



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

LIBERACIÓN DE EPICATEQUINA EN SISTEMAS HIDROFÓBICOS DESDE MICROPARTÍCULAS CON INULINA

Tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos

VALENTINA ANDREA CAUCOTO OLIVA

PROFESOR PATROCINANTE

Dra. Paz Robert Canales

Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Universidad de Chile

Santiago, Chile

2014

DEDICATORIA

A Guacolda...

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por el apoyo incondicional que me han transmitido durante este proceso, gracias a ellos soy la mujer y futura profesional íntegra que siempre he esperado ser.

A mis hermanos, Hugo y Rodrigo por la sabiduría y cariño que me han entregado.

A Ivonne por su comprensión y apoyo en estos años de convivencia juntas.

A mis amigos que siempre han estado junto a mí en los momentos que más los he necesitado.

A Kattyna por ser una persona muy importante en mi vida e incondicional compañera.

A mi directora de tesis Sra. Paz Robert y a mi Co-Directora Paula García que siempre estuvieron cuando más necesité de su ayuda.

A aquellos que compartieron conmigo y fueron de vital ayuda en el laboratorio: Carla Olate, Manuel Palma, Cristina Vergara, Guibeth Morelo y Juan Carlos Moreno.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	15
1.1. Oxidación de lípidos.....	16
1.2. Antioxidantes.....	17
1.2.1. Compuestos fenólicos.....	17
1.2.2. Flavonoides.....	18
1.3. Microencapsulación.....	20
1.3.1. Secado por atomización.....	20
1.3.2. Agentes encapsulantes.....	22
1.4. Liberación controlada desde micropartículas.....	24
1.4.1. Modelo cinético de Korsmeyer & Peppas.....	24
1.4.2. Modelo cinético de Higuchi.....	25
1.4.3. Modelo cinético de Hixson-Crowell.....	25
1.5. Hipótesis.....	27
1.6. Objetivos.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. Materiales.....	28
2.2. Elaboración de micropartículas.....	28
2.2.1. Diseño experimental.....	28
2.3. Caracterización de las micropartículas.....	30
2.3.1. Epicatequina superficial.....	30
2.3.2. Epicatequina total.....	30
2.3.3. Eficiencia de encapsulación.....	31
2.3.4. Liberación de epicatequina en hexano al t_{14}	31
2.3.5. Análisis cromatográfico.....	31
2.4. Caracterización de las micropartículas del sistema E-(In-APS) obtenidas bajo condiciones óptimas.....	32
2.4.1. Morfología.....	32
2.4.2. Cinética de liberación de epicatequina en hexano y linoleato de metilo.....	32
2.4.3. Análisis de las cinéticas de liberación.....	33

2.5. Análisis Estadístico.....	33
RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
3.1. Encapsulación de epicatequina.....	34
3.1.1. Liberación de epicatequina desde micropartículas del sistema E-(In-APS).....	35
3.2. Micropartículas de epicatequina obtenidas bajo condiciones óptimas.....	36
3.3. Perfil de liberación de epicatequina en modelos hidrofóbicos.....	42
3.3.1. Perfil de liberación de epicatequina en hexano.....	42
3.3.2. Perfil de liberación de epicatequina en linoleato de metilo.....	44
CONCLUSIONES.....	47
REFERENCIAS.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variables independientes y niveles del diseño experimental Box-Behnken para la encapsulación de epicatequina con inulina y aislado proteico de soja como agente canalizante.....	29
Tabla 2. Condiciones experimentales para la elaboración de micropartículas de epicatequina con inulina y aislado proteico de soja como agente canalizante para el sistema E-(In-APS).....	30
Tabla 3. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y liberación de epicatequina (t_{14}) para la elaboración de micropartículas de epicatequina con inulina como agente encapsulante y aislado proteico de soja como agente canalizante para el sistema E-(In-APS), utilizando un diseño Box-Behnken.....	34
Tabla 4. Condiciones y caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para el sistema E-(In-APS).....	39
Tabla 5. Caracterización de las micropartículas de flavonoides con y sin agente canalizante (APS).....	40
Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos desde datos del perfil de liberación de E para los sistemas E-(In) y E-(In-APS) en hexano.....	43
Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos desde datos del perfil de liberación de E superficial para los sistemas E-(In) y E-(In-APS) en linoleato de metilo.....	45
Tabla 8. ANOVA para eficiencia de encapsulación de epicatequina por experimento...57	
Tabla 9. Pruebas de Múltiple Rangos para eficiencia por experimento.....	58
Tabla 10. ANOVA para liberación de epicatequina en hexano por experimento.....	59

Tabla 11. Pruebas de Múltiple Rangos para liberación por experimento.....	59
Tabla 12. Análisis de varianza para eficiencia de encapsulación de epicatequina.....	60
Tabla 13. Análisis de varianza para liberación de epicatequina en hexano.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones de autoxidación de ácidos grasos insaturados.....	16
Figura 2. Estructura química epicatequina.....	19
Figura 3. Equipo de secado por atomización (spray dryer).....	21
Figura 4. Estructura química inulina.....	23
Figura 5. Diseño experimental Box-Bhenken.....	29
Figura 6. Liberación de epicatequina en hexano a los 14 días de almacenamiento (t_{14}) desde micropartículas de epicatequina con inulina y APS para el sistema E-(In-APS) con respecto al porcentaje de APS.....	36
Figura 7. Diagrama de Pareto estandarizado para eficiencia de encapsulación de epicatequina.....	37
Figura 8. Gráfico obtenido mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para la eficiencia de epicatequina para el sistema E-(In-APS).....	38
Figura 9. Diagrama de Pareto estandarizado para liberación de epicatequina en hexano.....	38
Figura 10. Gráfico obtenido mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para la liberación de epicatequina para el sistema E-(In-APS).....	39
Figura 11. Microfotografía SEM para las micropartículas del sistema E-In (A) y E-(In-APS) (B) obtenidas bajo condiciones óptimas.....	41
Figura 12. Perfil de liberación de E desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en hexano a 30°C. 0% APS (♦), 2% APS (■).....	42

Figura 13. Perfil de liberación de E desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en linoleato de metilo a 30°C, 0% APS (♦), 2% APS (■).....	44
Figura 14. Gráfico de medias para eficiencia de encapsulación.....	59
Figura 15. Gráfico de medias para liberación.....	59
Figura 16. Gráfico obtenido mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para la optimización de micropartículas del sistema E-(In-APS).....	61

RESUMEN

La oxidación de lípidos es una importante causa de deterioro en la calidad de los alimentos, generando alteraciones a nivel nutricional y organoléptico. Los antioxidantes como los flavonoides se presentan como una alternativa para prevenir la oxidación lipídica. Los flavonoides presentan una baja estabilidad por efecto de factores ambientales y una solubilidad limitada en sistemas lipídicos. Sin embargo, la encapsulación de flavonoides es una tecnología que permite su protección y el control de su liberación.

Una alternativa para la obtención de las micropartículas de flavonoides es la utilización de un agente encapsulante insoluble en sistemas lipídicos y la incorporación de un agente canalizante que permita la canalización de la partícula para favorecer la liberación del flavonoide al medio lipídico.

En este contexto, el objetivo de esta tesis fue estudiar la cinética y el mecanismo de liberación de epicatequina (E) en hexano y linoleato de metilo desde micropartículas de inulina con y sin agente canalizante (APS).

Se prepararon micropartículas de epicatequina con inulina como agente encapsulante y aislado proteico de soja como agente canalizante por secado por atomización E-(In-APS). Se utilizó un diseño experimental Box-Behnken con un total de 15 experimentos. La relación epicatequina/inulina (1:20-1:50), el porcentaje de agente canalizante (0-25%) y la temperatura del aire de entrada al secador (120-160°C), se evaluaron como variables independientes. Las variables de respuesta fueron la eficiencia de encapsulación (EE) y la liberación de E al día 14 en hexano (t_{14}). La metodología de superficie respuesta (MSR) se utilizó para optimizar las variables dependientes. En las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas (1:50, 2% APS y 160°C) para el sistema E-(In-APS), se observó que un aumento en el contenido de agente encapsulante (inulina) mejoró la eficiencia de encapsulación.

Para lograr el objetivo propuesto se prepararon micropartículas de epicatequina bajo condiciones óptimas, sin agente canalizante (E-In) y con agente canalizante (E-(In-

APS)). Ambos sistemas de micropartículas se almacenaron en estufa a 30°C para estudiar la liberación de E en hexano y linoleato de metilo como medio de disolución por un período de 145 y 90 días, respectivamente. Los datos de liberación se ajustaron a los modelos de Peppas, Higuchi y Hixson.Crowell.

Para ambos sistemas estudiados E-In y E-(In-APS) se observó un comportamiento bifásico en el gráfico del perfil de liberación de E en hexano; en cambio en LM sólo hubo liberación de los flavonoides superficiales. La baja liberación de E en hexano y linoleato de metilo se puede atribuir a la baja solubilidad de epicatequina en el medio y/o a la alta interacción epicatequina-inulina, debido a que ambos parámetros pueden influenciar la difusión de E. El mecanismo de liberación de E en hexano para las micropartículas sin agente canalizante (mayor a 0,5) correspondió a una difusión no-Fickiana o anómala donde diferentes mecanismos tales como difusión y relajación de las cadenas del polímero pueden ocurrir de forma simultánea. En contraste, en las micropartículas con agente canalizante, el mecanismo de liberación de epicatequina correspondió a un mecanismo de difusión Fickiana a favor de una gradiente de concentración. Este mismo mecanismo de liberación de E se observó en linoleato de metilo, para las micropartículas con y sin agente canalizante.

En consecuencia, los resultados obtenidos de las cinéticas de liberación desde micropartículas son fundamentales para definir su aplicación en alimentos. En este estudio, la velocidad de liberación de E fue lenta tanto en hexano como en linoleato, sugiriendo que la encapsulación de epicatequina es una técnica que se puede aplicar para mejorar la estabilidad y extender la vida útil de aceites comestibles.

SUMMARY

“Epicatechin release in hydrophobic system from inulin microparticles”

Lipids oxidation is an important cause of alteration in the food quality, leading to a loss of chemical and nutritional qualities. The antioxidants as flavonoids can be used to prevent the lipid oxidation. However, they have a low stability because of environmental factors and limited solubility in lipid systems. The encapsulation technology would allow the protection and the control release of flavonoids.

An alternative to design flavonoids microparticles with antioxidant properties in lipid medium is by encapsulating flavonoids into lipid-insoluble polymer and the incorporation of a channelizing agent that allow the gradual release of flavonoids in bulk lipid.

In this context, the object of this research was to study the kinetic and the mechanism of epicatechin (E) release in hexane and methyl linoleate (ML) from microparticles with inulin and with and without channelizing agent (SPI).

Microparticles of epicatechin with inulin as encapsulating agent and soy protein isolate as channelizing agent were obtained by spray drying E-(In-SPI). A Box-Behnken experimental design was used, with 15 runs. The E/inulin ratio (1:20-1:50), the percentage of channelizing agent (0-25%) and the inlet air temperature (120-160°C), were evaluated as independent variables. The response variables were the encapsulation efficiency and the E release in hexane at 14 days of storage (t_{14}). The response superficial methodology (RSM) was used to optimize the dependent variables. In the microparticles obtained under optimum conditions (1:50, 2% SPI and 160°C) for the system E-(In-SPI), an increase in encapsulating agent (inulin) content improved the encapsulation efficiency.

In order to achieve the proposed objective microparticles of epicatechin were prepared under optimal conditions, without channelizing agent (E-In) and with channelizing agent (E-(In-SPI)). Both systems of microparticles were stored in an oven at 30°C to study the

E release in hexane and methyl linoleate by 145 and 90 days, respectively. The data were fitted to Peppas, Higuchi and Hixson-Crowell mathematical models.

For both, E-In and E-(In-SPI) systems, a biphasic behavior was observed in the release profile graph of E in hexane. On the other hand, in ML there was only superficial flavonoid release. The low release of E in hexane and methyl linoleate can be attributed to the low solubility of epicatechin in the medium and/or to the high epicatechin-inulin interaction, due to that both parameters could influence the diffusion of E. The release mechanism of E in hexane for the microparticles without channelizing agent agreed with non-Fickian or anomalous diffusion where different mechanism such as diffusion and relaxation of the chains of the polymer can occur at the same time. In contrast, in the microparticles with channelizing agent, the release mechanism of epicatechin corresponded to a Fickian diffusion. This same release mechanism of E was observed in methyl linoleate, for the microparticles with and without channelizing agent.

Consequently, the results obtained from the release kinetic from microparticles are fundamental to define their application in foods. In this study, the release rate constant of E was slow, in both hexane and methyl linoleate, suggesting that the epicatechin encapsulation is a technique that can be applied to improve the stability and extend the shelf life of edible oils.

