}$	0,0000
D-OH-EA	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0\pm0,0^{\rm a}$	0,9999
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$100,0\pm0,0^{\rm b}$	$96{,}2\pm1{,}7^{\mathrm{a}}$	$95,1 \pm 1,2^{a}$	0,0176
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$100,0\pm0,0^{\rm b}$	$95,1 \pm 0,3^{a}$	$95,8 \pm 0,9^{a}$	0,0007
Glucósido de ácido elenólico isómero 1	$100,0\pm0,0^{\rm b}$	$82,3 \pm 6,1^{a}$	$84,2 \pm 1,0^{a}$	0,0075
Oleuropeína aglicona	$100,0\pm0,0^{\rm b}$	$92,1 \pm 1,7^{a}$	$91,0 \pm 0,3^{a}$	0,0009
Glucósido de ácido elenólico isómero 2	$98,3\pm0,0^{\rm b}$	$87,5 \pm 4,6^{a}$	$85,8 \pm 0,2^{a}$	0,0136
Acetoxipinoresinol	$97,2\pm0,9^{\rm b}$	$100,0 \pm 0,0^{c}$	$100,0 \pm 0,0^{c}$	0,0039
Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$100,0 \pm 0,0^{\rm c}$	$83,0 \pm 0,4^{a}$	$88,1 \pm 0,4^{b}$	0,0000
Hidroxitirosol-hexosa o isómero b	$90,4 \pm 1,1^{a}$	$100,0\pm0,0^{\rm b}$	$100,0\pm0,0^{\rm b}$	0,0045
Luteolina-7-glucósido	$95{,}5\pm1{,}5^{\mathrm{b}}$	$96,5 \pm 0,5^{b}$	$95,2 \pm 0,7^{b}$	0,0003
Decarboximetil oleuropeína aglicona	$99,1\pm0,0^{\rm d}$	$88,8 \pm 1,0^{a}$	$97,9\pm0,2^{bc}$	0,0002
Pinoresinol	$91,8\pm0,4^{\rm b}$	$100,0 \pm 0,0^{\rm c}$	$100,0\pm0,0^{\rm c}$	0,0012
Oleuropeína	$77,5\pm2,4^{\rm b}$	$82,4 \pm 2,4^{c}$	$86,4 \pm 2,8^{c}$	0,0036
p-cumaril-6-secologanosido	$83,8\pm2,1^{\rm b}$	$91,4 \pm 5,4^{c}$	$92,1 \pm 2,7^{c}$	0,0057
Ligustrosido	$100,0\pm0,0^{\rm b}$	$75,1 \pm 7,4^{a}$	$85,2 \pm 1,2^{a}$	0,0063
Luteolina	$88,9\pm2,1^{\rm b}$	$84,0 \pm 14,3^{b}$	$93,2 \pm 2,7^{b}$	0,0010
Apigenina	$85,0 \pm 2,2^{bc}$	$76,9 \pm 5,3^{b}$	$91,9 \pm 1,6^{c}$	0,0000
Dimetil oleuropeína	$59,4\pm3,4^{\circ}$	$7,6\pm0,1^{a}$	$38,3\pm1,2^{\rm b}$	0,0056

O: Orujo; MD: Maltodextrina; In: Inulina; Alg: alginato de sodio.

Promedios $(n=3) \pm$ desviación estándar, valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (por extracto) (p-valor < 0,05). Análisis ANDEVA y test de rango múltiple *Duncan*.

3.1.7. Estabilidad de los compuestos fenólicos de las micropartículas de orujo, almacenadas a 60°C.

Se estudió la estabilidad del extracto de orujo y de las micropartículas con y sin recubrimiento, almacenados a 60°C. Para esto se calculó el porcentaje de retención para cada uno de los compuestos fenólicos identificados.

En la Tabla 15 se muestran los porcentajes de retención de los distintos compuestos fenólicos encontrados en el extracto de orujo (EO-LP) y en las micropartículas O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg, obtenidas bajo condiciones óptimas y almacenadas por 180 días a 60°C.

Al comparar los resultados obtenidos en la tabla 15 entre el extracto de orujo y las micropartículas de los sistemas O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg, se observan diferencias significativas en cada uno de los compuestos analizados. Además, en general se observa una menor retención de compuestos fenólicos en el extracto de orujo (EO-LP) al compararlo con las distintas micropartículas, lo que sugiere que la microencapsulación otorga una efectiva protección a los distintos compuestos analizados frente a las condiciones del medio, aumentando su estabilidad. Este comportamiento tiene algunas excepciones como en los compuestos fenólicos oleósido, acetoxipinoresinol e hidroxitirosol hexosa, los que presentan porcentajes de retención mayor en el extracto, lo que podría explicarse por la degradación de otros compuestos fenólicos presentes, como compuestos secoiridoides, pinoresinol e hidroxitirosol, respectivamente (Obied y Robards, 2013). Por otro lado, al comparar la estabilidad de los compuestos fenólicos presentes en las micropartículas O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg, se observa que la retención de los compuestos fenólicos fenólicos presentes en las micropartículas O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg, se observa que la retención de los compuestos fenólicos es mayor en las micropartículas con MD (con y sin recubrimiento) al compararlas con O-In.

Compuesto fenólico	O-PLE	O-MD	O-In	O-MD-In	O-MD-Alg	p-valor
Alcoholes fenólicos						
Hidroxitirosol-hexosa o isómero a	97.8 ± 0.6^{a}	98.6 ± 0.2^{a}	131.7 ± 0.9^{b}	110.9 ± 7.2^{a}	95.0 ± 0.9^{a}	0,0226
Hidroxitirosol-hexosa o isómero b	144.7 ± 1.7^{b}	99.4 ± 0.2^{a}	99.3 ± 0.0^{a}	99.6 ± 0.2^{a}	$100,0 \pm 0,2^{a}$	0,0000
Hidroxitirosol	$56,7 \pm 0,3^{a}$	$92,2 \pm 0,3^{\circ}$	87.3 ± 0.8^{b}	101.5 ± 3.7^{d}	$92,4 \pm 0,7^{c}$	0,0000
Secoiridoides						
Oleósido/secologanósido o isómero 1	$13,4 \pm 0,1^{a}$	$82,1 \pm 3,4^{c}$	$59,2 \pm 6,9^{b}$	$76,6 \pm 7,0^{\circ}$	$73,1 \pm 1,4^{c}$	0,0001
Derivado secoiridoide 1	$78,0 \pm 1,3^{a}$	$96,8 \pm 0,4^{b}$	$233,2 \pm 0,8^{\circ}$	$80,5 \pm 5,6^{a}$	$78,6 \pm 2,0^{a}$	0,0000
D-OH-EA	$69,7 \pm 1,9^{\rm b}$	$89,8 \pm 2,7^{c}$	$42,1 \pm 0,7^{a}$	$108,9 \pm 1,3^{d}$	$71,0 \pm 7,1^{b}$	0,0001
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico isómero 1	$69,3 \pm 1,4^{b}$	$98,7 \pm 2,9^{d}$	$64,1 \pm 1,8^{a}$	$107,5 \pm 0,9^{e}$	$83,6 \pm 1,0^{c}$	0,0000
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$106,3 \pm 0,2^{e}$	$97.8 \pm 1.2^{\circ}$	$76,1 \pm 1,3^{a}$	$101,8 \pm 1,1^{d}$	$80,7 \pm 0,0^{\rm b}$	0,0000
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico isómero 2	$97,7 \pm 1,5^{d}$	$91,4 \pm 0,2^{c}$	$73,7 \pm 0,5^{a}$	$108,9 \pm 2,0^{e}$	$86,4 \pm 1,8^{b}$	0,0000
Glucósido de ácido elenólico isómero 1	$31,2 \pm 0,4^{a}$	107.6 ± 2.0^{d}	$73,8 \pm 0,8^{b}$	$102,3 \pm 11,6^{cd}$	$92,0 \pm 3,1^{\circ}$	0,0002
Oleuropeína aglicona	$113,8 \pm 0,4^{\rm b}$	$96,5 \pm 1,4^{a}$	$220,8 \pm 4,8^{\circ}$	$88,5 \pm 5,2^{a}$	$92,8 \pm 9,1^{a}$	0,0000
Glucósido de ácido elenólico isómero 2	$121,0 \pm 0,9^{c}$	$105,9 \pm 1,7^{\rm ab}$	$105,0 \pm 1,2^{ab}$	$113,5 \pm 6,8^{bc}$	$97,4 \pm 2,4^{a}$	0,0063
Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	99.8 ± 2.8^{b}	88.6 ± 4.9^{b}	$62,5 \pm 2,4^{a}$	$93,8 \pm 7,4^{b}$	$72,2 \pm 1,0^{a}$	0,0015
Decarboximetil oleuropeína aglicona	$48,9 \pm 0.5^{\circ}$	$22,9 \pm 1,1^{a}$	135.6 ± 5.3^{e}	$26,8 \pm 9,0^{b}$	$58,9 \pm 1,5^{d}$	0,0000
Oleuropeína	$78,7 \pm 1,6^{c}$	$69,1 \pm 1,4^{b}$	$44,2 \pm 0,3^{a}$	$84,7 \pm 2,9^{d}$	$77,8 \pm 3,0^{\circ}$	0,0000
p-cumaril-6-secologanosido	$108,1 \pm 7,0^{a}$	$85,2 \pm 3,4^{a}$	$90,9 \pm 0,7^{a}$	$106,5 \pm 0,3^{a}$	$84,1 \pm 5,8^{a}$	0,1583
Ligustrósido	$101,2 \pm 3,9^{\circ}$	$156,5 \pm 9,4^{d}$	53.1 ± 12.3^{b}	10.1 ± 0.0^{a}	$65,5 \pm 3,2^{b}$	0,0001
Dimetil oleuropeína	$57,0 \pm 18,0^{a}$	$67,4 \pm 2,5^{ab}$	$94,2 \pm 2,6^{c}$	$64,2 \pm 0,7^{ab}$	$83,1 \pm 5,2^{bc}$	0,0346
Flavonoides	· · · ·					
Luteolina-7-glucósido	$108,9 \pm 5,5^{\circ}$	$104,0 \pm 8,4^{c}$	$80,9 \pm 0,1^{a}$	$90,7 \pm 1,6^{ab}$	$101,0 \pm 3,0^{bc}$	0,0104
Luteolina	$16,9 \pm 6,3^{a}$	$121,8 \pm 1,6^{c}$	$97,4 \pm 0,3^{\rm bc}$	$88,5 \pm 5,4^{\rm b}$	$112,6 \pm 4,5^{bc}$	0,0010
Apigenina	$13,5 \pm 5,6^{\rm a}$	113,3 9,8 ^b	$108,4 \pm 1,3^{\rm b}$	$112,3 \pm 13,8^{b}$	$114,7 \pm 2,9^{b}$	0,0010
Lignanos						
Pinoresinol	$49,1 \pm 6,8^{a}$	$77,3 \pm 3,8^{b}$	$58,3 \pm 2,3^{a}$	$9\overline{7,4\pm 5,8^{c}}$	$88,8 \pm 1,4b^{c}$	0,0005
Acetoxipinoresinol	$337,9 \pm 16,8^{\circ}$	$94,7 \pm 8,0^{ m ab}$	$78,7 \pm 1,5^{a}$	$99,2 \pm 5,5^{ab}$	$104,2 \pm 3,5^{b}$	0,0000

Tabla 15. Retención (%) de compuestos fenólicos en tiempo final para el EO-LP y las micropartículas O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg, obtenidas bajo condiciones óptimas y almacenadas por 180 días a 60°C.

EO-LP: Extracto de orujo obtenido por líquidos presurizados; MD: Maltodextrina; In: Inulina y Alg: alginato de sodio.

Promedios (n=3) ± desviación estándar, valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor < 0,05) análisis ANDEVA y test de rango múltiple Duncan.

En la figura 12 se presentan las gráficas de Cinética de degradación de los compuestos fenólicos hidroxitirosol, oleuropeína, pinoresinol y luteolina del extracto de orujo y las micropartículas O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg. Se seleccionaron estos compuestos fenólicos como ejemplo de cada clase de polifenoles analizados. En estas se observan diferencias entre el extracto (EO-LP) y las micropartículas, mostrando una mayor degradación en el extracto de orujo.



3.1.8. Estudio de liberación de compuestos fenólicos desde las micropartículas de orujo, en un sistema gastrointestinal simulado.

Se estudió la bioaccesibilidad de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas de los sistemas O-MD, O-In, O-MD-In, O-MD-Alg, en condiciones gástrica simulada (FGS) e intestinal simulada (FIS).

En la Tabla 16 se presenta el porcentaje de bioaccesibilidad de cada compuesto fenólico en fluidos gástrico e intestinal simulados, de los sistemas de micropartículas de orujo (O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg), obtenidos bajo condiciones óptimas.

Al comparar la bioaccesibilidad en FGS, se observan diferencias significativas en la mitad de los compuestos fenólicos estudiados presentes en las micropartículas de orujo (O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg), mostrando una disminución de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de las micropartículas recubiertas (O-MD-In y O-MD-Alg), además se observa una mayor bioaccesibilidad del hidroxitirosol, hidroxitirosol hexosa isómero a y luteolina 7 glucósido en la micropartícula O-MD, al compararla con O-In, esto podría deberse a la mayor solubilidad en medio acuoso de la maltodextrina y por una mayor digestión del polímero por efecto de la enzima α -amilasa, presente en FGS.

En cuanto a la bioaccesibilidad en FIS, se observan diferencias significativas en la mayoría de los compuestos fenólicos estudiados presentes en las micropartículas de orujo (O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg), mostrando un aumento de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en las micropartículas recubiertas por lecho fluido, con mayor frecuencia en O-MD-Alg.

Por otro lado, al comparar la bioaccesibilidad en FGS y FIS, de los distintos compuestos fenólicos, es posible afirmar que los valores obtenidos dependen de la naturaleza de los compuestos estudiados, obteniendo una bioaccesibilidad que varía entre 0 y 37000%, este enorme rango de respuesta podría explicarse por varias razones: es posible decir que valores menores a 100% de bioaccesibilidad podrían estar asociados a una baja liberación de los compuestos fenólicos debido su baja solubilidad en el medio de disolución, como a distintos mecanismos de degradación debido a las condiciones presentes en FGS y FIS. Por otro lado, valores mayores a 100% podrían explicarse por un aumento de compuestos fenólicos más simples o estructuras oxidadas, formados por diversas rutas de degradación de compuestos fenólicos más complejos, esto se ve reflejado en un aumento significativo de derivados del ácido elenólico (compuestos presentes en secoiridoides como oleuropeína, ligustrósido y derivados) y de derivados de secoiridoides, formados por rutas de degradación de la oleuropeína (Obied y Robards, 2013).

Tabla 16. Bioaccesibilidad (%) de compuestos fenólicos en fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS) de las micropartículas O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg, obtenidas bajo condiciones óptimas.

			FGS					FIS		
Compuesto propuesto	O-MD	O-In	O-MD-In	O-MD-Alg	p-valor	O-MD	O-In	O-MD-	O-MD-Alg	<i>p</i> -
								In		valor
Alcoholes fenólicos										
Hidroxitirosol-hexosa isómero a	$60,0 \pm 1,7^{c}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0 \pm 0,0^{a}$	29,9 ± 2,9 ^b	0,0000	$0,0 \pm 0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0 \pm 0,0^{a}$	$207,5 \pm 2,1^{b}$	0,0000
Hidroxitirosol-hexosa isómero b	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,9999	$460,5 \pm 13,6^{d}$	272,9 ± 13,5°	$44,7 \pm 1,0^{a}$	$158,0 \pm 3,1^{b}$	0,0000
Hidroxitirosol	$41,1\pm2,3^{\rm c}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$29,9\pm3,5^{\text{b}}$	0,0001	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	0,9999
Secoiridoides										
Oleósido/secologanósido o isómero 1	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,9999	$95,0 \pm 0,0^{c}$	$143,7\pm3,8^{d}$	$0,6\pm0,0^{a}$	$34,2\pm1,3^{b}$	0,0000
Derivado secoiridoide	$848,8\pm28,8^{\mathrm{b}}$	$858,2\pm42,6^{\text{b}}$	$15{,}4\pm1{,}0^{a}$	$233{,}6\pm41{,}2^a$	0,0000	$85,0\pm53,6^{\rm c}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$7,0\pm0,3^{\text{b}}$	$294,0\pm4,2^{d}$	0,0011
D-OH-EA	$36{,}9\pm6{,}1^{b}$	$56,0\pm8,3^{b}$	$1,2\pm0,4^{a}$	$43,8\pm5,8^{b}$	0,0149	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$166,\!6\pm4,\!7^{\mathrm{b}}$	0,0000
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico isómero 1	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,9999	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	0,9999
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$26,\!4\pm0,\!2^{\mathrm{b}}$	$16,5\pm9,6^{b}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$11,1\pm4,3^{b}$	0,0314	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$32{,}5\pm0{,}0^{b}$	0,0000
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico isómero 2	$14,5\pm1,5^{b}$	$18,3\pm0,8^{\rm c}$	$0,1\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$17,1\pm1,5^{\rm c}$	0,0003	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,2\pm0,0^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$62,5\pm0,6^{\rm c}$	0,0000
Glucósido de ácido elenólico isómero 1	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,9999	$\textbf{23,8} \pm \textbf{0,6}^c$	$13,9\pm1,2^{b}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$25{,}5\pm1{,}2^{\rm c}$	0,0000
Oleuropeína aglicona	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$8,8\pm0,\!4^{b}$	0,0541	$29{,}9\pm0{,}1^{b}$	$98,6\pm2,1^{\rm c}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$736{,}9\pm3{,}4^{d}$	0,0000
Glucósido de ácido elenólico isómero 2	$285,7\pm9,5^{\mathrm{b}}$	$419,0\pm0,2^{\rm c}$	$2{,}5\pm0{,}4^{a}$	$258,6\pm30,2^{b}$	0,0001	$12,5\pm0,0^{b}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$30{,}3\pm1{,}0^{\rm c}$	0,0000
Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$208,8\pm24,7^{b}$	$205{,}4\pm45{,}0^{\text{b}}$	$2{,}6\pm0{,}3^{a}$	$445,5\pm25,2^{\rm c}$	0,0603	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$2,2\pm1,0^{\mathrm{a}}$	$913,3\pm23,7^{b}$	0,0000
Decarboximetil oleuropeína aglicona	$9{,}8\pm3{,}3^{\mathrm{b}}$	$17{,}9\pm5{,}7^{b}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,0219	$37503,\!6\pm245,\!5^{c}$	$35606, 1 \pm 465, 7^{c}$	$170{,}6\pm0{,}6^{a}$	$4893,8\pm95,7^{\text{b}}$	0,0000
Oleuropeína	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,9999	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$138,\!6\pm8,\!4^{\mathrm{b}}$	0,0000
p-cumaril-6-secologanosido	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,9999	$11{,}9\pm0{,}8^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$181,\!6\pm2,\!6^{\rm c}$	0,0000
Ligustrósido	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,9999	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	0,9999
Dimetil oleuropeína	$3114,9 \pm 193,1^{\mathrm{b}}$	$6236,0\pm 379,4^{\rm c}$	$34{,}8\pm0{,}9^{a}$	$2582,0 \pm 258,7^{\rm b}$	0,0000	$12,5\pm0,2^{a}$	$30{,}6\pm0{,}0^{b}$	$88,5\pm3,5^{\rm c}$	$5835,2\pm216,2^{d}$	0,0000
Flavonoides										
Luteolina-7-glucósido	$18,7\pm5,7^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,0067	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$8{,}2\pm1{,}5^{b}$	0,0003
Luteolina	$42,0\pm2,6^d$	$\textbf{37,0} \pm \textbf{1,0^c}$	$1{,}0\pm0{,}1^{a}$	$18,3\pm2,0^{\text{b}}$	0,0001	$9{,}6\pm1{,}0^{\mathrm{a}}$	$28,1\pm0,7^{b}$	$146,1\pm16,3^{\rm c}$	$123,9\pm17,1^{\rm c}$	0,0000
Apigenina	$48,2\pm2,3^{\mathrm{b}}$	$26,3\pm6,1^{ab}$	$0,4\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$42,3\pm7,1^{\text{b}}$	0,0495	$2,8\pm0,1^{\rm a}$	$9{,}8\pm0{,}3^{\rm c}$	$5{,}2\pm0{,}1^{\rm b}$	$15,7\pm0,\!6^{d}$	0,0010
Lignanos										
Pinoresinol	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,9999	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	0,9999
Acetoxipinoresinol	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	0,9999	$247,8\pm1,3^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,0001

O: orujo; MD: Maltodextrina; In: Inulina y Alg: alginato de sodio; FGS: fluido gástrico simulado, FIS: fluido intestinal simulado.

