



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

**PATROCINANTE**

**Paz Robert**

Departamento de Ciencias de los  
Alimentos y Tecnología Química  
Universidad de Chile.

**DIRECTORES DE MEMORIA**

**Paz Robert**

Departamento de Ciencias de  
Alimentos y Tecnología Química  
Universidad de Chile.

**Pedro Bouchon**

Departamento de Ingeniería  
Química y de Bioprocesos  
Pontificia Universidad Católica.

“Análisis y evaluación de la inclusión de extracto de hojas de olivo libre  
y encapsulado en matrices de almidón y gluten”

MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

**CATALINA INES URZUA URQUIAGA**

Santiago de Chile, 2015.

Esta memoria fue financiada por el proyecto anillo ACT1105

## **Agradecimientos**

A Dios y a mis padres, por su amor y apoyo incondicional durante todos los años de mi carrera. En especial a mi madre Inés por su paciencia, su dedicación, sus consejos y por inspirarme a ser cada día mejor.

A mi patrocinante de memoria y directora de tesis, Dra. Paz Robert, por acogerme en su equipo de trabajo, por su confianza y su tiempo.

A mi director de tesis Prof. Pedro Bouchon y en especial a Ingrid Contardo, por su ayuda desinteresada y apoyo durante mi investigación en la PUC.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Estefanía González, Paula García, Guibeth Morelo, por su apoyo y compañía durante todo este periodo.

A Sergio, por su compañía y apoyo, por creer en mí y ayudarme a ver las cosas de un modo más simple.

A mis amigas y compañeras de carrera Camila Hernández, Camila Meza, Carolina Plaza y Claudia Saavedra por su amistad durante todos estos años, por su apoyo, sus consejos, sus risas y por haber hecho inolvidables estos largos años de estudio.

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

## Índice general

Índice General	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	iv
Índice de Anexos	vii
Resumen	viii
Summary	xi
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	3
2.1 Antioxidantes	3
2.2 Oleuropeína	4
2.3 Determinación de polifenoles totales	6
2.4 Medida de la actividad antioxidante	6
2.5 Microencapsulación	8
2.6 Secado por atomización	9
2.7 Agente encapsulante: Inulina	10
2.8 Fritura atmosférica y al vacío	12
3. Hipótesis	14
4. Objetivos	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos específicos	14
5. Materiales y métodos	15
5.1 Materiales	15
5.2 Métodos	15
5.2.1 Preparación del extracto de hojas de olivo (EHO)	15
5.2.2 Obtención de micropartículas de extracto de hojas de olivo (In-EHO)	15
5.2.3 Caracterización de las micropartículas de extracto de hojas de olivo	16
5.2.4 Análisis cromatográfico	17

5.2.5 Incorporación de extracto de hojas de olivo y micropartículas (In-EHO) a las masas.	18
5.2.6 Fritura de las masas	19
5.2.7 Extracción de polifenoles de las masas/hojuelas	21
5.2.8 Determinaciones analíticas	22
5.2.9 Análisis de textura	23
5.2.10 Análisis estadístico	23
6. Resultados y discusión	24
6.1 Caracterización física y química del extracto de hojas de olivo ( <i>Olea Europaea L.</i> , cv. Arbequina)	24
6.1.1 Contenido de oleuropeína	24
6.1.2 Polifenoles totales	25
6.1.3 Capacidad antioxidante	26
6.2 Elaboración y caracterización de micropartículas de extracto de hojas de olivo ( <i>Olea Europaea L.</i> ) con inulina como agente encapsulante	29
6.3 Elaboración y caracterización de masas de almidón y gluten con y sin extracto de hojas de olivo o micropartículas	31
6.4 Caracterización de hojuelas de almidón y gluten sometidas a fritura atmosférica y vacío, sin y con extracto de hojas de olivo o micropartículas	33
6.4.1 Contenido de humedad y materia grasa libre en hojuelas	33
6.4.1.1 Humedad	33
6.4.1.2 Contenido de materia grasa libre	34
6.4.2 Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en hojuelas	36
6.4.2.1 Contenido de polifenoles totales	37
6.4.2.2 Actividad antioxidante	38
6.5 Efecto del tipo de fritura sobre la dureza de las masas	43
7. Conclusiones	45
8. Bibliografía	46
9. Anexos	53

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Estructura molecular de oleuropeína	4
<b>Figura 2:</b> Metabolismo de la oleuropeína	5
<b>Figura 3:</b> Esquema micropartícula tipo matriz	9
<b>Figura 4:</b> Estructura química de la inulina	11
<b>Figura 5:</b> Curva de calibración de estándar de oleuropeína	18
<b>Figura 6:</b> Esquema de la freidora	20
<b>Figura 7:</b> Cromatograma HPLC-DAD (280 nm) de la oleuropeína en el extracto de hojas de olivo (cv. Arbequina)	25
<b>Figura 8:</b> Contenido de materia grasa (% base seca) en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y a vacío	35
<b>Figura 9:</b> Comparación del contenido de polifenoles totales en hojuelas con extracto (EHO) versus hojuelas con micropartículas (In-EHO) sometidas a fritura atmosférica y al vacío	37
<b>Figura 10:</b> Comparación del contenido de polifenoles totales entre fritura atmosférica versus fritura al vacío, en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO	38
<b>Figura 11:</b> Comparación de la capacidad antioxidante (DPPH) en hojuelas con extracto (EHO) versus hojuelas con micropartículas (In-EHO) sometidas a fritura atmosférica y al vacío	39
<b>Figura 12:</b> Comparación de la capacidad antioxidante (FRAP) en hojuelas con extracto (EHO) versus hojuelas con micropartículas (In-EHO) sometidas a fritura atmosférica y al vacío	39
<b>Figura 13:</b> Comparación de la capacidad antioxidante DPPH entre fritura atmosférica versus fritura al vacío, en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO	40
<b>Figura 14:</b> Comparación de la capacidad antioxidante FRAP entre fritura atmosférica versus fritura al vacío, en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO	41

<b>Figura 15:</b> Contenido de polifenoles totales versus capacidad antioxidante en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y a vacío	42
<b>Figura 16:</b> Optimización de múltiples respuestas para el sistema de micropartículas In-EHO	53
<b>Figura 17:</b> Curva de calibración de ácido gálico	55
<b>Figura 18:</b> Ajuste lineal curva de decoloración de DPPH	56
<b>Figura 19:</b> Curva de calibración % decoloración v/s concentración de equivalentes Trolox ( $\mu\text{Moles/L}$ )	58
<b>Figura 20:</b> Curva de calibración absorbancia v/s concentración de equivalentes Trolox ( $\mu\text{Moles/L}$ )	59

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Formulación de las masas	19
<b>Tabla 2:</b> Condiciones de fritura.	21
<b>Tabla 3:</b> Características físicas y químicas del extracto hidroalcohólico de hojas de olivo (EHO)	24
<b>Tabla 4:</b> Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante (ORAC) en frutas (INTA, 2015)	28
<b>Tabla 5:</b> Caracterización física y química de las micropartículas de extracto de hojas de olivo obtenidas por secado por atomización	29
<b>Tabla 6:</b> Contenido de humedad, sólidos y polifenoles totales en masas de almidón y gluten con y sin extracto de hojas de olivo o micropartículas	31
<b>Tabla 7:</b> Contenido de humedad, materia grasa libre y sólidos en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y al vacío	33
<b>Tabla 8:</b> Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y a vacío	36
<b>Tabla 9:</b> Fuerza máxima de quiebre de las hojuelas almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y a vacío	43
<b>Tabla 10:</b> Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación, recuperación y rendimiento del diseño experimental para la obtención de micropartículas óptimas	53
<b>Tabla 11:</b> Condiciones óptimas elaboración de micropartículas (In-EHO)	54
<b>Tabla 12:</b> Optimización de la deseabilidad	54
<b>Tabla 13:</b> Humedad de los ingredientes (base húmeda)	54
<b>Tabla 14:</b> Porcentaje de decoloración del DPPH a distintas concentraciones de extracto de hojas de olivo y su concentración en polifenoles	57

<b>Tabla 15:</b> Elaboración curva de calibración equivalentes Trolox para DPPH	57
<b>Tabla 16:</b> Elaboración curva de calibración equivalentes Trolox para FRAP	59



## Índice de anexos

<b>Anexo 1:</b> Condiciones del diseño experimental para la obtención de micropartículas (In-EHO) en condiciones óptimas	53
<b>Anexo 2:</b> Humedad de los ingredientes utilizados en la preparación de las masas	54
<b>Anexo 3:</b> Determinación del contenido de polifenoles totales a través del método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965)	54
<b>Anexo 4:</b> Determinación de actividad antioxidante	56
<b>Anexo 5:</b> Prueba de múltiples rangos para humedad en masas crudas	59
<b>Anexo 6:</b> Prueba de múltiples rangos para contenido de polifenoles totales en masas crudas	60
<b>Anexo 7:</b> Prueba de múltiples rangos para humedad en hojuelas fritas	60
<b>Anexo 8:</b> Prueba de múltiples rangos para contenido de grasa en hojuelas fritas	61
<b>Anexo 9:</b> Prueba de múltiples rangos para contenido de polifenoles totales en hojuelas fritas	62
<b>Anexo 10:</b> Prueba de múltiples rangos para capacidad antioxidante (DPPH) en hojuelas fritas	63
<b>Anexo 11:</b> Prueba de múltiples rangos para capacidad antioxidante (FRAP) en hojuelas fritas	64
<b>Anexo 12:</b> Prueba de múltiples rangos para fuerza máxima de quiebre en hojuelas fritas	65

## Resumen

En Chile, el cultivo del árbol de olivo (*Olea Europaea L.*) es de gran importancia, siendo la Arbequina la variedad más cultivada. Como desecho de la industria olivícola se obtiene gran cantidad de hojas que poseen un interesante y amplio perfil de polifenoles, siendo la oleuropeína el más importante. El extracto de hojas de olivo es una interesante alternativa para la incorporación de antioxidantes naturales en alimentos. Sin embargo, la oleuropeína es susceptible a degradación frente a condiciones ambientales (luz, temperatura, entre otros) y/o condiciones en el alimento (pH, enzimas, interacción con otros componentes). La hipótesis de este trabajo plantea que la adición de micropartículas de extracto de hojas de olivo en matrices de almidón y gluten mantendrá en mayor grado el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante respecto a la adición de extracto sin encapsular. Se preparó un extracto hidroalcohólico de hojas de olivo (cv. Arbequina) donde la oleuropeína fue el principal polifenol encontrado. El extracto de hojas de olivo (EHO) se encapsuló utilizando inulina como agente encapsulante, a través de la técnica de secado por atomización. Las micropartículas (In-EHO) presentaron una alta eficiencia de encapsulación y recuperación de oleuropeína (>87%).

Para evaluar la factibilidad del uso de extracto de hojas de olivo como fuente de polifenoles en alimentos y comparar su efectividad con la de las micropartículas, se incorporó EHO y In-EHO a matrices de almidón y gluten. Se probaron tres concentraciones de polifenoles 200, 350 y 500 ppm EAG (Equivalente Ácido Gálico). Las matrices fueron fritas bajo condiciones atmosféricas y de vacío, 170 y 116°C por 5 y 3 min, respectivamente. Las hojuelas fueron caracterizadas según su contenido de humedad, grasa libre, polifenoles totales (Folin-Ciocalteu), actividad antioxidante (DPPH, FRAP) y dureza.

Las hojuelas con micropartículas (In-EHO), presentaron un mayor contenido de polifenoles totales en fritura atmosférica y una mayor capacidad antioxidante en fritura atmosférica y al vacío, respecto a aquellas hojuelas con extracto (EHO). Por su parte, a igual contenido de polifenoles, la capacidad antioxidante fue significativamente mayor en fritura atmosférica que al vacío, sugiriendo que durante la fritura atmosférica se generan metabolitos con actividad antioxidante derivados de la reacción de Maillard.

## Summary

“Analysis and evaluation of the incorporation of free and encapsulated olive leaves extract in gluten and starch matrices”.

In Chile, the olive tree (*Olea Europaea L.*) cultivation is of great importance, being Arbequina the most cultivated variety. As a discard by-product of the olive industry, lots of leaves are obtained. These leaves have an interesting and wide profile of polyphenols, being oleuropein the most important. The olive leaves extract is an interesting alternative for incorporation of natural antioxidants in food. Oleuropein, however, is sensitive to degradation by environmental (light, temperature) and food (pH, enzymes, interaction with other components) conditions. The hypothesis of this work suggests that the addition of microparticles of olive leaves extract in starch and gluten matrices will keep in a higher degree the polyphenol content and the antioxidant activity than the addition of not encapsulated extract. An hidroalcoholic olive leaves extract was prepared (cv. Arbequina) where oleuropein was the main polyphenol found. The olive leaves extract (EHO) was encapsulated using inulin as encapsulation agent by spray drying technology. The microparticles (In-EHO) showed high encapsulation efficiency and oleuropein recovery (>87%).

To evaluate the feasibility of using the olive leaves extract as a source of polyphenols and compare its effectiveness with the microparticles, EHO and In-EHO were incorporated in starch and gluten matrices. Three different concentrations of polyphenols were tested 200, 350 and 500 ppm EAG (Gallic Acid Equivalent). The matrices were fried under atmospheric and vacuum conditions, 170 and 116°C for 5 and 3 min, respectively. The fried chips were analyzed according to its moisture content, fat content, total polyphenol content (Folin-Ciocalteu), antioxidant activity (DPPH, FRAP) and hardness.

The chips with microparticles (In-EHO) showed higher polyphenol content in atmospheric frying and higher antioxidant capacity in both frying conditions, than those chips with extract (EHO). Furthermore, for the same polyphenol content the antioxidant activity was higher in atmosphere conditions than in vacuum ones, suggesting that during atmosphere frying Maillard reaction products with antioxidant activity are formed.

## Introducción

La alimentación cumple un rol fundamental en la salud y en la incidencia de las enfermedades crónicas no transmisibles, principal causa de muerte en Chile y en el mundo. El riesgo de padecer dichas enfermedades puede reducirse aumentando la ingesta de antioxidantes en la dieta, ya que éstos protegen los tejidos de la acción de radicales libres, inhibiendo o retrasando el daño celular. Los antioxidantes son compuestos químicos capaces de retrasar la oxidación de diversas sustancias, principalmente de ácidos grasos insaturados (Zamora, 2007; Scaccini, 2004; Mattivi, 2004).

En Chile, el cultivo del árbol de olivo es de gran importancia, con más de 25.000 ha plantadas, siendo la Arbequina la variedad de olivo más cultivada (Chile Oliva, 2014). Como desecho de la industria del aceite, se obtiene gran cantidad de hojas que actualmente no poseen aplicaciones tecnológicas económicamente viables. Las hojas del olivo poseen un interesante y amplio perfil de polifenoles, siendo la oleuropeína el principal compuesto fenólico presente (Soler-Rivas *et al.*, 2000). A la oleuropeína se le atribuyen efectos beneficiosos sobre la salud, presentando propiedades antioxidantes así como también anticancerígenas, antiinflamatorias y antimicrobianas (Carrera-González *et al.*, 2013). Estructuralmente, la oleuropeína comprende tres sub-unidades: un polifenol (hidroxitirosol), un secoiridoide (ácido elenólico) y un azúcar (glucosa) (Gikas *et al.*, 2007).

Actualmente, existe un creciente interés por parte de los consumidores por conocer tanto el origen de los alimentos como los efectos que estos pueden tener sobre la salud. Dicha preocupación se ha traducido en un aumento en la demanda por alimentos naturales o con adición de biocompuestos que ofrecen un beneficio mayor. Así, la tendencia en la industria alimentaria apunta al desarrollo de alimentos saludables y/o funcionales, basados en el uso de extractos naturales ricos en compuestos bioactivos (Lutz, 2012).

La elaboración de extractos de oleuropeína generalmente se realiza utilizando solventes (Jiménez *et al.*, 2011). Lamentablemente, la oleuropeína se degrada

fácilmente frente a condiciones ambientales (luz, oxígeno, entre otros) así como durante la elaboración y/o almacenamiento de alimentos. Así, la tecnología de encapsulación surge como una alternativa para la protección de biocompuestos y su liberación controlada en un lugar de interés y/o a una velocidad específica, preservando su actividad hasta llegar al organismo.

En este trabajo se estudió el efecto de la adición de extracto de hojas de olivo en forma libre y encapsulado sobre las propiedades antioxidantes de hojuelas de almidón y gluten fritas bajo condiciones atmosféricas y de vacío.

## Revisión bibliográfica

### 2.1 Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que se caracterizan por impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias, principalmente de ácidos grasos insaturados. Las reacciones de oxidación que se producen en el organismo humano pueden provocar alteraciones fisiológicas importantes, desencadenando diversas enfermedades. A nivel celular, los antioxidantes facilitan el uso fisiológico del oxígeno por parte de las mitocondrias celulares, ayudando a reducir los efectos del estrés oxidativo. Los compuestos antioxidantes forman complejos que mitigan las reacciones productoras de radicales libres (moléculas inestables de alta energía con electrones desapareados en sus niveles externos, que reaccionan con otros compuestos) y por consiguiente desempeñan una función fundamental en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles (Zamora, 2007). La protección que otorga el consumo de frutas y verduras se atribuye a la presencia de diversos compuestos con actividad antioxidante como vitamina C, vitamina E, tocoles y polifenoles (Moure *et al.*, 2000).

En alimentos el deterioro oxidativo de grasas y aceites es responsable de la aparición de olores y sabores rancios, con la consecuente pérdida de calidad nutricional e inocuidad alimentaria por formación de metabolitos secundarios potencialmente tóxicos. La adición de antioxidantes es necesaria para la preservación de las características sensoriales y nutricionales de los alimentos, aumentando así su vida útil (Moure *et al.*, 2000).

Los polifenoles, principal grupo de antioxidantes, son efectivos donadores de hidrógeno. Su potencial antioxidante depende del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de sustituyentes dadores de electrones en el anillo estructural. La capacidad de desplazamiento de

electrones en el grupo aromático (resonancia), define su efectividad (Kuskoski *et al.*, 2004).