ABREVIATURAS

E: Epicatequina

In: Inulina

APS: Aislado proteico de soja

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

MSR: Metodología de superficie respuesta

LIH: Liberación en hexano

Es: Epicatequina superficial

EE: Eficiencia de encapsulación

ROO[•]: Radical peroxil

R₁H: Ácido graso insaturado

R₁[•]: Radical alquil

SEM: Microscopía electrónica de barrido

INTRODUCCIÓN

La oxidación de lípidos es la segunda causa de deterioro de los alimentos después de la acción de los microorganismos. Tiene como consecuencia alteraciones en las propiedades organolépticas y nutricionales del alimento, como también en la formación de sustancias potencialmente nocivas para la salud de los consumidores (Shahidi y Zhong, 2010). Como consecuencia de la oxidación lipídica los alimentos pueden sufrir el desarrollo de rancidez, pérdida de sabor de ciertos compuestos, polimerización y la disminución de la vida útil y valor nutricional (Akoh y Min, 2008; Min y Boff, 2002).

Una alternativa para retardar la oxidación lipídica es el uso de antioxidantes sintéticos o naturales. Los flavonoides son un amplio grupo de compuestos fenólicos naturales que pueden actuar como antioxidantes en sistemas lipídicos (Huber *et al.*, 2009; Naz *et al.*, 2008). Sin embargo, tienen una limitada solubilidad y baja estabilidad por efecto de factores ambientales (oxígeno, luz, entre otros) y/o altas temperaturas, siendo necesaria la adición, en algunos casos, de altas cantidades de ellos para obtener los efectos deseados.

Desde de este punto de vista, la microencapsulación se presenta como una tecnología que permitiría mejorar la estabilidad del compuesto activo, extender su vida útil, preservar sus propiedades funcionales, facilitar su manipulación cuando son añadidos a una matriz alimenticia y liberar los compuestos activos en forma controlada (De Voos *et al.*, 2010). En este contexto, estudios sobre liberación de flavonoides encapsulados en materias grasas son escasos (Wu *et al.*, 2006a; Wu *et al.*, 2006b; Wu *et al.*, 2005; Deng y Yu, 2004), pero son fundamentales para definir su real aplicación, por lo que este estudio se enfocará en ese tópico.

El secado por atomización es una de las técnicas de encapsulación más utilizadas en la industria alimentaria, corresponde a una operación unitaria en que un producto líquido es atomizado hasta obtener un polvo, mediante un flujo de aire caliente (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

En este contexto, este estudio se enfoca en la elaboración de micropartículas de epicatequina mediante secado por atomización. Se utilizará inulina como agente encapsulante y aislado proteico de soja como agente canalizante, el cual permitirá la formación de canales en la micropartícula para liberar en forma controlada la epicatequina en sistemas hidrofóbicos (hexano y linoleato de metilo).

1.1. Oxidación de lípidos

La oxidación de lípidos es la segunda causa de deterioro de los alimentos después de la acción de los microorganismos. La autoxidación de ácidos grasos insaturados es una reacción en cadena que incluye los pasos de iniciación, propagación y término (Figura 1). En la iniciación, un iniciador (luz, metales u otro) extrae el átomo de hidrógeno desde el ácido graso o acilglicerol insaturado (R_1H) produciendo un radical alquil (R_1^\bullet) que reaccionará con el oxígeno formando un radical peroxil (R_1OO^\bullet). A su vez, el radical peroxil puede extraer el hidrógeno desde otra molécula de un lípido insaturado propagando la oxidación. En presencia de metales o bajo condiciones de alta temperatura los hidroperóxidos son rápidamente descompuestos formando aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres y otros compuestos secundarios (Choe y Min, 2007; Bravo, 1998).

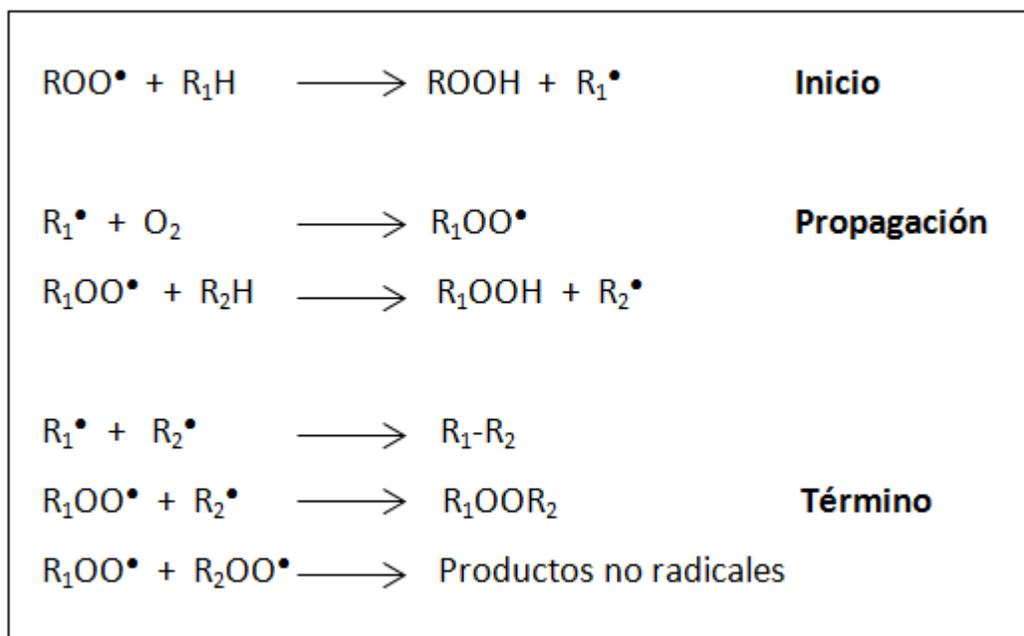


Figura 1. Reacciones de autoxidación de ácidos grasos insaturados.

La oxidación de lípidos tiene como consecuencia alteraciones del aroma y sabor (enranciamiento), pérdida de nutrientes y la formación de sustancias potencialmente nocivas. Es una reacción natural favorecida por muchos factores tales como: la temperatura, contacto con el oxígeno y/o luz, presencia de ácidos grasos insaturados, ausencia de compuestos antioxidantes (tocoles, polifenoles y pigmentos carotenoides entre otros), presencia de ácidos grasos libres, metales, pigmentos y compuestos oxidados térmicamente (Choe y Min, 2007).

Para retardar el deterioro oxidativo se ha recurrido a distintos mecanismos, siendo el uso de antioxidantes la herramienta más ampliamente utilizada por la industria de los alimentos (Yanishlieva *et al.*, 2006).

1.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas naturales o sintéticas, y se pueden definir como “cualquier sustancia que sea capaz de retardar el proceso de rancidez en alimentos y otro tipo de deterioro en el sabor debido a la oxidación, extendiendo el periodo de inducción” (Yanishlieva y Marinova, 2001).

Entre los antioxidantes sintéticos más comunes se encuentran el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), ter-butil-hidroquinona (TBHQ) y propil galato (PG), siendo su bajo costo una de sus principales ventajas. Sin embargo, generalmente son volátiles y fáciles de descomponer a altas temperaturas (Marmesat *et al.*, 2010), y su consumo se ha asociado con riesgos en la salud humana (Thompson y Moldeus, 1988; Siddhuraju y Becker, 2003). En este contexto, los antioxidantes de origen natural, sin efectos citotóxicos ni genotóxicos son una alternativa al uso de antioxidantes sintéticos (Yu *et al.*, 2005; Fuchs, 1998; Ito *et al.*, 1983). Entre los principales grupos de antioxidantes naturales se encuentran los compuestos fenólicos.

1.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Presentan una estructura compuesta por uno o varios anillos de benceno con uno o más grupos hidroxilos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

El término compuestos fenólicos abarca más de 8000 compuestos, los cuales poseen una característica estructural común: un fenol (un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo) que pueden ser sintetizados por la vía del ácido shikímico y/o del mevalonato (Bravo, 1998). De acuerdo a su estructura química (número de anillos fenólicos y elementos estructurales unidos a los anillos) pueden dividirse en diferentes clases encontrándose, desde moléculas simples como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos siendo, los flavonoides el grupo más importante (Manach *et al.*, 2004).

1.2.2. Flavonoides

Los flavonoides son sustancias fenólicas de bajo peso molecular, sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios y distribuidos en las hojas, semillas, corteza y en las flores. Derivan de la benzo- γ -pirona y comparten un esqueleto común de difenilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos fenil (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Pueden actuar como antioxidantes en sistemas lipídicos (Huber *et al.*, 2009; Naz *et al.*, 2008) al donar un átomo de hidrógeno al radical peroxil. El radical fenoxil formado es estabilizado por resonancia y puede también reaccionar con otros radicales libres para formar moléculas neutras. La actividad antioxidante de los flavonoides depende de sus características estructurales (Bors *et al.*, 1990) y del medio donde se encuentre el flavonoide.

Los flavonoides se encuentran comúnmente como *o*-glicósidos en la posición C_3 del anillo C y con menor frecuencia en la posición C_7 del anillo A, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Otros azúcares que se han encontrado glicosilando estas posiciones en los flavonoides son la D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y el ácido D-glucurónico. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo (Cook y Samman, 1996). El grupo de los flavonoides incluye flavonoles, flavonas, flavanoles, isoflavonas, flavanonas y antocianos (Manach *et al.*, 2004).

El flavonoide a utilizar en este estudio corresponde a la epicatequina (Figura 2). Se seleccionó en base a su estructura química y capacidad antioxidante. La molécula neutra presenta una estructura no plana, distorsionada, presenta un bajo potencial de

reducción, alta reactividad, un alto potencial antioxidante y propiedades biológicas como su capacidad para reducir la alergenicidad en humanos, entre otras (Mendoza-Wilson y Glossman-Mitnik, 2006; Kiewning *et al*, 2013).

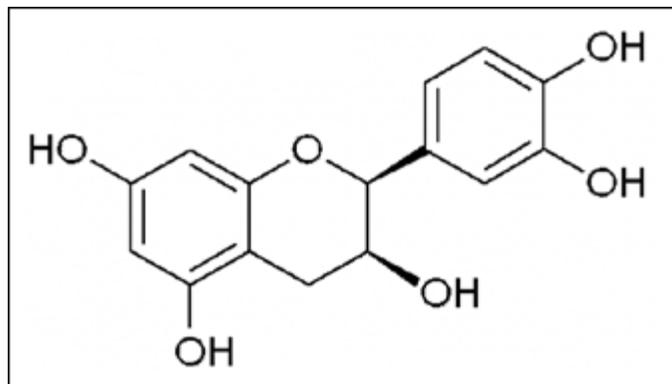


Figura 2. Estructura química epicatequina.

Se ha estudiado el efecto de la adición de algunos flavonoides libres en matrices lipídicas como metil linoleato, aceite de palma, aceite de canola, aceite de linaza, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceites marinos, utilizando principalmente quercetina, miricetina, morina, (+)catequina, (-)epigallocatequina, (-)epicatequina y kaempferol, entre otros (Pedrielli y Skibsted, 2002; Pekkarinen *et al.*, 1999; Huber *et al.*, 2009; Naz *et al.*, 2008; Tsimogiannis y Oreopoulou, 2007; Russin *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008; Wanasundara y Shahidi, 1996; Wanasundara y Shahidi, 1994; Nieto *et al.*, 1993; Pereira y Das, 1990; Wanasundara y Shahidi, 1998). Sin embargo, los flavonoides presentan una baja estabilidad por efecto de factores ambientales (oxígeno, luz y temperatura entre otros) y una limitada solubilidad en medios hidrofóbicos o lipofílicos, siendo necesario la adición en algunos casos de altas cantidades de ellos para obtener los efectos deseados.

Por esta razón, la encapsulación de flavonoides se presenta como una herramienta para la protección y el control de la liberación de flavonoides en una matriz lipídica, permitiendo extender la vida útil de ésta y disminuir la utilización inefectiva del antioxidante natural. No obstante, se han realizado pocos estudios sobre el efecto de la microencapsulación de flavonoides (polifenoles del té, quercetina) en la estabilidad oxidativa de aceites (Deng y Yu, 2004; Wu *et al.*, 2005).

1.3. Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica mediante la cual compuestos activos sólidos, líquidos o gaseosos son introducidos en una matriz o sistema pared de naturaleza biopolimérica, con el fin de proteger los activos del medio ambiente, de su interacción con otros componentes del alimento, o bien para controlar su liberación (Yáñez-Fernández *et al.*, 2002). Las micropartículas formadas tienen un amplio rango de tamaño que va desde 0,2 a 5000 μm con múltiples formas dependiendo del material y métodos utilizados para su obtención (Shaikh *et al.*, 2006).