Promedios (n=3) ± desviación estándar, valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor < 0,05) análisis ANDEVA y test de rango múltiple Duncan.

Al estudiar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en las micropartículas elaboradas a partir de extractos complejos como el orujo, es posible concluir que el resultado obtenido en el estudio de la bioaccesibilidad es más bien un resultado estático, obtenido por un equilibrio dinámico entre liberación, degradación y formación de los distintos compuestos fenólicos estudiados, debido a esto se decidió incluir las gráficas de la cinética de liberación de los compuestos fenólicos hidroxitirosol, oleuropeína, luteolina y derivado secoiridoide, los que destacan por un mayor contenido en las micropartículas estudiadas.

En la figura 13 se presentan las gráficas de liberación de los compuestos fenólicos hidroxitirosol, oleuropeína, luteolina y derivado secoiridoide en condiciones gástrica e intestinal simuladas desde las micropartículas elaboradas con el extracto de orujo (O-MD, O-In, O-MD-In y O-MD-Alg). En estas se repite el comportamiento encontrado en el estudio de bioaccesibilidad, asociado a las diferencias del perfil de liberación de los distintos compuestos fenólicos en las micropartículas estudiadas. Esto consiste en una menor liberación de compuestos fenólicos en la zona gástrica (FGS) de las micropartículas recubiertas (O-MD-In y O-MD-Alg) y su mayor liberación en condiciones intestinales (FIS), este comportamiento se repite en la mayoría de los compuestos fenólicos estudiados, por lo que se reafirma la efectividad del proceso de recubrimiento por lecho fluido, el que modifica el comportamiento de liberación de los activos en condiciones gastrointestinales.



Figura 13. Perfil de liberación de compuestos fenólicos en fluidos gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados: a) Hidroxitirosol, b) Oleuropeína, c) Luteolina y d) Derivado secoiridoide, para las micropartículas:(-) O-MD; (-); O-In; (-); O-MD-In y (-) O-MD-In y

3.2.1. Caracterización de la materia prima alpechín (Al).

En la tabla 17, se presenta el contenido de humedad, de fenoles totales y la capacidad antioxidante del alpechín (Al).

Tabla 17. Contenido de humedad, fenoles totales y capacidad antioxidante (ORAC) del alpechín.

Muestra	Humedad	Fenoles totales		ORAC		
	(g/100g)	(mg EAG/kg)		(µmol ET/100g)		
		(b.h)	(b.s)	(b.h)	(b.s)	
Alpechín (Al)	$91,9\pm0,2$	$2827 \pm 122,9$	$34909,3 \pm 1517,5$	8079,3 ± 137,6	$99744,8 \pm 1698,4$	

EAG: equivalente de ácido gálico; ET: Equivalente de trolox; b.h: base húmeda; b.s: base seca.

En la tabla 18 se observa el valor de humedad del Al, este es similar (> 90%) a lo reportado por Kapellakis *et al.*, 2008. En cuanto al contenido de fenoles totales (FT), en alpechín el valor de FT está dentro del rango reportado por Papaphilipou *et al.*, 2013 y Kalogerakis *et al.*, 2013 (1487 y 2064 mg/L) y (2800 y 3440 mg/L), respectivamente.

En la Figura 14 se presentan los cromatogramas HPLC-DAD-ESI-TOF/MS para alpechín, respectivamente y en la tabla 19 se presenta el listado de los compuestos fenólicos propuestos en la identificación de cada pico cromatográfico del alpechín.



Figura 14. Cromatograma HPLC-DAD-ESI-TOF/MS de alpechín de oliva Var. Arbequina.

En Al es posible identificar distintas familias de compuestos fenólicos como: alcoholes fenólicos (hidroxitirosol y tirosol); secoiridoides (oleuropeína, ligustrósido y derivados fenólicos, presentes exclusivamente en Olearaceae); flavonoides (apigenina, luteolina y sus formas glicosiladas) y verbascósidos, la mayoría de estos compuestos se han descrito previamente en aceite de oliva y en alpechín (Tripoli *et al.*, 2005; Agalias *et al.*, 2007; Cioffi, *et al.*, 2010; Papaphilipou *et al.*, 2013; Kalogerakis *et al.*, 2013; Skaltsounis *et al.*, 2015; Lozano-Sánchez *et al.*, 2017). Los polifenoles de la oliva se han asociados a propiedades beneficiosas para la salud como actividad antioxidante y efectos antiinflamatorio, antimicrobiano e hipoglicémico (Obied y Robards, 2013).

	Fórmula			
Peak	Compuesto propuesto	molecular	T_r (min)	m/z
1	Ácido quínico	$C_7H_{12}O_6$	3,3	191,0561
2	Hidroxitirosol oxidado	$C_8H_8O_3$	6,0	151,0401
3	Desconocido no identificado	$C_{22}H_{34}O_{16}$	7,3	553,1774
4	Hidroxitirosol-hexosa o isómero a	$C_{14}H_{20}O_8$	7,7	315,1085
5	Desconocido no identificado	$C_{14}H_{22}O_{9}$	8,0	317,1242
6	Desconocido no identificado	C21H36O15	8,4	527,1318
7	Desconocido no identificado	C21H38O15	8,7	529,2138
8	Desconocido no identificado	$C_{11}H_{20}O_9$	9,0	295,1035
9	Desconocido no identificado	C18H26O12	9,1	433,1351
10	Hidroxitirosol-hexosa o isómero b	$C_{14}H_{20}O_8$	10,8	315,1085
11	Desconocido no identificado	$C_{16}H_{24}O_{10}$	10,7	375,1297
12	Desconocido no identificado	C15H26O9	10,8	349,1504
13	Desconocido no identificado	C19H28O12	10,9	447,1508
14	Derivado secoiridoide 1	C17H28O11	11,2	407,1604
15	Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico	C9H12O4	11,9	183,0663
16	Desconocido no identificado	$C_8H_{18}O_{12}$	13,2	305,0700
17	Oleoside/secologanosido 2	$C_{16}H_{22}O_{11}$	14,3	389,1089
18	Desconocido no identificado	C29H36O16	14,6	639,1931
19	Desconocido no identificado	C23H32O12	15,0	499,1821
20	Desconocido no identificado	C23H32O12	15,4	499,1821
21	Oleuropeína aglicona	$C_{16}H_{26}O_{10}$	16,3	377,1493
22	Desconocido no identificado	C19H28O10	17,3	415,1610
23	Demetil oleuropeína	$C_{24}H_{30}O_{13}$	17,7	525,1614
24	Verbascósido	C29H36O15	17,9	623,1981
25	Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$C_{10}H_{16}O_5$	18,2	215,0925
26	Desconocido no identificado	$C_{23}H_{34}O_{11}$	18,6	485,2028
27	Luteolina-7-O-rutinosido	C27H30O15	19,5	593,1510
28	Decarboximetil oleuropeína aglicona	$C_{17}H_{20}O_{6}$	21,4	319,1187
29	Desconocido no identificado	$C_{25}H_{28}O_{14}$	23,2	551,1406
30	Desconocido no identificado	$C_{31}H_{40}O_{14}$	23,3	635,2345
31	Ligustrósido o isómero 1	$C_{25}H_{32}O_{12}$	25,5	523,1821
32	p-cumaril-6'-secologanosido	$C_{25}H_{28}O_{13}$	26,4	535,1457
33	Ligustrósido o isómero 2	$C_{25}H_{32}O_{12}$	27,9	523,1821
34	*Naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$	28,9	271,0893
35	Luteolina	$C_{15}H_{10}O_{6}$	30,1	285,0405

Tabla 18. Listado de compuestos, fórmula molecular, tiempo de retención (Tr) y masa de compuestos fenólicos identificados en el alpechín.

*Estándar interno

Por otro lado, en la tabla 19 se presenta la cuantificación de los compuestos fenólicos del Al.

Compuesto propuesto	Alpechín (b	b.s)
Compuesto propuesto	(mg/kg)	(%)
Ácido quínico	$2828,3 \pm 30,7$	$39,0 \pm 0,1$
Hidroxitirosol oxidado	$96,5 \pm 32,3$	$1,4 \pm 0,4$
Hidroxitirosol-hexosa o isómero a	$125,1 \pm 20,4$	$1,8 \pm 0,3$
Hidroxitirosol-hexosa o isómero b	$262,2 \pm 78,0$	$3,7 \pm 1,1$
Derivado secoiridoide 1	$450,2 \pm 24,0$	$6,4 \pm 0,1$
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$127,6 \pm 11,3$	$1,8 \pm 0,1$
Derivado de oleuropeína aglicona	$496,6 \pm 20,4$	$7,0 \pm 0,2$
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$64,6 \pm 5,5$	$0,9\pm0,0$
Demetil oleuropeína	$17,0 \pm 1,3$	$0,2 \pm 0,0$
Verbascosido	$594,8 \pm 12,4$	$8,4 \pm 0,2$
Forma aldehídica de decarboximetil de ácido elenólico	$5,3 \pm 0,8$	$0,1\pm0,0$
Luteolina-7-O-rutinosido	$59,7 \pm 2,0$	$0,8\pm0,0$
Decarboximetil oleuropeína aglicona	$1118,2 \pm 27,4$	$15,8 \pm 1,0$
Ligustrósido o isómero 1	$88,1 \pm 26,3$	$1,3 \pm 0,4$
p-cumaril-6'-secologanosido	$142,0 \pm 3,5$	$2,0 \pm 0,0$
Ligustrósido o isómero 2	$458,8 \pm 22,9$	$6,5 \pm 0,2$
Luteolina	$284,3 \pm 12,0$	$4,0\pm0,1$
Total	$7081,4 \pm 296,5$	100
Alcoholes fenólicos	$483,8 \pm 93,7$	$6,8 \pm 1,3$
Secoiridoides	$2968,4 \pm 67,1$	$42,0\pm1,6$
Flavonoides	$344,0 \pm 13,9$	$4,9\pm0,2$
Verbascósidos	$594,8 \pm 12,4$	$8,4 \pm 0,2$

Tabla 19. Cuantificación de compuestos fenólicos identificados en el alpechín.

MP: materia prima; b.s: base seca

Los principales compuestos fenólicos en Al fue la clase secoiridoides (42%), siendo sus principales compuestos decarboximetil oleuropeína aglicona (15,8%), derivado de oleuropeína aglicona (7%) ligustrósido (6,5%) y derivado de secoiridoide 1 (6,4%). Otras clases de polifenoles identificados fueron verbascósidos (8,4%) y alcoholes fenólicos (6,8%). En otros trabajos realizados en alpechín se reportaron contenidos mayores de hidroxitirosol y tirosol (Agalias *et al.*, 2007; Frankel *et al.*, 2013 y Kalogerakis *et al.*, 2013). La diferencia en el contenido de compuestos fenólicos puede atribuirse a la variedad de oliva, a las zonas de cultivo (condiciones edafoclimáticas) y las condiciones del proceso (para obtención de aceite y de extractos) como pre-tratamiento y tipo de extracción, entre otros, que hacen difícil la comparación de resultados (Ryan y Robards, 1998; Ziogas *et al.*, 2010; Bellincontro *et al.*, 2012; Frankel *et al.*, 2013).

3.2.2. Obtención un extracto de alpechín por filtración.

El tratamiento de extracción utilizado para la obtención del alpechín consistió en la centrifugación y posterior filtración.

3.2.3. Caracterización del extracto de alpechín.

En la figura 15 se presenta el perfil de compuestos fenólicos del alpechín filtrado (Alfiltrado).



Figura 15. Cromatograma HPLC-DAD-ESI-TOF/MS del alpechín filtrado con compuestos fenólicos identificados, listado de cada peak en Anexo 9, (Tabla 51).

Tabla 20. Cuantificación de comp	puestos fenólicos	identificados en	las muestras	de alpechín
filtrado (Al-filtrado) y en la mater	ria prima de alpec	chín (Al-MP).		

Compuesto fenólico	Al-filtrado	o (b.s.)	Alpechín (b.s.)		
compuesto renonco	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	
Ácido quínico	$2327,9 \pm 32,0^{a}$	$25{,}5\pm0{,}8^{a}$	$\textbf{2828,3} \pm \textbf{30,7}^{a}$	$39,0\pm0,1b$	
Hidroxitirosol oxidado	$971,0\pm60,0^{\mathrm{b}}$	$10{,}7\pm0{,}7^{\rm b}$	$96,5 \pm 32,3^{a}$	$1,4\pm0,4^{a}$	
Hidroxitirosol hexosa o isómero a	$412,3\pm17,4^{\mathrm{b}}$	$4,5\pm0,1^{\rm b}$	$125,1\pm20,4^{\mathrm{a}}$	$1,8\pm0,3^{a}$	
Hidroxitirosol hexosa o isómero b	$705{,}6\pm54{,}3^{\mathrm{b}}$	$7{,}7\pm0{,}3^{\rm b}$	$262,2\pm78,0^{\rm a}$	$3,7\pm1,1^{a}$	
Derivado secoiridoide 1	$498,0\pm33,\!6^{\mathrm{a}}$	$5{,}5\pm0{,}2^a$	$450,2\pm24,0^{\rm a}$	$6{,}4\pm0{,}1^{\rm b}$	
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$150{,}6\pm7{,}4^{\mathrm{b}}$	$1,7\pm0,1^a$	$127,6\pm11,3^{\rm a}$	$1,8\pm0,1^{a}$	
Oleósido/secologanósido	$96,8\pm6,0^{\rm b}$	$1,1\pm0,0^{\mathrm{b}}$	$64,6\pm5,5^{a}$	$0,9\pm0,0^{\mathrm{a}}$	
Derivado de oleuropeína aglicona	$550{,}4\pm29{,}4^{a}$	$6{,}0\pm0{,}2^{a}$	$496,6\pm20,4^{\rm a}$	$7,0\pm0,2^{\rm b}$	
Demetil oleuropeína	$34,6 \pm 3,0^{a}$	$0,4\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$17,0\pm1,3^{a}$	$0,2\pm0,0^{\mathrm{a}}$	
Verbascósido	$567,7 \pm 31,2^{a}$	$6,2\pm0,1a$	$594{,}8\pm12{,}4^{\rm a}$	$8{,}4\pm0{,}2^{\mathrm{b}}$	
Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$30,2\pm3,2^{\mathrm{b}}$	$0,3\pm0,0^{\rm b}$	$5,3\pm0,8^{a}$	$0,1\pm0,0^{\mathrm{a}}$	
Luteolina-7-O-rutinosido	$41{,}9\pm2{,}8^{\rm a}$	$0,5\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$59{,}7\pm2{,}0^{\rm b}$	$0,8\pm0,0^{\mathrm{b}}$	
Decarboximetil oleuropeína aglicona	$1216,\!3\pm68,\!5^a$	$13{,}3\pm0{,}2^a$	1118,2 \pm 27,4 ^a	$15{,}8\pm1{,}0^{\rm b}$	
Ligustrósido o isómero 1	$654,8\pm39,6^{b}$	$7{,}2\pm0{,}2^{\rm b}$	$88,1 \pm 26,3^{a}$	$1,3\pm0,4^{a}$	
Comselogoside (p-cumaril-6-secologanoside)	$191,0\pm9,1^{\rm b}$	$2,1\pm0,0^{\rm b}$	$142,0\pm3,5^{\rm a}$	$2,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	
Ligustrósido o isómero 2	$639,4\pm33,7^{b}$	$7{,}0\pm0{,}1^{\rm b}$	$458{,}8\pm22{,}9^{\rm a}$	$6,5\pm0,2^{a}$	
Luteolina	$32,1 \pm 4,5^{a}$	$0,4\pm0,1^{a}$	$284,3 \pm 12,0^{\mathrm{b}}$	$4,0\pm0,1^{\rm b}$	
Total	$9120,6 \pm 357,9^{b}$	100,0 ^a	$7081,\!4\pm296,\!5^a$	100,0 ^a	
Alcoholes fenólicos	$2088,8 \pm 86,2^{b}$	$22,9\pm0,3^{\rm b}$	$483,8 \pm 93,7^{a}$	$6,8 \pm 1,3^{a}$	
Secoiridoides	$4062,2\pm219,7^{b}$	$44{,}5\pm0{,}8^{a}$	$2968,\!4\pm67,\!1^a$	$42,\!0\pm1,\!6^{\rm a}$	
Flavonoides	$74,0 \pm 6,4^{a}$	$0,8\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$344,0\pm13,9^{\mathrm{b}}$	$4,\!9\pm0,\!2^{\mathrm{b}}$	
Verbascósidos	$567,7\pm31,2^{\mathrm{a}}$	$6,2\pm0,1^{a}$	$594,8 \pm 12,4^{a}$	$8,\!4\pm0,\!2^{\rm b}$	

Al: alpechín; bs: base seca.