## 2.2 Oleuropeína

La oleuropeína es el principal compuesto bioactivo presente en las hojas del árbol de olivo, *Olea Europaea L.* La molécula consiste en tres subunidades estructurales: polifenol (hidroxitirosol), secoiridoide (ácido elenólico) y azúcar (glucosa) (Figura 1). El hidroxitirosol es considerado uno de los antioxidantes más poderosos de la naturaleza, mientras que el ácido elenólico ha mostrado fuertes propiedades antivirales. A la oleuropeína se le atribuyen efectos beneficiosos sobre la salud humana, gracias a sus propiedades antioxidantes, que previenen la oxidación de las lipoproteínas evitando la formación de placas de ateroma. Además presenta propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas (Gikas *et al.*, 2007).

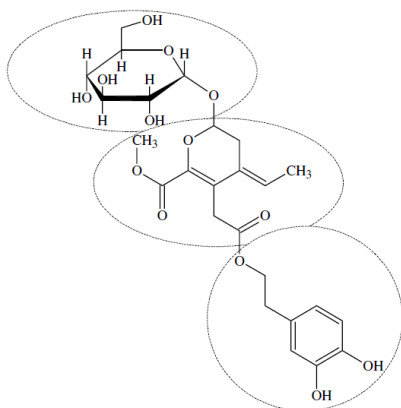


Figura 1: Estructura molecular de oleuropeína (Gikas *et al.*, 2007).

La oleuropeína pertenece al grupo de los secoiridoideos, presentes solo en plantas de la familia de *Oleaceae*, encontrándose en mayor concentración en las hojas de *Olea europaea L.* Su biosíntesis deriva de la vía del acetato/mevalonato, metabolismo secundario que resulta en la formación de oleosidos, de los cuales derivan los secoiridoideos (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Las hojas del olivo poseen un interesante y amplio perfil de polifenoles. Además de la oleuropeína, presentan

otros compuestos como verbascósido, oleurósido, ligustrósido, flavonoides glicosilados y en menor frecuencia apigenina-7-rutinósido, luteolina-7-rutinósido, luteolina-4-glicósido y flavonoides agliconas, entre otros (Ranalli *et al.*, 2006).

El metabolismo de la oleuropeína (Figura 2) lo ha sugerido Carrera-González *et al.* (2013) de acuerdo a las características estructurales de la molécula. Durante la digestión, en el estómago, la oleuropeína sufre hidrólisis ácida del enlace  $\beta$ -glicosídico liberando por una parte la glucosa y por otra la oleuropeína aglicona. De esta última inmediatamente se originan dos dialdehídos, los cuales son inestables en la interfase lípido/agua por lo que se convierten rápidamente en un secoiridoide transpuesto (compuesto estable de características lipofílicas). Por otro lado, cuando la oleuropeína es administrada en cápsulas que resisten las condiciones del estómago, ésta llega al intestino donde puede sufrir la acción de dos lipasas, con la subsecuente liberación del hidroxitirosol, compuesto con actividad biológica comprobada. Luego de su metabolización, los derivados de la oleuropeína son absorbidos y distribuidos a través del torrente sanguíneo prácticamente a todos los tejidos del cuerpo (Figura 2). Además, se ha sugerido que los compuestos fenólicos no absorbidos cumplen una función antioxidante a nivel del tracto gastrointestinal.

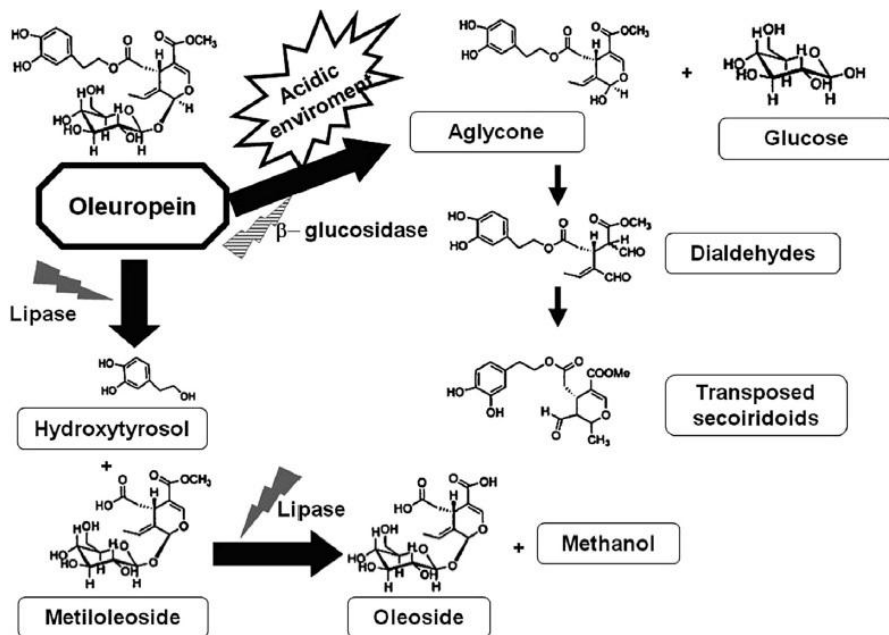


Figura 2: Metabolismo de la oleuropeína (Carrera-González *et al.*, 2013).



El alto contenido de oleuropeína y el amplio perfil de polifenoles presente en las hojas de olivo han motivado la investigación sobre su uso como fuente de antioxidantes naturales. La extracción de los polifenoles contenidos en las hojas de olivo generalmente se realiza utilizando solventes, mezclas acuosas de etanol o metanol. Algunos autores sugieren que el método de extracción y el pre tratamiento de las hojas podrían determinar el contenido y el perfil de polifenoles presente en el extracto y con esto su capacidad antioxidante (Jiménez *et al.*, 2011).

### 2.3 Determinación de polifenoles totales

El método más utilizado para la determinación de polifenoles totales es el ensayo de Folin-Ciocalteu. Este se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu corresponde a una mezcla de ácidosfosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{10}$ ) y fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), que en presencia de fenoles se reduce a óxidos azules de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). El color es proporcional al número de grupos hidroxilos y se determina en espectrofotómetro a 725 nm (Jiménez *et al.*, 2011; Singleton y Rossi, 1965).

### 2.4 Medida de la actividad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante permite estimar el nivel de protección a la oxidación que confiere cierta sustancia bioactiva. La mayoría de los métodos se basan en el uso de sistemas generadores de radicales, de manera que la actividad antioxidante de la especie de interés se determina según en qué medida es capaz de inhibir dichos radicales. No obstante, como la capacidad antioxidante total de una muestra viene determinada por interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos, así como por el modo de acción concreto de cada uno de ellos, es necesario combinar más de un método para evaluar de manera correcta la capacidad antioxidante de una muestra. Actualmente, existen diversas metodologías para evaluar la capacidad antioxidante basadas en diferentes métodos de acción, reducción de metales (FRAP), capacidad de captación de

radicales peroxilo (ORAC, TRAP), de radicales hidroxilo (ensayo de la deoxirribosa), de radicales generados a partir de ciertas moléculas orgánicas (ABTS, DPPH), entre otros (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2007). En este estudio se utilizaron los métodos de medición de actividad antioxidante que se detallan a continuación, DPPH, ORAC y FRAP.

El método de DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) consiste en determinar la capacidad de captura del radical DPPH por el compuesto antioxidante en estudio. El radical DPPH presenta un máximo de absorción a 515 nm, señal que disminuye su absorbancia de manera proporcional a la concentración y actividad del antioxidante (Brand-Williams *et al.*, 1995).

El método ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales Oxígeno) se basa en la habilidad de los antioxidantes para bloquear radicales libres por medio de la donación de un átomo de hidrógeno ( $X + AH \rightarrow XH + A^*$ ). El radical peroxilo reacciona con una sustancia fluorescente (proteína fluoresceína) generando productos no fluorescentes, provocando un descenso en la fluorescencia. La capacidad antioxidante se cuantifica como medida de la detención o inhibición del descenso de la fluorescencia (Ou *et al.*, 2001).

El método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) se basa en la transferencia de electrones, donde cierta sustancia antioxidante es capaz de reducir el  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$ . En este ensayo el complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina ( $Fe^{+3}$ -TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Se trata de un método espectrofotométrico en el que se mide la absorbancia del  $Fe^{+2}$ . De esta manera, la capacidad antioxidante se determina comparando la absorbancia a 593 nm de dicho compuesto ferroso cuando se adiciona o no un antioxidante a la solución del complejo férrico (Benzie y Strain, 1996).

Tanto el contenido de polifenoles como la capacidad antioxidante del extracto de hojas de olivo se ven afectadas por las condiciones ambientales y las del alimento

en el que se encuentra. Para que el extracto pueda efectivamente exhibir sus propiedades antioxidantes a nivel del organismo es necesario que resista dichas condiciones. La tecnología de encapsulación surge como una alternativa que reduciría o incluso evitaría la oxidación de los polifenoles y su interacción con otros componentes del alimento, preservando su capacidad antioxidante.

## 2.5 Microencapsulación

La microencapsulación se define como un proceso a través del cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas son cubiertas con una película polimérica que contiene una sustancia activa. La cubierta proporciona una barrera física entre el material del núcleo y los compuestos presentes en el alimento en cuestión. Dicho revestimiento confiere protección y varias ventajas para la inclusión de ingredientes en alimentos, protege el material activo de la degradación, reduce la migración del material encapsulado hacia el exterior, proporciona un manejo más fácil del ingrediente, permite enmascarar el sabor y olor del material, entre otros (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Gracias a la encapsulación es posible incluir sustancias que originalmente no eran viables en ciertas matrices alimentarias.

La encapsulación de antioxidantes confiere protección frente a condiciones medioambientales (oxígeno, luz, agua, entre otros), condiciones del alimento (pH, enzimas) y permite dirigir la liberación del antioxidante en un lugar y tiempo específico (Desai y Park, 2005). Así, la tecnología de encapsulación permite diseñar alimentos saludables, donde el alimento actúa como un carrier permitiendo que las micropartículas liberen el antioxidante en el lugar indicado, preservando de este modo su biodisponibilidad y bioaccesibilidad.

Las micropartículas pueden componerse de una o más sustancias así como el recubrimiento puede consistir en una o más capas. Generalmente, las micropartículas obtenidas por secado por atomización poseen características matriciales, donde no es posible distinguir claramente el núcleo del material

encapsulante (Figura 3). La retención del compuesto activo depende de varios factores como su solubilidad, polaridad, volatilidad y su función química. Así mismo, tanto el tamaño como la forma de las micropartículas formadas depende de los materiales y métodos usados para prepararlas. El tamaño de las micropartículas comprende desde  $1\mu\text{m}$  a  $1\text{ mm}$  (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

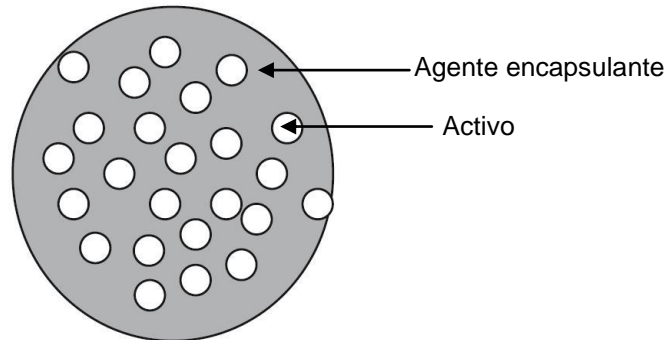


Figura 3: Esquema micropartícula tipo matriz (Desai y Park, 2005).

Las técnicas de microencapsulación pueden dividirse en procesos químicos y físicos. Dentro de los primeros se mencionan la coacervación, co-cristalización, polimerización interfacial y gelificación iónica, entre otros. En el caso de los métodos físicos se encuentra la extrusión, el secado por congelamiento, enfriamiento y aspersión, siendo este último el más común.

## 2.6 Secado por atomización

El secado por atomización es una operación unitaria, en la cual un producto líquido (solución, dispersión y/o emulsión) es atomizado a través de un gas caliente, generalmente aire, generando instantáneamente un polvo (Gharsallaoui *et al.*, 2007). El proceso involucra tres etapas, la preparación del líquido de alimentación, la homogeneización y la atomización del mismo. La atomización del líquido puede realizarse a través de la aplicación de presión o fuerza centrífuga. El objetivo de esta etapa es maximizar la superficie de transferencia de calor entre el aire y el

material. Cuando las pequeñas gotas toman contacto con el gas caliente se produce una rápida evaporación del solvente formándose una fina película del material de recubrimiento. La sustancia a encapsular es rodeada por la matriz protectora (Parra, 2011). El secado por atomización es el método de encapsulación más utilizado en la industria alimentaria por ser económico y permitir la obtención de un producto de buena estabilidad y flexibilidad (López-Hernández y Gómez-Carril, 2008).

Los parámetros a considerar y controlar para la aplicación efectiva de esta técnica son las temperaturas de entrada y salida del aire de secado, el flujo de alimentación, la relación activo/ agente encapsulante, el tiempo de residencia y el acondicionamiento de la materia prima (García *et al.*, 2004).

Entre los agentes encapsulantes utilizados para la encapsulación de compuestos bioactivos se encuentran lípidos, carbohidratos, almidones, maltodextrinas, gomas y proteínas, destacando el uso de alginato y quitosano como polímeros de liberación colónica (Parra, 2011). La elección del agente encapsulante es determinante para la aplicabilidad de las micropartículas.

### 2.7 Agente encapsulante: Inulina

Para elegir el material de recubrimiento es importante considerar una serie de factores, incluyendo sus propiedades físicas y químicas, su compatibilidad con la matriz alimentaria donde se incluirá así como con el material activo, su estabilidad y resistencia frente a ciertas condiciones y su influencia en las propiedades sensoriales del alimento (Sanguansri y Augustin, 2010).

La inulina es un polisacárido constituido por moléculas de fructosa (fructooligosacarido) unidas por enlaces  $\beta$ -(2-1) ligadas con una glucosa en el extremo de la cadena y ligeramente ramificado (1-5%) (Figura 4) (Stevens *et al.*,

2001), siendo su principal fuente de extracción la achicoria (*Cichorium intybus*) (Lara, 2011).

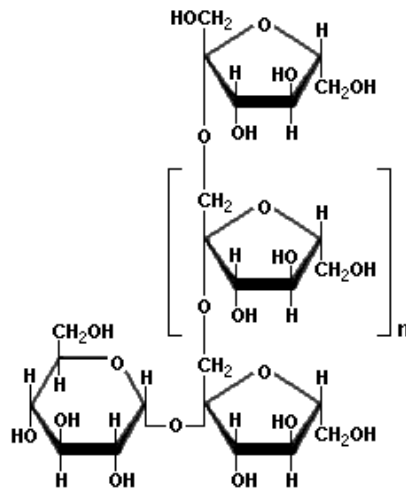


Figura 4: Estructura química de la inulina (Lara, 2011).

La solubilidad en agua a 25 °C, para inulina e inulina de alto grado de polimerización, corresponde a 120 y 25 g/L, respectivamente, mientras que la viscosidad en agua (5% p/p sol. acuosa a 10 °C) es 1,6 y 2,4 mPa•s, respectivamente (Muñoz *et al.*, 2012).

Su configuración química no permite que sea hidrolizado por las enzimas digestivas del hombre, permaneciendo sin modificación durante el recorrido por el intestino delgado. No obstante, puede ser hidrolizado y fermentado en su totalidad en el intestino grueso. Este proceso es realizado anaeróbicamente por la microflora, exhibiendo por tanto una función prebiótica (Muñoz *et al.*, 2012). Dicha característica, lo convierte en un material con alto potencial en la elaboración de fármacos con acción específica en el colon, permitiendo que, el principio activo del material encapsulado sea liberado en el lugar de interés (Lara, 2011).

La encapsulación de compuestos antioxidantes utilizando inulina como agente encapsulante podría proteger los polifenoles hasta su liberación a nivel gastrointestinal, aumentando también el aporte de fibra soluble en el alimento al cual se le ha adicionado.

## 2.8 Fritura atmosférica y al vacío

La operación de fritura consiste en cocinar alimentos por medio de su inmersión en un aceite comestible a una temperatura superior a la de evaporación del agua. Este proceso involucra simultáneamente transferencia de masa y calor entre el alimento y el aceite, con la consecuente formación de burbujas de vapor de agua y acumulación de aceite en la superficie del alimento (Dueik y Bouchon, 2011).

Dentro de esta operación pueden distinguirse cuatro fases, la primera corresponde al calentamiento inicial, donde aumenta la temperatura de la superficie del alimento hasta alcanzar el punto de ebullición del agua, es una fase corta y donde se liberan cantidades despreciables de agua. En la siguiente etapa la superficie del alimento, que se encuentra en ebullición, libera una gran cantidad de agua y comienza a formarse la corteza. La tercera fase representa el periodo donde se pierde la mayor parte de la humedad, se produce turbulencia debido a la gran pérdida de humedad como vapor de agua y el centro del alimento alcanza temperaturas similares a las del punto de ebullición. La última etapa, definida como punto final de burbuja, corresponde al término aparente de humedad en el producto (Dueik y Bouchon, 2011).

La fritura provoca una serie de cambios fisicoquímicos en los componentes del alimento así como cambios microestructurales en el mismo. En el centro del alimento se produce principalmente gelatinización del almidón y desnaturalización de proteínas, modificaciones debidas a la cocción del alimento. En la corteza por su parte, ocurren transformaciones estructurales debidas tanto a la deshidratación como a la exposición a altas temperaturas y oxígeno. Este último provoca cambios de color así como pérdida de la actividad biológica de biocompuestos como ácido ascórbico, carotenoides y antocianinas. Así mismo, las altas temperaturas provocan pérdida de la capacidad antioxidante y cambio de color en diversos compuestos. Se produce el pardeamiento no enzimático el cual además de provocar cambios deseados en color, sabor y aroma produce una gran cantidad de

compuestos tóxicos como acrilamida y furano en algunos alimentos. Cabe mencionar que no sólo el alimento sufre cambios, sino que también el aceite utilizado es sometido a los efectos de la exposición al oxígeno y a las altas temperaturas. Sufre oxidación, hidrólisis y degradación térmica con la consecuente formación de radicales libres (Dueik y Bouchon, 2011).