Entre las ventajas de la microencapsulación se encuentran: (1) protección del activo de factores externos (temperatura, humedad, oxígeno y luz), (2) modificación de las características físicas del material para facilitar su uso, (3) control de la liberación del componente activo y (4) enmascarar aromas o sabores (Desai y Park, 2005).

La encapsulación de compuestos activos puede realizarse por diferentes métodos tales como: secado por atomización, extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado, coacervación, liposomas, inclusión molecular y polimerización interfacial entre otros (Shahidi y Han, 1993; Gibbs *et al.*, 1999; Gouin, 2004; Desai y Park, 2005).

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

1.3.1. Secado por atomización

El secado por atomización es la técnica de microencapsulación más utilizada en la industria de alimentos para encapsular compuestos activos (aromas, lípidos, vitaminas y carotenoides entre otros), de forma económica, simple y continua (Su *et al.*, 2008; Desai y Park, 2005; Ré, 1998). En el proceso, un producto líquido es transformado en un polvo, obteniéndose partículas con baja actividad de agua (Desai y Park, 2005).

En el secado por atomización (Figura 3), un fluido (solución, emulsión o dispersión) (Murugesan y Orsat, 2011) es atomizado en forma de pequeñas gotas en un gas (generalmente aire) a alta temperatura, lo cual promueve una rápida evaporación del

solvente (agua). Las partículas secas son separadas desde la zona de aire caliente a una de menor temperatura y finalmente recolectadas (Gibbs *et al.*, 1999; Desai y Park, 2005).



Figura 3. Equipo de secado por atomización (spray dryer).

Mediante esta técnica de encapsulación, la morfología de las micropartículas obtenidas es generalmente esférica con un tamaño promedio entre 10-50 μm , dependiendo del fluido de alimentación y de las condiciones de operación (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Sin embargo, este método se considera una técnica de inmovilización más que una tecnología de encapsulación verdadera, ya que parte del compuesto activo puede quedar expuesto superficialmente sobre la micropartícula (De Vos *et al.*, 2010).

Se han reportado varios estudios acerca de la encapsulación de compuestos fenólicos por secado por atomización tales como: antocianinas de zanahorias negras con maltodextrinas (Ersus y Yurdagel, 2007); procianidinas de uva con maltodextrina y goma arábica (Zhang *et al.*, 2007); polifenoles de extracto de hojas de olivo con quitosano (Kosaraju *et al.*, 2008); extracto de soja con almidón (Georgetti *et al.*, 2008), extracto de manzana con caseinato de sodio y lecitina de soja (Kosaraju *et al.*, 2008); pulpa de *Opuntia ficus indica* con maltodextrina e inulina (Saéñz *et al.*, 2009); jugo de granada con aislado de proteína de soja y maltodextrina (Robert *et al.*, 2010); naringenina y

quercetina con ftalato acetato de celulosa y agentes surfactantes como potenciadores de la velocidad de disolución (Sansone *et al.*, 2011). Quercetina y vainillina utilizando 4 polímeros diferentes (alginato de sodio, metil- β -ciclodextrina (M β CD), hidroxipropil-metil celulosa (HPMC), e inulina) (Sun-Waterhouse, 2012); polifenoles del orujo de cereza agria utilizando goma arábica y maltodextrina (Cilek *et al.*, 2012); nanopartículas de quercetina y catequina (Pool *et al.*, 2012); y por último mangiferina (polifenol) de mango con pectina y quitosano (Souza *et al.*, 2013).

La mayoría de estos estudios se han dirigido principalmente a la protección de los polifenoles frente a condiciones ambientales (luz, oxígeno, temperatura y agua), evitando la oxidación y/o aumentando la vida útil. Otros se enfocan en la liberación dirigida a un lugar específico del organismo, evitando su degradación en el tracto gastrointestinal para mejorar su biodisponibilidad. Sin embargo, existen pocos estudios sobre liberación de polifenoles desde micropartículas en alimentos, especialmente en matrices hidrofóbicas como grasas y aceites (Deng y Yu, 2004; Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006a; Wu *et al.*, 2006b).

1.3.2. Agentes encapsulantes

Dependiendo del compuesto activo a encapsular y de las características deseadas en el producto final, los agentes encapsulantes se pueden seleccionar de una gran variedad de polímeros naturales y sintéticos. Dado que la mayoría de los procesos de secado por atomización en la industria alimentaria, se realizan a partir de formulaciones que incluyen una alimentación acuosa, el material encapsulante también debe ser soluble en agua a un nivel aceptable (Gouin, 2004). Además, el material encapsulante debe poseer buenas características formadoras de film, propiedades emulsificantes cuando se encapsulan compuestos hidrofóbicos y una baja viscosidad a altas concentraciones (Reineccius, 1988).

Algunos de los agentes encapsulantes utilizados habitualmente en encapsulación mediante secado por atomización incluyen, almidón, maltodextrinas, goma arábica, alginato, carboximetilcelulosa, goma guar, caseinato de sodio, proteínas del suero de leche y aislado proteico de soja entre otros (Gouin, 2004).

En este estudio se seleccionó inulina (In) como agente encapsulante. La inulina (Figura 4) es un fructooligosacárido (FOS), obtenido de la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*), compuesto por unidades de fructosa con enlaces β -(2-1) y es ligeramente ramificado (1-5%) (Stevens *et al.*, 2001). El interés por la inulina radica en sus propiedades prebióticas, dadas por su capacidad selectiva de estimular el crecimiento de un grupo de bacterias en el colon (bifidobacterias y lactobacillus). Entre otras propiedades beneficiosas a la salud, se pueden mencionar: el refuerzo de las funciones inmunológicas (frente cáncer o tumores), el aumento de la biodisponibilidad de minerales (calcio), la mejora del metabolismo de las grasas y de la respuesta glicémica (Madrigal y Sangronis, 2007).

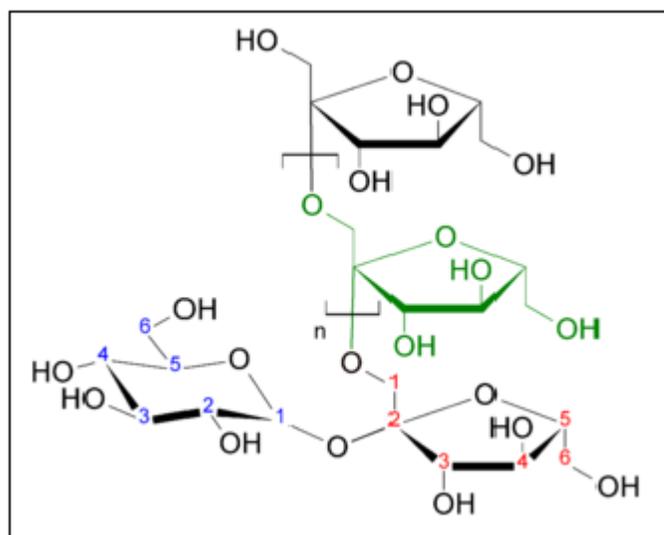


Figura 4. Estructura química inulina.

Un método para controlar la liberación de flavonoides desde micropartículas en sistemas lipídicos sería la encapsulación de flavonoides en un polímero insoluble en lípidos, que se comporte como una matriz inerte (inulina). Para lograr la liberación deseada de flavonoides desde las micropartículas en el sistema lipídico se puede añadir un polímero que actúe como agente canalizante, el cual permitiría la formación de canales dentro de la matriz de la micropartícula, facilitando su liberación (Song *et al.*, 2005). En este trabajo, se utilizó aislado proteico de soja (APS) como agente canalizante. El APS es una proteína vegetal de bajo costo, no tóxica, biocompatible y

biodegradable. Además presenta buenas propiedades gelificante, emulsificante, capacidad para absorber grasa y propiedades de unión al agua (Nesterenko *et al.*, 2012). Este tipo de proteína es ampliamente utilizada en la industria de alimentos, en especial por su interacción con las grasas, ya que promueve la absorción y retención de grasa, sin alterar sus características organolépticas (Cheftel *et al.*, 1989).

1.4. Liberación controlada desde micropartículas

La liberación del agente activo desde una micropartícula a un determinado medio puede producirse en forma inmediata o controlada. En el primer caso, la micropartícula al entrar en contacto con el medio de disolución pierde su integridad por acción de la temperatura, pH u otros factores, cediendo el compuesto activo rápidamente. En cambio la liberación controlada ocurre cuando los activos son liberados desde las micropartículas en un sitio y/o tiempo determinado a velocidades específicas (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995). En el área de alimentos, los mecanismos propuestos para la cesión de compuestos activos desde micropartículas son: difusión, hinchamiento, biodegradación (erosión) y presión osmótica. En la práctica, no es común encontrar un único sistema de liberación, sino más bien, una combinación de estos mecanismos (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995).

Es importante considerar que el mecanismo y la cinética de liberación del activo desde la micropartícula depende de la naturaleza del activo, del agente encapsulante, y del medio de disolución (Kou *et al.*, 1988; Brannon-Peppas y Peppas 1989; Gehrke y Cussler 1989; Bae *et al.*, 1991; Ramos *et al.*, 2000).

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

1.4.1. Modelo cinético de Korsmeyer & Peppas

La ecuación de Peppas (Ecuación 1) describe mecanismos de liberación que siguen un mecanismo de difusión Fickiana ó difusión anómala o no Fickiana, generalmente por hinchamiento del polímero (Siepmann y Peppas, 2001; Peppas y Sahlin, 1986).

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

Donde M_t es la cantidad de compuesto activo liberado en el tiempo t , M_∞ es la cantidad de compuesto activo liberado al tiempo infinito y k es la constante de velocidad de liberación. El parámetro n indica el mecanismo de liberación del activo.

Cuando $n = 0,5$ el agente activo es liberado por difusión Fickiana (modelo de Higuchi); valores entre $0,5 < n < 1,0$ se asocian a un mecanismo de difusión no Fickiana (anómalo), que está dominado por procesos de difusión y relajación de las cadenas poliméricas; cuando $n = 1$ se trata de un caso límite de transporte no Fickiano, denominado "Transporte caso II", controlado por la relajación de las cadenas del polímero (Siepmann y Peppas, 2001).

1.4.2. Modelo cinético de Higuchi

Explica la liberación del activo controlada por un proceso de difusión Fickiana a favor de una gradiente de concentración (Ecuación 2). Este modelo ajusta bien cuando el hinchamiento y la erosión son despreciables (Higuchi, 1963; Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995).

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

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

1.4.3. Modelo cinético de Hixson-Crowell

La liberación de un activo desde una matriz polimérica se puede controlar por difusión, erosión o por combinación de ambos. Los procesos de erosión controlada pueden envolver una erosión heterogénea u homogénea. La erosión heterogénea ocurre cuando la degradación se presenta como una delgada capa en la superficie del sistema, mientras que la erosión homogénea es el resultado de la degradación que sucede a una

velocidad uniforme fuera de la matriz polimérica. El tipo de erosión, heterogénea u homogénea dependerá del comportamiento hidrofóbico y morfología del polímero en un medio acuoso. La erosión heterogénea es más común para polímeros hidrofóbicos, mientras que la erosión homogénea es común para polímeros hidrofílicos.

La erosión heterogénea es más conveniente porque se puede llevar a cabo a una velocidad constante de liberación que es independiente de las propiedades físicas y químicas del componente activo. El modelo cinético de Hixson-Crowell (Ley de la raíz cúbica) describe este fenómeno de erosión (Ecuación 3).

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

Donde k es la constante de velocidad de liberación.

1.5. Hipótesis

La adición de micropartículas de epicatequina elaboradas con inulina y agente canalizante en hexano y linoleato de metilo, permitirá la liberación controlada del flavonoide en linoleato de metilo.

1.6. Objetivos

Objetivo general

Estudiar la cinética y mecanismo de liberación de epicatequina en hexano y linoleato de metilo desde micropartículas de inulina con y sin agente canalizante (aislado proteico de soja).

Objetivos específicos

- Estudiar la relación epicatequina/inulina, la temperatura del aire de entrada al secador y el porcentaje de agente canalizante (aislado proteico de soja) (variables independientes), sobre la eficiencia de encapsulación de epicatequina y su liberación en hexano (variables dependientes) utilizando la metodología de superficie respuesta (MSR).
- Caracterizar física, química y morfológicamente las micropartículas de epicatequina obtenidas bajo condiciones óptimas.
- Estudiar la cinética y mecanismo de liberación de epicatequina desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en hexano y linoleato de metilo como modelos lipídicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

- Agente encapsulante: Inulina Raftilina® HP(DP >23) (In), adquirida en Alfa Chilena S.A.
- Flavonoide: epicatequina (E) \geq 90% pureza, adquirida en Sigma-Aldrich.
- Agente canalizante: Aislado proteico de soja (APS), adquirido en Prinal S.A.
- Modelo lipídico: Linoleato de metilo (LM) \geq 99%, adquirido en Sigma-Aldrich.