En la tabla 20 se presenta la cuantificación de compuestos fenólicos de las muestras alpechín y alpechín filtrado (Al-filtrado). En cuanto al contenido total, se observa un mayor contenido en Al-filtrado al compararlo con el alpechín (9120,6 mg/kg b.s y 7081,4 mg/kg b.s, respectivamente), esto podría explicarse porque con el proceso de filtrado se elimina la fracción de sólidos que contiene fibra y parte de la fracción oleosa, la que presenta menor proporción de compuestos fenólicos.

Por otro lado, al estudiar el perfil de compuestos fenólicos se observan cambios luego del proceso de filtrado, encontrando un mayor porcentaje de alcoholes fenólicos (22,9%) (hidroxitirosol oxidado, hidroxitirosol hexosa isómeros a y b), respecto al alpechín (6,8%). Los polifenoles del alpechín podrían sufrir modificaciones en la etapa de filtración por la mayor exposición al oxígeno atmosférico, aumentando el contenido de compuestos oxidados en Al-filtrado (Obied *et al.*, 2007).

Con respecto al porcentaje de secoiridoides se observa que permanece constante, siendo la decarboximetil oleuropeína aglicona el principal compuesto secoiridoide presente en ambas muestras con un 13,3 y un 15% para las muestras con y sin filtrar, respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de flavonoides disminuye en Al-filtrado, esto podría explicarse porque con el filtrado se elimina la piel de oliva presente en el alpechín, lo que se traduce en una reducción del contenido de flavonoides (principalmente luteolina), que estarían ligados a la piel.

En general, las diferencias en el contenido de compuestos fenólicos entre los descartes de la industria de aceite de oliva se pueden atribuir al tipo de residuo, variedad de oliva, zonas de cultivo (condiciones edafoclimáticas) y las condiciones del proceso (para obtención de aceite y de extractos) como pre-tratamiento y tipo de extracción, entre otros, que hacen difícil la comparación de resultados (Ryan y Robards, 1998; Ziogas *et al.*, 2010; Bellincontro *et al.*, 2012).

3.2.4. Encapsulación del extracto del alpechín filtrado por secado por atomización.

3.2.4.1. Micropartículas de alpechín con maltodextrina (Al-MD).

En la tabla 21 se presentan los tratamientos y variables respuestas del diseño experimental para la encapsulación de alpechín-filtrado (Al-filtrado) con maltodextrina y en la figura 16 se presentan los gráficos de superficie de respuesta para cada variable respuesta estudiada.

Tabla 21. Diseño compuesto central 2^2 con puntos axiales para la encapsulación de alpechín con maltodextrina (Al-MD).

			EE	EE	EE	EE	EE	
	Tratamiento		Á aido avínico	Alcoholes	Saaaimidaidaa	Varbagaágidag	Flovonoidos	R
	Temperatura (°C)	Relación Al/MD	Actuo quinico	fenolicos	secontaolaes	(%)	Flavonolucs	
T ₁	140(-1)	1:0,5(-1)	$75{,}6\pm1{,}2$	$100\pm0,0$	$87,0\pm0,2$	$100 \pm 0,0$	$87,\!4\pm0,\!0$	82,3
T_2	165(0)	1:1,25(0)	$93{,}4\pm1{,}8$	$100\pm0,0$	$88,9\pm0,4$	$100 \pm 0,0$	$94,7\pm0,2$	81,3
T 3	134,75(-α)	1:1,25(0)	$94,1\pm0,2$	$100\pm0,0$	$88,6\pm1,1$	$100 \pm 0,0$	$93{,}2\pm0{,}8$	81,2
T_4	190(1)	1:0,5(-1)	$72,7 \pm 1,1$	$100\pm0,0$	$81,0\pm0,2$	$100 \pm 0,0$	$78,9\pm0,0$	83,0
T 5	165(0)	1:0,34(-	$71,1 \pm 1,4$	$100\pm0,0$	$85,3 \pm 3,2$	$99,1 \pm 0,8$	$85,8 \pm 2,1$	69,5
T 6	190(1)	1:2(1)	$95,8\pm0,7$	$100\pm0,0$	$95,3 \pm 2,2$	$100 \pm 0,0$	$98,3\pm2,2$	73,8
T ₇	195,25(α)	1:1,25(0)	$85,0 \pm 1,1$	$100\pm0,0$	$82,5 \pm 2,4$	$100 \pm 0,0$	$90,1 \pm 2,0$	81,6
T ₈	165(0)	1:2,15(α)	$93{,}2\pm0{,}4$	$100\pm0,0$	$92{,}7\pm0{,}5$	$100 \pm 0,0$	$98,9 \pm 1,0$	68,6
Т9	140(-1)	1:2(1)	$92,4 \pm 0,7$	$100\pm0,0$	$91,3\pm0,2$	$100 \pm 0,0$	$97,3\pm0,7$	74,6
T10	165(0)	1:1,25(0)	$93,7\pm0,4$	$100\pm0,0$	$85{,}8\pm2{,}1$	$100 \pm 0,0$	$97,3 \pm 2,7$	83,8
T ₁₁	165(0)	1:1,25(0)	$93,7\pm0,3$	$100\pm0{,}0$	$85,8\pm1,0$	$100 \pm 0,0$	$97,\!3\pm0,\!0$	82,8
T ₁₂	165(0)	1:1,25(0)	$94{,}6\pm0{,}6$	$100\pm0{,}0$	$88,9 \pm 1,3$	$100 \pm 0,0$	$94,\!6\pm1,\!5$	82,3

Al: alpechín; MD: maltodextrina; R: rendimiento; EE: eficiencia de encapsulación.

Las EE del ácido quínico, secoiridoides, verbascósidos y flavonoides fluctuaron entre 71,1-95,8%, 81-95,3%, 99,1-100% y 78,9-98,9%, respectivamente. El rendimiento de proceso varió entre 68,6% y 83,8%. La EE de los alcoholes fenólicos fue de 100% para todos los tratamientos del diseño de micropartículas Al-MD, por lo que se eliminó de la optimización estadística. En general, se observan mayores valores de EE y rendimiento al utilizar contenidos de MD más altos.


Figura 16. Gráficos de superficie de respuesta (GSR) para el diseño de encapsulación de micropartículas de alpechín con maltodextrina (Al-MD), a) EE ácido quínico; b) EE secoiridoides; c) EE verbáscósidos; d) EE flavonoides y e) rendimiento de proceso.

En relación con el **ácido quínico** y los **flavonoides**, en el GSR (figura 16a y d) se observa un aumento en la eficiencia de encapsulación con el uso de temperatura de entrada al secador intermedias y valores altos de MD. Por otro lado, el análisis estadístico mostró que las formas lineales, cuadráticas y la interacción entre las variables independientes presentaron diferencias significativas fueron significativas sobre la EE% de ácido quínico y flavonoides, con un ajuste del modelo de 94,4 y 93,8%, respectivamente (Anexo 11 (Tabla 49 y 50)).

En cuanto a los **secoiridoides** y **verbascósidos**, en el GSR (figura 16b y c) se observa una mayor EE con una mayor temperatura de entrada al secador y alto contenido de MD como agente encapsulante. Con respecto al análisis estadístico se observa un efecto significativo en la forma lineal de la relación O/MD y a la interacción entre temperatura y O/MD en la EE% de secoiridoides, con un ajuste del modelo de un 76,7%. Sin embargo, para verbascósidos no se encontró efecto significativo en las variables estudiadas (Anexo 11-tablas 52 y 53).

Finalmente, en el **rendimiento**, la GSR (figura 16e) muestra que un aumento de la temperatura de entrada al secador y valores intermedios de Al/MD influyen positivamente en el rendimiento del proceso. Con respecto al análisis estadístico, se observa un efecto significativo sólo en la forma cuadrática de la relación Al/MD, con un ajuste del modelo de un 59,3% (Anexo 11 (Tabla 54)).

3.2.4.2. Micropartículas de alpechín con inulina (Al-In).

En la tabla 22 se presentan los tratamientos y variables respuestas del diseño experimental para la encapsulación de alpechín-filtrado (Al-filtrado) con inulina y en la figura 17 se presentan los gráficos de superficie de respuesta para cada variable respuesta estudiada.

			EE	EE	EE	EE	EE	
1	Tratamiento			Alcoholes				R
			Ácido quínico	fenólicos	Secoiridoides	Verbascósidos	Flavonoides	
	Temperatura	Relación				(0/.)		
	(°C)	Al/In				(70)		
T ₁	140(-1)	1:0,5(-1)	$75,6 \pm 1,2$	$100 \pm 0,0$	$81,4 \pm 1,6$	$98,4 \pm 2,2$	$55,0 \pm 1,4$	52,5
T_2	165(0)	1:1,25(0)	$93,4 \pm 1,8$	$100\pm0{,}0$	$75{,}9\pm2{,}4$	$98,8\pm0,0$	$50,0\pm0,0$	79,2
T ₃	134,75(-α)	1:1,25(0)	$94,1 \pm 0,2$	$100\pm0{,}0$	$82{,}5\pm2{,}0$	$100 \pm 0,0$	$68,6\pm2,9$	83,4
T 4	190(1)	1:0,5(-1)	$66,7 \pm 1,1$	$100\pm0{,}0$	$74,8\pm2,1$	$91,4 \pm 5,0$	$54,4 \pm 4,1$	63,8
T 5	165(0)	1:0,34(-	$61,7 \pm 1,4$	$100\pm0{,}0$	$79,7\pm1,8$	$98,0\pm0,7$	$51,0\pm0,8$	70,4
T ₆	190(1)	1:2(1)	$95{,}8\pm0{,}7$	$100\pm0{,}0$	$76{,}5\pm0{,}0$	$98,6\pm0,8$	$50{,}0\pm0{,}0$	83,5
T_7	195,25(α)	1:1,25(0)	$85,0 \pm 1,1$	$100\pm0{,}0$	$75,7\pm0,3$	$82,7\pm0,9$	$50,2 \pm 0,3$	82,6
T 8	165(0)	1:2,15(α)	$93,2 \pm 0,4$	$100\pm0,0$	$77,2 \pm 0,7$	$100 \pm 0,0$	$63,7 \pm 3,5$	83,7
Т9	140(-1)	1:2(1)	$92,\!4 \pm 0,\!7$	$100\pm0{,}0$	$75{,}9\pm0{,}3$	$100 \pm 0,0$	$67,0 \pm 1,4$	84,9
T ₁₀	165(0)	1:1,25(0)	$93,7\pm0,4$	$100\pm0{,}0$	$76,1\pm0,2$	$98,9 \pm 1,0$	$53,1 \pm 2,6$	81,4
T11	165(0)	1:1,25(0)	$93,3 \pm 0,3$	$100\pm0,0$	$75{,}6\pm0{,}8$	$98,6 \pm 0,4$	$52,4 \pm 0,1$	80,2
T ₁₂	165(0)	1:1,25(0)	$94{,}6\pm0{,}6$	$100\pm0{,}0$	$74{,}9\pm0{,}8$	$97,7\pm0,8$	$50,\!0\pm0,\!0$	77,7

Tabla 22. Diseño compuesto central 2^2 con puntos axiales para la encapsulación de alpechín con inulina (Al-In).

Al: alpechín; In: inulina; R: rendimiento; EE: eficiencia de encapsulación.

Las EE del ácido quínico, secoiridoides, verbascósidos y flavonoides fluctuaron entre 61,7-95,8%, 74,8-82,5%, 82,7-100% y 50-68,6%, respectivamente y el rendimiento de proceso varió entre 52,5 y 84,9%. La EE de los alcoholes fenólicos fue de 100% para todos los tratamientos del diseño de micropartículas Al-MD, por lo que se eliminó de la optimización estadística. En general, se observan mayores valores de EE y rendimiento al utilizar contenidos de In más altos.



Figura 17. Gráficos de superficie de respuesta (GSR) para el diseño de encapsulación de

las micropartículas de alpechín con inulina (Al-In), para las variables respuesta a) ácido quínico; b) secoiridoides; c) verbáscósidos; d) flavonoides y e) rendimiento de proceso.

En relación con el **ácido quínico**, en el GSR (figura 17a) se observa un aumento en la eficiencia de encapsulación con el uso temperaturas intermedias y valores elevados de la relación Al/In. Además, el análisis estadístico mostró que la temperatura de entrada en su forma lineal, la relación extracto/polímero en sus formas lineal y cuadrática, además de la interacción entre ambas variables independientes fueron significativas sobre la EE% de ácido quínico, con un ajuste del modelo de 96,9% (Anexo 12 (tabla 55)).

Respecto a los **secoiridoides**, en el GSR (figura 17b) se observa una mayor EE con una menor temperatura de entrada al secador y de Al/In. En relación con el análisis estadístico sólo la variable temperatura de entrada en su forma lineal, presentó diferencias significativas, con un ajuste del modelo de un 64,7% (Anexo 12 (tabla 56)).

En cuanto a los **verbascósidos**, **flavonoides** y **rendimiento**, en el GSR (figura 17c, d y e) se observan mayores valores con una menor temperatura de entrada al secador y un mayor contenido de In como agente encapsulante. Con respecto al análisis estadístico se observa un efecto significativo solo en la forma lineal de la temperatura sobre la EE% de verbascósidos, con un ajuste del modelo de un 60,2%; un efecto significativo en las formas lineal y cuadrática de la temperatura de entrada y relación Al/In sobre la EE% de flavonoides, con un ajuste del modelo de un 75,9% y sólo un efecto en la relación Al/In en su forma lineal sobre el rendimiento de proceso, con un ajuste del modelo de un 61,7% (Anexo 12 (Tablas 57, 58 y 59).

3.2.4.3. Optimización de la microencapsulación de alpechín por secado por atomización.

La figura 18 muestra el gráfico de superficie respuesta para el diseño de micropartículas del alpechín filtrado con maltodextrina (Al-MD) e inulina (Al-In). Las condiciones óptimas para la obtención de micropartículas del sistema Al-MD corresponde a una temperatura de aire de entrada de 154°C y una relación de Al/MD 1:1,56; y para Al-In una temperatura de aire de entrada de 135°C y una relación de Al/In de 1:1,54. Ambas condiciones óptimas se encuentran dentro de la zona de dominio estudiada. Además, se observa en los gráficos de superficie de respuesta, que los óptimos se ubican en la zona naranja con una deseabilidad de 0,85 y 0,88, para Al-MD y Al-In, respectivamente.



Figura 18. Optimización múltiple por MSR para el diseño de micropartículas del alpechín filtrado, a) con maltodextrina (Al-MD) y b) con inulina (Al-In).

Las EEs para los polifenoles de todos los sistemas (Al-MD y Al-In) dependieron de la estructura química de los polifenoles encapsulados y del agente encapsulante. En general, se observa que, a mayor contenido de agente encapsulante, mayor es la eficiencia de encapsulación. Esto puede explicarse por la formación de la costra sobre la superficie de las gotas atomizadas de manera más rápida (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Por otro lado, se observa que las EEs fueron mayores en aquellos sistemas de micropartículas con MD al compararlas con las elaboradas con In, mostrando el efecto del tipo de polímero como agente encapsulante. Esto podría atribuirse a la estructura química de los polímeros utilizados, a pesar de que ambos polímeros (maltodextrina e inulina) son polisacáridos, la MD es un polímero compuesto de D-glucosa (Kuntz, 1997) mientras que la In es un polímero compuesto por D-fructosa (Sinha y Kumria, 2003; Stevens *et al.*, 2001), estas diferencias estructurales pueden explicar los mayores valores de EE de compuestos fenólicos en el diseño Al-MD, debido al mayor número de grupos hidroxilos disponibles en la maltodextrina, lo que favorece la interacción de los compuestos fenólicos con la maltodextrina, facilitando la formación de puentes de hidrógeno (Lauro *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2010 y Sun-Waterhouse *et al.*, 2013).

3.2.5. Caracterización de las micropartículas de alpechín, obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización.

En la tabla 23 se presenta la caracterización de las micropartículas de alpechín (Al-MD y Al-In), obtenidas bajo condiciones óptimas por secado por atomización.

Tabla 23. Condiciones óptimas de secado y caracterización de micropartículas óptimas de los sistemas elaborados con alpechín (Al-MD y Al-In).

Parámetros	Al-MD	Al-In	p-valor	
Relación E/AE	1:1,6	1:1,5	-	
Temperatura de entrada (°C)	154	135	-	
Rendimiento (%)	$82,6 \pm 2,6^{a}$	$86,5 \pm 2,9^{a}$	0,1578	
Fenoles totales (mgEAG/g)	$2,4 \pm 0,1^{a}$	$2,5 \pm 2,0^{a}$	0,0784	
Capacidad antioxidante ORAC	56.8 ± 7.4^{a}	$58,4 \pm 2,1^{a}$	0,7430	
Humedad (%)	$8,1 \pm 0,3^{a}$	$7,4 \pm 0,1^{a}$	0,0711	
aw	$0,21 \pm 0,02^{a}$	$0,\!27 \pm 0,\!0^{a}$	0,0522	
Higroscopicidad (g/100 g)	$35,4 \pm 0,2^{b}$	$29,7 \pm 1,1^{a}$	0,0169	
Solubilidad (g/100 g)	$96,4 \pm 0,5^{a}$	$96,3 \pm 1,2^{a}$	0,9212	
Tamaño de partícula D(4.3) (µm)	$7,8\pm0,2^{\mathrm{b}}$	$5,1 \pm 0,9^{a}$	0,0035	

Al: Alpechín; MD: Maltodextrina; In: Inulina; E/AE: Extracto/agente encapsulante, EE: Eficiencia de encapsulación, EAG: Equivalente de ácido gálico, a_w : actividad de agua. X: promedios (n=3) ± DS: desviación estándar. Valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (por extracto) (p-valor < 0,05). Análisis ANDEVA y test de rango múltiple *Duncan*.