En este contexto, la fritura al vacío surge como una alternativa para la producción de alimentos fritos más saludables. Al disminuir la presión de trabajo es posible reducir la temperatura de ebullición del agua. Esto crea un ambiente con una menor presión de oxígeno lo cual permite disminuir tanto el efecto negativo que tienen las altas temperaturas como el oxígeno sobre el alimento y el aceite. Manteniendo en mayor grado la función de compuestos termolábiles así como el color, sabor y olor del alimento original (Dueik y Bouchon, 2011).



### 3. Hipótesis

La inclusión de micropartículas de extracto de hojas de olivo en matrices de almidón y gluten sometidas a procesos de fritura (atmosférica y vacío) permitirá mantener en mayor grado el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante con respecto a la adición del extracto sin encapsular.

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de un extracto de hojas de olivo libre y encapsulado sobre las propiedades antioxidantes de hojuelas de almidón y gluten sometidas a fritura atmosférica y al vacío.

#### 4.2 Objetivos específicos

1. Obtener y caracterizar un extracto de hoja de olivo (*Olea Europaea L.*) a través del contenido de oleuropeína, polifenoles totales y actividad antioxidante (DPPH, ORAC y FRAP).
2. Elaborar micropartículas de extracto de hojas de olivo (*Olea Europaea L.*) utilizando inulina como agente encapsulante, bajo condiciones óptimas determinadas en estudios previos.
3. Caracterizar las micropartículas de extracto de hojas de olivo según su contenido de oleuropeína total, superficial, polifenoles totales y actividad antioxidante (DPPH, FRAP).
4. Elaborar matrices de almidón y gluten con extracto de hojas de olivo y micropartículas.
5. Determinar el contenido de polifenoles totales, actividad antioxidante, humedad, materia grasa libre y dureza de las hojuelas de almidón y gluten sometidas a fritura atmosférica y vacío, sin y con extracto de hojas de olivo libre o encapsulado.

## Materiales y métodos

### 5.1 Materiales

- Hojas de olivo (*Olea Europaea L.*) variedad Arbequina (Melipilla, Región Metropolitana, 2013).
- Inulina HP (DP>23) Raftilina®, obtenida de Alfa Chile S.A.
- Almidón y gluten de trigo, obtenida de Asitec S.A, Chile.
- Aceite de maravilla alto oleico, obtenida de Camilo Ferrón Chile S.A.

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 Preparación del extracto de hojas de olivo (EHO).

Las hojas de olivo fueron previamente escaldadas, secadas y molidas. Las hojas de olivo molidas (400 g) se maceraron con 1600 mL de una mezcla etanol: agua (1:1 v/v) por 24 h. El sobrenadante fue filtrado al vacío en embudo Büchner provisto de papel filtro (Whatman #1). La torta se volvió a re-extraer dos veces más, utilizando la misma metodología anterior. El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio (Büchi, Suiza) a una temperatura promedio de 40°C, hasta reducir su volumen en aproximadamente un 80%. El volumen de extracto obtenido fue de 1000 mL. Finalmente, el EHO se almacenó en botellas de vidrio forradas en papel metálico en congelador a -20°C.

#### 5.2.2 Obtención de micropartículas de extracto de hojas de olivo (In-EHO).

Las micropartículas de EHO se elaboraron utilizando inulina como agente encapsulante de acuerdo a condiciones óptimas de temperatura del aire de entrada al secador (136°C) y relación EHO/In (1:1,8), determinadas en estudios previos (Anexo 1).

Se calentó 172 mL de agua destilada a 65 – 70 °C y se agregó 18 g de inulina bajo agitación. Posteriormente, cuando la solución alcanzó una temperatura de 25 – 30 °C, se agregó 10 mL de extracto. La solución se agitó continuamente utilizando un agitador magnético y se alimentó en un secador Mini Spray-drying Buchi 290 a una temperatura de aire de entrada de 136°C. El flujo de aire, la velocidad de alimentación y la presión de atomización correspondieron a 600 L/h, 5 mL/min y 5 bar, respectivamente. Las micropartículas obtenidas se almacenaron a -20°C hasta posterior análisis.

### 5.2.3 Caracterización de las micropartículas de extracto de hojas de olivo.

#### a) Determinación de oleuropeína total:

En un tubo de ensayo, se pesaron 0,1 g de micropartículas en balanza analítica (Precisa 125 A, Suiza), se agregaron 2 mL de agua HPLC y se agitó en vortex por un minuto. Posteriormente, se sumergió el tubo en un vaso con agua caliente (65±5°C) por unos segundos y se volvió a agitar en vortex. Este procedimiento se repitió hasta obtener una solución completamente translúcida. Luego, la solución se traspasó a un matraz de aforo y se completó el volumen agregando fase móvil (acetonitrilo:agua:ácido acético (80:20:0,1 v/v/v)). Finalmente, se sonicó por 5 min y se inyectó en el HPLC (ver punto 5.2.4).

#### b) Determinación de oleuropeína superficial:

En un tubo de ensayo, se pesaron 0,1 g de micropartículas en balanza analítica (Precisa 125 A, Suiza), se agregaron 2 mL de etanol y se agitó suavemente el tubo de manera que las micropartículas tomaran contacto con el solvente. Se centrifugó en una centrifuga (Hermle Z 206 A, Alemania) dos veces por 5 min a 5000 rpm (2,906 x g), se colectó el sobrenadante en un matraz de aforo y se completó el volumen agregando fase móvil (acetonitrilo:agua:ácido acético (80:20:0,1 v/v/v)). Finalmente, se sonicó por 5 min y se inyectó en el HPLC (ver punto 5.2.4).

c) Eficiencia encapsulación de oleuropeína (OE) (EE):

Se calculó a partir de la ecuación 1:

$$EE(\%) = \frac{\text{Contenido OE total} - \text{contenido OE superficial}}{\text{Contenido OE total}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

d) Porcentaje de recuperación de oleuropeína (OE) (R):

Se calculó utilizando la ecuación 2:

$$R(\%) = \frac{\text{Contenido OE total}}{\text{Contenido OE teórico}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

e) Rendimiento del proceso (Y):

Se calculó utilizando la ecuación 3:

$$Y(\%) = \frac{\text{peso micropartículas obtenidas experimentalmente (g)}}{\text{peso teórico micropartículas (g)}} \quad (\text{EC. 3})$$

#### 5.2.4 Análisis cromatográfico.

Se determinó el contenido de oleuropeína por HPLC utilizando una bomba Merck – Hitachi L-6200, con detector de arreglo de diodos Waters 996 acoplado a un computador equipado con el software Empower Pro y una columna C18 (5 µm, 4,6 d.i x 250 mm, Symmetry, Waters). Se utilizó una fase móvil isocrática compuesta de acetonitrilo:agua:ácido acético (80:20:0,1 v/v/v) con flujo de 1 mL/min. La detección de oleuropeína se realizó a 280 nm y se cuantificó utilizando una curva de calibración (20 – 200 µg/mL, R<sup>2</sup>= 0,9997, Figura 5). Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mg OE/mL y/o mg OE/g hoja seca.

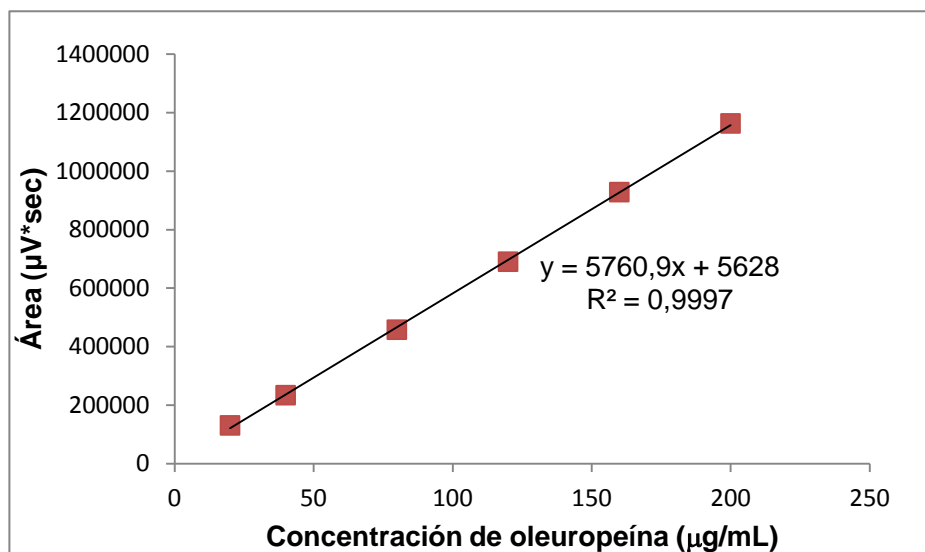


Figura 5: Curva de calibración de estándar de oleuropeína.

### 5.2.5 Incorporación de extracto de hojas de olivo y micropartículas (In-EHO) a las masas.

La adición de extracto (EHO) y micropartículas (In-EHO) a las masas se realizó en base a su contenido de polifenoles totales,  $25,70 \pm 0,82$  mg EAG/mL y  $10,25 \pm 0,13$  mg EAG/g respectivamente. Se estudiaron tres concentraciones de polifenoles 200, 350 y 500 ppm (mg EAG/kg masa, base húmeda) de extracto y micropartículas considerando un batch de masa de 300 g. El contenido de gluten en las masas fue constante (12% base seca). Éstas se formularon con un 42% de humedad con el fin de obtener una humedad final cercana a un 40% (pruebas preliminares mostraron que durante la preparación se pierde aproximadamente un 2% de la humedad original). Según la humedad del EHO o In-EHO se ajustaron las cantidades de agua fría y almidón de manera de mantener constante tanto el contenido de sólidos como la humedad de las masas.

En la tabla 1 se muestra la formulación de las masas, donde según la humedad del EHO o In-EHO se adaptaron las proporciones de agua y almidón. La humedad de los ingredientes utilizados en la preparación de las masas se muestra en el Anexo 2.

Tabla 1: Formulación de las masas (g).

Ingrediente	Control	M+EHO	M+EHO	M+EHO	M+(In-EHO)	M+(In-EHO)	M+(In-EHO)
		200	350	500	200	350	500
Almidón	166,80	166,56	166,38	166,22	161,18	157,22	153,11
Gluten	22,08	22,08	22,08	22,08	22,08	22,08	22,08
Agua (15°C)	55,00	52,83	51,20	49,74	54,62	54,35	54,07
Agua (90°C)	55,00	55,00	55,00	55,00	55,00	55,00	55,00
EHO	-	2,41	4,22	5,84	-	-	-
In-EHO	-	-	-	-	6,00	10,24	14,63
TOTAL	298,88	298,88	298,88	298,88	298,88	298,89	298,89

M: masa cruda; EHO: extracto hojas de olivo; In-EHO: micropartículas inulina-extracto de hojas de olivo; 200, 350, 500: concentración de polifenoles en mg EAG/kg.

#### Procedimiento de preparación:

En una batidora (Heavy duty, KitchenAid, USA) se mezcló por tres minutos el almidón y el gluten, se agregó agua fría y se mezcló por dos minutos más. Luego, se agregó el agua caliente y se mezcló por 3 min. Finalmente se amasó por 3 min más y se dejó reposar la masa por 40 min envuelta en un film plástico. El EHO se adicionó a la masa junto con el agua fría mientras que las micropartículas In-EHO junto con el almidón y el gluten. Finalmente, la masa se llevó a la laminadora (LSB516, Doyon, Canadá) hasta alcanzar un grosor de 2 mm y se cortó en cuadrados de 3,8 cm por lado utilizando un molde.

#### 5.2.6 Fritura de las masas.

La fritura se llevó a cabo en un equipo que consistió básicamente de un recipiente de acero inoxidable (10 L) provisto de una tapa y de una cesta interior donde poner las muestras (Figura 6). La temperatura fue controlada ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) a través de un termostato acoplado a un sistema de control de temperatura (Micro-controller X,

model PXR4; Fuji Electric Instruments, Enzan, Japan). Para la fritura al vacío, se conectó el recipiente a una bomba de vacío de dos etapas (Modelo DVR-140, Dosivac, Argentina), la cual logró generar – 27 pulgadas de Hg (presión de vacío). Para evitar que el vapor de agua de las muestras dañara la bomba se dispuso de un condensador entre los dispositivos. Una vez que la temperatura del aceite (3,5 L aceite de maravilla alto oleico) alcanzó el valor establecido, se colocaron las masas (8 unidades) en la cesta y se cubrieron con una tapa tipo red. A continuación, la tapa del equipo se fijó con la ayuda de 6 pernos y se despresurizó la cámara. Cuando se alcanzó la presión requerida se sumergió la cesta en el aceite por el tiempo requerido. Luego, se despresurizó el equipo, las muestras se retiraron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. El aceite de fritura se descartó después de 1 h de fritura de las masas. Las hojuelas se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

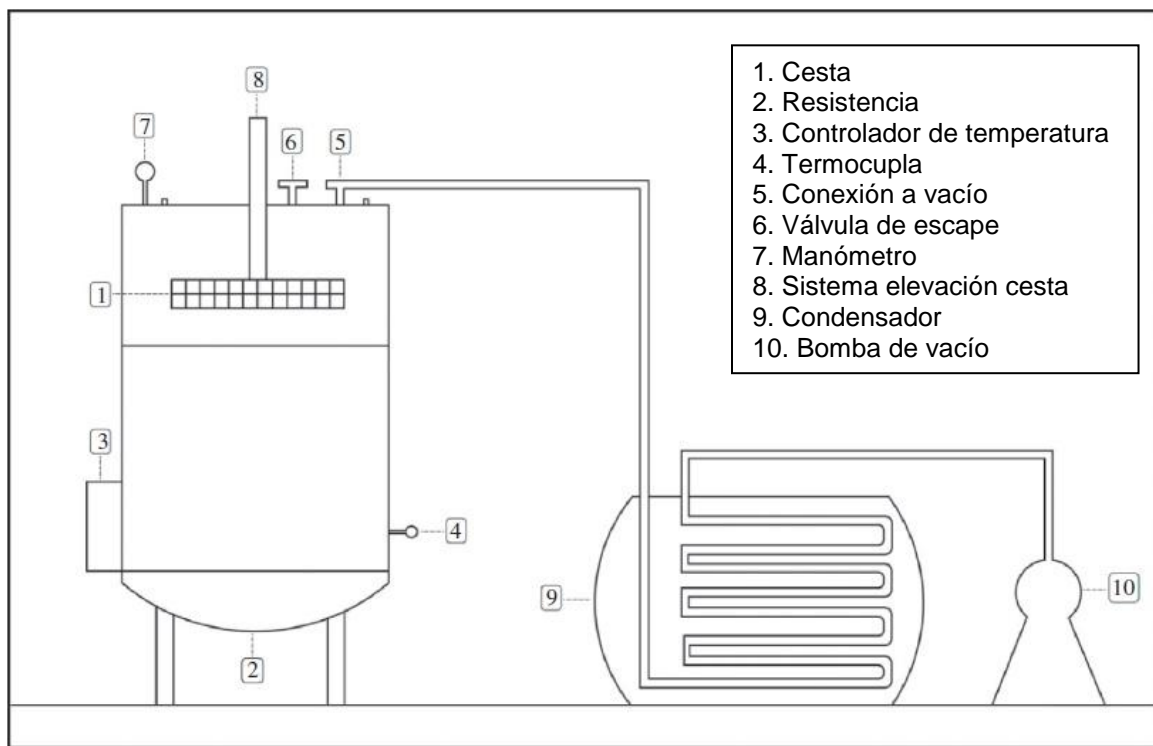


Figura 6: Esquema de la freidora (Dueik y Bouchon, 2011).

Los tiempos de fritura para la condición atmosférica y de vacío fueron, 170°C por 5 min y 116°C por 3 min, respectivamente. Las temperaturas se definieron utilizando el concepto de fuerza motriz equivalente, la cual se define como la diferencia entre la temperatura del aceite y la temperatura de ebullición del agua a la presión de operación, en este caso se utilizó 70°C. Por su parte el tiempo de fritura se definió luego de determinar el Bubble End Point (termino aparente de la humedad en el producto) para cada condición (humedad final hojuela  $2 \pm 0,5\%$ )

Tabla 2: Condiciones de fritura.

Condición	Presión absoluta (Kgf/cm <sup>2</sup> )	Temperatura ebullición H <sub>2</sub> O (°C)	Temperatura aceite (°C)	Tiempo fritura (min)
Atmosférica	30	100	170	5
Vacío	3	46	116	3

#### 5.2.7 Extracción de polifenoles de las masas/hojuelas.

Las masas crudas y hojuelas fritas congeladas se trituraron en una procesadora de alimentos (Moulinex) y posteriormente se molieron en un mortero. Se intentó disminuir al máximo el tamaño de partícula con el fin de hacer más eficiente la extracción. Para cada muestra, en duplicado, se pesó en un tubo 1 g de masa u hojuela en balanza analítica (Precisa 125 A, Suiza) y se agregaron 5 mL de solución compuesta por acetona (100 mL), agua (70 mL) y ácido acético (29,5 mL). Luego, el tubo se agitó en vortex por un minuto, se sonicó durante 5 min y se mantuvo bajo agitación por 45 min con un agitador magnético. Pasado este tiempo, se centrifugó (Hermle Z 206 A, Alemania) por 5 min a 4000 rpm (1,860 x g) y se colectó el sobrenadante en un tubo limpio. El residuo se re-extrajo dos veces más siguiendo el mismo procedimiento anterior. Los sobrenadantes se reunieron y se concentraron utilizando un evaporador rotatorio (Büchi, Suiza) hasta sequedad. El residuo se re-suspendió en 3 mL de agua destilada. En el caso de las hojuelas fritas, el residuo se lavó tres veces con hexano para eliminar la materia grasa. Los extractos se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Todas las mediciones se realizaron dentro de los 10 días siguientes a la extracción.



#### 5.2.8 Determinaciones analíticas.

Determinación de humedad: según método descrito en A.O.A.C. (Official Methods of Analysis) (2007).

Determinación de sólidos solubles (°Brix): según método descrito en A.O.A.C. (Official Methods of Analysis) (2007).

Determinación de densidad: según método descrito en A.O.A.C. (Official Methods of Analysis) (2007).

Determinación de grasa libre: se realizó según el método de Soxhlet, descrito en A.O.A.C. (Official Methods of Analysis) 15th Edition, U.S.A. (2007).

Determinación de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu): basado en el método descrito por Singleton y Rossi (1965). Las mediciones se realizaron a 765 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción UV-Vis Ati UNICAM (Cambridge, UK). Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico en base a una curva de calibración (Anexo 3).