2.2. Elaboración de las micropartículas

Las micropartículas del sistema E-(In-APS) se prepararon considerando 100 g de solución. La Inulina (6,8 - 17 g) se disolvió en agua (73,6 - 64,8 g) a 70°C y agitación constante, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó el APS (0 - 1,7 g). A la dispersión resultante se le incorporó la E (0,34 g) y se sonicó (FS-30H-Fisher Scientific) durante 15 min para finalmente llevarlas a un mini spray-dryer B-290 (Buchi, Suiza) con alimentación y flujo de aire de secado en paralelo. El equipo operó a una temperatura de aire de entrada que fluctuó entre 120 y 160°C. El flujo de aire, la velocidad de alimentación y la presión de atomización correspondieron a 600 L/h, 2 mL/min y 5 bar, respectivamente. Las micropartículas resultantes se almacenaron en oscuridad a -20°C hasta posterior análisis.

2.2.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental Box-Behnken (Figura 5) con un total de 15 experimentos para el sistema E-(In-APS). La relación E/In, el porcentaje de agente canalizante (APS) y la temperatura del aire de entrada al secador, se evaluaron como variables independientes. Las variables de respuesta fueron la eficiencia de encapsulación (EE) y la liberación de E al día 14 en hexano (t_{14}). La metodología de superficie respuesta (MSR) se utilizó para optimizar las variables dependientes.

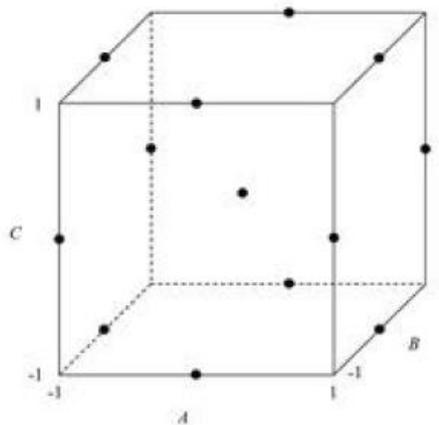


Figura 5. Diseño experimental Box-Bhenken.

En la tabla 1 se presentan las variables independientes y niveles del diseño experimental Box-Bhenken para la encapsulación de epicatequina con inulina y aislado proteico de soja como agente canalizante.

Tabla 1. Variables independientes y niveles del diseño experimental Box-Behnken para la encapsulación de epicatequina con inulina y aislado proteico de soja como agente canalizante.

N° experimentos	Relación E/In		Temperatura del aire de entrada (°C)		APS (%)*	
	Nivel					
	-1	1	-1	1	-1	1
15	1:20	1:50	120	160	0	25

E: epicatequina; In: Inulina; APS: aislado proteico de soja; * % APS respecto a inulina.

En la tabla 2, se presentan las condiciones experimentales utilizadas en la elaboración de las micropartículas de epicatequina con inulina y aislado proteico de soja como agente canalizante para el sistema E-(In-APS).

Tabla 2. Condiciones experimentales para la elaboración de micropartículas de epicatequina con inulina y aislado proteico de soja como agente canalizante para el sistema E-(In-APS).

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

E: epicatequina; In: inulina; APS: aislado proteico de soja; * % de APS respecto a inulina.

2.3. Caracterización de las micropartículas

2.3.1 Epicatequina superficial

Micropartículas (100 mg) se colocaron en un tubo de ensayo (100x12 mm), se trataron con 2 mL de metanol, se agitaron manualmente durante un min y luego se centrifugó por 10 min a 3000 rpm. Posteriormente se extrajo el sobrenadante y se traspasó a un matraz de 25 mL y se aforó con una solución de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético. La epicatequina superficial se cuantificó por HPLC con detector de arreglo de diodos.

2.3.2. Epicatequina total

Micropartículas (100 mg) se colocaron en un tubo de ensayo (100x12 mm) y se trataron con 4 mL de solución agua:etanol:acetona (50:25:25 v/v/v). Las dispersiones se agitaron en vortex por 1 min, luego se sonicaron (FS-30H-Fisher Scientifics) por 20 min y se centrifugaron por 3 min a 3000 rpm. El sobrenadante se traspasó a un matraz aforado

de 50 mL y el precipitado se sometió nuevamente al mismo procedimiento. Posteriormente, se aforó con una solución de agua:metanol:acetonitrilo: (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético. La epicatequina total se cuantificó por HPLC con detector de arreglo de diodos.

2.3.3. Eficiencia de encapsulación

El porcentaje de epicatequina superficial (Es) y eficiencia de encapsulación (EE) se calcularon de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5, respectivamente.

$$Es (\%) = \frac{E \text{ superficial}}{E \text{ total experimental}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

$$EE (\%) = 100 - Es (\%) \quad (\text{Ec. 5})$$

2.3.4. Liberación de epicatequina en hexano al t_{14}

La cinética de liberación de epicatequina desde las micropartículas se evaluó utilizando hexano como medio de disolución a una temperatura de 30°C en estufa (Memmert) por un período de 14 días (t_{14}). Se pesaron 500 mg de micropartículas en bolsas de filtro de celulosa y se introdujeron dentro de botellas de vidrio tapadas que contenían 100 mL de hexano y 0,5 % de span 85. Se tomaron alícuotas de 2 mL al día 14. Las alícuotas se trataron con 3 mL de solución de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético, se agitaron en vortex por 1 min y se centrifugaron por 3 min a 3000 rpm. La fase que contenía la epicatequina se traspasó a un matraz de 5 mL, repitiéndose el proceso con 2 mL de solución. El volumen del matraz se completó con solución agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% ácido acético. La epicatequina se cuantificó por HPLC con detector de arreglo de diodos.

2.3.5. Análisis cromatográfico

Para la determinación de epicatequina se utilizó una bomba Merck–Hitachi L-6200, con detector de arreglo de diodos Waters 996 acoplado a un computador con el software Empower Pro, y una columna C18 (3 μ m, 4,6 d.i x 150 mm, Atlantis®, Waters, Irlanda). Se utilizó una fase móvil isocrática de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético a un flujo de 1 mL/min. La detección de E se realizó a 280 nm y se

cuantificó utilizando una curva de calibración (1-100 µg/mL, $R^2=0,9983$) (Anexo 1). Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en mg E/g de polvo.

2.4. Caracterización de las micropartículas del sistema E-(In-APS) obtenidas bajo condiciones óptimas.

La epicatequina superficial, total y eficiencia de encapsulación se determinaron como se describió previamente.

2.4.1. Morfología

La estructura externa de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, se analizó mediante microscopia 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 Microscopia Electrónica Ltd, Cambridge, Reino Unido) operado a 20 kV. Las imágenes se obtuvieron digitalmente utilizando un software EDS 7424 (Oxford Instruments, Oxford, Reino Unido).

2.4.2. Cinética de liberación de epicatequina en hexano y linoleato de metilo

La liberación de E desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas del sistema E-(In-APS) se evaluó utilizando hexano y linoleato de metilo como medio de disolución a una temperatura de 30°C en estufa (Memmert) por un período de 145 y 90 días, respectivamente. Las micropartículas (500 y 50 mg) se colocaron en bolsas de filtro de celulosa y se introdujeron en una botella de vidrio con 100 mL de hexano o un tubo de ensayo (100x12 mm) con 5 g de LM, respectivamente. Se tomaron alícuotas (2 mL para el sistema de hexano y 1 mL para el sistema de LM) en intervalos de tiempo específico (1 vez por semana), manteniendo el volumen por reposición del medio de disolución respectivo. Las alícuotas de hexano (2 mL) y LM (1 mL) se trataron con 3 mL de solución de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético, se agitaron en vortex por 1min y se centrifugaron por 3 min a 3000 rpm. A las alícuotas de LM se adicionó previamente 1,5 mL de hexano. La fase que contenía la epicatequina se traspasó a un matraz de 5 mL, repitiéndose el proceso con 2 mL de solución agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético. El volumen del matraz se aforó con solución agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) con 1% de ácido acético. La epicatequina se cuantificó por HPLC con detector de arreglo de diodos.

2.4.3. Análisis de las cinéticas de liberación

Los datos obtenidos en los estudios de liberación se ajustaron a los modelos matemáticos de Peppas (Peppas y Sahlin, 1986), Higuchi (Higuchi, 1963), y Hixson-Crowell (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995), de acuerdo a las ecuaciones 1, 2 y 3 respectivamente.

Para el modelo de Higuchi la constante de liberación (k) se obtuvo a partir de la pendiente del gráfico M_t/M_∞ vs $(\text{tiempo})^{1/2}$, para el modelo de Peppas desde el intercepto del gráfico $\ln(M_t/M_\infty)$ vs \ln del tiempo y de la pendiente se obtuvo el valor del exponente difusional n ; y para el modelo de Hixson-Crowell desde la pendiente del gráfico $(1-(M_t/M_\infty))^{1/3}$ vs (tiempo) .

2.5. Análisis Estadístico

Las condiciones óptimas para el diseño experimental se obtuvieron mediante la metodología de superficie respuesta (MSR). Para determinar las constantes de velocidad de liberación se empleó regresión lineal. Para determinar diferencias estadísticas entre las constantes de velocidad de liberación se aplicó análisis de varianza y prueba de rango múltiple de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics version 7.0 (Manugistics Inc., Statistical Graphics Corporation, 1993, Rockville, MA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Encapsulación de epicatequina

Se aplicó un diseño experimental Box-Behnken para el sistema E-(In-APS), con 15 experimentos, utilizando secado por atomización como método de encapsulación. Se evaluaron las variables independientes: temperatura del aire de entrada al secado (variable del proceso), relación E/inulina y porcentaje de agente canalizante (variables de formulación) sobre la eficiencia de encapsulación y liberación de epicatequina.

En la Tabla 3 se presentan las condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y liberación de E a los 14 días de almacenamiento en hexano (t_{14}) para el sistema E-(In-APS).

Tabla 3. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y liberación de epicatequina (t_{14}) para la elaboración de micropartículas de epicatequina con inulina como agente encapsulante y aislado proteico de soja como agente canalizante para el sistema E-(In-APS), utilizando un diseño Box-Behnken.

Experimento	Relación E/In	APS (%)*	Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	EE (% \pm DS)	LIH (t_{14}) (% \pm DS)
1	1:20	13	120	57,8 \pm 3,7 ^{cd}	12,0 \pm 0,1 ^e
2	1:20	13	160	72,9 \pm 2,3 ^b	33,1 \pm 0,8 ^{cd}
3	1:50	5	120	77,1 \pm 4,1 ^a	24,3 \pm 2,8 ^d
4	1:50	5	160	72,5 \pm 1,4 ^b	23,9 \pm 3,3 ^d
5	1:35	0	120	47,4 \pm 1,4 ^f	0,0
6	1:35	0	160	45,7 \pm 0,9 ^f	0,0
7	1:35	14	120	53,5 \pm 0,2 ^e	50,4 \pm 1,8 ^{ab}
8	1:35	14	160	60,2 \pm 0,3 ^c	48,8 \pm 5,1 ^{ab}
9	1:20	0	140	36,7 \pm 1,9 ^B	0,0
10	1:50	0	140	53,8 \pm 1,7 ^{de}	0,0
11	1:20	25	140	52,1 \pm 1,4 ^e	48,1 \pm 3,0 ^{ab}
12	1:50	10	140	47,5 \pm 0,1 ^f	56,6 \pm 5,7 ^a
13	1:35	7	140	70,9 \pm 1,6 ^b	43,9 \pm 7,0 ^b
14	1:35	7	140	70,4 \pm 2,2 ^b	41,0 \pm 4,7 ^{bc}
15	1:35	7	140	61,4 \pm 0,6 ^c	42,9 \pm 4,3 ^{bc}

E: epicatequina; In: inulina; APS: aislado proteico de soja; EE: eficiencia de encapsulación; LIH: liberación de E en hexano a los 14 días de almacenamiento (t_{14}); *% de APS respecto a inulina; DS: desviación estándar; letras distintas en una columna representan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La eficiencia de encapsulación de E fluctuó entre 36,7-77,1%. En estos sistemas se observó que un aumento en el contenido de agente encapsulante (inulina) permite mejorar la eficiencia de encapsulación. Estos resultados se podrían explicar debido a la interacción polímero-activo mediante puentes de hidrógeno, atribuida a la presencia de grupos hidroxilos en el flavonoide y la inulina.