En la tabla 23 se observa que las condiciones óptimas de temperatura del aire de entrada al secador y relación extracto/agente encapsulante para las micropartículas de Al-MD y Al-In, dependieron del tipo de polímero utilizado como agente encapsulante, mostrando que las condiciones óptimas fueron características de cada sistema, como reportó Gharsallaoui *et al.* (2007). Además, se observa un rendimiento que alcanzó valores sobre un 82%, sin diferencia significativa entre tipo de polímero (MD o In). Un comportamiento similar se encontró para el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y el resto de las variables analizadas. Sólo el tamaño de partículas presentó diferencias significativas entre los sistemas analizados, mostrando un mayor tamaño en las micropartículas elaboradas con MD.

En la tabla 24 se presenta las eficiencias de encapsulación de los compuestos fenólicos en las micropartículas Al-MD y Al-In, elaboradas bajo condiciones óptimas. Los valores de EE para los polifenoles en los sistemas de micropartículas (Al-MD y Al-In), dependió de la estructura química de los polifenoles encapsulados y del agente encapsulante. En general, los valores de EE fueron significativamente mayores en los sistemas de micropartículas con MD respecto a aquellos con In para el ácido quínico y decarboximetil-oleuropeína aglicona presentes en el alpechín, luteína y apigenina. Estos resultados muestran el efecto del tipo de polímero como agente encapsulante sobre la EE.

En la figura 19 se presentan las fotografías SEM y las gráficas de distribución de tamaño de las micropartículas de alpechín, elaboradas bajo condiciones óptimas (Al-MD y Al-In), los sistemas mostraron forma esférica, con superficie abollada en el caso de las elaboradas con maltodextrina y con superficie lisa para las micropartículas de inulina. La formación de abolladuras ha sido atribuida al encogimiento de las partículas durante el proceso de secado y se puede producir a bajas o altas temperaturas de entrada al secador.



Figura 19. Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM) las micropartículas de alpechín obtenidas bajo condiciones óptimas: a) Al-MD y b) Al-In y la distribución de tamaño de partículas: c) Al-MD y d) Al-In.

En la tabla 24 se observa que los valores de EE para los polifenoles en los sistemas de micropartículas (Al-MD y Al-In), dependen de la estructura química de los polifenoles encapsulados y del agente encapsulante. Los valores de EE fueron significativamente mayores en los sistemas de micropartículas con MD respecto a aquellos con In para el ácido quínico y descarboxi-oleuropeína presentes en el alpechín. Estos resultados muestran el efecto del tipo de polímero como agente encapsulante sobre la EE.

Tabla 24. Eficiencia de encapsulación (%) de los compuestos fenólicos presentes en las micropartículas de alpechín (Al-MD y Al-In), obtenidas bajo condiciones óptimas.

Compuesto propuesto	Al-MD	Al-In	p-valor
Ácido quínico	$96,9 \pm 0,1^{b}$	$93,6 \pm 0,1^{a}$	0,0002
Oleósido/secologanósido o isómero 1	$98,8 \pm 0,1^{a}$	$99,5 \pm 0,1^{b}$	0,0384
Hidroxitirosol-hexosa o isómero a	$100,0 \pm 0,0^{\rm a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Derivado secoiridoide 1	$99,2 \pm 0,0^{a}$	$99,1 \pm 0,1^{a}$	0,0955
Hidroxitirosol	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
D-OH-EA	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$100,0 \pm 0,0^{\rm a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9998
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Glucósido de ácido elenólico isómero 1	$100,0 \pm 0,0^{\rm a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	1,0000
Oleuropeína aglicona	$100,0 \pm 0,0^{\rm a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9997
Glucósido de ácido elenólico isómero 2	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$100,0 \pm 0,0^{a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Luteolina-7-glucósido	$98,6 \pm 0,4a$	95,5 ± 1,5a	0,1078
Decarboximetil oleuropeína aglicona	$98,1\pm0,0^{\rm b}$	$97,4 \pm 0,1^{a}$	0,0059
Oleuropeína	$55,2 \pm 2,1^{a}$	$55,1\pm0,5^{\mathrm{a}}$	0,9056
p-cumaril-6-secologanosido	$89,0 \pm 0,1^{a}$	$90,6 \pm 0,3^{b}$	0,0190
Ligustrosido	$100,0 \pm 0,0^{\rm a}$	$100,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999
Luteolina	$87,4 \pm 0,7b$	61,1 ± 1,2a	0,0015
Apigenina	$78,5 \pm 1,9b$	$46,5 \pm 7,4a$	0,0273
Demetil oleuropeína	$45,6 \pm 2,5^{a}$	$43,5\pm0,5^{\mathrm{a}}$	0,3496
Verbacósido	60, 5 ± 2,1a	$57,6 \pm 1,4a$	0,2485

Al: Alpechín; MD: Maltodextrina; In: Inulina

Promedios $(n=3) \pm$ desviación estándar, valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (por extracto) (p-valor < 0,05). Análisis ANDEVA y test de rango múltiple *Duncan*.

3.2.6. Caracterización de las micropartículas de alpechín, recubiertas por lecho fluidizado.

En la tabla 25 se presenta la caracterización de cada sistema de micropartículas Al-MD, elaboradas bajo condiciones óptimas y a las recubiertas por lecho fluidizado (Al-MD-In, Al-MD-Alg), en esta se observa que las micropartículas recubiertas presentaron diferencias significativas en todos los parámetros evaluados, mostrando una disminución en el contenido de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, esto se debería a la suma de polímero sin activo en la etapa de recubrimiento. Por otro lado, se observa una disminución en la solubilidad en solución acuosa y un aumento en la humedad, actividad de agua, higroscopicidad y tamaño de partícula, al compararlo con las micropartículas sin recubrir (O-MD). El tamaño de partícula fue significativamente mayor para las micropartículas recubiertas alginato de sodio.

Tabla 25. Caracterización de micropartículas Al-MD, elaboradas bajo condiciones óptimas y a las recubiertas por lecho fluido (Al-MD-In y Al-MD-Alg).

Parámetros	Al-MD	Al-MD-In	Al-MD-Alg	p-valor
Fenoles totales (mgEAG/g)	2.4 ± 0.1^{b}	$2.0 + 0.0^{a}$	2.3 ± 0.0^{b}	0,0001
Capacidad antioxidante ORAC (uMTrolox/100g)	$56,8 \pm 7,4^{b}$	$46,9 \pm 1,0^{a}$	$43,1 \pm 5,0^{a}$	0,0077
Humedad (%)	$8,1 \pm 0,3^{a}$	$9,3\pm0,6^{b}$	$9,0\pm0,2^{b}$	0,0122
aw	$0,21 \pm 0,02^{a}$	$0,42 \pm 0,0^{b}$	$0,\!40 \pm 0,\!0^{\mathrm{b}}$	0,0000
Higroscopicidad (g/100 g)	$35,4 \pm 0,2^{a}$	$43,3 \pm 1,1^{b}$	$43,4 \pm 0,9^{b}$	0,0002
Solubilidad (g/100 g)	$96,4 \pm 0,5^{b}$	$91,5 \pm 1,5^{a}$	$91,5 \pm 0,5^{a}$	0,0002
Tamaño de partícula D(4.3) (µm)	$7,8 \pm 0,2^{a}$	$17{,}3\pm0{,}3^{\mathrm{b}}$	$27,1\pm3,2^{c}$	0,0000

Al: Alpechín; MD: Maltodextrina; In: Inulina y Alg: alginato de sodio; E/AE: extracto/agente encapsulante, EE: Eficiencia de encapsulación, EAG: Equivalente de ácido gálico, Aw: actividad de agua.

Promedios $(n=3) \pm$ desviación estándar, valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (por extracto) (p-valor < 0,05). Análisis ANDEVA y test de rango múltiple *Duncan*.

En la figura 20 se presentan las fotografías SEM y las gráficas de distribución de tamaño de las micropartículas de alpechín recubiertas por lecho fluido (Al-MD-In y Al-MD-Alg). En ambos sistemas se observan pequeñas partículas que recubren las micropartículas esféricas, además de aglomeraciones. El tamaño promedio y su distribución presentan un cambio importante al comparar los resultados con las micropartículas sin recubrir, mostrando un aumento significativo en el tamaño de las micropartículas recubiertas, respecto a las micropartículas sin recubrir (tabla 24). Además, de un aumento en la distribución de tamaño (entre 1 y 100 μ m) con forma unimodal. Estos cambios morfológicos y de tamaño se atribuyen al efecto del proceso de recubrimiento por lecho fluido.



Figura 20. Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM) las micropartículas de alpechín obtenidas bajo condiciones óptimas: a) Al-MD-In y b) Al-MD-Alg y la distribución de tamaño de partículas: c) Al-MD-In y d) Al-MD-Alg.

En la tabla 26 se presentan las eficiencias de encapsulación de cada compuesto fenólico, de las micropartículas Al-MD, elaboradas bajo condiciones óptimas y a las recubiertas por lecho fluidizado (Al-MD-In y Al-MD-Alg).

Tabla	26.	Eficiencia	de	encapsulación	de	los	compuestos	fenólicos	presentes	en	las
microp	artíc	ulas Al-MI), e	laboradas bajo	con	dicic	ones óptimas	y a las rec	ubiertas po	or le	cho
fluido ((Al-I	MD-In y Al	-MI	D-Alg).							

Compuesto propuesto	Al-MD	Al-MD-In	AI-MD-Alg	p-valor
Ácido quínico	$96,9 \pm 0,1^{b}$	$99,6\pm0,1^{\rm c}$	$99,7 \pm 0,0^{\circ}$	0,0000
Oleósido/secologanósido o isómero 1	$98,8\pm0,1^{\rm b}$	$99,1\pm0,2^{\mathrm{b}}$	$97{,}2\pm0{,}7^{\mathrm{a}}$	0,0129
Hidroxitirosol-hexosa o isómero a	$100,0\pm0,0^{\rm c}$	$87,0\pm0,8^{\rm b}$	$84{,}5\pm0{,}4^{\mathrm{a}}$	0,0000
Derivado secoiridoide 1	$99,2\pm0,0^{\rm c}$	$97,1\pm0,1^{\rm b}$	$93{,}2\pm0{,}3^{\mathrm{a}}$	0,0000
Hidroxitirosol	$100,0\pm0,0^{\rm b}$	$75,7\pm3,2^{\rm a}$	$72{,}9\pm0{,}8^{\rm a}$	0,0001
D-OH-EA	$100,0\pm0,0^{\rm b}$	$95{,}3\pm1{,}5^{\mathrm{a}}$	$94{,}5\pm0{,}5^{\mathrm{a}}$	0,0037
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$100,0\pm0,0^{\rm c}$	$98{,}4\pm0{,}1^{\mathrm{b}}$	$95{,}8\pm0{,}3^{\rm a}$	0,0001
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$100,0\pm0,0^{\rm a}$	$100,0\pm0,0^{\rm a}$	$100,0\pm0,0^{\rm a}$	0,9999
Glucósido de ácido elenólico isómero 1	$100,0\pm0,0^{\rm c}$	$94{,}9\pm0{,}9^{\mathrm{b}}$	$91{,}5\pm1{,}0^{\rm a}$	0,0006
Oleuropeína aglicona	$100,0\pm0,0^{\rm c}$	$98,0\pm0,0^{\rm b}$	$94{,}8\pm0{,}2^{\rm a}$	0,0000
Glucósido de ácido elenólico isómero 2	$100,0\pm0,0^{\rm c}$	$96{,}9\pm0{,}2^{\mathrm{b}}$	$92,2\pm0,6^{\rm a}$	0,0000
Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$100,0\pm0,0^{\rm c}$	$88,8\pm4,4^{\rm b}$	$79,3 \pm 1,0^{\mathrm{a}}$	0,0020
Luteolina-7-glucósido	$98,6\pm0,4^{\rm ~a}$	$95{,}2\pm2{,}4^{\mathrm{a}}$	$95{,}5\pm1{,}2^{\rm a}$	0,2347
Decarboximetil oleuropeína aglicona	$98,1\pm0,0^{\rm b}$	$99,6\pm0,2^{\rm c}$	$96{,}6\pm0{,}4^{\rm a}$	0,0011
Oleuropeína	$55{,}2\pm2{,}1^{\rm a}$	$96,1\pm0,6^{\rm c}$	$78,6\pm1,8^{\rm b}$	0,0000
p-cumaril-6-secologanosido	$89,0\pm0,1^{\rm a}$	$96,7\pm0,1^{\rm c}$	$90{,}5\pm0{,}8^{\mathrm{b}}$	0,0002
Ligustrósido	$100,0\pm0,0^{\rm b}$	$99,6\pm0,4^{\mathrm{b}}$	$94{,}8\pm0{,}3^{\rm a}$	0,0000
Luteolina	$87,4\pm0,7^{\rm b}$	$82{,}9\pm14{,}7^{\mathrm{b}}$	$92{,}5\pm4{,}2^{\mathrm{b}}$	0,0480
Apigenina	$78,5\pm1,9^{bc}$	$63,9\pm0,1^{ab}$	$86,1\pm11,0^{\rm c}$	0,0147
Demetil oleuropeína	$45,\!6\pm2,\!5^{\mathrm{b}}$	$2,1\pm0,1^{\rm a}$	$6{,}1\pm0{,}1^{a}$	0,0000
Verbacósido	$60,5\pm2,1^{\text{b}}$	$16,1\pm0,\!4^{\rm a}$	$17,3\pm5,7^{\rm a}$	0,0002

Al: Alpechín; MD: Maltodextrina; In: Inulina; Alg: alginato de sodio.

Promedios $(n=3) \pm$ desviación estándar, valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (por extracto) (p-valor < 0,05). Análisis ANDEVA y test de rango múltiple *Duncan*.

La EE de las micropartículas recubiertas (Al-MD-In y Al-MD-Alg) aumentó significativamente para algunos compuestos fenólicos como el ácido quínico, la oleuropeína y p-cumaril-6-secologanosido, respecto a Al-MD. Similarmente, la EE de decarboximetil oleuropeína aglicona aumentó significativamente en Al-MD-In respecto a Al-MD. Sin embargo, en este estudio en la mayoría de los polifenoles, la EE disminuyó, lo que podría ser explicada por la formación de estructuras oxidadas o derivadas por diversas rutas de degradación de los secoiridoides y del hidroxitirosol (Obied y Robards, 2013), generadas durante el proceso de recubrimiento por lecho fluidizado, donde se exponen las micropartículas a 50°C por 2 horas. Estas estructuras más polares se ubicarían preferentemente en la superficie de la micropartícula, disminuyendo la EE. No solamente se encontró un efecto de las características estructurales de los polifenoles sobre la EE, sino que también del polímero. Las micropartículas con recubrimiento de alginato presentaron EE significativamente menores en 12 de los 21 polifenoles del alpechín, con respecto al recubrimiento con In, el cual tendría una mayor protección frente a la degradación de los distintos compuestos fenólicos.

3.2.7. Estabilidad de los compuestos fenólicos de las micropartículas de alpechín, almacenadas a 60° C.

Se estudió la estabilidad del alpechín y de las micropartículas con y sin recubrimiento, almacenados a 60°C. Para esto se calculó el porcentaje de retención para cada uno de los compuestos fenólicos identificados.

En la Tabla 27 se muestran los porcentajes de retención de los distintos compuestos fenólicos encontrados en el extracto alpechín y en las micropartículas Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg, obtenidas bajo condiciones óptimas y almacenadas por 180 días a 60°C.

Al comparar los resultados obtenidos en la tabla 28 entre el alpechín y las micropartículas de los sistemas Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg, se observan diferencias significativas en cada uno de los compuestos analizados. Además, se observa una mayor estabilidad de los distintos compuestos fenólicos en los sistemas elaborados con MD, al compararlos con Al-In, y que las micropartículas recubiertas (Al-MD-In y Al-MD-Alg), presentan mayor estabilidad de los polifenoles respecto al sistema sin recubrir (Al-MD). Este comportamiento tiene algunas excepciones, es así como para los compuestos fenólicos luteolina 7-glucósido y oleósido, el contenido total aumentó en el tiempo de almacenamiento, esto podría explicarse por la degradación de otros compuestos fenólicos presentes, como luteolina y compuestos secoiridoides, que dan origen al aumento de estas estructuras (Obied y Robards, 2013).

Tabla 27.	Retención (%)	de compuestos fer	nólicos en tiemp	oo final para e	l alpechín y la	s micropartículas	Al-MD, Al-I	in, Al-MD-In y Al	1-
MD-Alg, o	obtenidas bajo co	ondiciones óptimas	s y almacenadas	por 180 días a	60°C.				