Determinación de la actividad antioxidante:

a) Método del radical DPPH (2,2-difenil –1-picrylhydrazyl): basado en el método propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995). Las mediciones se realizaron a 517 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción UV-Vis Ati UNICAM (Cambridge, UK). Los resultados se expresaron como  $\mu$ moles equivalentes Trolox y/o según el índice EC<sub>50</sub> (Anexo 4).

b) Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power): basado en el método descrito por Benzie y Strain (1996). Las mediciones se realizaron a 593 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción UV-Vis Ati UNICAM (Cambridge, UK). Los resultados se expresaron como  $\mu$ moles equivalentes Trolox (Anexo 4).

c) Método ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales Oxígeno): basado en el método propuesto por Ou *et al.*, (2001). Análisis realizado por el Centro de Nutrición Molecular y Enfermedades Crónicas de la Universidad Católica de Chile (CNMEC-UC).

#### 5.2.9 Análisis de textura.

Para evaluar la dureza de las hojuelas fritas se realizó el ensayo de quiebre de tres puntos. Se determinó la fuerza máxima (N) necesaria para producir el quiebre de la estructura del producto. La prueba se realizó en un texturómetro (TA-XT plus, Stable Micro Systems, UK). La distancia entre los ejes fue de 1,6 cm y la velocidad de desplazamiento del instrumento fue de 10 mm/s. El producto fue apoyado sobre dos soportes paralelos (ejes) separados a una distancia conocida (1,6 cm). Un tercer eje paralelo del mismo material fue desplazado verticalmente ejerciendo una fuerza (N) hasta producir el quiebre de la estructura del producto. Para cada muestra se analizaron 8 ejemplares.

#### 5.2.10 Análisis estadístico.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los sistemas estudiados se realizó el análisis de varianza ANOVA y la prueba de múltiples rangos de Tukey HSD. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion XV.II (STATPOINT TECHNOLOGIES, USA) (Anexo 5 – 12).

## Resultados y discusión

### 6.1 Caracterización física y química del extracto de hojas de olivo (*Olea Europaea* L., cv. Arbequina).

En la tabla 3 se muestran las características físicas y químicas del extracto hidroalcohólico de hojas de olivo.

Tabla 3: Características físicas y químicas del extracto hidroalcohólico de hojas de olivo (EHO).

Parámetro	Extracto de hojas de olivo
	X ± DS
Humedad (%)	90,1 ± 0,1
Sólidos solubles (°Brix a 20°C)	11,3 ± 0,1
Densidad (g/mL)	1,0334 ± 0,0002
<b>Contenido de Oleuropeína</b>	
Oleuropeína (mg OE/mL extracto)	31,1 ± 0,9
Oleuropeína (mg OE/ g hoja seca*)	77,2 ± 2,8
<b>Polifenoles Totales</b>	
Polifenoles (mg EAG/mL extracto)	25,7 ± 0,8
Polifenoles (mg EAG/g hoja seca*)	64,3 ± 2,0
<b>Capacidad Antioxidante</b>	
DPPH EC <sub>50</sub> (mg EAG/mL extracto)	0,15 ± 0,00
DPPH (µmoles ET/mL extracto)	86,9 ± 0,4
FRAP (µmoles ET/mL extracto)	113,6 ± 0,2
ORAC (µmoles ET/mL extracto)	442,4 ± 21,2

OE: oleuropeína; EAG: equivalentes de ácido gálico; ET: equivalentes Trolox X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3); \*expresado en hojas secas (8% humedad).

#### 6.1.1 Contenido de oleuropeína:

En la figura 7, se presenta el cromatograma HPLC-DAD a 280 nm para el EHO, donde la oleuropeína presentó un tiempo de retención de 25,98 min y un 40% del total de especies encontradas. Talhaoui *et al.* (2014) encontró un perfil similar

para cv. Arbequina, cv. Sikitita y cv. Picual, donde la oleuropeína representó un 28%, 33% y 34% de los polifenoles, respectivamente.

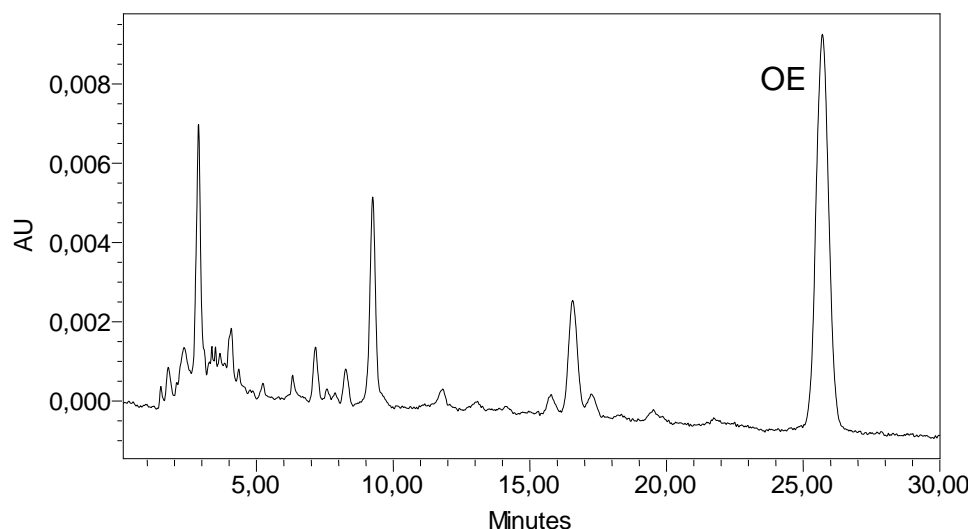


Figura 7: Cromatograma HPLC-DAD (280 nm) del extracto hidroalcohólico de hojas de olivo (cv. Arbequina).

El principal polifenol encontrado en el extracto hidroalcohólico de hojas de olivo cv. Arbequina fue la oleuropeína, con un contenido de 31,1 mg OE/mL de extracto (77,2 mg OE/g de hoja seca). Japón-Luján y Luque de Castro (2008) en un extracto etanólico (cv. Arbequina) asistido por microondas, obtuvo un contenido de OE de 12,92 mg OE/mL, menor al de este estudio. En extractos metanol:agua (80:20 v/v) de hojas de olivo (cv. Arbequina), se reportaron valores de OE de 17,083 mg OE/g de hoja seca (Talhaoui *et al.* 2014) y de 0,00364 mg OE/g de hoja seca (Márquez, 2009), menores a los encontrados en el presente estudio. Las diferencias en el contenido de OE, se podría explicar por factores agronómicos (clima, riego, cosecha), pre-tratamientos, solvente de extracción y factores analíticos (Silva *et al.*, 2006).

#### 6.1.2 Polifenoles totales:

El contenido de polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico de hojas de olivo fue de 25,7 mg EAG/mL (64,3 mg EAG/ gramo de hoja seca). Diversos autores han reportado valores de polifenoles totales en extractos de hojas de olivo, no

obstante, la comparación entre trabajos es compleja debido a diferencias tanto en el método de extracción como en la expresión de los resultados. De hecho, Jiménez *et al.* (2011) utilizó la misma metodología de extracción y tipo de cultivar que los empleados en este estudio, reportando un contenido de 11,6 mg EAC/g hoja seca, expresado como equivalentes de ácido cafeico (EAC). Márquez (2009), reportó un valor de polifenoles totales menor al de este estudio, de 23,18 mg de EAG/g de hoja seca para un extracto metanol:agua (80:20 v/v).

Algunos autores estudiaron el contenido de polifenoles totales en hojas de olivo de otras variedades, utilizando además métodos de extracción diferentes a los de este estudio. Bilgin y Sahin (2013) estudiaron la variación en el contenido de polifenoles según la zona geográfica (10,11 - 61,66 mg EAG/g de hoja seca) y el método de extracción (7,35 - 38,66 mg EAG/g de hoja seca). Scognamiglio *et al.* (2012) en hojas de olivo liofilizadas de seis cultivares y extracción con metanol:agua (50:50 v/v) asistida por ultrasonido, obtuvo valores de 330,2 mg EAG/g hoja seca (cv. Salella) y de 68,4 mg EAG/g hoja seca en (cv. FS-17).

La comparación entre los valores reportados resulta poco clara dada la diversidad de métodos de extracción, expresión de resultados (equivalente de ácido gálico, ácido cafeico y ácido tánico entre otros) y condiciones agronómicas (época de cosecha, cultivar, zona geográfica entre otros). Dichas variaciones demuestran el desafío que significa estandarizar la obtención continua de extractos antioxidantes desde fuentes naturales.

#### 6.1.3 Capacidad antioxidante:

La determinación de la capacidad antioxidante del extracto de hojas de olivo se realizó según los métodos DPPH, FRAP y ORAC. El DPPH, expresado como  $EC_{50}$  alcanzó un valor de 0,15 mg EAG/mL extracto (86,1  $\mu$ moles ET/mL extracto). Para el índice  $EC_{50}$  los valores son inversamente proporcionales a la capacidad antioxidante de la sustancia. Jiménez *et al.* (2011) reportó un valor de  $EC_{50}$  de 0,026 mg EAC/mL en un extracto hidroalcohólico de hojas de olivo,

utilizando la misma variedad de hoja y el mismo método de extracción que el empleado en este estudio. Scognamiglio *et al.* (2012) estudió la variación de la capacidad antioxidante en extractos metanólicos de hojas de olivo liofilizadas de seis diferentes cultivares, obtuvo valores de  $EC_{50}$  entre 0,17 y 0,037 mg EAG/mL. Por su parte, Hayes *et al.* (2011) analizó la capacidad antioxidante de distintos compuestos/extractos naturales y sintéticos, expresó sus resultados según la concentración del compuesto o extracto requerida para reducir en 50% la concentración de DPPH. Así, el extracto de hojas de olivo presentó un valor de 0,034 mg/mL con una capacidad antioxidante menor que el BHA (0,018 mg/mL) y el ácido elágico (0,002 mg/mL). A pesar de la buena capacidad antioxidante de éstos últimos, el EHO se situaría como un buen antioxidante de origen natural con una mezcla compleja de compuestos.

En el caso de FRAP y ORAC los valores obtenidos fueron 113,62 y 442,44  $\mu$ moles ET/mL extracto, respectivamente. Hayes *et al.* (2011) midió la capacidad antioxidante, FRAP y ORAC, de un extracto en polvo de hoja de olivo obtenido comercialmente siendo estos de 30,1 y 17,43 g equivalentes Trolox/100 gramos de polvo, respectivamente. Para poder comparar estos valores con los obtenidos en el presente estudio, estos se expresaron como  $\mu$ moles equivalentes Trolox/mL extracto, considerando un contenido de sólidos en el EHO de un 10%. Así, los valores obtenidos por Hayes *et al.* (2011) se aproximan a 120,3 y 69,6  $\mu$ moles ET/mL de extracto para FRAP y ORAC respectivamente, mientras que los obtenidos en el laboratorio fueron de 113,62 y 442,44  $\mu$ moles ET/ mL de extracto. Se observa que los valores obtenidos para FRAP son muy similares, no obstante los valores para ORAC difieren significativamente, siendo para este parámetro el EHO obtenido en el laboratorio, muy superior.

Las diferencias en los valores obtenidos por las distintas metodologías, en la medición de la capacidad antioxidante del EHO, se deben principalmente a que los métodos de actividad antioxidante evalúan diferentes mecanismos de acción del antioxidante. Por ejemplo, capacidad de captura del radical DPPH, bloqueo

de radicales libres por donación de átomo de hidrógeno (ORAC) y transferencia de electrones (FRAP).

En la tabla 4 se muestra el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de frutas reconocidas como ricas en antioxidantes. Al comparar el extracto de hojas de olivo con otras especies, observamos que el EHO presenta el mayor contenido de polifenoles totales y el mayor poder antioxidante. Si bien, el extracto corresponde a una sustancia concentrada y las frutas a un alimento de consumo directo, el EHO representa una alternativa interesante para la incorporación de antioxidantes naturales en alimentos.

Al analizar la relación existente entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante entre distintas frutas se observa que no existe una relación lineal entre estos parámetros. Autores concuerdan que dicha relación depende del perfil de polifenoles presente, relacionando la estructura del polifenol con la capacidad antioxidante, existiendo por tanto algunos polifenoles más eficientes que otros (Kuskoski *et al.*, 2005).

Tabla 4: Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante (ORAC) en frutas (INTA, 2015).

Especie	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante ORAC
	(mg EAG/g)	(µg ET/g)
	X	X
Extracto (EHO)	24,9	428,1
Maqui	16,6	198,5
Murtilla	8,6	107,7
Mora	6,7	90,4
Frambuesa	3,8	69,0
Granada	2,7	39,7
Arándano	2,6	54,8
Frutilla	2,3	37,7

X: Promedio; EAG: equivalentes de ácido gálico; ET: equivalentes Trolox.

Fuente: Base de datos de actividad antioxidante y polifenoles totales en frutas (INTA, 2015).

## 6.2 Elaboración y caracterización de micropartículas de extracto de hojas de olivo (*Olea Europaea L.*) con inulina como agente encapsulante.

En la tabla 5 se presenta la caracterización de las micropartículas de EHO obtenidas por secado por atomización.

Tabla 5: Caracterización física y química de las micropartículas de extracto de hojas de olivo obtenidas por secado por atomización.

<b>Parámetro</b>	<b>In-EHO X ± DS</b>
OE superficial (mg OE/g polvo)	1,7 ± 0,7
OE total (mg OE/g polvo)	13,2 ± 0,4
Eficiencia de encapsulación de OE (%)	87,1 ± 0,3
Recuperación de OE (%)	90,1 ± 2,3
Rendimiento (%)	64,3 ± 3,8
Humedad (%)	6,37 ± 0,04
Polifenoles totales (mg EAG/g micropartículas)	10,2 ± 0,1
DPPH (μmoles ET/g micropartículas)	32,8 ± 0,5
FRAP (μmoles ET/g micropartículas)	52,3 ± 0,9

In-EHO: micropartículas inulina-extracto de hojas de olivo. ; EAG: equivalentes de ácido gálico; ET: equivalentes Trolox; X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3).

Los resultados de la tabla 5 muestran una eficiencia de encapsulación y de recuperación de oleuropeína, sobre un 87%. La eficiencia de encapsulación, representa la interacción entre el activo y el agente encapsulante, la cual se ve favorecida por interacciones tales como puentes de hidrógeno. Por otro lado, la alta recuperación de OE (90%) indica una buena estabilidad de la oleuropeína durante el proceso de secado.

En la literatura son escasos los estudios de encapsulación que reportan valores de referencia para comparar con el presente estudio. Se han reportado valores de eficiencia de encapsulación de polifenoles, mayores, menores o dentro del rango, utilizando secado por atomización, por ejemplo: ácido gálico con inulina nativa



(67,5-96,4%), inulina acetilada (61,8-85,9%) e inulina entrecruzada (51,5-68%) (García, 2012); polifenoles de pulpa de tuna (*Opuntia ficus indica*) con inulina (39,41–74,78%) (Sáenz *et al.*, 2009); polifenoles de jugo de granada con aislado proteico de soja y maltodextrinas (36,6-82,8%) (Robert *et al.*, 2010); yerba mate con quitosano (100%) (Harris *et al.*, 2011). El amplio rango de valores de EE de polifenoles observados, sugiere que la encapsulación depende del tipo de agente encapsulante empleado, del tipo de extracto, de las condiciones del proceso y del método de encapsulación, entre otras variables.

Para polifenoles totales se obtuvo un valor de 10,2 mg EAG/g micropartículas mientras que para capacidad antioxidante éstos fueron de 32,8 y 52,3  $\mu$ moles ET/g micropartículas para DPPH y FRAP, respectivamente. Kosaraju *et al.* (2006) elaboró micropartículas de EHO-quitosano por medio de secado por atomización. Midió la carga de polifenoles remanente luego de dicho proceso para estimar la cantidad de EHO encapsulado, siendo ésta de un 27%. Más tarde, este mismo grupo de investigación determinó que existe una retención significativa de la capacidad antioxidante del EHO luego del proceso de encapsulación en emulsiones lípido-proteína (Kosaraju *et al.*, 2008). El mismo comportamiento para la actividad antioxidante medida por DPPH reportó Harris *et al.* (2011) en micropartículas de yerba mate con quitosano.

### 6.3 Elaboración y caracterización de masas de almidón y gluten con y sin extracto de hojas de olivo o micropartículas.

En la tabla 6 se presenta la caracterización de las masas de almidón y gluten, humedad, sólidos y polifenoles totales determinados teórica y experimentalmente.

Tabla 6: Contenido de humedad, sólidos y polifenoles totales en masas de almidón y gluten con y sin extracto de hojas de olivo o micropartículas.

Muestra	Humedad (%) <sup>*</sup>	Sólidos (%) <sup>**</sup>	Polifenoles (Teo)	Polifenoles (Exp)
	X ± DS	X ± DS	(mg EAG/g bs)	(mg EAG/g bs) X ± DS
Control	39,62 ± 0,04 <sup>a</sup>	60,38 ± 0,04	0	0,759 ± 0,017 <sup>z</sup>
M+EHO 200	39,69 ± 0,04 <sup>a</sup>	60,31 ± 0,04	0,332	0,980 ± 0,008 <sup>y</sup>
M+EHO 350	39,20 ± 0,08 <sup>b</sup>	60,80 ± 0,08	0,576	1,159 ± 0,004 <sup>x</sup>
M+EHO 500	39,42 ± 0,03 <sup>c</sup>	60,58 ± 0,03	0,825	1,358 ± 0,007 <sup>w</sup>
M+(In-EHO) 200	40,38 ± 0,05 <sup>d</sup>	59,62 ± 0,05	0,335	1,077 ± 0,013 <sup>v</sup>
M+(In-EHO) 350	40,49 ± 0,04 <sup>d</sup>	59,51 ± 0,04	0,588	1,316 ± 0,012 <sup>u</sup>
M+(In-EHO) 500	40,15 ± 0,04 <sup>e</sup>	59,85 ± 0,04	0,835	1,562 ± 0,009 <sup>t</sup>

M: masa cruda; EHO: extracto hidroalcohólico hojas de olivo; In-EHO: micropartículas; Teo: teórico, Exp: experimental. 200, 350, 500: concentración de polifenoles en mg EAG/kg; EAG: equivalentes de ácido gálico bs: base seca.. X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3). \*: Expresado en base húmeda; \*\*: calculado como 100 - %humedad. Letras diferentes entre muestras indican diferencias significativas (p<0,05).