Los resultados obtenidos corresponden a las condiciones esperables, en donde valores similares de EE de polifenoles, mediante secado por atomización, se encontraron para la encapsulación de: pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficus indica*) con inulina (Saéñz *et al.*, 2009), jugo de granada con aislado proteico de soja y maltodextrinas (Robert *et al.*, 2010), procianidinas de semillas de uva con maltodextrina y goma arábica (Zhang *et al.*, 2007) y epigallocatequina galato con los mismos agentes encapsulantes (Rocha *et al.*, 2011). Mientras que, valores mayores de EE reportaron Sansone *et al.* (2011), para la encapsulación de naringenina y quercetina con ftalato acetato de celulosa y agentes surfactantes (62-94%) y Cilek *et al.* (2012) para polifenoles del orujo de cereza agria con goma arábica y maltodextrina (88-90%). Sin embargo, valores menores de EE reportaron Kosaraju *et al.* (2006), para la encapsulación de polifenoles de extractos de hojas de olivo (27%) con quitosano y por Sun-Waterhouse *et al.* (2012) para quercetina utilizando diferentes fibras naturales (9-19%).

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

3.1.1. Liberación de epicatequina desde micropartículas del sistema E-(In-APS)

La liberación de E desde micropartículas del sistema E-(In-APS) en hexano a los 14 días de almacenamiento fluctuó entre 0-56,6% (Tabla 3). En la Figura 6 se muestra el porcentaje de liberación de E al t_{14} versus el porcentaje de APS.

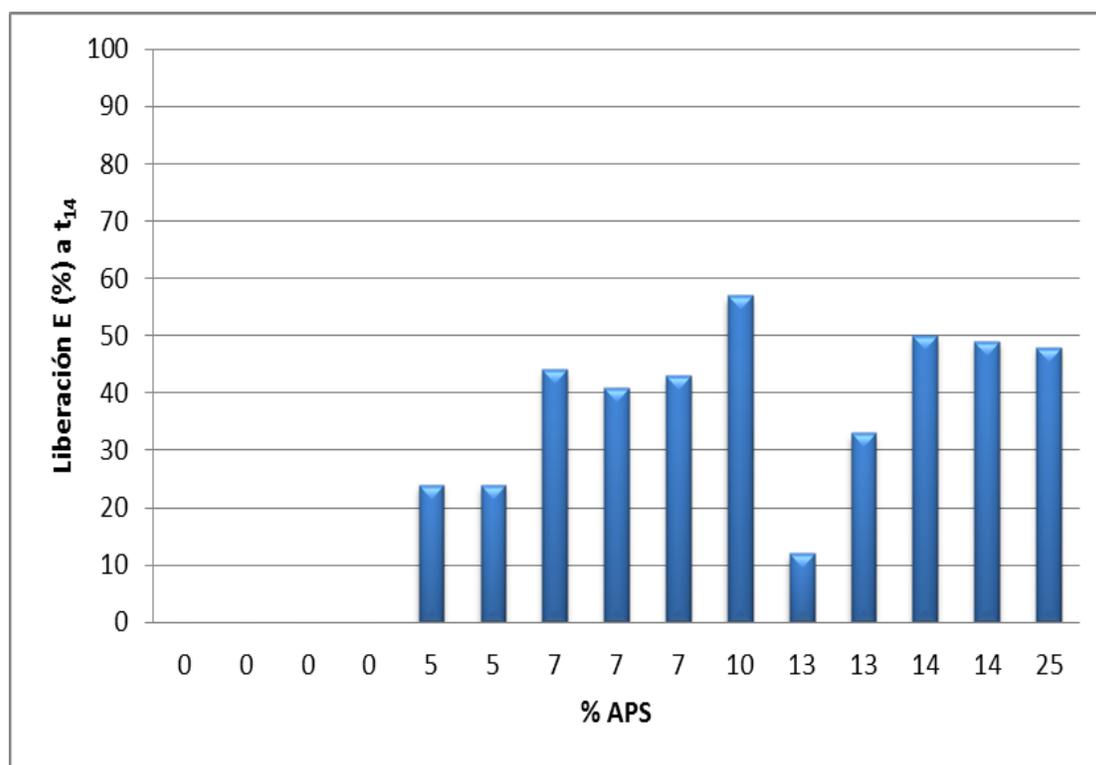


Figura 6. Liberación de epicatequina en hexano a los 14 días de almacenamiento (t_{14}) desde micropartículas de epicatequina con inulina y APS para el sistema E-(In-APS) con respecto al porcentaje de APS.

En la figura 6 se observa en general que los experimentos donde se adicionó el agente canalizante, presentaron una mayor liberación de E hacia el medio de disolución (hexano) en relación a los experimentos sin APS. En consecuencia los resultados sugieren que las micropartículas con APS fueron capaces de formar canales, facilitando la difusión de E al medio de disolución.

3.2. Micropartículas de epicatequina obtenidas bajo condiciones óptimas

Para obtener las micropartículas bajo condiciones óptimas del diseño E-(In-APS) estudiado, se utilizó la metodología de superficie respuesta (MSR) teniendo en cuenta la forma cuadrática, lineal y la interacción entre las variables independientes estudiadas a un nivel $p \leq 0,05$.

Los resultados del análisis de varianza para la EE del diseño E-(In-APS) (Anexo 3), indicaron que la temperatura de entrada al secador en su forma lineal, cuadrática y su

interacción con la relación E/In y con APS, no presentaron un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación de epicatequina ($p>0,05$) (Anexo 3). La relación E/In en su forma lineal, el agente canalizante en su forma lineal y cuadrática, y la interacción entre ambas variables tuvieron un efecto significativo ($p<0,05$) sobre la EE de E (Anexo 3). En el gráfico de Pareto (Figura 7) se observa que hay un efecto positivo de la relación E/In y el agente canalizante sobre la EE, observándose que en la medida que se incrementa la relación E/In, mejora la eficiencia de encapsulación de epicatequina (Figura 8).

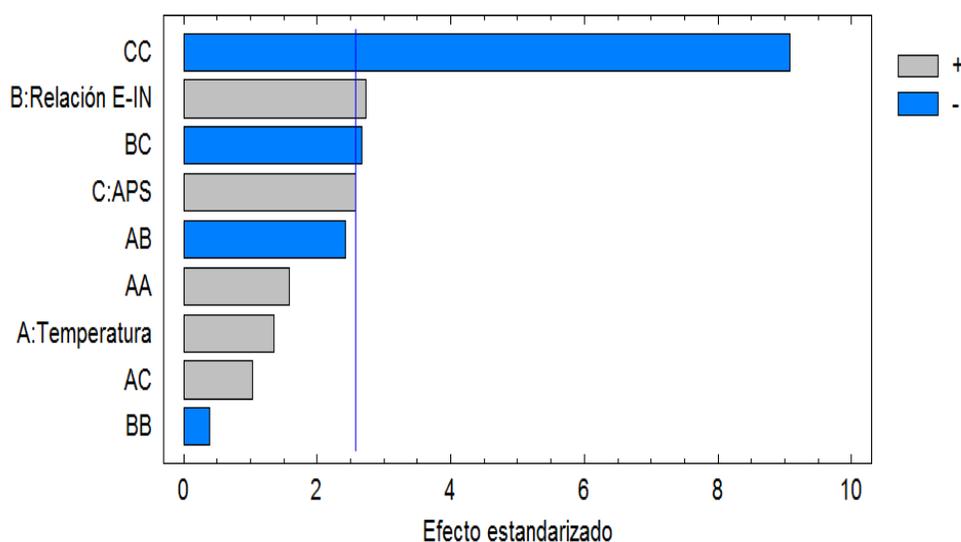


Figura 7. Diagrama de Pareto estandarizado para eficiencia de encapsulación de epicatequina.

La temperatura no ejerció un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación, sin embargo, a mayores temperaturas de secado mejora la retención de epicatequina debido a un aumento en la velocidad de secado, reduciendo el tiempo de residencia del flavonoide (Rosenberg *et al.*, 1990).

La Figura 8 muestra el gráfico de superficie respuesta para la EE del sistema E-(In-APS).

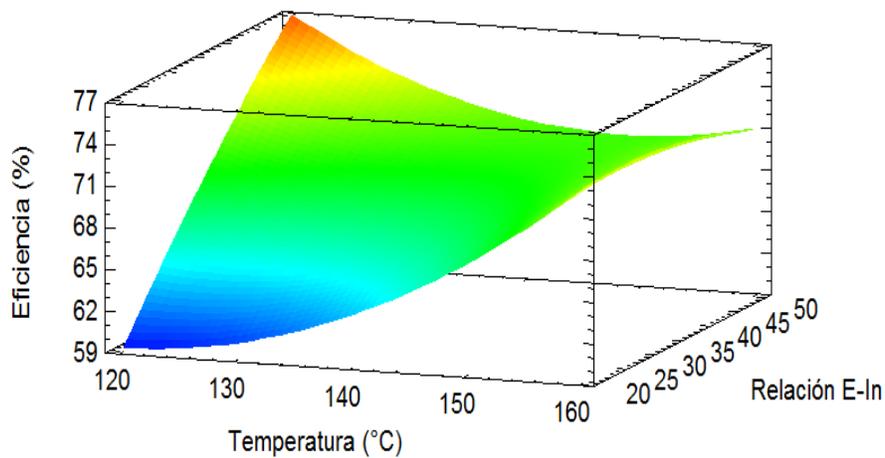


Figura 8. Gráfico obtenido mediante metodología de superficie de respuesta (MSR) para la eficiencia de encapsulación del sistema E-(In-APS).

El análisis de varianza para la liberación de E en hexano (t_{14}) del diseño E-(In-APS) (Anexo 3) indicó que la temperatura y relación E/In, ambas en su forma lineal no tuvieron un efecto significativo ($p > 0,05$). En cambio, la temperatura, la relación E/In (ambas en su forma cuadrática) y la interacción entre ambas variables tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la LIH de E. Por otro lado, el agente canalizante en su forma lineal y cuadrática tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$). El gráfico de Pareto muestra que hay un efecto positivo de la relación E/In y agente canalizante sobre la LIH (Figura 9).

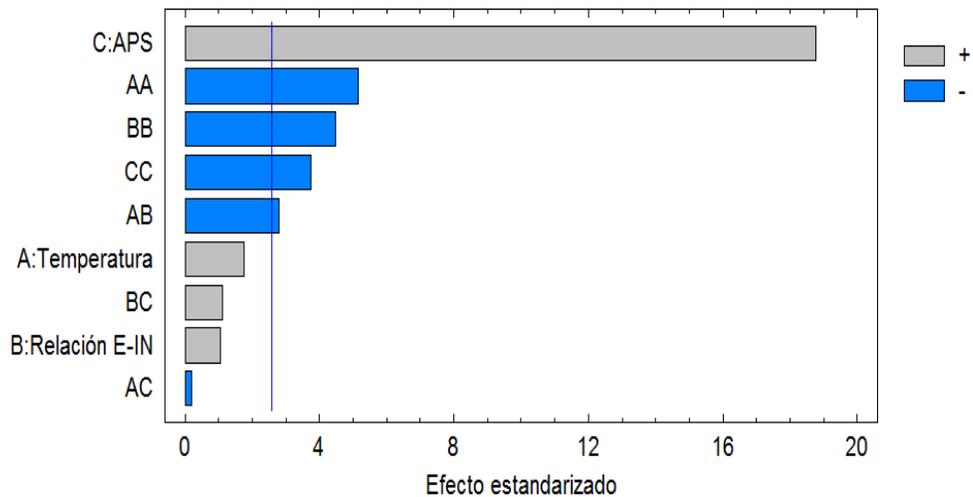


Figura 9. Diagrama de Pareto estandarizado para liberación de epicatequina en hexano.

De esta forma, los experimentos a los cuales se les adicionó APS, liberaron más rápidamente la E debido a la mayor canalización de las micropartículas en comparación a aquellos sin APS.

La Figura 10 muestra el gráfico de superficie respuesta para la liberación de E en hexano al t_{14} del sistema E-(In-APS).

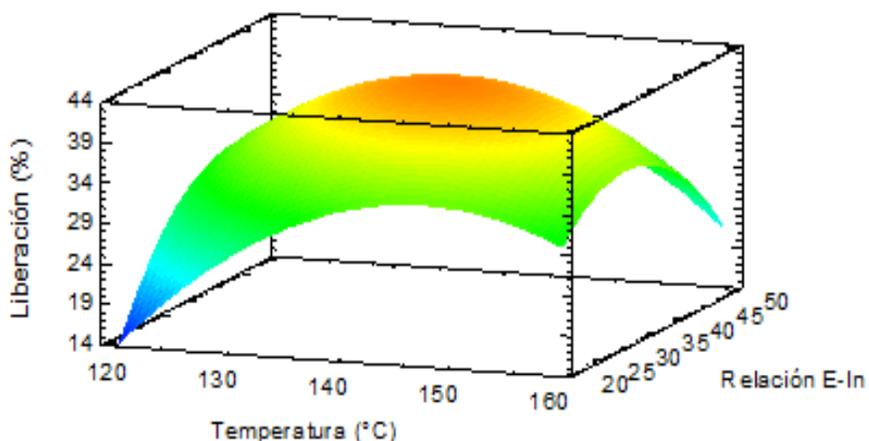


Figura 10. Gráfico obtenido mediante metodología de superficie de respuesta (MSR) para la liberación de epicatequina para el sistema E-(In-APS).