Compuesto fenólico	Al	AI-MD	AI-In	Al-MD-In	AI-MD-Alg	p-valor
Alcoholes fenólicos						
Hidroxitirosol-hexosa	88.8 ± 2.3^{b}	114.1 ± 2.5^{d}	36.4 ± 0.7^{a}	$99.9 \pm 6.0^{\circ}$	92.1 ± 2.4^{bc}	0,0000
Hidroxitirosol	$79,1 \pm 0,4^{b}$	105.0 ± 2.0^{d}	$75,3 \pm 0,2^{a}$	$124,8 \pm 2,0^{e}$	$90.8 \pm 0.3^{\circ}$	0,0000
Secoiridoides	, ,	, , ,			, , ,	
Oleósido/secologanósido o isómero 1	$25,7 \pm 0,5^{a}$	$116,3 \pm 0,8^{d}$	$52,3 \pm 1,4^{b}$	$88.8 \pm 5.6^{\circ}$	$96,4 \pm 4,7^{c}$	0,0000
Derivado secoiridoide 1	$92,9 \pm 2,4^{a}$	$94,2 \pm 6,3^{a}$	$98,6 \pm 0,0^{a}$	$100,8 \pm 4,1^{a}$	$91,8 \pm 2,9^{a}$	0,2154
D-OH-EA	$62,7 \pm 8,8^{b}$	$93,0 \pm 4,5^{cd}$	$23,1 \pm 2,8^{a}$	$86,9 \pm 3,7^{c}$	$100,5 \pm 3,5^{d}$	0,0001
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$106,9 \pm 6,7^{\circ}$	$135,9 \pm 3,2^{d}$	$53,6 \pm 1,8^{a}$	$89,9 \pm 5,2^{b}$	$115,8 \pm 2,4^{\circ}$	0,0001
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$105,3 \pm 3,4^{b}$	$203,0 \pm 1,5^{d}$	$46,5 \pm 8,8^{a}$	$109,0 \pm 6,7^{\rm b}$	$128,8 \pm 9,0^{\circ}$	0,0000
Glucósido de ácido elenólico isómero 1	$10,9 \pm 1,0^{\rm a}$	$137,7 \pm 2,2^{e}$	$61,6 \pm 8,3^{b}$	$85,0 \pm 2,7^{c}$	$126,7 \pm 2,0^{\rm d}$	0,0000
Oleuropeína aglicona	$98,8\pm5,5^{\rm b}$	$137,3 \pm 4,2^{c}$	$56,5 \pm 1,3^{a}$	$99,9\pm4,5^{\rm b}$	$101,5 \pm 3,2^{b}$	0,0001
Glucósido de ácido elenólico isómero 2	$94,6 \pm 3,5^{b}$	$125,7 \pm 11,5^{\circ}$	$59,8 \pm 4,5^{a}$	$113,6 \pm 5,7^{c}$	$91,1 \pm 0,3^{b}$	0,0009
Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$19,0 \pm 0,9^{a}$	$144,3 \pm 6,1^{d}$	$55,3 \pm 4,6^{b}$	$92,4 \pm 4,1^{\circ}$	$90,4 \pm 6,3^{\circ}$	0,0000
Decarboximetil oleuropeína aglicona	$10,0 \pm 0,4^{\rm b}$	$95,1 \pm 2,7^{d}$	$3,1 \pm 0,2^{a}$	$80,5 \pm 1,8^{\circ}$	$95,5 \pm 2,0^{d}$	0,0000
Oleuropeína	$50,4\pm0,5^{\mathrm{a}}$	$125,5 \pm 3,8^{d}$	$56,8 \pm 0,0^{\rm b}$	$99,7 \pm 3,7^{\circ}$	$95,8 \pm 0,3^{\circ}$	0,0000
p-cumaril-6-secologanosido	$65,4 \pm 3,6^{b}$	$120,3 \pm 5,5^{d}$	$35,8 \pm 0,3^{a}$	$95,5 \pm 3,9^{\circ}$	$96,7 \pm 0,0^{c}$	0,0000
Ligustrósido	$53,5 \pm 1,1^{b}$	$137,8 \pm 10,3^{e}$	$20,2 \pm 3,2^{a}$	$108,6 \pm 7,1^{d}$	$91,9 \pm 2,0^{\circ}$	0,0000
Dimetil oleuropeína	$109,4 \pm 9,9^{\circ}$	$93,0 \pm 4,8^{b}$	$57,5 \pm 4,0^{a}$	$96,9 \pm 2,0^{b}$	$94,3 \pm 0,9^{b}$	0,0001
Flavonoides						
Luteolina-7-glucósido	$163,8 \pm 9,1^{d}$	$130,3 \pm 3,7^{\circ}$	$13,2 \pm 0,4^{a}$	$123,6 \pm 7,7^{c}$	$70,2 \pm 10,2^{b}$	0,0000
Luteolina	$7,2\pm0,3^{\mathrm{a}}$	$150,4 \pm 4,7^{e}$	$133,9 \pm 3,1^{d}$	$85,0 \pm 3,4^{b}$	$94,9 \pm 4,3^{c}$	0,0000
Apigenina	$28,8 \pm 0,7^{a}$	$156,6 \pm 5,4^{d}$	$96,1 \pm 5,6^{c}$	$89,0 \pm 10,3^{b}$	$90,9 \pm 11,4^{b}$	0,0000
Verbascósido	$1\overline{17,8\pm 8,9^{a}}$	$106,4 \pm 21,7^{a}$	$1\overline{17,5 \pm 14,8^{a}}$	$8\overline{3,8} \pm 7,8^{a}$	$83,8 \pm 5,5^{a}$	0,0730

Al: Alpechín; MD: Maltodextrina; In: Inulina y Alg: alginato de sodio.

Promedios (n=3) ± desviación estándar, valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor < 0,05) análisis ANDEVA y test de rango múltiple Duncan.

En la figura 21 se presentan las gráficas de Cinética de degradación de los compuestos fenólicos hidroxitirosol, oleuropeína, luteolina y verbascósido en alpechín y en las micropartículas Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg. Se observa una rápida degradación en el alpechín, para cada uno de los compuestos y un comportamiento estable para las micropartículas, demostrando una mayor estabilidad de los compuestos fenólicos con el proceso de encapsulación.



Figura 21. Cinética de degradación de compuestos fenólicos: a) Hidroxitirosol, b) Oleuropeína, c) Luteolina y d) Verbascósido, para el extracto de Alpechín (\rightarrow) y los sistemas de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas: (\rightarrow) Al-MD; (\rightarrow) Al-In; (\rightarrow); Al-MD-In y (\rightarrow) Al-MD-Alg.

3.2.8. Estudio de liberación de compuestos fenólicos desde las micropartículas de alpechín, en un sistema gastrointestinal simulado.

Se estudió la bioaccesibilidad de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas de los sistemas Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg, en condiciones gástrica simulada (FGS) e intestinal simulada (FIS).

En la Tabla 28 se presentan los porcentajes de bioaccesibilidad de cada compuesto fenólico en fluido gástrico e intestinal simulados, de los sistemas de micropartículas de alpechín (Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg), obtenidos bajo condiciones óptimas.

Al comparar la bioaccesibilidad en FGS, se observan diferencias significativas en la mayoría de los compuestos fenólicos estudiados presentes en las micropartículas de alpechín (Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg), mostrando una disminución de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de las micropartículas recubiertas (Al-MD-In y Al-MD-Alg), además se observa una mayor bioaccesibilidad del hidroxitirosol, hidroxitirosol hexosa, D-OH-EA. Oleósido, oleuropeína aglicona, Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico 2, *p*-cumaril-6-secologanosido y luteolina 7 glucósido en la micropartícula O-MD, al compararla con O-In, esto podría deberse a la mayor solubilidad en medio acuoso de la maltodextrina y por una mayor digestión del polímero por efecto de la enzima α -amilasa, presente en FGS.

En cuanto a la bioaccesibilidad en FIS, se observan diferencias significativas en la mayoría de los compuestos fenólicos estudiados presentes en las micropartículas de alpechín (Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg), mostrando una mayor bioaccesibilidad de luteolina en Al-MD-Alg.

Al comparar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos entre las micropartículas de alpechín, es posible indicar que Al-MD presenta mayor bioaccesibilidad que Al-In en los fluidos gástrico e intestinal, esto podría deberse a su mayor solubilidad en medio acuoso o a su mayor digestión frente a las enzimas utilizadas de FGS y FIS. Por otro lado, al comparar la bioaccesibilidad en FGS y FIS, de los distintos compuestos fenólicos, es posible afirmar que los valores obtenidos dependen de la naturaleza de los compuestos estudiados, obteniendo una bioaccesibilidad que varía entre 0 y 21000%, este amplio rango de respuesta puede tener más de una explicación, es posible decir que valores menores a 100% se puede deber a liberación baja por la baja solubilidad de los compuestos en el medio de disolución, como a distintos mecanismos de degradación debido a los factores medioambientales de FGS y FIS. Sin embargo, valores mayores a 100% podrían explicarse por un aumento de compuestos fenólicos más simples formados luego de la degradación de otros, que los contienen en su estructura, así se observa un aumento significativo de hidroxitirosol y ácido elenólico (compuestos presentes en secoiridoides como oleuropeína, ligustrósido y derivados) y de derivados de secoiridoides, formados por rutas de degradación de la oleuropeína (Obied y Robards, 2013).

Tabla 28. Bioaccesibilidad (%) de compuestos fenólicos en fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS) de las micropartículas Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg, obtenidas bajo condiciones óptimas.

			FGS					FIS		
Compuesto propuesto	Al-MD	Al-In	Al-MD-In	Al-MD-Alg	p-valor	Al-MD	Al-In	Al-MD-In	Al-MD-Alg	p-valor
Alcoholes fenólicos										
Hidrovitirosol hovoso	$77.9 \pm 0.8^{\circ}$	3.7 ± 0.0^{a}	$9.0 + 1.4^{a}$	20.8 ± 0.2^{b}	0.0002	$0.0 + 0.0^{a}$	$0.0 + 0.0^{a}$	$0.0 + 0.0^{a}$	$0.0 + 0.0^{a}$	0 0000
Hidroxitinosol	$77,7 \pm 0,6$	5.7 ± 0.0	$9,0 \pm 1,4$ $9,3 \pm 3,3^{a}$	$20,0 \pm 0,2$ 33.6 ± 0.7 ^b	0,0002	0.0 ± 0.0^{a}	0.0 ± 0.0^{a}	0.0 ± 0.0^{a}	0.0 ± 0.0^{a}	0,0000
	234,4 ± 1,0	0,5 ± 0,4	9,5 ± 5,5	55,0 ± 0,7	0,0000	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0 ± 0,0	0,0±0,0	0,9999
Secoiridoides										
Oleósido/secologanósido o isómero 1	$0,0 \pm 0,0^{a}$	$0,0 \pm 0,0^{a}$	$0,0 \pm 0,0^{a}$	$0,0 \pm 0,0^{a}$	0,9999	$131,4 \pm 0,1^{\circ}$	$21,9 \pm 0,0^{b}$	$0,0 \pm 0,0^{a}$	$21,7 \pm 0,0^{b}$	0,0000
Derivado secoiridoide 1	$28,7\pm2,1^{a}$	$30{,}9\pm0{,}5^{a}$	$37,6 \pm 0,1^{b}$	$40,9\pm1,3^{b}$	0,0018	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,9999
D-OH-EA	$120{,}6\pm8{,}4^{d}$	$39,1\pm0,6^a$	$85,1\pm6,5^{\rm c}$	$64,4\pm3,1^{b}$	0,0002	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,9999
Oleósido/secologanósido o isómero 2	$212,6\pm8,0^{\rm c}$	$42,1\pm4,7^a$	$55,1\pm8,5^{\mathrm{b}}$	$68,6\pm2,1^{\mathrm{b}}$	0,0000	$12,8\pm0,0^{\rm b}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	0,0000
Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico 1	$492,\!6\pm0,\!0^{\rm a}$	$475,2\pm12,5^{\mathrm{a}}$	$492,\!4\pm20,\!3^{a}$	$460{,}9\pm31{,}3^{\mathrm{a}}$	0,2502	$249,1\pm0,1^{\rm c}$	$425,0\pm11,2^{\rm d}$	$189,2\pm0,3^{b}$	$45,8\pm0,\!6^{a}$	0,0000
Glucósido de ácido elenólico isómero 1	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0{,}0\pm0{,}0^{a}$	0,9999	$0,0\pm0,0^{a}$	$2,\!4\pm0,\!0^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0{,}0\pm0{,}0^{a}$	0,0000
Oleuropeína aglicona	$94{,}7\pm2{,}0^{c}$	$25,\!4\pm0,\!6^a$	$36,5\pm4,8^{\text{b}}$	$41,\!6\pm0,\!8^{\mathrm{b}}$	0,0000	$1,1\pm0,1^{\rm c}$	$0,8\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$1,1\pm0,0^{\rm c}$	$0,9\pm0,0^{\text{b}}$	0,0005
Glucósido de ácido elenólico isómero 2	$680,2\pm18,1b^{c}$	$709,3\pm8,5^{c}$	$324,7\pm73,3^a$	$584,1\pm2,4^{b}$	0,0056	$0,0\pm0,0^{a}$	$4,6\pm0,0^{\rm c}$	$0{,}4\pm0{,}0^{\mathrm{b}}$	$0{,}0\pm0{,}0^{a}$	0,0000
Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico 2	$793,\!4\pm9,\!0^{\mathrm{b}}$	$552,3\pm39,6^a$	$477,0\pm14,2^{a}$	$724,7\pm49,5^{\mathrm{b}}$	0,0018	$515,7\pm30,7^{c}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$471,8\pm31,4^{\rm c}$	$223,2\pm1,4^{\text{b}}$	0,0001
Descarboximetil oleuropeína aglicona	$0{,}6\pm0{,}1^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,1\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,7\pm0,0^{\rm c}$	0,0001	$74,7\pm0,1^{d}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$60,9\pm0,0^{\rm c}$	$52,4\pm0,8^{b}$	0,0000
Oleuropeína	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$9,1\pm0,0^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	0,0000	$2,4\pm0,1^{c}$	$0,0\pm0,1^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$1,7\pm0,0^{\mathrm{b}}$	0,0000
p-cumaril-6-secologanosido	$\textbf{85,4} \pm \textbf{0,2^c}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$10,7\pm0,0^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	0,0000	$0,0\pm0,0^{a}$	$0{,}9\pm0{,}0^{\mathrm{b}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	0,0000
Ligustrósido	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	1,0000	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{a}$	0,9999
Dimetil oleuropeína	$5928,6\pm914,3^{b}$	$6975,6\pm78,2^{b}$	$3524,1\pm150,2^{a}$	$2907,1\pm243,\!6^a$	0,0029	$9181,\!6\pm103,\!7^d$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$7883,2 \pm 157,4^{\rm c}$	$4477,0\pm10,9^{\mathrm{b}}$	0,0000
Flavonoides										
Luteolina-7-glucósido	$134,6 \pm 14,6^{b}$	$0,0\pm0,0^{a}$	$26{,}7\pm10{,}2^{a}$	$494,4 \pm 85,5^{c}$	0,0016	$0,0\pm0,0^{a}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$0,0 \pm 0,0^{a}$	$0,0 \pm 0,0^{a}$	1,0000
Luteolina	$333,5\pm28,3^a$	$292,0\pm19,9^{\mathrm{a}}$	$751,7\pm41,9^{c}$	$543,9\pm36,4^{\text{b}}$	0,0107	$50{,}7\pm0{,}0^{a}$	$105,2\pm9,8^{\rm c}$	$585,2\pm12,5^{\text{d}}$	$100,8\pm4,6^{\rm b}$	0,0000
Apigenina	$2479,6\pm41,\!6^{ab}$	$1279,\!4\pm43,\!4^a$	$6398,1\pm 398,1^{\rm c}$	$3769,1\pm90,7^{b}$	0,0106	$1497,\!4\pm0,\!1^{b}$	$0,0\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$1385,1\pm 108,7^{b}$	$0{,}0\pm0{,}0^{a}$	0,0000
Verbacósido	$4714,1 \pm 909,3^{a}$	$5806,2 \pm 962,5^{a}$	4052,2 ±22,8 ^a	$2926,1 \pm 801,9^{a}$	0,0822	$21195,0 \pm 100,1^{d}$	12073,1 ± 926,0°	$11543,7 \pm 98,6^{b}$	$6607,7 \pm 88,7^{a}$	0,0000

Al: alpechín; MD: Maltodextrina; In: Inulina y Alg: alginato de sodio; FGS: fluido gástrico simulado, FIS: fluido intestinal simulado

Promedios (n=3) ± desviación estándar, valores con letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor < 0,05) análisis ANDEVA y test de rango múltiple Duncan.

Al estudiar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en las micropartículas elaboradas a partir de extractos complejos como el alpechín, es posible concluir que el resultado obtenido en el estudio de la bioaccesibilidad es más bien un resultado estático, obtenido por un equilibrio dinámico entre liberación, degradación y formación de los distintos compuestos fenólicos estudiados, debido a esto se decidió realizar presentar un resultado de la cinética de liberación.

En la figura 22 se presentan las gráficas de liberación de los compuestos fenólicos hidroxitirosol, oleuropeína, luteolina e hidroxitirosol hexosa, en condiciones gástrica e intestinal simuladas desde las micropartículas elaboradas con el alpechín (Al-MD, Al-In, Al-MD-In y Al-MD-Alg). En estas se repite el comportamiento encontrado en el estudio de bioaccesibilidad asociado a las diferencias del perfil de liberación de los distintos compuestos fenólicos en las micropartículas estudiadas. Esto consiste en una menor liberación de compuestos fenólicos en FGS de las micropartículas recubiertas (Al-MD-In y Al-MD-Alg), este comportamiento se repite en la mayoría de los compuestos fenólicos estudiados. Sin embargo, en FIS sólo se observa una mayor liberación del compuesto fenólico luteolina en las micropartículas recubiertas. Debido a lo anterior, es posible concluir que el proceso de recubrimiento por lecho fluido permite modificar el perfil de liberación de los compuestos fenólicos encapsulados.



SUGERENCIAS SOBRE PROYECCIONES DEL ESTUDIO

Con los antecedentes recabados en esta tesis es posible definir algunas proyecciones y/o usos de los resultados del estudio:

- Elección de materias primas:

Al caracterizar las materias primas orujo y alpechín se observó un alto contenido de compuestos fenólicos los que se pueden extraer y concentrar para su aplicación en la industria de alimentos, nutracéuticos y farmacéutica. Sin embargo, para maximizar el contenido de compuestos fenólicos se sugiere utilizar variedades de oliva ricas en compuestos fenólicos como la variedad Picual, además de escoger zonas de producción que presenten condiciones climáticas que favorezcan la síntesis de antioxidantes, como la zona norte de nuestro país.

- Manejo de los sub-productos producidos en la industria del aceite de oliva:

La extracción de compuestos fenólicos desde el orujo y el alpechín del aceite de oliva es una alternativa para el adecuado manejo de los distintos sub-productos producidos por ésta industria, sin embargo para lograr solucionar el problema de contaminación actual, es necesario definir estrategias de manejo multidisciplinarias, en las que se pueden incluir, una reducción del uso de agua en el proceso, el desarrollo de productos a partir de los sub-productos, la generación de energía, la descontaminación de las aguas residuales y su uso como compostaje, entre otros.