Las masas se formularon con un contenido de humedad de un 42% con el fin de obtener una humedad final aproximada de un 40 %. Pruebas preliminares mostraron que durante la preparación se pierde aproximadamente un 2% de la humedad original. El método de preparación fue estandarizado para disminuir la posibilidad de diferencias entre las muestras por desigualdades en la preparación. No obstante, el análisis ANOVA (Anexo 5) para humedad, muestra que existen diferencias significativas entre la mayoría de las muestras, siendo las formuladas con micropartículas las de mayor humedad (Tabla 6). Lo anterior, probablemente se deba a la capacidad de retención de agua y formación de gel que presenta la inulina (Muñoz *et al.*, 2012).

El extracto de hojas de olivo (EHO) y las micropartículas de extracto (In-EHO) se adicionaron a las masas de almidón y gluten en una proporción de polifenoles equivalente a 200, 350 y 500 mg EAG/kg masa húmeda. Se midió la concentración experimental de polifenoles determinada analíticamente por el método de Folin-Ciocalteu. Al analizar estadísticamente los valores experimentales de polifenoles para las distintas muestras se observa que, para una misma adición de antioxidantes, existen diferencias significativas entre las masas con extracto y las con micropartículas (Anexo 6). Esto permite sugerir una acción protectora de las micropartículas sobre los polifenoles del EHO durante la preparación de las masas. Por otra parte, destaca el contenido de polifenoles presente en el control, 0,759 mg EAG/kg masa b.s., lo cual revela la presencia de compuestos que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu en la masa, como aminoácidos con grupos OH, como es el caso de la tirosina (Pérez *et al.*, 2002). Similarmente, Alvarez-Jubete *et al.* (2010) reportó valores de polifenoles de  $0,531 \pm 0,028$  y  $0,291 \pm 0,006$  mg EAG/g b.s. tanto en semillas de trigo como en pan, respectivamente.

## 6.4 Caracterización de hojuelas de almidón y gluten sometidas a fritura atmosférica y vacío, sin y con extracto de hojas de olivo o micropartículas.

### 6.4.1 Contenido de humedad y materia grasa libre en hojuelas.

En la tabla 7 se muestra el contenido de humedad, materia grasa libre y contenido de sólidos en hojuelas de almidón y gluten, sin y con EHO o In-EHO, sometidas a fritura atmosférica y al vacío.

Tabla 7: Contenido de humedad, materia grasa libre y sólidos en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y al vacío.

Muestra	Humedad (%) * X ± DS	Grasa (%) * X ± DS	Sólidos (%) **
<b>Fritura atmosférica</b>			
Control	1,82 ± 0,08 <sup>A,B,C</sup>	38,67 ± 0,03 <sup>a,H</sup>	59,51 ± 0,08
H+EHO 200	1,78 ± 0,02 <sup>A,B</sup>	39,08 ± 0,20 <sup>b,H</sup>	59,13 ± 0,16
H+EHO 350	1,89 ± 0,02 <sup>B,C,D</sup>	40,35 ± 0,14 <sup>c,I</sup>	57,76 ± 0,10
H+EHO 500	1,95 ± 0,03 <sup>C,D,E</sup>	38,33 ± 0,03 <sup>a,H</sup>	59,72 ± 0,01
H+(In-EHO) 200	1,75 ± 0,05 <sup>A,B</sup>	33,70 ± 0,04 <sup>d,F</sup>	64,54 ± 0,06
H+(In-EHO) 350	1,99 ± 0,08 <sup>D,E</sup>	31,16 ± 0,05 <sup>e,C</sup>	66,84 ± 0,11
H+(In-EHO) 500	2,08 ± 0,08 <sup>E</sup>	31,39 ± 0,05 <sup>e,C,D</sup>	66,53 ± 0,09
<b>Fritura al vacío</b>			
Control	1,80 ± 0,03 <sup>A,B,C</sup>	28,86 ± 0,04 <sup>z,A</sup>	69,34 ± 0,03
H+EHO 200	1,74 ± 0,04 <sup>A,B</sup>	29,82 ± 0,45 <sup>z,B</sup>	68,43 ± 0,36
H+EHO 350	1,73 ± 0,03 <sup>A</sup>	32,00 ± 0,51 <sup>y,D,E</sup>	66,27 ± 0,35
H+EHO 500	1,69 ± 0,02 <sup>A</sup>	35,36 ± 0,07 <sup>x,G</sup>	62,95 ± 0,03
H+(In-EHO) 200	1,72 ± 0,01 <sup>A</sup>	32,56 ± 0,09 <sup>y,E</sup>	65,73 ± 0,06
H+(In-EHO) 350	2,31 ± 0,07 <sup>F</sup>	34,84 ± 0,09 <sup>x,G</sup>	62,85 ± 0,14
H+(In-EHO) 500	2,54 ± 0,07 <sup>G</sup>	29,17 ± 0,06 <sup>z,A,B</sup>	68,29 ± 0,09

H: hojuela frita; EHO: extracto hidroalcohólico hojas de olivo; In-EHO: micropartículas. 200, 350, 500: concentración de polifenoles en mg EAG/kg. X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3); \*: expresado en base húmeda; \*\*: calculado como 100 - %humedad - % grasa; Letras diferentes entre muestras indican diferencias significativas (p<0,05), letras minúsculas indican diferencias en una misma fritura, letras mayúsculas indican diferencias entre frituras (fritura atmosférica vs vacío).

#### 6.4.1.1 Humedad:

El análisis estadístico ANOVA (Anexo 7) muestra que existen diferencias significativas (p<0,05), en contenido de humedad, entre las muestras con

micropartículas (350 y 500 ppm) y el control en ambos tipos de fritura. Los resultados sugieren que el mayor contenido de humedad encontrado en las hojuelas con micropartículas se debería a la capacidad de retención de agua que presenta la inulina, comportamiento que coincide con lo observado en las masas crudas. Por otro lado, no se observa una tendencia que relacione contenido de humedad y tipo de fritura.

#### 6.4.1.2 Contenido de materia grasa libre:

Al analizar el contenido de materia grasa libre en las muestras, según tipo de fritura, se observa que en fritura atmosférica las hojuelas con micropartículas presentaron un contenido de grasa significativamente menor al control. Por su parte, en fritura al vacío, no se observa una tendencia clara que relacione la absorción de grasa con la presencia de extracto (EHO) o micropartículas (In-EHO).

En la figura 8 se muestra el contenido de materia grasa libre en base seca para las hojuelas fritas bajo condiciones atmosféricas y de vacío. Cuando se compara una misma muestra, frita bajo condiciones de vacío y atmosféricas, se observa que existen diferencias significativas en la absorción de aceite, siendo el contenido de materia grasa mayor para las hojuelas fritas bajo condiciones atmosféricas (excepto muestra In-EHO 350) (Anexo 8). Estos resultados concuerdan con los reportados por Dueik (2011) en hojuelas de zanahoria, papas y manzanas fritas bajo condiciones atmosféricas y de vacío, encontrando que los productos fritos al vacío absorben significativamente menos aceite que aquellos fritos a presión atmosférica. Este mismo autor sostiene que el mecanismo de absorción de aceite en productos fritos a presión atmosférica y a vacío es claramente distinto, aunque ambos se relacionan con parámetros microestructurales. Para la fritura atmosférica, la absorción de aceite ocurre principalmente durante el enfriamiento, mientras que en el caso de la fritura al vacío ésta ocurre básicamente durante la presurización, siendo ambos fenómenos superficiales (Dueik, 2011).

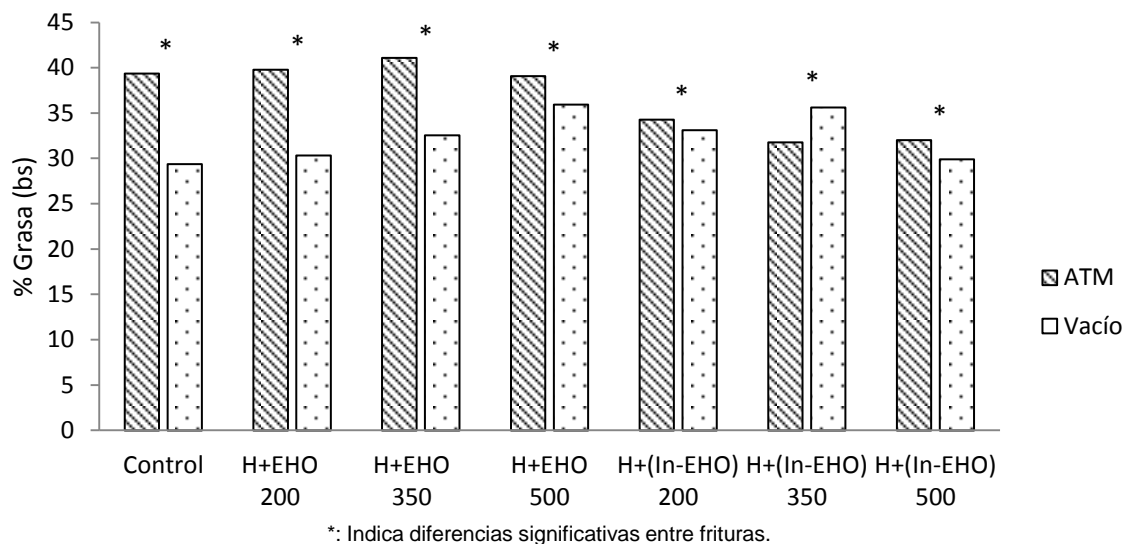


Figura 8: Contenido de materia grasa (% base seca) en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y a vacío.

De manera similar, Sobukola *et al.* (2012) determinó la absorción de aceite en hojuelas de almidón y gluten fritas bajo condiciones de vacío, utilizando una fuerza motriz constante de 70°C pero variando la temperatura de ebullición del agua. Para temperaturas de ebullición del agua entre 38 y 71 °C obtuvo un contenido de aceite entre 0,67 y 0,31 (g aceite/g de sólidos desgrasados). Sus resultados sugieren que en condiciones de vacío, para mayores temperaturas de ebullición del agua menor es la absorción de aceite, debido a la estructura que se forma en la matriz. Así, para temperaturas de ebullición del agua bajo 55-65°C no ocurre gelatinización del almidón lo que lleva a una estructura más débil y consecuentemente a una mayor permeabilidad al aceite. En este estudio el valor de absorción de aceite, para un punto de ebullición del agua de 46°C, fue de 0,42 (g aceite/g de sólidos desgrasados), valor que se encuentra dentro del rango reportado por dicho autor.

En el caso de la absorción de aceite bajo condiciones atmosféricas, Moreno *et al.*, (2010) determinó el contenido de aceite en laminas de almidón y gluten formuladas con un 12% de gluten (base seca). Para diferentes tiempos de enfriamiento de las hojuelas, 2 s y 10 min, encontró un contenido total de grasa entre 32 y 42% en base seca. Para el control en el presente estudio, el contenido de grasa libre fue

de un 39%, valor que se encuentra dentro de los parámetros expuestos anteriormente. Dicho autor coincide en que la microestructura del producto, tamaño de poro y permeabilidad, principalmente de la corteza, son factores críticos en la absorción de aceite. También afectarían las propiedades humectantes y la naturaleza hidrofóbica del producto.

#### 6.4.2 Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en hojuelas.

En la tabla 8 se muestra el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de las hojuelas fritas bajo condiciones atmosféricas y de vacío.

Tabla 8: Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y a vacío.

Muestra	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante	
	Folin Ciocalteu (mg EAG/g SS) X± DS	DPPH (µmoles ET/g SS) X± DS	FRAP (µmoles ET/g SS) X± DS
<b>Fritura atmosférica</b>			
Control	0,515 ± 0,021 <sup>a,A</sup>	0,416 ± 0,023 <sup>a,A</sup>	0,598 ± 0,018 <sup>a,A</sup>
H+EHO 200	0,804 ± 0,040 <sup>b,C</sup>	1,154 ± 0,057 <sup>b,B,C</sup>	1,567 ± 0,043 <sup>b,B</sup>
H+EHO 350	1,049 ± 0,029 <sup>d,D</sup>	1,721 ± 0,072 <sup>c,E</sup>	2,745 ± 0,117 <sup>d,D</sup>
H+EHO 500	1,282 ± 0,010 <sup>e,F</sup>	2,578 ± 0,130 <sup>d,F,G</sup>	3,265 ± 0,091 <sup>e,E</sup>
H+(In-EHO) 200	0,906 ± 0,016 <sup>c,C</sup>	1,381 ± 0,075 <sup>b,C,D</sup>	1,959 ± 0,016 <sup>c,C</sup>
H+(In-EHO) 350	1,264 ± 0,013 <sup>e,F</sup>	2,410 ± 0,116 <sup>d,F</sup>	3,493 ± 0,075 <sup>e,E</sup>
H+(In-EHO) 500	1,559 ± 0,023 <sup>f,G,H</sup>	3,552 ± 0,095 <sup>e,H</sup>	5,094 ± 0,243 <sup>f,H</sup>
<b>Fritura al vacío</b>			
Control	0,655 ± 0,031 <sup>z,B</sup>	0,520 ± 0,024 <sup>z,A</sup>	0,809 ± 0,020 <sup>z,A</sup>
H+EHO 200	1,083 ± 0,031 <sup>y,D,E</sup>	0,904 ± 0,026 <sup>y,B</sup>	1,642 ± 0,066 <sup>y,B,C</sup>
H+EHO 350	1,429 ± 0,032 <sup>x,G</sup>	1,639 ± 0,069 <sup>x,D,E</sup>	2,792 ± 0,046 <sup>x,D</sup>
H+EHO 500	1,792 ± 0,095 <sup>w,I</sup>	2,496 ± 0,098 <sup>w,F,G</sup>	3,918 ± 0,188 <sup>w,F</sup>
H+(In-EHO) 200	1,184 ± 0,065 <sup>y,E,F</sup>	1,533 ± 0,072 <sup>x,D,E</sup>	2,730 ± 0,113 <sup>x,D</sup>
H+(In-EHO) 350	1,569 ± 0,080 <sup>x,H</sup>	2,691 ± 0,094 <sup>w,G</sup>	4,604 ± 0,229 <sup>v,G</sup>
H+(In-EHO) 500	1,867 ± 0,034 <sup>w,I</sup>	3,572 ± 0,169 <sup>v,H</sup>	5,338 ± 0,187 <sup>u,H</sup>

H: hojuela frita; EHO: extracto hidroalcohólico hojas de olivo; In-EHO: micropartículas. 200, 350, 500: concentración de polifenoles en mg EAG/kg. EAG: equivalentes de ácido gálico. SS: sólidos secos desgrasados. ET: equivalentes Trolox. X: promedio; DS: desviación estándar (n= 3). Letras diferentes entre muestras indican diferencias significativas (p<0,05), letras minúsculas indican diferencias en una misma fritura, letras mayúsculas indican diferencias entre frituras (fritura atmosférica vs vacío).

#### 6.4.2.1 Contenido de polifenoles totales:

Al comparar el contenido de polifenoles totales en las hojuelas en una misma fritura, se observa que en fritura atmosférica las hojuelas con micropartículas presentan un contenido de polifenoles significativamente mayor a aquellas con extracto (EHO) (Tabla 8). Demostrando la protección que confiere la encapsulación sobre los polifenoles del EHO durante la fritura atmosférica. Sin embargo, en el caso de la fritura al vacío, no se observó un efecto significativo de la adición de micropartículas sobre el contenido de polifenoles en las hojuelas, siendo las hojuelas con EHO o In-EHO estadísticamente iguales (Figura 9). Este resultado se debería a que la degradación de polifenoles bajo condiciones de vacío es menor, no observándose el efecto protector de las micropartículas. En concordancia con lo anterior, Dueik (2011) reportó una pérdida significativamente menor de carotenoides de zanahoria en fritura al vacío (9,4%) respecto a fritura atmosférica (51,6%). Similarmente, Chiou *et al.* (2007) determinó el contenido de polifenoles totales en aceite de maravilla suplementado con 240 ppm de EHO, antes y después de la fritura de papas. La pérdida de polifenoles en el aceite utilizado para fritura atmosférica fue de un 36%.

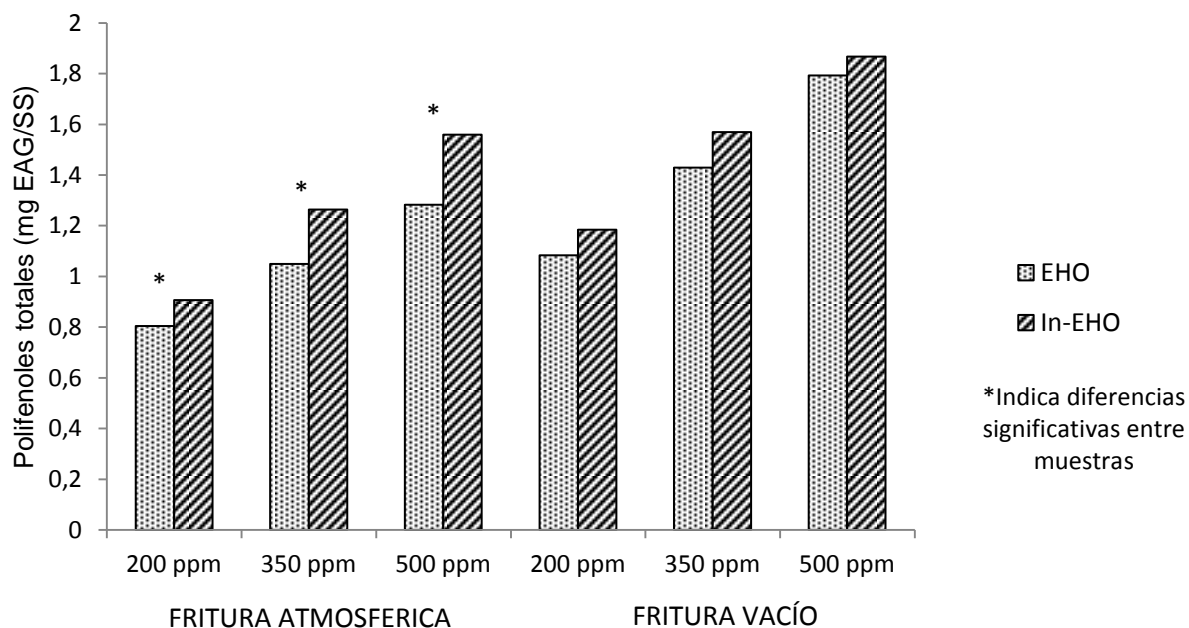


Figura 9: Comparación del contenido de polifenoles totales en hojuelas con extracto (EHO) versus hojuelas con micropartículas (In-EHO) sometidas a fritura atmosférica y al vacío.