Para la optimización, se aplicó la función deseabilidad, considerando la maximización de la EE y la minimización de la liberación de E al t_{14} . La Tabla 4 muestra las condiciones óptimas para la encapsulación de E para el sistema E-(In-APS).

Tabla 4. Condiciones y caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para el sistema E-(In-APS).

Caracterización	
Relación E/In	1:50
Temperatura de entrada al secador (°C)	160
APS (%)	2
Eficiencia de encapsulación (%)	65,7 ± 10

E: epicatequina; In: inulina; APS: aislado proteico de soja.

En la Tabla 4 se observa que las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas presentaron una eficiencia de encapsulación de 65,7%. Este valor se obtuvo a una relación E/In (1:50) con alto contenido de inulina, indicando la influencia del contenido de sólidos (inulina) sobre la EE de E. Las características del agente encapsulante como solubilidad, viscosidad entre otros factores afecta la velocidad de formación de la costra sobre la superficie de la partícula (Garshallaoui *et al.*, 2007) y por lo tanto la eficiencia de encapsulación. Por otro lado la temperatura del aire de entrada al secador fue mayor dentro del rango estudiado (160°C), lo cual también permite la formación rápida de la costra.

Para lograr el objetivo propuesto, se prepararon dos sistemas de micropartículas para la relación E/In y temperatura del aire de entrada; considerando un sistema sin agente canalizante (E-In) y otro con agente canalizante E-(In-APS), ambos obtenidos bajo condiciones óptimas (Tabla 5).

Tabla 5. Caracterización de las micropartículas de flavonoides con y sin agente canalizante (APS).

Sistema	Relación E/In	APS (%)	Temperatura del aire de entrada (°C)	Flavonoides totales después del secado (mg/g polvo)	Eficiencia de encapsulación (%)	Recuperación (%)
E-In	1:50	0	160	16,71 ± 0,7	70,9 ± 2,5 ^a	85,2 ± 3,7 ^a
E-(In-APS)	1:50	2	160	16,39 ± 0,6	61,9 ± 1,4 ^b	85,5 ± 2,9 ^a

E: epicatequina; In: inulina; APS: aislado proteico de soja. Letras distintas en una columna representan diferencias significativas (p≤0,05).

La Figura 11 (A y B) muestra las fotografías por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las micropartículas de los sistemas E-In y E-(In-APS), obtenidas bajo condiciones óptimas de temperatura del aire de entrada al secador y relación E/In, respectivamente. En general, se observan micropartículas con forma esférica y paredes lisas, junto a micropartículas con superficie contraída. Ambos tipos de micropartículas presentan paredes continuas y aparentemente sin presencia de fisuras o grietas. La formación de micropartículas con abolladuras es una característica usual del secado por atomización. El encogimiento de las partículas durante el proceso de secado se puede producir a bajas o altas temperaturas de entrada al secador (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005). A bajas temperaturas de secado, existe una menor difusión del agua y las

partículas tienen más tiempo para encogerse, mientras que a altas temperaturas de secado (como en este estudio), la rápida evaporación del agua y la alta presión en el interior de las partículas, también produce encogimiento (Ronkart et al., 2007). Por consiguiente, la morfología de las micropartículas depende de diferentes parámetros que intervienen en el secado como: temperatura de alimentación al secador, temperatura del aire de entrada al secador y solvente utilizado entre otros factores (Kosaraju et al., 2006).

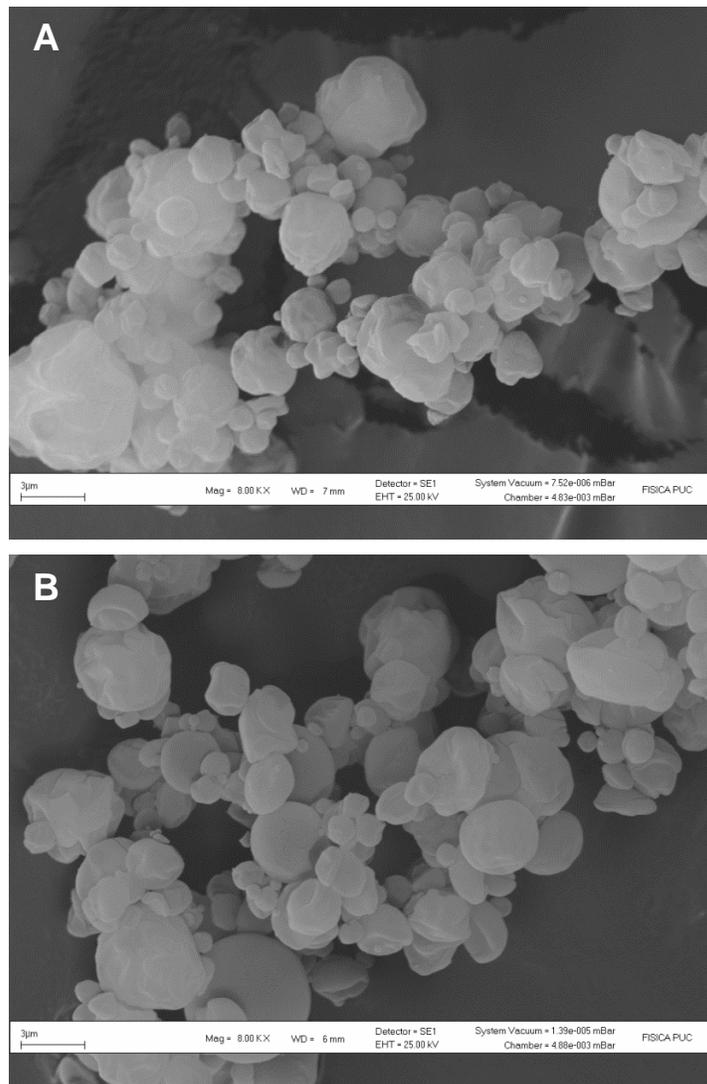


Figura 11. Microfotografía SEM para las micropartículas del sistema E-In (A) y E-(In-APS) (B) obtenidas bajo condiciones óptimas.

3.3. Perfil de liberación de epicatequina en modelos hidrofóbicos

Para el estudio de liberación de epicatequina se realizó el perfil de liberación de E desde las micropartículas del sistema E-(In) y E-(In-APS), en hexano y linoleato de metilo a 30°C.

3.3.1. Perfil de liberación de epicatequina en hexano

La Figura 12 muestra el perfil de liberación de epicatequina desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas E-(In) y E-(In-APS) en hexano a 30 °C.

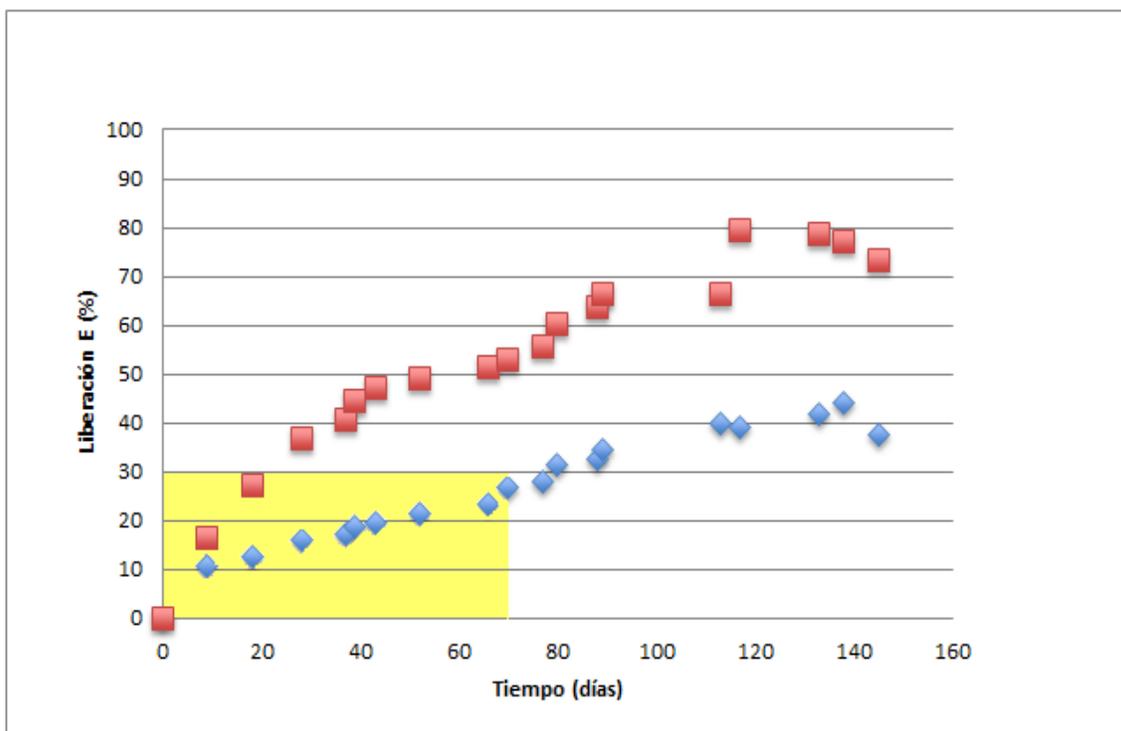


Figura 12. Perfil de liberación de E desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en hexano a 30°C. E-In (◆), E-(In-APS) (■).

Se observó un comportamiento bifásico en el gráfico del perfil de liberación (liberación E vs. tiempo), para ambos sistemas estudiados E-(In) y E-(In-APS) en concordancia con estudios realizados por Poulain *et al.* (2003) y Robert *et al.* (2012). Donde, la primera zona corresponde a la liberación de E superficial. Para las micropartículas sin agente canalizante (Figura 12), la liberación de E superficial alcanzó un 30% a los 70 días de almacenamiento. Mientras que para las micropartículas con agente canalizante, la

liberación de E superficial (30%) se alcanzó en un tiempo menor (20 días). En la segunda zona, correspondiente a la E encapsulada, la liberación de E desde micropartículas con y sin agente canalizante alcanzaron un 72% y 38%, respectivamente a las 145 días de almacenamiento.

Los datos de los perfiles de liberación de E obtenidos para cada sistema estudiado, se ajustaron a los modelos matemáticos de Peppas, Higuchi y Hixson-Crowell. La Tabla 6 muestra las constantes de velocidad de liberación de E para las micropartículas sin (E-In) y con (E-(In-APS)) agente canalizante en hexano. El coeficiente de correlación presentó un buen ajuste para los tres modelos matemáticos aplicados.

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos desde datos del perfil de liberación de E para los sistemas E-(In) y E-(In-APS) en hexano.

Sistema	n	Peppas		Higuchi		Hixson-Crowell	
		$10^3 k_{obs} \pm 10^4 DS$ (días ⁻ⁿ)	R ²	$10^3 k_{obs} \pm 10^4 DS$ (días ^{-0,5})	R ²	$10^4 k_{obs} \pm DS$ (días)	R ²
E-In	0,6	4,7 ± 3,7 ^a	0,947	7,6 ± 4,2 ^b	0,957	2 ± 0,2 ^a	0,939
E-(In-APS)	0,5	23 ± 3,6 ^a	0,976	13 ± 0,57 ^a	0,978	5 ± 0,9 ^b	0,956

APS: aislado proteico de soja; DS: desviación estándar; letras distintas en una columna representan diferencias significativas (p≤0,05).

Las micropartículas de E presentaron valores de constantes de velocidad de liberación de E bajos, para ambos sistemas, con y sin agente canalizante. Lo que correspondería a una liberación lenta de E hacia el medio de disolución (hexano) desde las micropartículas.

Este comportamiento se podría atribuir a la baja solubilidad del flavonoide en hexano y/o a la alta interacción epicatequina/inulina, debido a que ambos parámetros influirían en la difusión de E desde el interior de la matriz hacia el medio de disolución. El sistema E-(In-APS) presentó constantes de velocidad de liberación mayores que el sistema E-In mostrando el efecto del agente canalizante.

El parámetro *n* en el modelo de Peppas puede tomar un rango de valores, que indican el mecanismo de liberación del activo desde las micropartículas (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995). De acuerdo a este parámetro (n>0,5) se puede establecer

que el mecanismo de liberación de la E desde las micropartículas sin agente canalizante corresponde a una difusión no-Fickiana o anómala. En contraste, en las micropartículas con agente canalizante, el mecanismo de liberación del flavonoide corresponde a un mecanismo de difusión Fickiana a favor de un gradiente de concentración.