- Usos de las distintas micropartículas desarrolladas:

La tecnología de encapsulación para los compuestos fenólicos de orujo y alpechín le otorgan estabilidad a los compuestos fenólicos frente al almacenamiento, con un potencial como ingredientes o aditivos de larga vida útil, sus posibles aplicaciones son:

a) Las micropartículas sin recubrir (O-MD, O-In, Al-MD, Al-In), se podrían utilizar como antioxidantes y/o antimicrobianos en alimentos, aprovechando las propiedades de los distintos compuestos fenólicos encapsulados presentes en los sub-productos del aceite de oliva.

b) Las micropartículas recubiertas (O-MD-In, O-MD-Alg, Al-MD-In, Al-MD-Alg), se podrían utilizar como nutracéuticos, aprovechando el aumento de la accesibilidad de los compuestos fenólicos encapsulados a nivel intestinal.

Además, los polímeros utilizados para el recubrimiento de las micropartículas (inulina y alginato de sodio) poseen propiedades que entregarían características diferenciadoras a las micropartículas; la inulina presenta efecto prebiótico, lo que tendría un efecto positivo en la microbiota intestinal del consumidor y el alginato de sodio presenta propiedades mucoadhesivas, lo que podría aumentar la absorción de los compuestos fenólicos encapsulados.

CONCLUSIONES

Los extractos orujo y alpechín presentan un perfil complejo de compuestos fenólicos lo que dificulta su caracterización con técnicas comunes de laboratorio, lo que hace necesario incorporar técnicas más sofisticadas como la cromatografía acoplada a detector de masas.

La técnica de extracción con líquidos presurizados permite obtener extractos con mayor contenido de compuestos fenólicos y más selectivos que la extracción convencional (sólido-líquido).

Las EEs de los polifenoles en los distintos sistemas estudiados (Al-MD, Al-In, O-MD y O-In), dependieron de la estructura química de los polifenoles encapsulados y del agente encapsulante.

Las micropartículas recubiertas por lecho fluidizado (Al-MD-In, Al-MD-Alg, O-MD-In y O-MD-In), presentaron mayor estabilidad que los sistemas elaborados con inulina y similares propiedades de liberación gastrointestinal.

Al combinar dos técnicas de encapsulación como secado por atomización y lecho fluidizado es posible diseñar micropartículas elaboradas con polímeros de uso común en la industria de alimentos, como la maltodextrina y recubrirlos con polímeros que presentan propiedades de liberación en el tracto gastrointestinal, logrando producir micropartículas de liberación controlada.

La estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos presentes en las distintas micropartículas es resultado de un equilibrio dinámico entre liberación, degradación y formación de los distintos compuestos fenólicos estudiados.

La bioaccesibilidad de los distintos compuestos fenólicos permite definir la aplicabilidad de las micropartículas (facilitar la absorción o efecto localizado a nivel estomacal).

BIBLIOGRAFÍA

Agalias, A.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.L.; Mikros, E.; Tsarbopoulos, A.; Gikas, E.; Spanos, I.; Manios, T. 2007. A New Process for the Management of Olive Oil MillWasteWater and Recovery of Natural Antioxidants. J. Agric. Food Chem, 55, 2671–2676.

Aliakbarian, B.; Casazza, A.; Perego, P. 2011. Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor. Food Chem, 128, 704–710.

Antolovich, M.; Bedgood, D.R.; Bishop, A.G.; Jardine, D.; Prenzler, P.D.; Robards, K. 2004. LC-MS investigation of oxidation products of phenolic antioxidants. J. Agric. Food Chem, 52, 962–971.

Bouallagui, Z.; Bouaziz, M.; Lassoued, S.; Engasser, J.M.; Ghoul, M.; Sayadi, S. 2011. Hydroxytyrosol Acyl Esters: Biosynthesis and Activities. Appl. Biochem. Biotechnol, 163, 592–599.

Cádiz-Gurrea, M.L.; Lozano-Sánchez, J.; Fernández-Ochoa, A.; Segura-Carretero, A. 2019. Enhancing the Yield of Bioactive Compounds from Sclerocarya birrea Bark by Green Extraction Approaches. Molecules, 24, 966.

Cardinali, A.; Pati, S.; Mirenvini, F.; D'Antuono, I.; Linsalata, V.; Lattanzio, V. 2012. Verbascoside, Isoverbascoside, and Their Derivatives Recovered from Olive Mill Wastewater as Possible Food Antioxidants. J. Agric. Food Chem, 60, 1822–1829.

Cermola, F.; DellaGreca, N.; Iesce, M.R.; Montella, S.; Pollio, A.; Temussi, F. 2004. A mild photochemical approach to the degradation of phenols from olive oil mill wastewater. Chemosphere, 55, 1035–1041.

Cicerale, S.; Lucas, L.; Keast, R. 2010. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. Int. J. Mol. Sci, 11, 458–479.

Cioffi, G.; Pesca, M.S.; De Caprariis, P.; Braca, A. 2010. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. Food Chem, 121, 105–111.

Chanioti, S.; Tzia, C. 2018. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. Innovative Food Sci. Emerg. Techn, 48, 228–239.

Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A. 2006. Potential use of olive by products. Grasas y aceites, 57, 95–106.

Frankel, E.; Bakhouche, A.; Lozano-Sánchez, J.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutierrez, A. 2013. Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of bioproducts as alternative sources of polyphenols. J. Agric. Food Chem, 61, 5179–5188.

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

Gouin, S. 2004. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends in Food Science and Technology, 15, 330 -3 47.

He, J.; Alister-Briggs, M.; de Lister, T.; Jones, G. 2012. Stability and antioxidant potential of purified olive mill wastewater extracts. Food Chem, 131, 1312–1321.

Japón-Luján, R.; de Castro, M.L. 2007. Static-Dynamic superheated liquid extraction of hydrotyrosol and other biophenols from alperujo (a semisolid residue of the olive oil industry). Agric. Food Chem, 55, 3629–3634.

Kalogerakis, N.; Politi, M.; Foteinis, S.; Chatzisymeon, E.; Mantzavinos, D. 2013. Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: A viable solution that promotes their overall sustainable management. J. environ. manage, 128, 749–758.

Kapellakis, I.E.; Tsagarakis, K.P.; Crowther, J.C. 2008. Olive oil history, production and by-product management. Rev. Environ. Sci. Biotechnol, 7, 1–26.

Lozano-Sánchez, J.; Giambanelli, E.; Quirantes-Piné, R.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Antonio Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. 2011. Wastes Generated during the Storage of Extra Virgin Olive Oil as a Natural Source of Phenolic Compounds. J. Agric. Food Chem, 59, 11491–11500.

Lozano-Sánchez, J.; Castro-Puyana, M.; Mendiola, J.; Segura-Carretero, A.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. 2014. Recovering Bioactive Compounds from Olive Oil Filter Cake by Advanced Extraction Techniques. Int. J. Mol. Sci, 15, 6270–16283.

Lozano-Sánchez, J.; Cea, I.; González-Cáceres, E.; Núñez, H.; Robert, P.; Segura-Carretero, A. 2017. Chapter 9: Extraction, Isolation and Utilisation of Bioactive Compounds fromWaste Generated by the Olive Oil Industry. In Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Waste, 1st ed.; Vuong, Q.V., Ed.; CRC Press LLC.: Boca Ratón, Florida, USA; pp. 230–251.

McDonald, S.; Prenzler, P.; Antolovich, M.; Robards, K. 2001. Phenolic content and actioxidant activity of olive extracts. Food Chem, 73, 73–84.

Morsi, M.; Malal, S.; Alabdulla, O. 2016. Antioxidative Activity of Olive Pomace Polyphenols Obtained by Ultrasound Assisted Extraction. J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol, 10, 95–100.

Mulinacci, N.; Innocenti, M.; La Marca, G.; Mercalli, E.; Giaccherini, C.; Romani, A.; Saracini, E.; Vincieri, F. 2005. Solid Olive Residues: Insight into Their Phenolic Composition. J. Agric. Food Chem, 53, 8963–8969.

Mustafa, A.; Turner, C. 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. Analyt. Chim. Acta, 703, 8–18.

Papaioannou, E.H.; Patsios, S.I.; Karabelas, A.J.; Philippopoulos, N.A. 2013. Characterization of condensates from an indirect olive oil pomace drying process: The effect of drying temperatura. J. Environ. Chem. Eng, 1, 831–837.

Peralbo-Molina, A.; Priego-Capote, F.; Luque de Castro, M.D. 2012. Tentative Identification of Phenolic Compounds in olive Pomace Extracts Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with a Quadrupole Quadrupole-Time-of-Flight Mass Detector. J. Agric. Food Chem, 60, 11542–11550.

Pérez-Serradilla, J.A.; Japón Luján, R.; de Castro, M.D.L. 2008. Static-dynamic sequential superheated liquid extraction of phenols and fatty acids from alperujo. Analy. Bioanaly. Chem, 392, 1241–1248.

Obied, H. K., Bedgood, D. R., Prenzler P. D. and K. Robards. 2007. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. Analytica Chimica acta, 603(2), 176-189.

Obied, H.; Prenzler, P.; Ryan, D.; Servili, M.; Taticchi, A.; Esposto, S.; Robards, K. 2008. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from Olea europaea L. Nat. Prod. Rep, 25, 1167–1179.

Rubio-Senent, F.; Rodríguez-Gutierrez, G.; Lama-Muñoz, A.; Fernández-Bolaños, J. 2012. New phenolic compounds hydrothermally extracted from the olive oil byproduct alperujo and their antioxidative activities. J. Agric. Food Chem, 60, 1175–1186.

Rubio-Senent, F.; Lama-Muñoz, A.; Rodríguez-Gutierrez, G.; Fernández-Bolañoz, J. 2013. Isolation and Identification of Phenolic Glucosides from Thermally Treated Olive Oil Byproducts. J. Agric. Food Chem, 61, 1235–1248.

Ryan, D.; Lawrence, H.; Prenzler, P.; Antolovich, M.; Robards, K. 2001. Recovery of phenolic compounds from Olea europaea. Analy. Chimica Acta, 445, 67–77.

Servili, M.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Urbani, S.; Di Maio, I.; Veneziani, G.; Selvaggini, R. 2015. New approaches to virgin olive oil quality, technology, and by-products valorization. Eur. J. Lipid Sci. Technol, 117, 1882–1892.

Servili, M.; Sordini, B.; Esposto, S.; Urbani, S.; Veneziani, G.; Di Maio, I.; Selvaggini, R.; Taticchi, A. 2017. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. Antioxidants, 3, 1–23.

Skaltsounis, A.L.; Argyropoulou, A.; Aligiannis, N.; Xynos, N. 2015. Chapter 11: Recovery of High Added Value Compounds from Olive Tree Products and Olive Processing Byproducts. In Olive and Olive Oil Bioactive Constituents, 1st ed.; Boskou, D., Ed.; Academic Press: Urbana, Illinois, USA, pp. 333–356.

Tripoli, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; Di Majo, D.; Giammanco, S.; La Guardia, M. 2005. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. Nutri. Res. Review, 18, 98–112.

Uribe, E.; Lemus-Mondaca, R.; Vega-Gálvez, A.; Zamorano, M.; Quispe-Fuentes, I.; Pasten, A.; Di Scala, K. 2014. Influence of process temperature on drying kinetics, physicochemical properties and antioxidant capacity of the olive-waste cake. Food Chem, 147, 170–176.

Yoo, S. H.; Song, Y. B.; Chang, P. S.; Lee, H. G. 2006. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. International Journal of Biological Macromolecules, 38(1), 25–30.

ANEXOS

Anexo 1. Publicaciones, estadías y presentaciones en congresos.

Publicaciones

Inés Cea Pavez; Jesús Lozano-Sánchez; Isabel Borrás-Linares; Hugo Nuñez; Paz Robert; Antonio Segura-Carretero Obtaining an Extract Rich in Phenolic Compounds from Olive Pomace by Pressurized Liquid Extraction. Molecules 2019, Volume 24, Issue 17, 3108. (Publicado)

Capítulo de libro: Lozano-Sánchez, J., **Cea, I.**, González, E., Núñez, H., Robert. and Segura-Carretero, A. "Extraction, Isation and utilization of Bioactive Compounds from wastes generate by Olive Oil Industry". In book: Utilization of bioactive compounds from agricultural and food waste edited by Quan V Vuong, 2016. (Publicado)

Estadías

Estadía de investigación: "Estudio del efecto de la temperatura y tiempo de extracción con líquidos presurizados, sobre el contenido de compuestos fenólicos desde orujo de oliva y la caracterización de compuestos fenólicos de extractos de alpechín y orujo de oliva por HPLC-DAD-ESI-TOF/MS" realizada en el Centro Tecnológico de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF) Granada, España. Dr. Antonio Segura y Dr. Jesús Lozano (02 de octubre 2015 - 31 de marzo 2016).

Estadía de investigación: "Caracterización de compuestos fenólicos de micropartículas de extractos fenólicos de alpechín y orujo de oliva por HPLC-DAD-ESI-TOF/MS", realizada en el Centro Tecnológico de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF) Granada, España. Dr. Antonio Segura y Dr. Jesús Lozano (27 de septiembre - 13 de octubre 2016).

Presentaciones en congresos

Cea, I., García, P., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. and Robert, P. "Olive pomace microparticles desing by spray drying and fluid bed coating". 3rd Latin-America Symposium on Microencapsulation Pucón-Chile, 2017. (Presentación oral)

Cea, I., García, P., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. and Robert, P. "Efecto de la encapsulación de alpechín con maltodextrina e inulina sobre el perfil de compuestos fenólicos". XI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de alimentos (CIBIA) Valparaíso, Chile), 2017. (Presentación oral)

Cea I., Lozano J., Núñez H., Segura-Carretero A. y P. Robert. "Microencapsulación de un extracto polifenólico de orujo de oliva obtenido por extracción con fluidos presurizados por secado por atomización". XXI Congreso Chileno de Ciencias y Tecnología de Alimentos, Santiago-Chile, 2017. (Presentación oral)

Cea, I., Lozano-Sánchez, J., Nuñez, H., Segura-Carretero, A. y Robert, P. "Optimización de la extracción de compuestos fenólicos del orujo de oliva por extracción acelerada por disolventes". 2° Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los alimentos (CIIAL), Punta del Este (Uruguay) 13 y 14 de noviembre, 2016. (Presentación poster)

Cea, I., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. and Robert, P. "Microparticles of a polyphenols extract from olive mil waste water". 24th International Conference on Bioencapsulation, Lisboa (Portugal) 21-23 septiembre, 2016. (Presentación poster)

Lozano-Sánchez, J., **Cea, I.**, Robert, P. and Segura-Carretero. PLE-Frezze/Spary drying as innovative process for developing functional ingredients". 24th International Conference on Bioencapsulation, Lisboa (Portugal) 21-23 septiembre, 2016. (Presentación poster)

González, E., **Cea, I.** y Robert, P. "Diseño de micropartículas de compuestos bioactivos extraídos desde subproductos agroindustriales para la formulación de alimentos saludables". XVII Congreso nacional de estudiantes de ingeniería agroindustrial de Amazonas (CONEIA), Chachapoyas-Amazonas (Perú) 04-10 septiembre, 2016. (Resumen *In extenso*).

Cea, I., Robert, P. and Sáenz, C. "Identification and quantification of betalains in Orange cactus pear fruit (*Opuntia ficus-indica* L.) during ripening". XVIII Euro Food Chem, Madrid (España) 13-16 octubre, 2015. (Presentación poster)

Anexo 2. Determinación del contenido de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

Fundamento

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (tungstofosfato y molibdofosfato) a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de una determinación espectrofotométrica a 765 nm.

El presente método corresponde a un análisis colorimétrico que permite medir compuestos orgánicos que presenten anillos aromáticos hidroxilados (fenoles, ácido tánico, taninos, ligninas, ácidos húmicos, proteínas, etc.)

Materiales

Agua destilada, Reactivo de Folin-Ciocalteu, Carbonato de sodio al 20%.

Análisis de polifenoles totales

- 1. Agregar 100 μ L de muestra (o extracción de muestra, según corresponda) en un matraz aforado de 10 mL, luego adicionar 4,9 mL de agua destilada.
- 2. Agregar 0,5 mL de reactivo Folin-ciocalteu, esperar entre 3 y 8 minutos.
- 3. Agregar 1,7 mL de la solución de carbonato de sodio al 20%.
- 4. Aforar con agua destilada, tapar y agitar, esperar que repose por 30 minutos en oscuridad.
- 5. Medir absorbancia en espectrofotómetro a 765 nm, contra un blanco de agua preparado en las condiciones anteriormente descritas (reemplazando la muestra por agua destilada). En cubeta de paso óptico de 10 mm.

Para los cálculos del contenido de polifenoles totales, se realizó una curva de calibración de ácido gálico (Figura 23) (y=0,001x + 0,0047; R^2 =0,9992, Donde: x= Concentración de polifenoles e y= Absorbancia de la muestra (U.A.)).



Figura 23. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-ciocalteu, medido en espectrofotómetro en cubetas de paso óptico de 1 cm.

Preparación de reactivo carbonato de sodio al 20%

- 1. Pesar 200 g de carbonato de sodio en un vaso precipitado.
- 2. Hervir 600 mL de agua destilada en vaso precipitado de 1L, mezclar en agitador magnético con temperatura, disolver el carbonato de sodio lentamente y esperar a que hierva.
- 3. Dejar en reposo por 24 horas.
- 4. Filtrar la solución por papel whatman nº 1 (si la solución cristaliza, debe solubilizarse nuevamente en agitador magnético a 20-30 °C y filtrar).
- 5. Aforar a 1L en un matraz de aforo, agitar para homogeneizar la solución; trasvasijar el carbonato a un envase para reactivos; rotular y guardar.

Anexo 3. Análisis de capacidad antioxidante ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno).

Fundamento

El ensayo ORAC mide la actividad o capacidad global que tienen todos los antioxidantes presentes en una muestra para "apagar o neutralizar" (scavenging) los radicales peroxilo. En el ensayo ORAC, los radicales peroxilo, generados a partir del azo-compuesto ([2,2'-azobis (2-amidinopropano]), reaccionan con fluoresceína como sustrato. Como resultado de tal reacción, la fluorescencia decrece a través del tiempo, configurando un área bajo la curva (fluorescencia versus tiempo). Cuando dicha reacción tiene lugar en presencia de compuestos antioxidantes, el área bajo la curva se incrementa en forma lineal y proporcional a la concentración de antioxidantes.