En la figura 10 se muestra el contenido de polifenoles totales para las hojuelas fritas bajo condiciones atmosféricas y de vacío. Cuando se comparan muestras equivalentes, fritas bajo condiciones atmosféricas versus de vacío, se observa que el contenido de polifenoles es significativamente mayor en aquellas fritas al vacío. El menor contenido de polifenoles en las hojuelas fritas bajo condiciones atmosféricas pueden explicarse debido a la mayor temperatura y presión de oxígeno utilizada en este tipo de fritura, la cual produce una mayor degradación de dichos compuestos (Dueik, 2011).

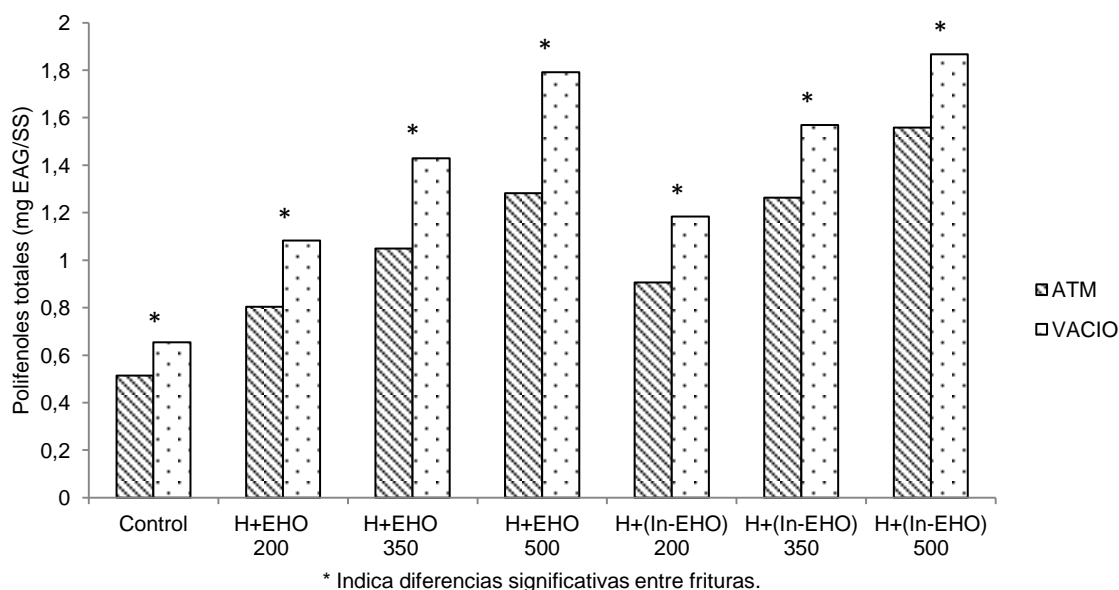


Figura 10: Comparación del contenido de polifenoles totales entre fritura atmosférica versus fritura al vacío, en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO.

#### 6.4.2.2 Actividad antioxidante:

En el caso de la actividad antioxidante, medida por DPPH, al analizar las hojuelas en una misma fritura, se observa que en general las hojuelas con micropartículas presentan una capacidad antioxidante significativamente mayor a aquellas con extracto (EHO vs In-EHO), tanto en fritura atmosférica como al vacío (Tabla 8) (Figura 11). En ambas condiciones se observa que la hojuela con (In-EHO) 500 posee la mayor capacidad antioxidante (Anexo 10). En la medición de la capacidad antioxidante por FRAP, se reafirma la tendencia anterior. Las hojuelas con

micropartículas poseen una capacidad antioxidante significativamente mayor que aquellas con extracto (EHO) (Figura 12).

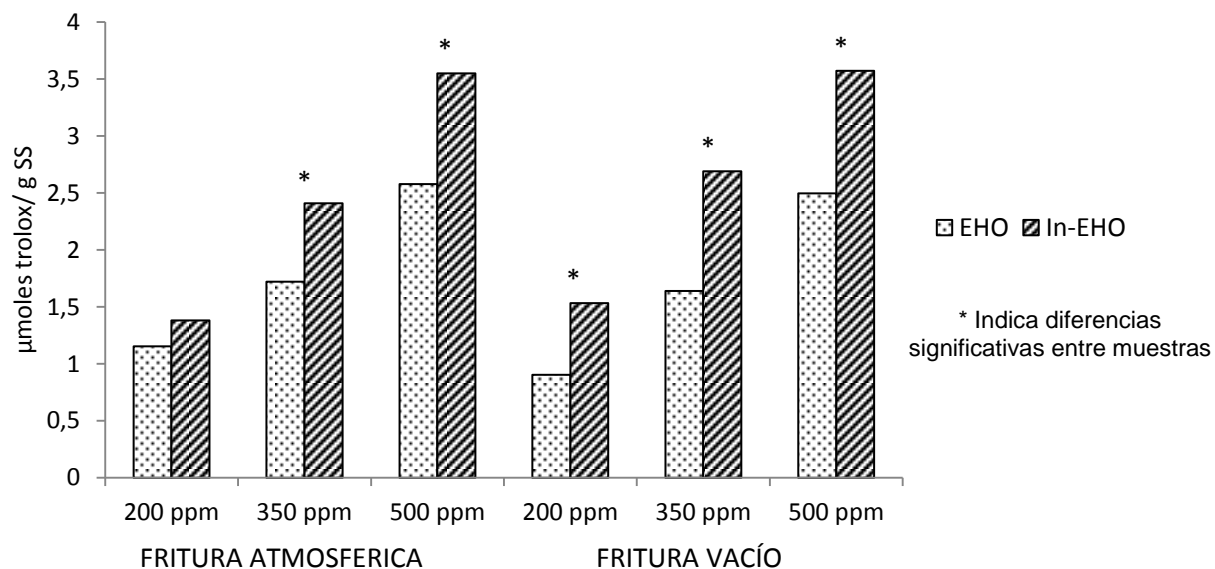


Figura 11: Comparación de la capacidad antioxidante (DPPH) en hojuelas con extracto (EHO) versus hojuelas con micropartículas (In-EHO) sometidas a fritura atmosférica y al vacío.

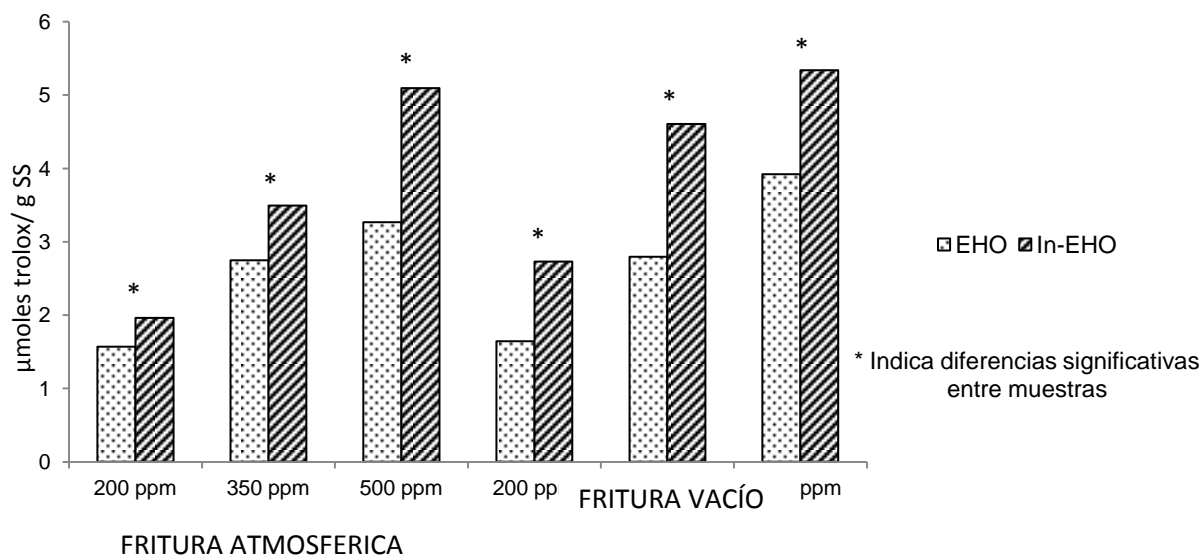


Figura 12: Comparación de la capacidad antioxidante (FRAP) en hojuelas con extracto (EHO) versus hojuelas con micropartículas (In-EHO) sometidas a fritura atmosférica y al vacío.

En la figura 13 y 14 se presenta la comparación de la capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) de las hojuelas con y sin la adición de EHO o In-EHO fritas bajo condiciones atmosféricas y de vacío. Cuando se comparan muestras equivalentes, fritas bajo condiciones atmosféricas versus de vacío, a diferencia de lo que ocurre en el caso de los polifenoles, no se observa un efecto claro de la fritura al vacío sobre la capacidad antioxidante (Anexo 11). No se encontraron diferencias significativas entre fritura atmosférica y al vacío en la capacidad antioxidante de las hojuelas medida por DPPH (Figura 13), excepto en el sistema H+(In-EHO) y en aquellas medidas por FRAP (Figura 14) excepto en los sistemas H+EHO 500, H+(In-EHO) 200 y H+(In-EHO) 350.

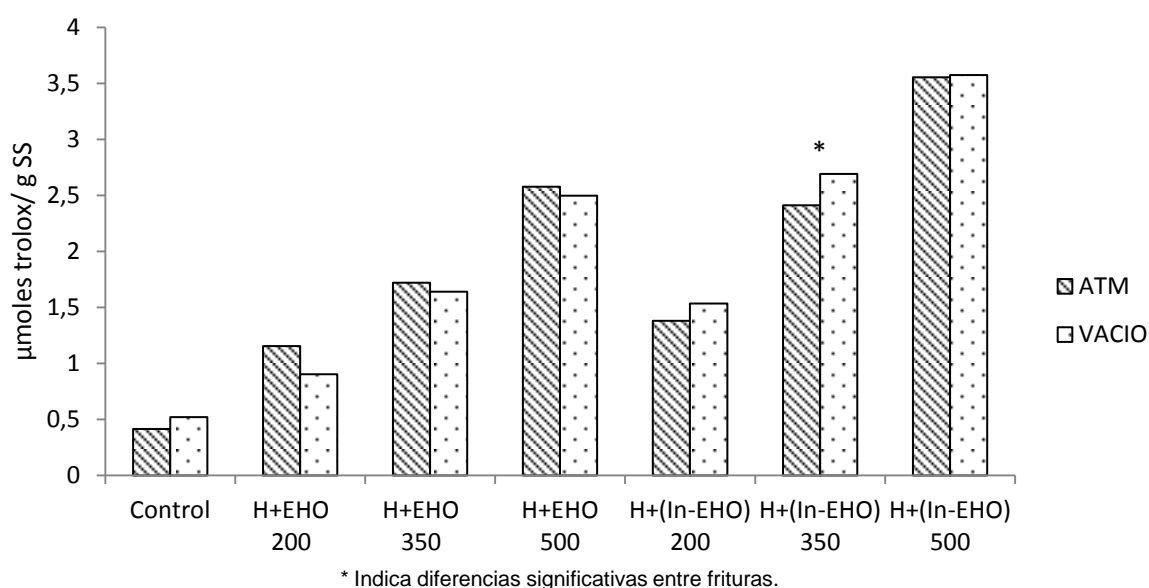


Figura 13: Comparación de la capacidad antioxidante DPPH entre fritura atmosférica versus fritura al vacío, en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO.

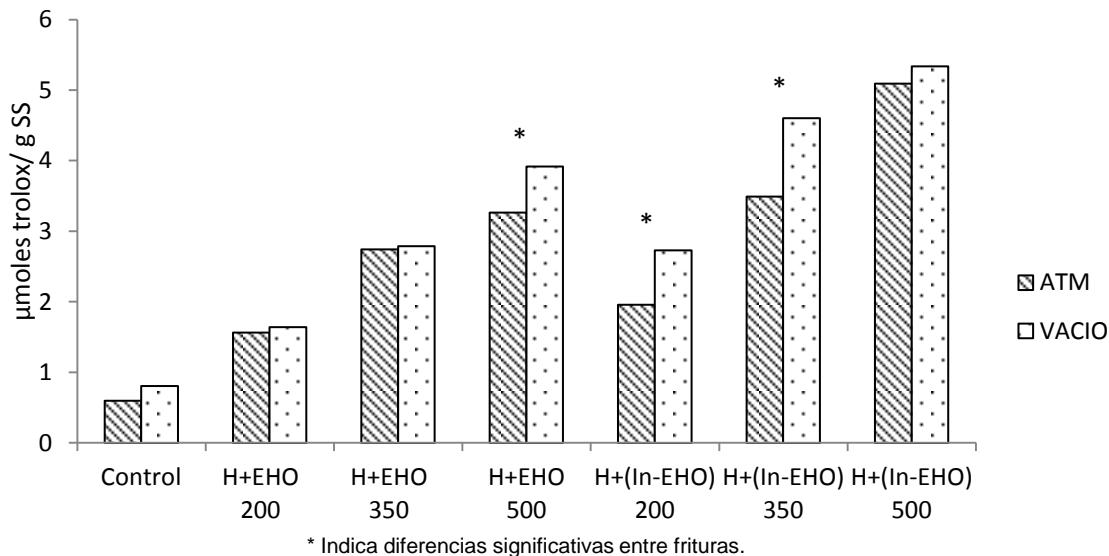


Figura 14: Comparación de la capacidad antioxidante FRAP entre fritura atmosférica versus fritura al vacío, en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO.

En la figura 15 se observa la relación entre contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en fritura al vacío y atmosférica. Si se analiza la relación existente entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en ambas frituras de manera particular, se observa una tendencia clara, a mayor contenido de polifenoles mayor es la capacidad antioxidante, alcanzando  $R^2$  sobre 0,87 (DPPH ATM: 0,987, FRAP ATM: 0,978, DPPH VACIO: 0,873 y FRAP VACIO: 0,876).

Por su parte, cuando se comparan distintas condiciones de fritura (a igual contenido de polifenoles) se observa que la capacidad antioxidante es significativamente mayor en fritura atmosférica que en vacío.

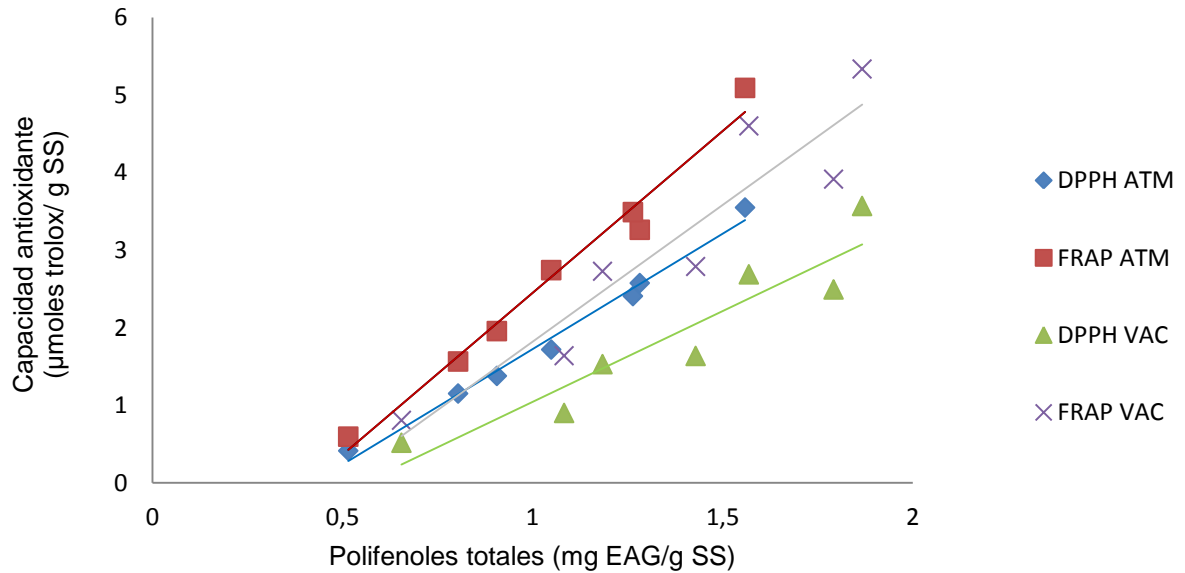


Figura 15: Contenido de polifenoles totales versus capacidad antioxidante en hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y a vacío.

Se esperaba que la capacidad antioxidante fuese mayor en el caso de la fritura al vacío por la menor degradación de los polifenoles bajo dichas condiciones. No obstante, en algunos trabajos se ha encontrado una capacidad antioxidante mayor en fritura atmosférica debido a la aparición de metabolitos con capacidad antioxidante, como los derivados de la reacción de Maillard (Nicoli *et al.*, 1997). Las reacciones de pardeamiento no enzimático son altamente dependientes de la temperatura e involucran principalmente azúcares reductores y aminoácidos. Comúnmente, dicha reacción se asocia al desarrollo de color y sabor en los alimentos, pero también con la formación de compuestos tóxicos como acrilamida, hidroximetilfurfural (HMF) y pérdida de valor nutritivo principalmente en proteínas. Sin embargo, dicha reacción también es capaz de producir compuestos antioxidantes (Martins *et al.*, 2001). Dueik (2011) comparó la incidencia de dicha reacción en láminas de papas, zanahoria y manzana fritas bajo condiciones atmosféricas y de vacío. Bajo condiciones de vacío la reacción no fue detectada mientras que bajo condiciones atmosféricas la reacción de pardeamiento fue significativamente mayor. Consecuentemente con lo anterior, observó una mayor capacidad antioxidante (FRAP) en los productos fritos atmosféricamente.