3.3.2. Perfil de liberación de epicatequina en linoleato de metilo

Los perfiles de liberación de epicatequina desde las micropartículas con (E-(In-APS)) y sin agente canalizante (E-In) en linoleato de metilo a 30°C, se muestran en la Figura 13.

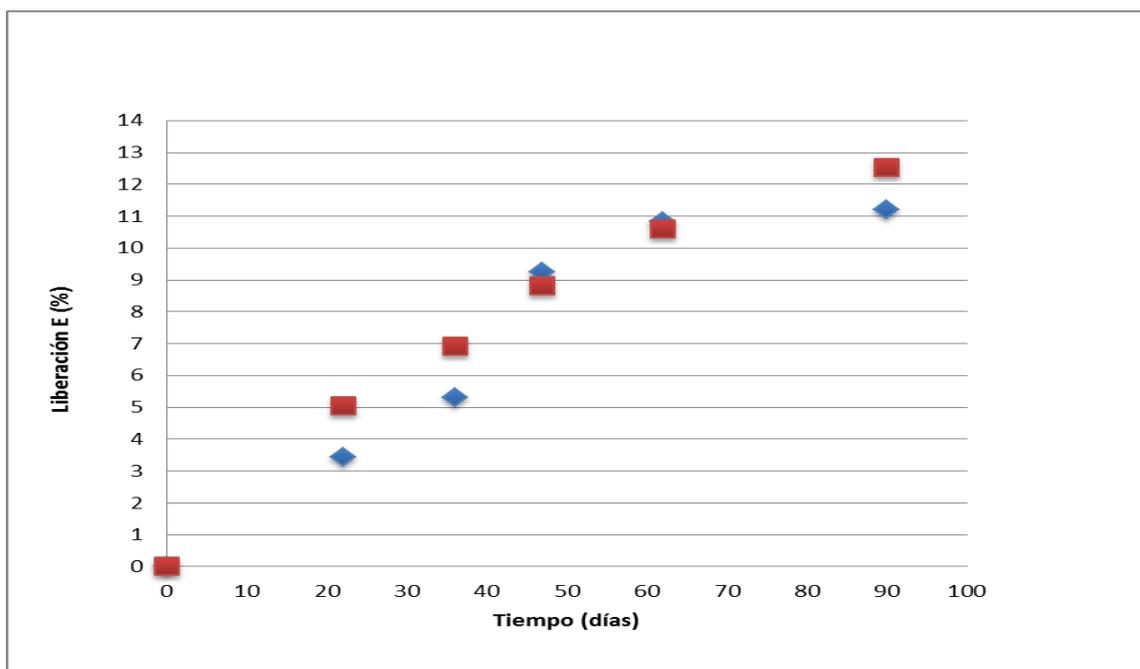


Figura 13. Perfil de liberación de E desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en linoleato de metilo a 30°C, E-(In) (♦), E-(In-APS) (■).

En el gráfico del perfil de liberación (liberación E vs. tiempo) se observa que sólo hubo liberación superficial de E desde las micropartículas con y sin agente canalizante (12 y 11%, respectivamente) a los 90 días de almacenamiento.

Se aplicaron tres modelos analíticos (Peppas, Higuchi y Hixson-Crowell) para explicar el mecanismo de liberación de la epicatequina superficial. La Tabla 7 muestra los parámetros cinéticos obtenidos de las curvas de liberación de E en LM desde las micropartículas de epicatequina con (E-(In-APS) y sin agente canalizante (E-In). Como

se puede ver, las cinéticas de liberación mostraron una buena correlación con los modelos matemáticos aplicados.

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos desde datos del perfil de liberación de E superficial para los sistemas E-(In) y E-(In-APS) en linoleato de metilo.

Sistema	n	Peppas		Higuchi		Hixson-Crowell	
		$10^5 k_{obs} \pm 10^4 DS$ (días ⁻ⁿ)	R ²	$10^3 k_{obs} \pm 10^3 DS$ (días ^{-0.5})	R ²	$10^5 k_{obs} \pm DS$ (días)	R ²
E-In	0,5	6,2 ± 6,3 ^a	0,930	2 ± 1,5 ^a	0,929	11 ± 1,3 ^a	0,967
E-(In-APS)	0,5	16,8 ± 1,9 ^b	0,987	3,3 ± 2,4 ^a	0,989	7 ± 4,2 ^a	0,966

APS: aislado proteico de soja; DS: desviación estándar; letras distintas en una columna representan diferencias significativas (p≤0,05).

Las micropartículas de E exhibieron valores de constantes de liberación bajos, para ambos sistemas (con y sin agente canalizante) en linoleato de metilo. Mostrando que la baja solubilidad de E en LM permite el control de la liberación (Palma *et al*, 2014).

En ambas micropartículas, con y sin agente canalizante, el mecanismo de liberación fue por difusión Fickiana.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las micropartículas de flavonoides se podrían aplicar en aceites comestibles para mejorar la estabilidad oxidativa y así aumentar su vida útil.

CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrollaron micropartículas de flavonoides con inulina y agente canalizante (APS) que permitieron estudiar la liberación de E en un medio hidrofóbico, mediante el método de microencapsulación. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio la hipótesis y objetivos se cumplieron.

1. Las micropartículas de epicatequina obtenidas bajo condiciones óptimas presentaron una eficiencia de encapsulación de 65,7%. Este valor se obtuvo a una relación E/In (1:50) con alto contenido de inulina, y a una temperatura de aire de entrada al secador de 160°C.
2. La influencia del agente encapsulante (In) y del agente canalizante (APS) tuvieron un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación y la liberación, respectivamente.
3. Los factores que influyeron en la eficiencia de encapsulación y en la liberación, fueron la cantidad de agente encapsulante (In) y agente canalizante (APS) respectivamente.
4. El perfil de liberación de epicatequina en hexano y linoleato de metilo (E-In y E-(In-APS)) mostró una liberación lenta de epicatequina hacia el medio de disolución.
5. El análisis de la cinética de liberación de E en hexano desde las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, indicó que la epicatequina se liberó hacia el medio hidrofóbico principalmente a través de un mecanismo de difusión de tipo no-Fickiano o difusión anómala, para aquellas micropartículas sin agente canalizante; en contraste, en las micropartículas con agente canalizante, el mecanismo de liberación fue por difusión Fickiana. La cinética de liberación de E en LM desde micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas, indicó que el mecanismo de liberación fue por difusión Fickiana, para ambos sistemas (con y sin agente canalizante).

6. La velocidad de liberación de E dependió del medio de disolución, siendo más lenta la liberación en LM.

7. La liberación controlada de epicatequina encapsulada podría ser utilizada para extender la vida útil de grasas y aceites comestibles.

REFERENCIAS

- Akoh, C.C. y Min, D.B. (2008). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 3: 4-12.
- Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J.J., Jiménez-Aparicio, A.R., Gutiérrez-López, G.F. (2005). Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*, 67: 179-184.
- Bae, Y.H., Okano, T., Kim, S.W. (1991). "On-off" thermocontrol of solute transport. II. Solute release from thermosensitive hydrogels. *Pharmaceutical Research*, 8: 624-628.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990). Flavonoid as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186: 343-355.
- Brannon-Peppas, L., Peppas, N.A. (1989). Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. IX. The mechanism of drug release from pH-sensitive swelling controlled system. *Journal of Controlled Release*, 8: 267-274
- Brannon-Peppas, L. (1993). Properties and applications. In: *Polymeric Delivery System* (edited by M.A. El-Nokaly, D.M. Piatt y B.A. Charpentier), Pp. 52. ACS Symposium Series 520. Washington, DC: *American Chemical Society*.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317-333.
- Cheftel, J. Cuq, J. Lorient, D. (1989). "Proteínas alimentarias: Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas". Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España, pp.5-47.
- Choe, E. y Min, D. (2007). Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*, 72: 77-86.

Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., Sumnu, G. (2012). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, 235: 587-596.

Cook, N., Samman, S. (1996). Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 7: 66-76.

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

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

Deng, Z.Y. y Yu, Y. (2004). Process for producing oil-soluble microencapsulated tea polyphenols. *Fine and Speciality Chemicals*. [DOI] cnki: ISSN: 1008-11000.0.2004-16-003.

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

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

Fuchs, J. (1998). Potentials and limitations of the natural antioxidants alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radical Biology Medicine*, 25: 848-873.

Gehrke, S.H. y Cussler, E.L. (1989). Mass transfer in pH-sensitive hydrogels. *Chemical Engineering Science*, 44: 559-566.

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

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

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

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

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

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

Huber, G., Rupasinghe, H., Shahidi, F. (2009). Inhibition of oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and fish oil by quercetin glycosides. *Food Chemistry*, 117:290-295.

Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M., Ogiso, T. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 70: 343-347.

Kiewning, D. Wollseifen, R. Michaela, S.E. (2013). The impact of catechin and epicatechin, total phenols and PPO activity on the Mal d 1 content on apple fruit. *Food Chemistry*, 140: 99-104.

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

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

Kou, J.H., Amidon, G.L., Lee, P.I. (1988). pH-dependent swelling and solute diffusion characteristics of poly (hydroxyethyl methacrylate-CO-methacrylic acid) hydrogels. *Pharmaceutical Research*, 5: 592-597.

Madrigal, L., Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 57: 387-396.

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

Marmesat, S., Morales, A., Velasco, J., Dobarganes, M.C. (2010) Action and fate of natural and synthetic antioxidants during frying. *Grasas y Aceites*, 61: 333-340.

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

Mendoza-Wilson, A.M. y Glossman-Mitnik, D. (2006). Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. *Journal of Molecular Structure*, 761: 97-106.

Min, D.B y Boff, J.M. (2002). Lipid oxidation of edible oil, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, pp. 335-364, Marcel Dekker, New York. NY, USA.

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

Naz, S., Siddiqi, R., Sayeed, S. (2008). Effect of flavonoids on the oxidative stability of corn oil during deep frying. *International Journal of Food Science and Technology*, 43:1850-1854.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. (2012). Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International*, 48:387–396.

Nieto, S., Garrido, A., Sanhueza, J., Loyola, L.A., Morales, G., Leighton, F., Valenzuela, A. (1993). Flavonoids as stabilizers in fish oil: an alternative to synthetic antioxidants: *Journal of Oil and Fat Industries*, 70: 773-778.

Palma, M., García, P., Márquez-Ruiz, G., Vergara, C., Robert, P. (2014). Release kinetics of flavonoids in methyl linoleate from microparticles designed with inulin and channelizing agent. *Food Research International*, 64: 99-105.

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

Pekkarinen, S., Heinonen, M., Hopia, A. (1999). Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (p)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 499–506.

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

Pereira, T., y Das, N. (1990). The effects of flavonoids on the thermal autoxidation of palm oil and other vegetable oils determined by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, 165, 129–137.

Pool, H., Quintanar, D., Figueroa, J.D., Mano, C.M., Bechara, J.E.B., Godínez, L.A., Mendoza S. (2012). Research Article: Antioxidant effect of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, Volume 2012, Article ID 145380, 12 pages. DOI:10.1155/2012/145380.

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

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

Ramos, D., Gómez, M., Fernández, D., Núñez, L. (2000). Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Revista Cubana de Farmacia*, 34: 70-77.

Ré, I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16:1195-1236.

Reineccius, G.A. (1988). Spray-drying of food flavors. In G.A. Reineccius & S.J. Risch (Eds.), *Flavors encapsulation*. (pp. 55-66). Washington, DC: American Chemical Society.

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

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

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

- Ronkart, S., Deroanne, C., Paquot, M., Fougnyes, C., Lambrechts, J., Blecker, C. (2007). Characterization of the physical state of spray-dried Inulin. *Food Biophysics*, 2:83–92.
- Rosenberg, M., Kopelman, I., Talmon, Y. (1990). Factors affecting retention in spray-drying micro-encapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1288–1294.
- Russin, T.A., Boye, J.I., Pham, H.M., Arcand, Y. (2006). Antioxidant properties of genistein in a model edible oil system. *Journal of Food Science*, 71: 395-399.
- Saéñz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. (2009). Microencapsulacion by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114 (2): 616-622.
- Sansone, F., Picerno, P., Mencherini, T., Villecco, F., D'Ursi, A.M., Aquino, R.P., Lauro, M.R. (2011). Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability. *Journal of Food Engineering*, 103: 188-196.
- Shahidi, F., Han, X. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 33: 501-547.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39: 4067-407.
- Shaikh, J., Bhosale, R., Singhal, R. (2006). Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chemistry*, 94:105-110.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:2144-2155.

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

Song, M., Li, N., Tiedt, L., Liebenberg, W., Villiers, M. (2005). Effect of viscosity and concentration of wall former, emulsifier and pore-inducer on the properties of amoxicillin microcapsules prepared by emulsion solvent evaporation. *II FÁrmacology*, 60:261-267.