Materiales

Cloruro de Sodio (NaCl), Cloruro de Potasio (KCl), Dihidrógeno Fosfato de Sodio (NaH2PO4), Dihidrógeno Fosfato de Potasio (KH2PO4), Ácido Clorhídrico (HCl), Hidróxido de Sodio (NaOH), Fluoresceína, AAPH ([2,2'-azobis(2-amidinopropano]), Estándar Trolox, agua Milli-Q y placas de 96 pocillos negras

Análisis ORAC

La placa de 96 pocillos negra se prepara de la siguiente manera:

- 1. En cada pocillo, colocar 150 μ L de Fluoresceína y 25 μ l de AAPH.
- 2. Incubar por 30 minutos a 37°C.
- 3. Agregar 25 µL de blanco, muestra o estándar.
- 4. Agitar suavemente por algunos segundos.
- 5. Colocar la placa en espectrofluorímetro e iniciar el programada de medición por 80 minutos.

Preparación de la Solución PBS (Buffer)

Para un Litro de solución Buffer pesar las siguientes cantidades:

- 8,06 g de NaCl
- 0,22 g de KCl
- 1,15 g NaH2PO4 Dihidratado
- 0,20 g KH2PO4

Disolver en 750 mL de agua Milli-Q y luego ajustar a pH 7 con ácido clorhídrico o Hidróxido de Sodio al 10%, enrazar a un Litro y agitar.

Preparación de la fluoresceína

- Solución Stock Fluoresceína (duración 07 días - mantener siempre refrigerado):

Pesar 22 mg de Fluoresceína en un matraz aforado ámbar de 50 mL, disolver y enrazar con solución de PBS.

- Solución diaria Fluoresceína (duración 1 día a temperatura ambiente):

Tomar una alícuota de 50 μ L de solución stock en un matraz aforado ámbar de 10 mL, homogeneizar y realizar una segunda dilución de 2 mL en un matraz aforado de 100 mL disolver y aforar con solución de PBS pH 7, homogeneizar agitando.

Preparación de la Solución del radical AAPH (duración 1 día refrigerada)

Pesar la cantidad de masa necesaria para las muestras a analizar en el día (a una concentración de 46 mg/mL), trasvasijar en un matraz de volumen apropiado con tapa, disolver con solución PBS previamente mantenida a 37°C, agitar y homogeneizar.

Preparación de la Solución estándar de Trolox (Duración dos días refrigerado en ausencia de luz)

Pesar 25 mg de estándar Trolox en un matraz aforado ámbar de 50 mL, disolver y aforar con PBS manteniendo a 37°C. (Concentración 2000 μ M). Para la curva de calibración realizar soluciones de 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 μ M

Preparación de la muestra (Duración un día a temperatura ambiente y luz)

Realizar una dilución de 50 μ l en un matraz aforado de 50 mL, enrazar con solución de PBS, luego tomar una alícuota de 50 μ L en un matraz aforado de 20 mL y aforar con solución PBS.

Cálculo

La Fluorescencia fue medida inmediatamente después de la adición de AAPH hasta que la intensidad fue menor al 5% del valor de la lectura inicial.

Los valores ORAC, expresados como umoles Equivalentes de Trolox, calculado mediante la siguiente fórmula:

ORAC = (AUC Muestra-AUC Blco) / (AUC Trolox-AUC Blco)* C Trolox K

Donde:

AUC: Área bajo la curva C: Concentración Estándar de Trolox K: Factor dilución de las muestras

Anexo 4. Metodología HPLC-DAD-ESI-TOF/MS.

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	95	5
7	65	35
13	55	45
18,5	50	50
25	40	60
29	5	95
36	5	95

Tabla 29. Método cromatográfico utilizado para la identificación de compuestos fenólicos.

Fase móvil A: agua + 0,25% acético

Fase móvil B: metanol

Flujo: 0,5 mL/min

Volumen de inyección: 10 µL

Se utilizó una columna Zorbax Eclipse Plus (C_{18} 150 mm \times 4,6 mm, 1,8 $\mu m)$

Fabla 30. Curvas de c	alibración de	estándares d	e compuestos fenólicos
-----------------------	---------------	--------------	------------------------

Compuesto fenólico	Ecuación de calibración	\mathbf{r}^2				
Hidroxitirosol	<i>y</i> =50601 <i>x</i> +31918	0,9950				
Tirosol	<i>y</i> = <i>17329x</i> + <i>15598</i>	0,9869				
Ácido cafeico	<i>y</i> =104204 <i>x</i> +116857	0,9873				
Vainillina	<i>y</i> =17478 <i>x</i> +20527	0,9912				
Oleuropeína	<i>y</i> =279416 <i>x</i> +152339	0,9852				
Pinoresinol	y = 287596x + 129511	0,9958				
Luteolina	<i>y</i> =563280 <i>x</i> +1074,4	0,9756				
Luteolina 7-O-Glucósido	<i>y</i> =408627 <i>x</i> +577265	0,9778				
Apigenina	<i>y</i> =430518 <i>x</i> +222224	0,9793				
Otros compuestos polares						
Ácido quínico	<i>y</i> = <i>1</i> 89688 <i>x</i> +7 <i>1</i> 239	0,988				

Anexo 5. Metodología de liberación gastrointestinal simulada.

Materiales

Cloruro de Sodio (NaCl), Fosfato de potasio monobásico, ácido clorhídrico (HCl 37%), hidróxido de sodio (NaOH 0,2 N), Pepsina (P7000 powder, >250 unidades/mg solidos-Sigma), Pancreatina (P-1750-Sigma) y Agua ultrafiltrada (milli-Q), vasos precipitados, matraz erlenmeyer, agitador magnético con regulador de temperatura, bolsas filtro de celulosa (bolsa de té) y barra de agitación.

Preparación del fluido gástrico simulado (FGS).

- Pesar 2 g de NaCl, disolver en agua milli-Q (50 mL aproximadamente).
- Pesar 3,2 g de pepsina y disolver en 7 mL de HCl 37%.
- Transferir cuantitativamente a matraz de aforo de 1000 mL
- Aforar con Agua milli-Q
- Ajustar pH de la solución a 1,2.

Preparación del fluido intestinal simulado (FIS).

- Pesar 6,8 g de fosfato de potasio monobásico y disolver en 250 mL de agua milli-Q.
- A la solución anterior, agregar 190 mL de *NaOH 0,2 N y 400 mL de agua milli-Q
- Pesar 10 g de pancreatina y mezclar con la solución anterior.
- Ajustar pH a 7,5 \pm 0,1, con NaOH 0,2 N.
- Aforar en matraz de aforo de 1000 mL con agua milli-Q.

^(*) NaOH 0,2 N: pesar 8 g de perlas de NaOH y disolver en 1000 mL de agua milli-Q

Preparación del sistema de liberación.

- Pesar 0,5 g de micropartículas en la bolsa filtro e introducirla en el canastillo.
- Instalar el equipo de liberación a 37°C y 100 RPM para FGS y 50 RPM para FIS.
- tomar muestras a distintos tiempos (alícuotas de 10 mL).
- FGS (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min).
- FIS (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 min).

Anexo 6. Análisis estadístico del proceso extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva (var. Arbequina) por extracción con líquidos presurizados (ELP).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	42324,8	1	42324,8	42324,85	0,0000
B: Etanol	1623,56	1	1623,56	1623,56	0,0000
AA	14278,4	1	14278,4	14278,42	0,0000
AB	6511,91	1	6511,91	6511,91	0,0000
BB	409,411	1	409,411	409,41	0,0000
Error total	9557,29	6	1592,88	1592,88	0,0000
Sigma externa			1,0		
Total (corr.)	82912,1	11			

Tabla 31. Análisis de varianza de contenido de hidroxitirosol para el diseño composito central de la extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva por ELP.

R-cuadrada = 88,473 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 78,8671 porciento

Error estándar del est. = 39,9109

Error absoluto medio = 20,597

Estadístico Durbin-Watson = 2.27291 (P=0,8918)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,307709

Tabla 32. Análisis de varianza de contenido de hidroxi D-oleuropeína aglicona para el diseño composito central de la extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva por ELP.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	118,618	1	118,618	0,36	0,5704
B: Etanol	523,819	1	523,819	1,59	0,2541
AA	10127,7	1	10127,7	30,75	0,0015
AB	25,1495	1	25,1495	0,08	0,7916
BB	1619,86	1	1619,86	4,92	0,0684
Error total	1976,45	6	329,408		
Total (corr.)	14578,9	11			

R-cuadrada = 86,4431 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 75,1457 porciento

Error estándar del est. = 18,1496

Error absoluto medio = 10,4785

Estadístico Durbin-Watson = 2,06927 (P=0,7732)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,181465

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P					
A: Temperatura	3656,18	1	3656,18	3,60	0,1065					
B: Etanol	2401,14	1	2401,14	2,37	0,1750					
AA	17567,8	1	17567,8	17,31	0,0059					
AB	2,34565	1	2,34565	0,00	0,9632					
BB	3117,69	1	3117,69	3,07	0,1302					
Error total	6090,85	6	1015,14							
Total (corr.)	31676,3	11								

Tabla 33. Análisis de varianza de contenido de hidroxi oleuropeína para el diseño composito central de la extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva por ELP.

R-cuadrada = 80,7716 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 64,748 porciento

Error estándar del est. = 31,8613

Error absoluto medio = 20,169

Estadístico Durbin-Watson = 1,68583 (P=0,4351)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,0661553

Tabla 34. Análisis de varianza de contenido de descarboximetil-oleuropeína para el diseño composito central de la extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva por ELP.

-		-		•	-
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	14,449	1	14,449	1,61	0,2510
B: Etanol	13,6533	1	13,6533	1,52	0,2630
AA	425,539	1	425,539	47,53	0,0005
AB	7,32752	1	7,32752	0,82	0,4005
BB	81,121	1	81,121	9,06	0,0237
Error total	53,7187	6	8,95311		
Total (corr.)	601,709	11			

R-cuadrada = 91,0723 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 83,6326 porciento

Error estándar del est. = 2,99218

Error absoluto medio = 1,86083

Estadístico Durbin-Watson = 1,1744 (P=0,0727)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,329249

Tabla 35. Análisis de varianza de contenido de dimetil oleuropeína para el diseño composito central de la extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva por ELP.

1		1		5	1	
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	
A: Temperatura	69,2627	1	69,2627	3,98	0,0929	
B: Etanol	239,089	1	239,089	13,76	0,0100	
AA	461,585	1	461,585	26,56	0,0021	
AB	109,428	1	109,428	6,30	0,0460	
BB	6,55101	1	6,55101	0,38	0,5618	
Error total	104,287	6	17,3811			
Total (corr.)	987,409	11				

R-cuadrada = 89.4383 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 80.6369 porciento

Error estándar del est. = 4.16907

Error absoluto medio = 2.53767

Estadístico Durbin-Watson = 1.27268 (P=0.1216)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.232752

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-	
					Р	
A: Temperatura	5650,06	1	5650,06	38,15	0,0008	
B: Etanol	1826,83	1	1826,83	12,34	0,0126	
AA	3976,57	1	3976,57	26,85	0,0021	
AB	2987,01	1	2987,01	20,17	0,0041	
BB	76,7892	1	76,7892	0,52	0,4985	
Error total	888,52	6	148,087			
Total (corr.)	14328,0	11				

Tabla 36. Análisis de varianza de contenido de Oleuropeína para el diseño composito central de la extracción de compuestos fenólicos desde orujo de oliva por ELP.

R-cuadrada = 93,7987 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 88,631 porciento

Error estándar del est. = 12,1691

Error absoluto medio = 7,55641

Estadístico Durbin-Watson = 1.88796 (P=0,6252)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,104362

Tabla 37. Análisis de varianza del rendimiento	de proceso para el diseño composito central
de la extracción de compuestos fenólicos desde	orujo de oliva por ELP.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	295,563	1	295,563	108,09	0,0000
B: Etanol	23,3825	1	23,3825	8,55	0,0265
AA	27,7676	1	27,7676	10,15	0,0189
AB	37,7949	1	37,7949	13,82	0,0099
BB	36,3875	1	36,3875	13,31	0,0107
Error total	16,4071	6	2,73452		
Total (corr.)	472,249	11			

R-cuadrada = 96,5258 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 93,6305 porciento

Error estándar del est. = 1,65364

Error absoluto medio = 1,01776

Estadístico Durbin-Watson = 1,91499 (P=0,6493)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,0218011

Anexo 7. Listado de compuestos fenólicos presentes en el EO-LP elaborado bajo condiciones óptimas.

Tabla 38. Listado de compuestos, fórmula molecular, tiempo de retención (Tr) y masa de compuestos fenólicos identificados en EO-LP.

		Fórmula		
Peak	Compuesto propuesto	molecular	T_r (min)	m/z
1	Ácido quínico	$C_7 H_{12} O_6$	3,3	191,0561
2	Hidroxitirosol oxidado	$C_8H_8O_3$	6,0	151,0401
3	Ácido vainillinico	$C_8H_8O_4$	10,2	167,0350
4	Oleosido/secologanosido o isómero 1	$C_{16}H_{22}O_{11}$	10,5	389,1114
5	Desconocido no identificado	$C_{16}H_{24}O_{10}$	10,7	375,1318
6	Hidroxitirosol	$C_8H_{10}O_3$	11,0	153,0557
7	Derivado secoiridoide 1	$C_{17}H_{28}O_{11}$	11,2	407,1559
8	D-OH-EA	$C_{10}H_{14}O_5$	11,9	213,0768
9	Hydroxylated-DEA	$C_9H_{12}O_5$	12,1	199,0618
10	Vainillina	$C_8H_8O_3$	13,6	151,0401
11	Oleosido/secologanosido o isómero 2	$C_{16}H_{22}O_{11}$	14,1	389,1089
12	Desconocido no identificado	$C_9H_{12}O_4$	14,2	183,0665
13	Hidroxi oleuropeína	$C_{25}H_{32}O_{14}$	17,0	555,1719
14	Demetil oleuropeína	$C_{24}H_{30}O_{13}$	17,7	525,1614
15	Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$C_{10}H_{16}O_5$	18,2	215,0925
16	Luteolina-7-O-rutinosido	$C_{27}H_{30}O_{15}$	19,5	593,1510
17	Luteolina-7-glucosido	$C_{21}H_{20}O_{11}$	20,1	447,0933
18	Desconocido no identificado	$C_{38}H_{26}O_8$	21,1	609,1555
19	Oleuropeína	$C_{25}H_{32}O_{13}$	22,9	539,1770
21	Pinoresinol	$C_{20}H_{22}O_{6}$	24,4	357,1344
22	Acetoxipinoresinol	$C_{22}H_{24}O_8$	25,3	415,1390
20	Desconocido no identificado	$C_{31}H_{36}O_{11}$	25,3	583,2123
23	Desconocido no identificado	$C_{31}H_{36}O_{12}$	25,6	583,2123
24	Ligustrosido	$C_{25}H_{32}O_{12}$	26,3	523,1821
25	Naringenina*	$C_{15}H_{12}O_5$	28,9	271,0893
26	Luteolina	$C_{15}H_{10}O_{6}$	30,1	285,0405
27	Apigenina	$C_{15}H_{10}O_5$	31,7	269,0451

(*) Estándar interno

Anexo 8. Análisis estadístico del diseño de encapsulación del orujo con maltodextrina (O-MD), por secado por atomización.

Tabla 39.	Análisis	de	varianza	de la	EE d	le ácido	quínico	para el	diseño	composito	central
de la encap	psulación	del	orujo co	n mal	todey	ktrina (C)-MD), p	or seca	do por a	atomizaciói	1.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	1,868	1	1,868	3,98	0,0930
B: Polímero	97,6172	1	97,6172	208,10	0,0000
AA	0,615089	1	0,615089	1,31	0,2958
AB	3,24	1	3,24	6,91	0,0392
BB	47,1757	1	47,1757	100,57	0,0001
Lack-of-fit	2,81455	3	0,938185		
Total error	2,81455	6	0,469092		
Total (corr.)	153,317	11			

R-squared = 98,1642 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 96,6344 percent Standard Error of Est. = 0,684903

Mean absolute error = 0.358672

Durbin-Watson statistic = 2,41555 (P=0,7663)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,292734

Tabla 40. Análisis de varianza de la EE de alcoholes fenólicos para el diseño composito central de la encapsulación del orujo con maltodextrina (O-MD), por secado por atomización.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	1,47595	1	1,47595	0,16	0,7073
B: Polímero	53,7253	1	53,7253	5,65	0,0550
AA	9,28664	1	9,28664	0,98	0,3613
AB	2,56	1	2,56	0,27	0,6225
BB	40,2615	1	40,2615	4,23	0,0854
Lack-of-fit	57,0826	3	19,0275		
Total error	57,0826	6	9,51377		
Total (corr.)	164,443	11			

R-squared = 65,2872 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 36,3598 percent

Standard Error of Est. = 3,08444

Mean absolute error = 1,64375

Durbin-Watson statistic = 1,96392 (P=0,4676)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,201775

Tabla 41.	Análisis o	de varianza	de la EE	de secoiridoi	des para	el diseño	composito	central
de la encaps	sulación	del orujo co	n maltode	extrina (O-MI	D), por se	ecado por a	atomizació	1.

-	0		· · ·	-		
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	
A: Temperatura	0,0572076	1	0,0572076	0,04	0,8425	
B: Polímero	37,0568	1	37,0568	27,90	0,0019	
AA	0,888995	1	0,888995	0,67	0,4446	
AB	3,61	1	3,61	2,72	0,1503	
BB	1,74062	1	1,74062	1,31	0,2959	
Lack-of-fit	5,06986	3	1,68995	1,75	0,3288	
Total error	7,96986	6	1,32831			
Total (corr.)	51,3267	11				

R-squared = 84,4723 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 71,5325 percent

Standard Error of Est. = 1,15252

Mean absolute error = 0,72886

Durbin-Watson statistic = 2,35849 (P=0,7333), Lag 1 residual autocorrelation = -0,201869
Fuente	Suma de Cuadrados	GÌ	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	18,2695	1	18,2695	0,18	0,6876
B: Polímero	1265,81	1	1265,81	12,35	0,0126
AA	6,06213	1	6,06213	0,06	0,8160
AB	95,0625	1	95,0625	0,93	0,3727
BB	625,644	1	625,644	6,10	0,0484
Lack-of-fit	615,073	3	205,024		
Total error	615,073	6	102,512		
Total (corr.)	2626,08	11			
R-squared = 76,5783 perc	ent				

Tabla 42. Análisis de varianza de la EE de lignanos para el diseño composito central de la encapsulación del orujo con maltodextrina (O-MD), por secado por atomización.