## 6.5 Efecto del tipo de fritura sobre la dureza de las masas.

En la tabla 9 se muestran los valores de fuerza máxima de quiebre para las hojuelas de almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y a vacío.

Tabla 9: Fuerza máxima de quiebre de las hojuelas almidón y gluten, sin y con adición de EHO o In-EHO sometidas a fritura atmosférica y a vacío.

<b>Muestra</b>	<b>Fuerza (N) X±DS</b>
<b>Fritura atmosférica</b>	
Control	34,232 ± 4,448 <sup>a,E</sup>
H+EHO 200	27,510 ± 5,610 <sup>b,c,C,D</sup>
H+EHO 350	26,70 ± 5,14 <sup>b,c,B,C,D</sup>
H+EHO 500	21,726 ± 1,741 <sup>c,B</sup>
H+(In-EHO) 200	22,493 ± 2,720 <sup>c,B,C</sup>
H+(In-EHO) 350	28,957 ± 1,825 <sup>a,b,D</sup>
H+(In-EHO) 500	23,110 ± 3,202 <sup>b,c,B,C</sup>
<b>Fritura al vacío</b>	
Control	8,752 ± 0,988 <sup>z,y,A</sup>
H+EHO 200	9,844 ± 2,922 <sup>y,A</sup>
H+EHO 350	7,799 ± 1,993 <sup>z,y,A</sup>
H+EHO 500	6,404 ± 1,225 <sup>z,A</sup>
H+(In-EHO) 200	6,458 ± 0,786 <sup>z,A</sup>
H+(In-EHO) 350	7,687 ± 0,533 <sup>z,y,A</sup>
H+(In-EHO) 500	8,970 ± 1,375 <sup>y,A</sup>

H: hojuela frita; EHO: extracto hidroalcohólico hojas de olivo; In-EHO: micropartículas. 200, 350, 500: concentración de polifenoles en mg EAG/kg. X: promedio; DS: desviación estándar (n= 8). ). Letras diferentes entre muestras indican diferencias significativas (p<0,05), letras minúsculas indican diferencias en una misma fritura, letras mayúsculas indican diferencias entre frituras (fritura atmosférica vs vacío).

Al analizar estadísticamente los valores de fuerza máxima de quiebre o dureza de las hojuelas fritas bajo condiciones atmosféricas, se observa que el control posee un valor de dureza significativamente mayor que las muestras con incorporación de extracto o micropartículas, siendo estas últimas prácticamente iguales entre sí

(excepto hojuela (In-EHO) 350)) (Anexo 12). Los resultados muestran que tanto la adición de EHO como de In-EHO a las masas posee un efecto sobre la dureza de las hojuelas. Estos resultados sugieren que la incorporación de un nuevo elemento podría interferir en la formación de estructura o eventualmente se podrían producir interacciones entre polifenoles, proteínas y carbohidratos las cuales no permiten formar una estructura tan rígida como la del control. Sudha *et al.* (2007), estudió el efecto de la adición de pulpa de manzana en polvo, como fuente de fibra y polifenoles, sobre las características texturales de pasteles. Sus resultados muestran que la estabilidad de la masa disminuyó y se debilitó con la adición de la pulpa.

En el caso de la fritura al vacío, no se encontraron diferencias significativas entre el control y las hojuelas con EHO o micropartículas, posiblemente debido a que bajo condiciones de vacío no se forma estructura (gelatinización del almidón) y por tanto, esta tampoco puede diferenciarse. Las hojuelas fritas bajo condiciones atmosféricas presentaron una dureza significativamente mayor que aquellas fritas bajo condiciones de vacío. El control atmosférico presentó la mayor fuerza de quiebre entre las muestras. En coherencia con este estudio, Sobukola *et al.* (2012) reportó una dureza significativamente mayor en hojuelas de almidón y gluten fritas bajo condiciones atmosféricas, respecto a aquellas fritas al vacío.

## Conclusiones

El principal polifenol del extracto de hojas de olivo (EHO) fue la oleuropeína. La encapsulación de extracto de hojas de olivo con inulina presentó una alta eficiencia de encapsulación y recuperación de oleuropeína (>87%).

Las hojuelas con micropartículas (In-EHO), respecto a aquellas hojuelas con extracto (EHO), presentaron un mayor contenido de polifenoles totales en fritura atmosférica y una mayor capacidad antioxidante en fritura atmosférica y al vacío.

Las hojuelas fritas al vacío mostraron un contenido de polifenoles significativamente mayor que sus pares fritas en condiciones atmosféricas. Aunque, a igual contenido de polifenoles, la capacidad antioxidante fue significativamente mayor en fritura atmosférica que al vacío, sugiriendo que durante la fritura atmosférica se generan metabolitos con actividad antioxidante derivados de la reacción de Maillard.

El contenido de materia grasa y la dureza de las hojuelas fritas dependen del método de fritura (atmosférico o vacío), siendo ambos parámetros menores en la fritura al vacío.

Las micropartículas de inulina–extracto de hojas de olivo (In-EHO) representan una interesante alternativa para la incorporación de antioxidantes naturales en alimentos. Así mismo, la fritura al vacío es una opción en la producción de alimentos fritos más saludables aunque, renunciando a las características texturales típicas de los productos fritos.



## Bibliografía

Alvarez-Jubete, L., Wijngaard, H., Arendt, E.K. y Gallagher, E. 2010. Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*. 119: 770- 778.

A.O.A.C International. 2007. *Official Methods of Analysis* (18th ed.). U.S.A.

Benzie, I. y Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76.

Bilgin M. y Sahin S. 2013. Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea Europaea*) leaves. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 44: 8 -12.

Brand-Williams, W., Cuvelier M. y Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 28: 25-30.

Carrera-González, M., Ramírez-Expósito, M., Mayas, M. y Martínez-Martos, J. 2013. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends in Food Science and Technology*. 31: 92-99.

Chiou, A., Salta, E., Kalogeropoulos, A., Mylona, A., Ntalia, A. y Andrikopoulos, N. 2007. Retention and distribution of polyphenols after pan-frying of French fries in oils enriched with olive leaf extract. *Journal of Food Science*. 72: 574-584.

Chile Oliva. 2014. *Informativo Mercado Nacional 1º Semestre 2014*. Asociación de productores de aceite de oliva.

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

Dueik, V. 2011. Understanding oil absorption and quality attributes preservation during vacuum frying. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

Dueik, V. y Bouchon, P. 2011. Development of healthy low-fat snacks: Understanding the mechanisms of quality changes during atmospheric and vacuum frying. *Food Reviews International*. 27: 408 – 432.

García, P. 2012. Desarrollo de micropartículas de liberación controlada de compuestos bioactivos (antioxidantes), utilizando diferentes tipos de inulina modificada químicamente como agente encapsulante y su aplicación a matrices alimentarias modelos. Tesis para optar al grado de Doctor en Nutrición y Alimentos. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

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

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

Gikas, E., Bazoti, N. y Tsaibopoulos, A. 2007. Conformation of oleuropein, the major bioactive compound of *Olea europaea*. *Journal of Molecular Structure: Theochem*. 821: 125-132.

Harris, R., Lecumberri, E., Mateos-Aparicio, I., Mengibar, M. y Heras, A. 2011. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*. 84: 803-806.

Hayes J.E, Allen P., Brunton N., O'Grady M.N, y Kerry J.P. 2011. Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four comercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea Europaea L.*), lutein, sesamol and ellagic acid. Food Chemistry. 126: 948 – 955.

Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos (INTA). 2015. Base de datos de la actividad antioxidante (ORAC) y del contenido de polifenoles totales (PFT) en frutas producidas y/o consumidas en Chile: <http://www.portalantioxidantes.com/base-de-datos-de-antioxidantes/>

Japón-Luján R. y Luque de Castro M. 2008. Liquid–liquid extraction for the enrichment of edible oils with phenols from olive leaf extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 2505–2511.

Jiménez P., Masson L., Barriga A., Chávez J. y Robert P. 2011. Oxidative stability of oils containing olive leaf extracts obtained by pressure, supercritical and solvent-extraction. European Journal of Lipid Science and Technology. 113: 497-505.

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

Kosaraju, S. L., Labbett, D., Emin, M., Konczak, I. y Lundin, L. 2008. Delivering polyphenols for healthy ageing. Nutrition & Dietetics. 65: 48-52.

Kuskoski, M., Asuero, A., García-Parilla, M., Troncoso, A. y Fett, R. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. Food Science and Technology. 24: 691-693.

Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J. y Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*. 25: 726-732.

Lara, L. 2011. Inulina: Polisacárido con interesantes beneficios a la salud humana y con aplicación en la industria farmacéutica. Artículos de Revisión Bibliográfica: [http://www.gelathinplus.com/pdf/ec\\_inulina\\_1.pdf](http://www.gelathinplus.com/pdf/ec_inulina_1.pdf).

López-Hernández, O. y Gómez-Carril, M. 2008. Preparación de microesferas mediante secado por aspersion. *Revista Cubana de Farmacia*. 42: 1561-2988

Lutz, M. 2012. ¿Podemos hablar de alimentos funcionales en Chile? *Revista Chilena de Nutrición*. 39: 211-216.

Márquez D. 2009. Caracterización de la composición fenólica de la hoja del olivo (*Olea europaea L.*) de distintos cultivares. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Martins, S., Jongen, W. y Boekel, M. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*. 11: 364-373.

Mattivi, F. 2004. Antioxidantes polifenólicos naturales en la dieta. Dietas mediterráneas: la evidencia científica. Pontificia Universidad Católica de Chile. 99 - 112.

Moreno, C., Brown, C., Bouchon, P. 2010. Effect of food surface roughness on oil uptake by deep-fat fried products. *Journal of Food Engineering*. 101: 179-186.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J. y Parajó, J.C. 2000. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 104: 686-692.

Muñoz, S.A., Restrepo, D. A. y Sepúlveda, J.U. 2012. Revisión: Inulina en algunos derivados cárnicos. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín. 65: 6789-6798.

Nicoli, M.C., Anese, M., Parpinel, M.T., Franceschi, S. y Lericci, C.R. 1997. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. Cancer Letters. 114: 71-74.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M. y Prior, M. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 4619-4626.

Parra, R. 2011. Revisión: Microencapsulación de alimentos. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín. 63: 5669 – 5684.

Pérez, D., Ros, G. y Periago, M. J. 2002. Aminoácidos esenciales y no esenciales de harinas de cereales infantiles en distintas fases de procesado industrial y su relación con índices químicos de la calidad proteica. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 52: 193-202.

Pérez-Jiménez, J. y Saura-Calixto, F. 2007. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones.

Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D. y Di Fonzo, V. 2006. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 434-440.

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

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

Sanguansri, L. y Augustin, M. 2010. Microencapsulation in Functional Food Product Development. Functional Food Product Development. John Wiley & Sons.: 1-23.

Scaccini, C. 2004. Efecto de los polifenoles de la dieta en el proceso de la alimentación. Dietas mediterráneas: la evidencia científica. Pontifica Universidad Católica de Chile: 129 - 144.

Scognamiglio M., D'Abrosca B., Pacifico S., Fiumano V., De Luca P., Monaco F. y Fiorentino A. 2012. Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of *Olea europaea* varieties cultivated in Cilento National Park (Italy). Food Research International. 46: 294-303.

Silva S., Gomes L., Leitão F., Coelho A.V. y Vilas – Boas L. 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. Food Science Technology International. 12: 385 – 396.

Singleton, V., y Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16: 144-158.

Sobukola, O.P., Dueik, V. y Bouchon, P. 2012. Understanding the effect of vacuum level in structure development and oil absorption in vacuum-fried wheat starch and gluten-based snacks. Food Bioprocess Technology. 6: 2010-2017.

Soler-Rivas, C., Espín, J. y Wichers, J. 2000. Oleuropein and related compounds. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 1013-1023.

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

Sudha, M.L., Baskaran, V. y Leelavathi, K. 2007. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*. 104: 686-692.

Talhaoui N., Gómez - Caravaca A.M., León L., De la Rosa R., Segura - Carretero A. y Fernández - Gutiérrez A. 2014. Determination of phenolic compounds of "Sikitita" olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents "Arbequina" and "Picual" olive leaves. *Food Science and Technology*. 58: 28 - 34.

Zamora, J. 2007. Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*. 34: 17-26.

## Anexos

Anexo 1: Condiciones del diseño experimental para la obtención de micropartículas (In-EHO) en condiciones óptimas.

Tabla 10: Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación, recuperación y rendimiento del diseño experimental para la obtención de micropartículas óptimas.

Experimento	Temperatura (°C)	Relación (EHO/In)	Eficiencia (%)	Recuperación (%)	Rendimiento (%)
1	140	0,5	79,6	91,4	52
2	180	0,5	79,3	95	48
3	140	2	87	97	73,1
4	180	2	84	93,1	58
5	135,8	1,25	89	98	71
6	184,2	1,25	87	92	59
7	160	0,34	80	90	38
8	160	2,16	85	85	66
9	160	1,25	85,7	85,6	64
10	160	1,25	85,1	86,8	63
11	160	1,25	85,25	85,4	59,7
12	160	1,25	85,3	85,9	67

EHO: extracto hidroalcohólico hojas de olivo; In: inulina.

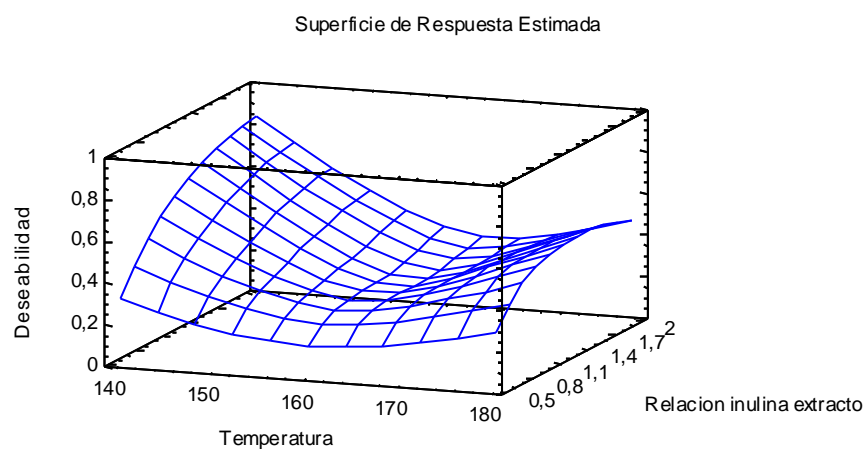


Figura 16: Optimización de múltiples respuestas para el sistema de micropartículas In-EHO.



Tabla 11: Condiciones óptimas elaboración de micropartículas (In-EHO).

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Temperatura	135,8	184,2	135,8
Relación inulina:EHO	1: 0,34	1:2,16	1:1,76

EHO: extracto hidroalcohólico hojas de olivo

Tabla 12: Optimización de la deseabilidad.

<b>Respuesta</b>	<b>Óptimo</b>
Eficiencia	88,7
Recuperación	98,7
Rendimiento	76,61

Valor óptimo logrado= 0,94

Anexo 2: Humedad de los ingredientes utilizados en la preparación de las masas.

Tabla 13: Humedad de los ingredientes (base húmeda).

<b>Ingrediente</b>	<b>Humedad</b>
<b>Almidón</b>	8,20%
<b>Gluten</b>	5,40%
<b>Agua</b>	100%
<b>EHO</b>	90,10%
<b>In-EHO</b>	6,37%

EHO: extracto hojas de olivo; (In-EHO): micropartículas inulina-extracto de hojas de olivo.

Anexo 3: Determinación del contenido de polifenoles totales a través del método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

Preparación de muestras:

*Extracto:* Se filtró el EHO a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Se diluyó tomando 500  $\mu\text{L}$  de extracto en 50 ml de una mezcla etanol: agua (1:1 v:v).

*Micropartículas:* Se disolvió 0,1 g de micropartículas en 2 mL de agua destilada siguiendo la metodología para la determinación de OE total expuesta en el punto 5.2.3 Sobre dicha solución se midió el contenido de polifenoles totales en el polvo.

*Masas/hojuelas:* Se pesó 1 g de muestra y se extrajo los polifenoles con una solución compuesta por 100 ml acetona, 70 ml de agua destilada y 29,5 ml de ácido acético. Se llevó a un volumen final conocido y se midió sobre este el contenido de polifenoles según lo expuesto en el punto 5.2.7.

#### Procedimiento:

En un matraz de aforo de 10 ml se agregaron 100 µL de muestra, 4,9 ml de agua destilada y 500µl de reactivo Folin-Ciocalteu. Se esperaron 3 min y en seguida se agregó 1,7 ml de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% (preparada con 24 h de antelación), se aforó con agua destilada, se mezcló y dejó en reposo por 30 min en un lugar oscuro. En paralelo se preparó el blanco. Pasado el tiempo se midió la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro a 765 nm. Los resultados se expresaron equivalentes de ácido gálico (EAG) en base a una curva de calibración ( $y=0,001x + 0,065$ ;  $R^2=0,99$ , donde:  $x$ =Concentración de polifenoles,  $y$ =Absorbancia de la muestra).

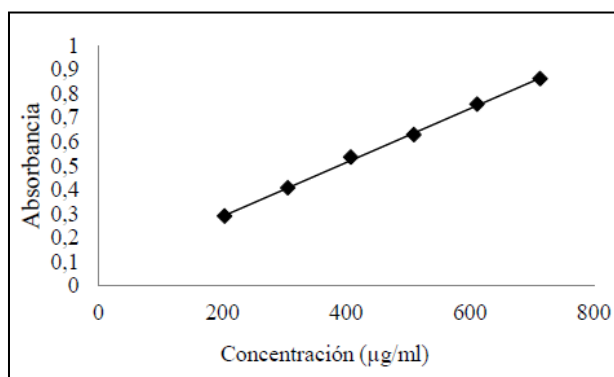


Figura 17: Curva de calibración de ácido gálico.