Souza, J.R., Feitosa, J., Ricardo, N., Trevisan, M.T., Paula, H.C., Ulrich, C., Owen, R. (2013). Spray-drying encapsulation of mangiferin using polymers. *Food Hydrocolloids*. 33:10-18.

Stevens, C., Meriggi, A., Booten, K. (2001). Chemical modification of inulin, a valuable renewable resource, and its industrial applications. *Biomacromolecules*, 2:1-16.

Su, Y., Xu, J., Ng, C., Leung, L., Huang, Y., & Chen, Z. (2004). Antioxidant activity of tea theaflavins and methylated catechins in canola oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 269–274

Su, Y., Fu, Z., Zhang, J., Wang, W., Wang, H., Wang, Y., Zhang, Q. (2008). Microencapsulation of radix *Salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. *Powder Technology*, 184:114-121.

Sun-Waterhouse, D., Wadhwa, S., Waterhouse, G. (2012). Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: A comparative study using different natural fibre polymers as encapsulante. *Food Bioprocess Technology*, 6:2376-2388.

Thompson, D., Moldeus, P. (1988). Citotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. *Biochemistry. Pharmacology*, 37: 2201-2207.

Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V. (2007). Defining the role of flavonoid structure on cottonseed oil stabilization: study of A- and C-ring substitution. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 84:129-136.

Wanasundara, U. y Shahidi, F. (1994). Stabilization of canola oil with flavonoides. *Food Chemistry*, 50:393-396.

Wanasundara, U. y Shahidi, F. (1996). Stabilization of seal blubber and menhaden oils with green tea catechins. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 73: 1183-1190.

Wanasundara, U. y Shahidi, F. (1998). Stabilization of marine oils with flavonoids. *Journal of Food Lipids*, 5:183-186.

Wu, C., Chen, L., Li, W. (2005). Preparation of microencapsulation quercetin and its antioxidative properties in oils. *The Food Industry*. [DOI] cnki: ISSN: 1004-471X.0.2005-03-11.

Wu, C., Chen, L., Li, W. (2006a). Study on antioxidation of microencapsulation Semen Cuscutae flavonoids for Oil. *Chemistry and Adhesion* [DOI] cnki: ISSN:1001-0017.0.2006-04-005

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

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

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

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

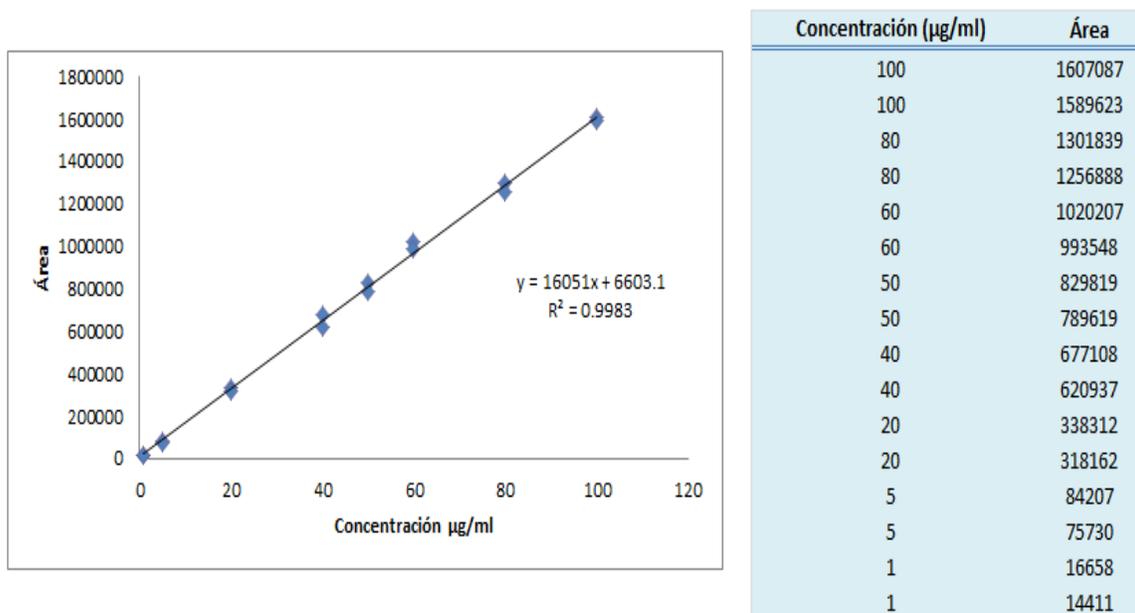
Yanishlieva, N., Marinova, E., Pokorny, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108:776-793.

Yu, J., Wang, L., Walzem, R., Miller, E., Pike, L., Patil, B. (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2009-2014.

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

ANEXO

Anexo 1. Curva de calibración de epicatequina por cromatografía HPLC con detector de arreglo de diodos.



Anexo 2. Análisis ANOVA para eficiencia de encapsulación y liberación en hexano de epicatequina para los experimentos del diseño E-(In-APS).

Tabla 8. ANOVA para eficiencia de encapsulación de epicatequina por experimento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6089,25	14	434,946	231,21	0,0000
Intra grupos	56,4361	30	1,8812		
Total (Corr.)	6145,69	44			

Tabla 9. Pruebas de Múltiple Rangos para eficiencia por experimento.

Experimento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
9	3	36,7067	x
6	3	45,65	x
5	3	47,35	x
12	3	47,4533	x
11	3	52,05	x
7	3	53,48	x
10	3	53,83	xx
1	3	57,8133	xx
8	3	60,1733	x
15	3	61,36	x
14	3	70,37	x
13	3	70,9233	x
4	3	72,4833	x
2	3	72,9033	x
3	3	77,0833	x

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

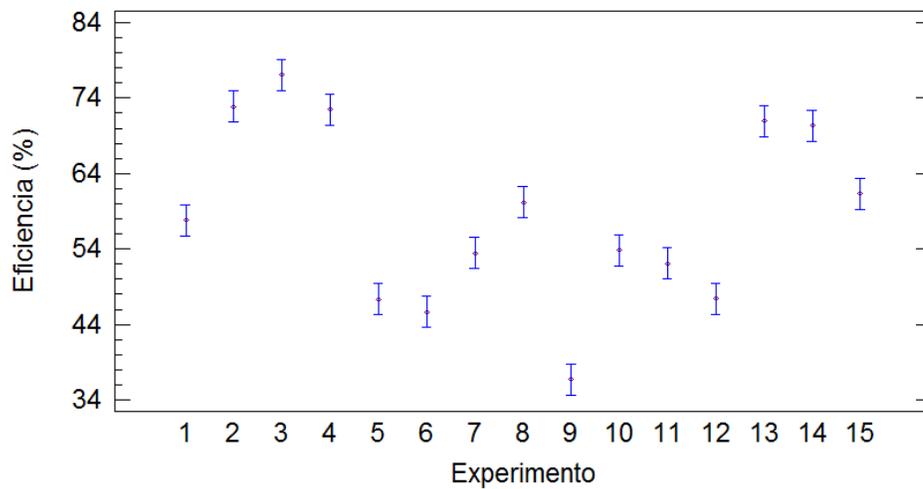


Figura 14. Gráfico de medias para eficiencia de encapsulación.

Tabla 10. ANOVA para liberación de epicatequina en hexano por experimento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	18724,1	14	1337,43	112,62	0,0000
Intra grupos	356,28	30	11,876		
Total (Corr.)	19080,3	44			

Tabla 11. Pruebas de Múltiple Rangos para liberación por experimento.

Experimento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	0,0	x
10	3	0,0	x
9	3	0,0	x
6	3	0,0	x
1	3	11,9667	x
4	3	23,9333	x
3	3	24,3	x
2	3	33,0667	xx
14	3	41,0333	xx
15	3	42,8667	xx
13	3	43,9	x
11	3	48,0667	xx
8	3	48,7667	xx
7	3	50,3667	xx
12	3	56,5667	x

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

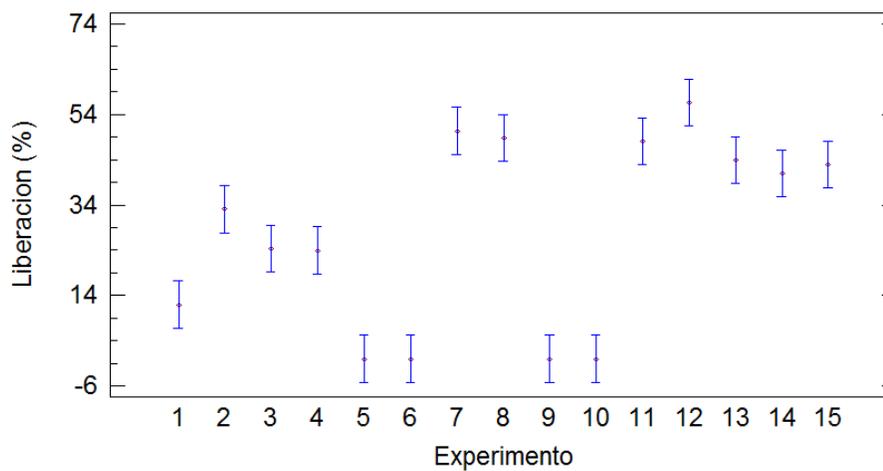


Figura 15. Gráfico de medias para liberación.

Anexo 3. Análisis de varianza del Diseño Box-Behnken para el sistema E-(In-APS).

Tabla 12. Análisis de varianza para la eficiencia de encapsulación de epicatequina.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	30,0313	1	30,0313	1,82	0,2354
B:Relación E/IN	123,245	1	123,245	7,46	0,0412
C:APS	110,261	1	110,261	6,67	0,0492
AA	41,231	1	41,231	2,50	0,1750
AB	97,0225	1	97,0225	5,87	0,0599
AC	17,64	1	17,64	1,07	0,3488
BB	2,5641	1	2,5641	0,16	0,7098
BC	117,722	1	117,722	7,13	0,0444
CC	1362,31	1	1362,31	82,47	0,0003
Error total	82,5992	5	16,5198		
Total (corr.)	2027,44	14			

R-cuadrada = 95,9%

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 88,6%

Error estándar del est. = 4,1

Error absoluto medio = 1,8

Estadístico Durbin-Watson = 1,8393 (P=0.2000)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,163238

Tabla 13. Análisis de varianza para liberación de epicatequina en hexano.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	45,6012	1	45,6012	3,08	0,1394
B:Relación E-IN	16,82	1	16,82	1,14	0,3349
C:APS	5196,9	1	5196,9	351,49	0,0000
AA	393,621	1	393,621	26,62	0,0036
AB	115,563	1	115,563	7,82	0,0382
AC	0,64	1	0,64	0,04	0,8434
BB	295,763	1	295,763	20,00	0,0066
BC	18,0625	1	18,0625	1,22	0,3194
CC	206,31	1	206,31	13,95	0,0135
Error total	73,9275	5	14,7855		
Total (corr.)	6247,03	14			

R-cuadrada = 98,8%

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 96,7%

Error estándar del est. = 3,8

Error absoluto medio = 1,9

Estadístico Durbin-Watson = 2,86641 (P=0,8675)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,463998

Anexo 4. Optimización deseabilidad

Valor óptimo = 0,802974

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	120,0	160,0	159,998
Relación E-IN	20,0	50,0	50,0
APS	0,0	1,7	0,413211

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo</i>
Eficiencia	65,7409
Liberación	5,83205

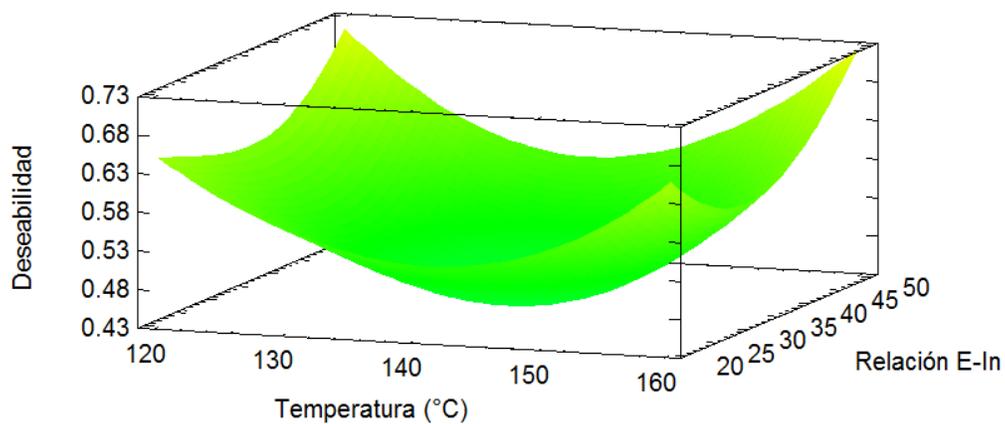


Figura 16. Gráfico obtenido mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para la optimización de micropartículas del sistema E-(In-APS).