R-squared (adjusted for d.f.) = 57,0602 percent

Standard Error of Est. = 10,1248

Mean absolute error = 5,22894

Durbin-Watson statistic = 1,98159 (P=0,4801)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,176942

Tabla 43. Análisis de varianza del rendimiento para el diseño composito central de la encapsulación del orujo con maltodextrina (O-MD), por secado por atomización.

Fuente	Suma de Cuadrados	GÌ	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	31,0041	1	31,0041	0,86	0,3884
B: Polímero	657,56	1	657,56	18,33	0,0052
AA	9,97656	1	9,97656	0,28	0,6169
AB	38,44	1	38,44	1,07	0,3405
BB	61,4067	1	61,4067	1,71	0,2387
Lack-of-fit	51,5382	3	17,1794	0,31	0,8161
Total error	215,266	6	35,8776		
Total (corr.)	1013,59	11			

R-squared = 78,762 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 61,0637 percent

Standard Error of Est. = 5,98979

Mean absolute error = 3,07283

Durbin-Watson statistic = 3,22423 (P=0,9920)

Anexo 9. Análisis estadístico del diseño de encapsulación del orujo con inulina (O-In), por secado por atomización.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
B: Polímero	14872,7	1	14872,7	192,69	0,0000
AA	166,597	1	166,597	2,16	0,1922
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
BB	7000,39	1	7000,39	90,69	0,0001
Lack-of-fit	463,117	3	154,372		
Total error	463,117	6	77,1861		
Total (corr.)	22500,0	11			

Tabla 44. Análisis de varianza de la EE de ácido quínico para el diseño composito central de la encapsulación del orujo con inulina (O-In), por secado por atomización.

R-squared = 97,9417 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 96,2265 percent

Standard Error of Est. = 8,78556

Mean absolute error = 4.81582

Durbin-Watson statistic = 1,85364 (P=0,3910)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,121745

Tabla 45	. Análisis	de varianza	a de la E	E de a	alcoholes	fenólicos	para el	diseño	composito
central de	e la encaps	ulación del	orujo coi	1 inulir	na (O-In),	por secad	o por a	tomizac	ión.

			_	-	
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	876,924	1	876,924	1,46	0,2727
B: Polímero	3066,97	1	3066,97	5,10	0,0647
AA	0,323714	1	0,323714	0,00	0,9822
AB	1521,0	1	1521,0	2,53	0,1629
BB	443,214	1	443,214	0,74	0,4236
Lack-of-fit	1733,29	3	577,762	0,92	0,5250
Total error	3608,29	6	601,381		
Total (corr.)	9516,69	11			

R-squared = 62,0847 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 30,4885 percent

Standard Error of Est. = 24,5231

Mean absolute error = 13,635

Durbin-Watson statistic = 2,5449 (P=0,8331)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,348122

Tabla 46.	Análisis	de varianza	de la EE	de secoiri	doides par	ra el dise	eño compo	sito cer	ntral
de la encap	sulación	del orujo co	n inulina ((O-In), po	r secado p	or atomi	zación.		

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	15,8257	1	15,8257	0,49	0,5117
B: Polímero	261,078	1	261,078	8,02	0,0299
AA	3,53658	1	3,53658	0,11	0,7529
AB	275,56	1	275,56	8,47	0,0270
BB	8,35618	1	8,35618	0,26	0,6304
Lack-of-fit	96,0594	3	32,0198	0,97	0,5103
Total error	195,267	6	32,5445		
Total (corr.)	759,609	11			

R-squared = 74,2938 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 52,8719 percent

Standard Error of Est. = 5,70478

Mean absolute error = 3,79315

Durbin-Watson statistic = 1,87517 (P=0,4057)

<u>`</u>	0	· · 1	1			
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	
A: Temperatura	175,278	1	175,278	0,45	0,5287	
B: Polímero	5447,7	1	5447,7	13,89	0,0098	
AA	673,055	1	673,055	1,72	0,2381	
AB	2176,22	1	2176,22	5,55	0,0566	
BB	45,9729	1	45,9729	0,12	0,7437	
Lack-of-fit	1266,47	3	422,157	1,17	0,4514	
Total error	2353,19	6	392,199			
Total (corr.)	10871,0	11				

Tabla 47. Análisis de varianza de la EE de lignanos para el diseño composito central de la encapsulación del orujo con inulina (O-In), por secado por atomización.

R-squared = 78,3534 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 60,3146 percent

Standard Error of Est. = 19,804

Mean absolute error = 11,9575

Durbin-Watson statistic = 1,83344 (P=0,3772)

Lag 1 residual autocorrelation = 0,039919

Tabla 48. Análisis de varianza del rendimiento para el diseño composito central de la encapsulación del orujo con inulina (O-In), por secado por atomización.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	278,951	1	278,951	59,66	0,0002
B: Polímero	1374,47	1	1374,47	293,97	0,0000
AA	0,000111242	1	0,000111242	0,00	0,9963
AB	201,64	1	201,64	43,13	0,0006
BB	366,639	1	366,639	78,42	0,0001
Lack-of-fit	23,106	3	7,70199	4,67	0,1189
Total error	28,0535	6	4,67558		
Total (corr.)	2249,76	11			

R-squared = 98,753 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 97,7139 percent

Standard Error of Est. = 2,16231

Mean absolute error = 1,28476

Durbin-Watson statistic = 2,61293 (P=0,8633)

Anexo 10. Listado de compuestos fenólicos presentes en el alpechín filtrado elaborado bajo condiciones óptimas.

Tabla 49. Listado de compuestos, fórmula molecular, tiempo de retención (Tr) y masa de compuestos fenólicos identificados en alpechín-filtrado.

		Fórmula		
Peak	Compuesto propuesto	molecular	Tr (min)	m/z
1	Ácido quínico	$C_7 H_{12} O_6$	3,3	191,0561
2	Hidroxitirosol oxidado	$C_8H_8O_3$	6,0	151,0401
3	Hidroxitirosol-hexosa o isómero a	$C_{14}H_{20}O_8$	6,3	315,1085
4	Desconocido no identificado	$C_{14}H_{22}O_9$	6,7	317,1242
5	Desconocido no identificado	$C_{13}H_{24}O_{16}$	7,2	435.0970
6	Desconocido no identificado	$C_{22}H_{34}O_{16}$	7,4	553,1774
7	Hidroxitirosol-hexosa o isómero b	$C_{14}H_{20}O_8$	7,9	315,1085
8	Desconocido no identificado	$C_{14}H_{22}O_8$	8,1	317,1242
9	Desconocido no identificado	$C_{14}H_{24}O_8$	8,4	319,1404
10	Desconocido no identificado	$C_{21}H_{36}O_{15}$	8,6	527,1318
11	Desconocido no identificado	$C_{21}H_{38}O_{15}$	8,8	529,2138
12	Desconocido no identificado	$C_{11}H_{20}O_9$	9,1	295,1035
13	Desconocido no identificado	$C_{18}H_{26}O_{12}$	9,1	433,1351
14	Desconocido no identificado	$C_{14}H_{20}O_8$	10,5	315,1085
15	Desconocido no identificado	$C_{16}H_{24}O_{10}$	10,8	375,1308
16	Desconocido no identificado	$C_{15}H_{26}O_9$	10,8	349,1504
17	Derivado secoiridoide 1	$C_{17}H_{28}O_{11}$	11,2	407,1604
18	Forma dialdehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$C_9H_{12}O_4$	11,9	183,0663
19	Desconocido no identificado	$C_8H_{18}O_{12}$	13,5	305,0700
20	Oleoside/secologanosido 2	$C_{16}H_{22}O_{11}$	14,2	389,1089
21	Desconocido no identificado	$C_{23}H_{32}O_{12}$	15,2	499,1821
22	Desconocido no identificado	$C_{23}H_{32}O_{12}$	15,5	499,1821
23	Oleuropeína aglicona	$C_{16}H_{26}O_{10}$	16,4	377,1453
24	Desconocido no identificado	$C_{19}H_{28}O_{10}$	17,4	415,1610
25	Demetil oleuropeína	$C_{24}H_{30}O_{13}$	17,7	525,1614
26	Verbascosido	$C_{29}H_{36}O_{15}$	17,9	623,1981
27	Forma aldehídica de descarboximetil de ácido elenólico	$C_{10}H_{16}O_5$	18,2	215,0925
28	Desconocido no identificado	$C_{23}H_{34}O_{11}$	18,7	485,2028
29	Luteolina-7-O-rutinosido	$C_{27}H_{30}O_{15}$	19,5	593,1510
30	Decarboximetil oleuropeína aglicona	$C_{17}H_{20}O_{6}$	21,4	319,1187
31	Desconocido no identificado	$C_{18}H_{38}O_{19}$	22,9	557,1929
32	Desconocido no identificado	$C_{18}H_{32}O_{19}$	23,5	551,1406
33	Desconocido no identificado	$C_{31}H_{40}O_{14}$	23,9	635,2345
34	Ligustrósido isómero 1	$C_{25}H_{32}O_{12}$	25,5	523,1821
35	p-cumaril-6'-secologanosido	$C_{25}H_{28}O_{13}$	26,4	535,1457
36	Ligustrósido isómero 2	$C_{25}H_{32}O_{12}$	28,0	523,1821
37	Naringenina*	$C_{15}H_{12}O_5$	29,0	271,0893
38	Luteolina	$C_{15}H_{10}O_{6}$	30,1	285,0405

(*) Estándar interno

Anexo 11. Análisis estadístico del diseño de encapsulación del alpechín con maltodextrina (Al-MD), por secado por atomización.

de la cheupsulación del alpecian con matodexama (11 MD), por seculo por acomización.						
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	
A: Temperatura	15,9466	1	15,9466	3,25	0,1216	
B: Polímero	641,006	1	641,006	130,54	0,0000	
AA	25,9968	1	25,9968	5,29	0,0610	
AB	9,9225	1	9,9225	2,02	0,2050	
BB	242,234	1	242,234	49,33	0,0004	
Lack-of-fit	28,652	3	9,55066	35,37	0,0077	
Total error	29,462	6	4,91033			
Total (corr.)	964,569	11				

Tabla 50. Análisis de varianza de la EE de ácido quínico para el diseño composito central de la encapsulación del alpechín con maltodextrina (Al-MD), por secado por atomización.

R-squared = 96,9456 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 94,4002 percent

Standard Error of Est. = 2,21593

Mean absolute error = 1,19842

Durbin-Watson statistic = 1,72839 (P=0,3082)

Lag 1 residual autocorrelation = 0,122127

Tabla 51. Análisis de varianza	de la EE de flavonoides	para el diseño	composito central de
la encapsulación del alpechín c	on maltodextrina (Al-MD), por secado p	or atomización.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	18,271	1	18,271	7,94	0,0305
B: Polímero	294,248	1	294,248	127,85	0,0000
AA	38,1142	1	38,1142	16,56	0,0066
AB	22,5625	1	22,5625	9,80	0,0203
BB	26,8709	1	26,8709	11,67	0,0142
Lack-of-fit	6,78206	3	2,26069	0,97	0,5113
Total error	13,8096	6	2,30159		
Total (corr.)	413,877	11			

R-squared = 96,6634 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 93,8828 percent

Standard Error of Est. = 1,5171

Mean absolute error = 1,00276

Durbin-Watson statistic = 2,88793 (P=0,9498)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,580975

Tabla 52. Análisis de varianza de la EE de secoiridoides para el diseño composito central de la encapsulación del alpechín con maltodextrina (Al-MD), por secado por atomización.

1	1			1	
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	12,7022	1	12,7022	3,25	0,1213
B: Polímero	109,584	1	109,584	28,07	0,0018
AA	1,96137	1	1,96137	0,50	0,5050
AB	25,0	1	25,0	6,40	0,0446
BB	12,1003	1	12,1003	3,10	0,1288
Lack-of-fit	13,8109	3	4,60363	1,44	0,3864
Total error	23,4209	6	3,90348		
Total (corr.)	184,769	11			

R-squared = 87,3242 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 76,7611 percent

Standard Error of Est. = 1,97572

Mean absolute error = 1,26972

Durbin-Watson statistic = 1,64208 (P=0,2556)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
B: Polímero	0,171173	1	0,171173	2,85	0,1421
AA	0,0629784	1	0,0629784	1,05	0,3450
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
BB	0,148565	1	0,148565	2,48	0,1665
Lack-of-fit	0,359783	3	0,119928		
Total error	0,359783	6	0,0599638		
Total (corr.)	0,7425	11			
R-squared = 51,5444 pe	ercent				
R-squared (adjusted for	d.f.) = 11,1647 percent				

Tabla 53. Análisis de varianza de la EE de verbascósidos para el diseño composito central de la encapsulación del alpechín con maltodextrina (Al-MD), por secado por atomización.

Standard Error of Est. = 0,244875

Mean absolute error = 0,131521

Durbin-Watson statistic = 1,99955 (P=0,4927)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,223818

Tabla 54. Análisis de varianza del rendimiento para el diseño composito central de la encapsulación del alpechín con maltodextrina (Al-MD), por secado por atomización.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0,0212835	1	0,0212835	0,00	0,9683
B: Polímero	46,7084	1	46,7084	3,76	0,1006
AA	10,0844	1	10,0844	0,81	0,4023
AB	0,5625	1	0,5625	0,05	0,8385
BB	204,203	1	204,203	16,44	0,0067
Lack-of-fit	71,2774	3	23,7591	21,93	0,0153
Total error	74,5274	6	12,4212		
Total (corr.)	336,107	11			

R-squared = 77,8263 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 59,3482 percent

Standard Error of Est. = 3,52438

Mean absolute error = 1.87633

Durbin-Watson statistic = 1,71755 (P=0,3014)

Anexo 12. Análisis estadístico del diseño de encapsulación del alpechín con inulina (Al-In), por secado por atomización.

Tabla 55.	. Análisis	de vari	anza de l	a EE de	ácido	quínico	para el	diseño	composito	central
de la enca	psulación	del alp	echín cor	n inulina	(Al-Ir	i), por se	ecado p	or atomi	ización.	

de la cheupsulación del apecinin con manna (11 m), por secudo por atomización.							
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P		
A:Temperatura	39,3483	1	39,3483	9,18	0,0231		
B:Polímero	1018,81	1	1018,81	237,66	0,0000		
AA	12,8941	1	12,8941	3,01	0,1336		
AB	37,8225	1	37,8225	8,82	0,0249		
BB	428,606	1	428,606	99,98	0,0001		
Lack-of-fit	24,6708	3	8,22359	23,50	0,0138		
Total error	25,7208	6	4,28679				
Total (corr.)	1563,2	11					

R-squared = 98,3546 percent

R-squared = 96,9340 percent R-squared (adjusted for d.f.) = 96,9835 percent Standard Error of Est. = 2,07046 Mean absolute error = 1,06598 Durbin-Watson statistic = 1,91101 (P=0,4304)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,0942858

Tabla 56. Análisis	de varianza	de la EE de	secoiridoides	para el c	liseño composito	central
de la encapsulación	del alpechír	o con inulina	(Al-In), por se	ecado por	r atomización.	

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	29,2191	1	29,2191	12,50	0,0123
B: Polímero	6,72333	1	6,72333	2,88	0,1409
AA	7,00227	1	7,00227	2,99	0,1343
AB	12,96	1	12,96	5,54	0,0567
BB	2,98232	1	2,98232	1,28	0,3019
Lack-of-fit	13,2021	3	4,4007	15,95	0,0239
Total error	14,0296	6	2,33827		
Total (corr.)	72,9167	11			

R-squared = 80,7594 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 64,7256 percent

Standard Error of Est. = 1,52914

Mean absolute error = 0,865964

Durbin-Watson statistic = 2,38401 (P=0,7482)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,294721

Tabla 57. Análisis de var	rianza de la EE de verb	ascósidos para el di	iseño composito central
de la encapsulación del al	pechín con inulina (Al-	In), por secado por	atomización.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	124,192	1	124,192	12,35	0,0126
B: Polímero	18,1705	1	18,1705	1,81	0,2275
AA	56,9446	1	56,9446	5,66	0,0548
AB	7,84	1	7,84	0,78	0,4113
BB	10,7097	1	10,7097	1,06	0,3419
Lack-of-fit	59,4461	3	19,8154	66,05	0,0031
Total error	60,3461	6	10,0577		
Total (corr.)	278,202	11			

R-squared = 78,3086 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 60,2324 percent

Standard Error of Est. = 3,17138

Mean absolute error = 1,7348

Durbin-Watson statistic = 1,5954 (P=0,2291)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	229,372	1	229,372	19,89	0,0043
B: Polímero	76,1357	1	76,1357	6,60	0,0424
AA	60,9613	1	60,9613	5,29	0,0612
AB	67,24	1	67,24	5,83	0,0522
BB	24,0946	1	24,0946	2,09	0,1984
Lack-of-fit	61,3784	3	20,4595	7,86	0,0621
Total error	69,1859	6	11,531		
Total (corr.)	526,99	11			

Tabla 58. Análisis de varianza de la EE de flavonoides para el diseño composito central de la encapsulación del alpechín con inulina (Al-In), por secado por atomización.

R-squared = 86,8715 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 75,9311 percent

Standard Error of Est. = 3,39573

Mean absolute error = 1,92354

Durbin-Watson statistic = 2,71328 (P=0,9013)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,3838

Tabla 59. Análisis de varianza del rendimiento para el diseño composito central de la encapsulación del alpechín con inulina (Al-In), por secado por atomización.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	11,5153	1	11,5153	0,31	0,5991
B: Polímero	671,211	1	671,211	17,94	0,0055
AA	6,61815	1	6,61815	0,18	0,6887
AB	40,3225	1	40,3225	1,08	0,3392
BB	120,717	1	120,717	3,23	0,1225
Lack-of-fit	217,058	3	72,3526	29,46	0,0100
Total error	224,425	6	37,4042		
Total (corr.)	1074,81	11			

R-squared = 79,1195 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 61,7191 percent

Standard Error of Est. = 6,1159

Mean absolute error = 3,26595

Durbin-Watson statistic = 2,12043 (P=0,5777)