#### Anexo 4: Determinación de actividad antioxidante.

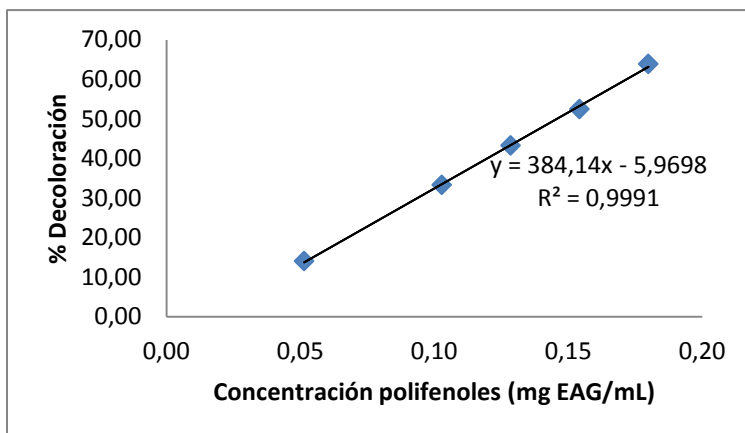
##### Preparación de muestras:

El extracto, las micropartículas y las hojuelas fueron preparadas siguiendo la misma metodología utilizada para la determinación de polifenoles totales (Anexo 2).

##### a) Método del radical DPPH (2,2-difenil –1-picrylhydrazyl):

Basado en el método propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995). Las mediciones se realizaron a 517 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción UV-Vis Ati UNICAM (Cambridge, UK). Primero se evaluó la cinética de reacción de DPPH-muestra, con la finalidad de estimar el tiempo de estabilización de la reacción (Steady state), siendo este de 60 min. Se midieron diferentes diluciones del extracto de manera de generar una curva de calibración (concentración vs %decoloración) a partir de la cual se determinó el EC<sub>50</sub>. Además se confeccionó una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones del patrón Trolox. Las absorbancias se midieron a 515 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu$ moles equivalentes Trolox o a través del índice EC<sub>50</sub> dependiendo de la muestra.

Para los cálculos del EC<sub>50</sub> se realizó un ajuste lineal de la curva de decoloración (Figura 18), obteniendo la ecuación:  $y = 384,14x - 5,9698$ ;  $R^2 = 0,9991$ , Donde:  $y =$  % decoloración;  $x =$  concentración de polifenoles en el extracto.



18: Ajuste lineal curva de decoloración de DPPH.

En la Tabla 14 se presentan las absorbancias y el porcentaje de decoloración del radical DPPH a distintas concentraciones del EHO y su concentración fenólica.

Tabla 14: Porcentaje de decoloración del DPPH a distintas concentraciones del extracto de hojas de olivo y su concentración en polifenoles.

Dilución inicial extracto (µl/ml)	Concentración de polifenoles (mg EAG/mL)	Absorbancia X ± DS	% Decoloración X ± DS
D1 (2 ul/ml)	0,051	0,449 ± 0,002	14,08 ± 0,41
D2 (4 ul/ml)	0,103	0,348 ± 0,003	33,33 ± 0,54
D3 (5 ul/ml)	0,129	0,296 ± 0,003	43,30 ± 0,54
D4 (6 ul/ml)	0,154	0,248 ± 0,003	52,49 ± 0,54
D5 (7 ul/ml)	0,180	0,189 ± 0,001	63,89 ± 0,14

Absorbancia DPPH 0, 522; D: dilución; EAG: equivalente ácido gálico; X: promedio; DS: desviación estándar.

En la tabla 15 se muestran los datos para generar la curva de calibración en base a equivalentes Trolox para la medición del DPPH. En la figura 19 se observa dicha curva  $y = 0,1019x - 0,5682$ ,  $R^2 = 0,9998$ .

Tabla 15: Elaboración curva de calibración equivalentes Trolox para DPPH.

Muestra	Concentración (µM)	Absorbancia	Absorbancia	% Decoloración X ± DS
Blanco	0	0,580	0,579	0
1	50	0,555	0,556	4,14 ± 0,24
2	100	0,520	0,523	10,01 ± 0,48
3	200	0,461	0,464	20,19 ± 0,46
4	400	0,347	0,351	39,78 ± 0,56
5	600	0,227	0,233	60,31 ± 0,78
6	799	0,112	0,107	81,10 ± 0,59

X: promedio; DS: desviación estándar.

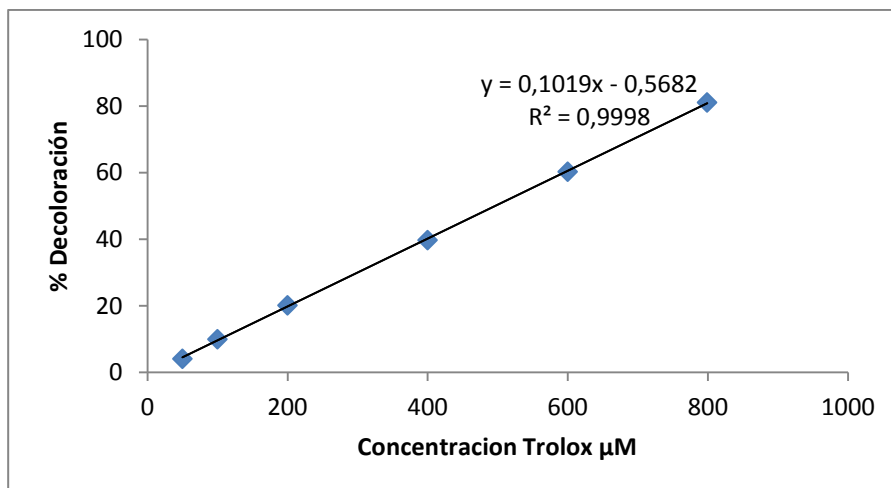


Figura 19: Curva de calibración % decoloración v/s concentración de equivalentes Trolox ( $\mu\text{Moles/L}$ ).

b) Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power):

Basado en el método propuesto por Benzie y Strain (1996). Las mediciones se realizaron a 593 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción UV-Vis Ati UNICAM (Cambridge, UK). Se preparó la solución FRAP a partir de los reactivos, buffer de acetato (300 mM), HCL (40 mM), TPTZ (2,4,6,-tri(2-pyridyl)-s-triazina) 10 mM en HCL y  $\text{FeCl}_3$  1mM en  $\text{H}_2\text{O}$ . Se prepararon las muestras agregando 50  $\mu\text{L}$  de esta, 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 1,5 mL de reactivo FRAP, se llevaron a un baño termostático (37°C) por 4 min y se midió su absorbancia a 593 nm. Se confeccionó una curva de calibración utilizando como patrón Trolox. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{M}$  de equivalente Trolox (ET).

En la tabla 16 se muestran los datos para generar la curva de calibración en base a equivalentes Trolox para la medición del FRAP. En la figura 20 se observa dicha curva  $y = 0,0005x + 0,0049$   $R^2 = 0,9997$ .

Tabla 16: Elaboración curva de calibración equivalentes Trolox para FRAP.

Muestra	Concentración (µM)	Absorbancia promedio
1	250	0,144
2	500	0,274
3	750	0,417
4	1000	0,553
5	1250	0,68
6	1500	0,829

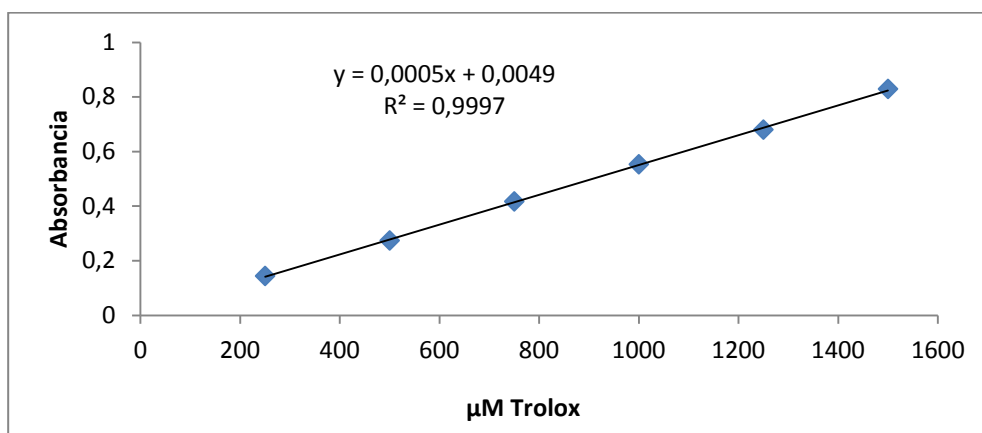


Figura 20: Curva de calibración absorbancia v/s concentración de equivalentes Trolox (µM).

**Anexo 5:** Prueba de múltiples rangos para humedad en masas crudas.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

MUESTRA	Casos	Media	Grupos Homogéneos
M+EHO 350	3	39,2008	X
M+EHO 500	3	39,4211	X
Control	3	39,621	X
M+EHO 200	3	39,6857	X
M+(In-EHO)500	3	40,1502	X
M+(In-EHO)200	3	40,3821	X
M+(In-EHO)350	3	40,4926	X

**Anexo 6:** Prueba de múltiples rangos para contenido de polifenoles totales en masas crudas.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	3	0,758649	X
M+EHO 200	3	0,980223	X
M+(In-EHO)200	3	1,07664	X
M+EHO 350	3	1,15973	X
M+(In-EHO)350	3	1,31615	X
M+EHO 500	3	1,35799	X
M+(In-EHO)500	3	1,56196	X

**Anexo 7:** Prueba de múltiples rangos para humedad en hojuelas fritas.

a) Fritura atmosférica.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
H+(In-EHO)200	3	1,75333	X
H+EHO 200	3	1,78267	XX
Control	3	1,82267	XX
H+EHO 350	3	1,89467	XXX
H+EHO 500	3	1,94533	XXX
H+(In-EHO)350	3	1,99333	XX
H+(In-EHO)500	3	2,08067	X

b) Fritura al vacío.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
H+EHO 500	3	1,68967	X
H+(In-EHO)200	3	1,715	X
H+EHO 350	3	1,73033	X
H+EHO 200	3	1,742	X
Control	3	1,80233	X
H+(In-EHO)350	3	2,31067	X
H+(In-EHO)500	3	2,53467	X

c) Comparacion entre frituras:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
H+EHO 500 V	3	1,68967	X
H+(In-EHO)200 V	3	1,715	X
H+EHO 350 V	3	1,73033	X
H+EHO 200 V	3	1,742	XX
H+(In-EHO)200 A	3	1,75333	XX
H+EHO 200 A	3	1,78267	XX
Control V	3	1,80233	XXX
Control A	3	1,82267	XXX
H+EHO 350 A	3	1,89467	XXX
H+EHO 500 A	3	1,94533	XXX
H+(In-EHO)350 A	3	1,99333	XX
H+(In-EHO)500 A	3	2,08067	X
H+(In-EHO)350 V	3	2,31067	X
H+(In-EHO)500 V	3	2,53467	X

Anexo 8: Prueba de múltiples rangos para contenido de grasa en hojuelas fritas.

a) Fritura atmosferica:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
H+(In-EHO)350 A	3	31,1607	X
H+(In-EHO)500 A	3	31,3928	X
H+(In-EHO)200 A	3	33,7023	X
H+EHO 500 A	3	38,3295	X
Control A	3	38,668	X
H+EHO 200 A	3	39,0832	X
H+EHO 350 A	3	40,3486	X

b) Fritura al vacío:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	3	28,8616	X
M+(In-EHO)500	3	29,1725	X
M+EHO 200	3	29,8238	X
M+EHO 350	3	32,002	X
M+(In-EHO)200	3	32,5556	X
M+(In-EHO)350	3	34,8389	X
M+EHO 500	3	35,3566	X



c) Comparación entre frituras:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control V	3	28,8616	X
M+(In-EHO)500 V	3	29,1725	XX
M+EHO 200 V	3	29,8238	X
H+(In-EHO)350 A	3	31,1607	X
H+(In-EHO)500 A	3	31,3928	XX
M+EHO 350 V	3	32,002	XX
M+(In-EHO)200 V	3	32,5556	X
H+(In-EHO)200 A	3	33,7023	X
M+(In-EHO)350 V	3	34,8389	X
M+EHO 500 V	3	35,3566	X
H+EHO 500 A	3	38,3295	X
Control A	3	38,668	X
H+EHO 200 A	3	39,0832	X
H+EHO 350 A	3	40,3486	X

Anexo 9: Prueba de múltiples rangos para contenido de polifenoles totales en hojuelas fritas.

a) Fritura atmosférica:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra atm</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control A	3	0,514743	X
H+EHO 200 A	3	0,803768	X
H+(In-EHO)200 A	3	0,905799	X
H+EHO 350 A	3	1,04872	X
H+(In-EHO)350 A	3	1,26425	X
H+EHO 500 A	3	1,28161	X
H+(In-EHO)500 A	3	1,55861	X

b) Fritura al vacío:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	3	0,654986	X
H+EHO 200	3	1,08309	X
H+(In-EHO)200	3	1,18419	X
H+EHO 350	3	1,42864	X
H+(In-EHO)350	3	1,56894	X
H+EHO 500	3	1,79228	X
H+(In-EHO)500	3	1,86731	X

c) Comparación entre frituras:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control A	3	0,514743	X
Control V	3	0,654986	X
H+EHO 200 A	3	0,803768	X
H+(In-EHO)200 A	3	0,905799	X
H+EHO 350 A	3	1,04872	X
H+EHO 200 V	3	1,08309	XX
H+(In-EHO)200 V	3	1,18419	XX
H+(In-EHO)350 A	3	1,26425	X
H+EHO 500 A	3	1,28161	X
H+EHO 350 V	3	1,42864	X
H+(In-EHO)500 A	3	1,55861	XX
H+(In-EHO)350 V	3	1,56894	X
H+EHO 500 V	3	1,79228	X
H+(In-EHO)500 V	3	1,86731	X

Anexo 10: Prueba de múltiples rangos para capacidad antioxidante (DPPH) en hojuelas fritas.

a) Fritura atmosférica:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>MUESTRAS ATM</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control A	3	0,416106	X
H+EHO 200 A	3	1,1536	X
H+(In-EHO)200 A	3	1,38148	X
H+EHO 350 A	3	1,72086	X
H+(In-EHO)350 A	3	2,41048	X
H+EHO 500 A	3	2,57815	X
H+(In-EHO)500 A	3	3,55165	X

b) Fritura al vacío:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>MUESTRAS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	3	0,519512	X
H+EHO 200	3	0,904062	X
H+(In-EHO)200	3	1,53254	X
H+EHO 350	3	1,63862	X
H+EHO 500	3	2,49608	X
H+(In-EHO)350	3	2,69063	X
H+(In-EHO)500	3	3,57213	X

c) Comparación entre frituras:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>MUESTRAS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control A	3	0,416106	X
Control V	3	0,519512	X
H+EHO 200 V	3	0,904062	X
H+EHO 200 A	3	1,1536	XX
H+(In-EHO)200 A	3	1,38148	XX
H+(In-EHO)200 V	3	1,53254	XX
H+EHO 350 V	3	1,63862	XX
H+EHO 350 A	3	1,72086	X
H+(In-EHO)350 A	3	2,41048	X
H+EHO 500 V	3	2,49608	XX
H+EHO 500 A	3	2,57815	XX
H+(In-EHO)350 V	3	2,69063	X
H+(In-EHO)500 A	3	3,55165	X
H+(In-EHO)500 V	3	3,57213	X

Anexo 11: Prueba de múltiples rangos para capacidad antioxidante (FRAP) en hojuelas fritas.

a) Fritura atmosférica:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>MUESTRAS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control A	3	0,597522	X
H+EHO 200 A	3	1,56683	X
H+(In-EHO)200 A	3	1,95914	X
H+EHO 350 A	3	2,74495	X
H+EHO 500 A	3	3,26491	X
H+(In-EHO)350 A	3	3,49301	X
H+(In-EHO)500 A	3	5,09432	X

b) Fritura al vacío:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>MUESTRAS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	3	0,809492	X
H+EHO 200	3	1,64188	X
H+(In-EHO)200	3	2,72963	X
H+EHO 350	3	2,79205	X
H+EHO 500	3	3,91789	X
H+(In-EHO)350	3	4,60406	X
H+(In-EHO)500	3	5,33849	X

c) Comparación entre frituras:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>MUESTRAS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control A	3	0,597522	X
Control V	3	0,809492	X
H+EHO 200 A	3	1,56683	X
H+EHO 200 V	3	1,64188	XX
H+(In-EHO)200 A	3	1,95914	X
H+(In-EHO)200 V	3	2,72963	X
H+EHO 350 A	3	2,74495	X
H+EHO 350 V	3	2,79205	X
H+EHO 500 A	3	3,26491	X
H+(In-EHO)350 A	3	3,49301	X
H+EHO 500 V	3	3,91789	X
H+(In-EHO)350 V	3	4,60406	X
H+(In-EHO)500 A	3	5,09432	X
H+(In-EHO)500 V	3	5,33849	X

Anexo 12: Prueba de múltiples rangos para fuerza máxima de quiebre en hojuelas fritas.

a) Fritura atmosférica:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra ATM</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
H+EHO 500 A	8	21,7263	X
H+(In-EHO)200 A	8	22,4932	X
H+(In-EHO)500 A	8	23,1104	XX
H+EHO 350 A	8	26,6962	XX
H+EHO 200 A	8	27,5102	XX
H+(In-EHO)350 A	8	28,9569	XX
Control A	8	34,2325	X

b) Fritura al vacío:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra VAC</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
H+EHO 500	8	6,40414	X
H+(In-EHO)200	8	6,45789	X
H+(In-EHO)350	8	7,68657	XX
H+EHO 350	8	7,79884	XX
Control	8	8,75171	XX
H+(In-EHO)500	8	8,96969	X
H+EHO 200	8	9,84436	X

c) Comparación entre frituras:

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
H+EHO 500 V	8	6,40414	X
H+(In-EHO)200 V	8	6,45789	X
H+(In-EHO)350 V	8	7,68657	X
H+EHO 350 V	8	7,79884	X
Control V	8	8,75171	X
H+(In-EHO)500 V	8	8,96969	X
H+EHO 200 V	8	9,84436	X
H+EHO 500 A	8	21,7263	X
H+(In-EHO)200 A	8	22,4932	XX
H+(In-EHO)500 A	8	23,1104	XX
H+EHO 350 A	8	26,6962	XXX
H+EHO 200 A	8	27,5102	XX
H+(In-EHO)350 A	8	28,9569	X
Control A	8	34,2325	X