

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES DE VAINA DE TARA Y SU ESTABILIZACIÓN POR MICROENCAPSULACIÓN PARA EL DESARROLLO DE UN INGREDIENTE ANTIOXIDANTE NATURAL.

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Ciencias de los Alimentos y Memoria para optar
al Título de Ingeniera en Alimentos por:

PAULINA ISABEL RIVAS REYES

Directoras de Tesis

MSc. Nalda Romero Palacios

Dra. Paz Robert Canales

Santiago - Chile

2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata:

PAULINA ISABEL RIVAS REYES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias de los Alimentos y Título de Ingeniera en Alimentos, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

MSc. Nalda Romero Palacios

Co-director de Tesis:

Dra. Paz Robert Canales

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Lilian Abugoch James

Dr. Claudio Olea Azar

Dra. Mónica Rubilar Díaz

DEDICATORIA

A mis padres, Marta y Ricardo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme y sostenerme durante toda mi vida. Por poner en mi camino a las personas indicadas y ayudarme a entender que los tiempos que yo quería o planeaba, no siempre son los perfectos para mi.

Agradezco profundamente a mis padres, Marta Reyes y Ricardo Rivas, por llevarme de la mano desde pequeña, por guiarme por el camino de Dios e impulsarme a dar lo mejor en cada una de las actividades que he realizado, a enseñarme a hacerlo con una sonrisa y de manera honesta. Por su dedicación hacia mi, por los cuidados, retos y cariños que siempre recibí para así ser mejor persona cada día.

A Cristián Carril, por su incondicional apoyo en todo este proceso, por tener las palabras precisas para cada momento, por el ánimo, paciencia y enorme cariño que me entrega cada día.

A mis directoras, MSc. Nalda Romero y Dra. Paz Robert, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Química de los Alimentos y Laboratorio de Encapsulación. Por su guía en este trabajo de investigación, su exigencia y acogida.

A mis compañeros de laboratorio, por su simpatía y ayuda en el trabajo diario, especialmente a Cristián Encina, Paulina Navarrete, Juan Carlos Carmona, Paulina Gaete y Tamar Toledo. Sin duda el laboratorio no hubiese sido tan entretenido sin ustedes.

Por último, agradezco a mis alumnos que siempre estaban pendientes del término de este proceso, por su interés y ánimo. En especial a Evelyn Soto, Sofía Iturrieta y Valentina Pérez.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Los Polifenoles: Taninos.....	1
1.3 La Tara.....	4
1.3.1 Extracción de polifenoles de vaina de tara.....	7
1.4 Microencapsulación.....	10
1.4.1 Encapsulación de antioxidantes por secado por atomización.....	12
1.4.2 Agentes encapsulantes.....	13
1.5 Método de Superficie de Respuesta.....	14
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1 Materiales.....	17
2.2 Métodos.....	17
2.2.1 Preparación y caracterización del polvo de vaina de tara.....	17
2.2.2 Extracción de polifenoles del polvo de vaina de tara: Diseño de variables..	19
2.2.2.1 Caracterización del extracto de polvo de vaina de tara.....	20
2.2.3 Microencapsulación: Diseño de variables.....	20
2.2.3.1 Caracterización de micropartículas.....	21
2.2.4 Estudio de la estabilidad de las micropartículas de polifenoles durante el almacenamiento a 60°C.....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
3.1 Obtención y caracterización del polvo de vaina de tara (Caesalpinia spinosa).....	23
3.2 Extracción de polifenoles de vaina de tara.....	24
3.3 Caracterización fisicoquímica del extracto de vaina de tara obtenido bajo condiciones óptimas.....	30
3.4 Encapsulación de extracto de vaina de tara con maltodextrina e inulina por secado por atomización.....	31

3.4.1 Maltodextrina como agente encapsulante de EVT.....	33
3.4.2 Inulina como agente encapsulante de EVT.....	35
3.4.3. Micropartículas EVT-MD y EVT-In obtenidas bajo condiciones óptimas.....	37
3.5 Estabilidad de micropartículas.....	40
CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS.....	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracteres diagnósticos de las especies peruanas de <i>Caesalpinia</i>	5
Tabla 2. Extracción de polifenoles de vaina de tara.....	9
Tabla 3. Investigaciones de microencapsulación de polifenoles.....	12
Tabla 4. Caracterización del polvo de vaina de tara <i>Caesalpinia spinosa</i>	23
Tabla 5. Diseño de experimentos de Box-Behnken para la extracción de polifenoles en el polvo de vaina de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>).	25
Tabla 6. Condiciones óptimas para la extracción del polifenoles del polvo de vaina de tara.....	29
Tabla 7. Caracterización del extracto de vaina de tara (EVT) obtenido bajo condiciones óptimas.....	30
Tabla 8. Diseño de experimentos de compósito central y eficiencia de encapsulación para sistema EVT-MD y EVT-In.	32
Tabla 9. Caracterización de las micropartículas EVT-MD y EVT-In, obtenidas bajo condiciones óptimas.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taninos hidrolizables (Fuente: Garro <i>et al.</i> , 1997).....	3
Figura 2. Precursor de los taninos condensados (Fuente: Garro <i>et al.</i> , 1997).....	3
Figura 3. Estructura de ácido quínico galoilado del tanino de tara (Fuente: Garro <i>et al.</i> , 1997).....	4
Figura 4. Fotografías de vainas de tara (Dostert <i>et al.</i> , 2009).....	7
Figura 5. Molécula de maltodextrina.....	13
Figura 6. Molécula de inulina.....	14
Figura 7. Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño de extracción de polifenoles totales del PVT.....	26
Figura 8. Gráficos de superficie de respuesta de optimización de extracción de polifenoles de PVT.....	28
Figura 9. Diagrama de Pareto Estandarizado para Eficiencia de encapsulación EVT-MD.....	33
Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta para optimización de microencapsulación de EVT-MD.....	34
Figura 11. Diagrama de Pareto estandarizado para Eficiencia de encapsulación para el sistema EVT-In.	35
Figura 12. Gráfico de Superficie de respuesta para optimización de micropartículas de EVT-In.....	36
Figura 13. Microfotografías de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas EVT-MD y EVT-IN (Mag 600x).....	39
Figura 14. Gráfico rapidez de degradación vs tiempo para sistema EVT-MD.....	40
Figura 15. Gráfico rapidez de degradación vs tiempo para sistema EVT-In.... ¡Error! Marcador no definido.	

LISTA DE ABREVIATURAS

PVT	: Polvo de vaina de tara.
EVT	: Extracto de vaina de tara.
MD	: Agente encapsulante Maltodextrina.
In	: Agente encapsulante Inulina.
EVT-MD	: Sistema de micropartículas de extracto de vaina de tara con maltodextrina.
EVT-In	: Sistema de micropartículas de extracto de vaina de tara con inulina.
MSR	: Método de superficie de respuesta.
EE	: Eficiencia de encapsulación.
R	: Recuperación de polifenoles.

RESUMEN

Actualmente, existe una gran demanda de alimentos naturales con ingredientes que además de aportar nutrientes, ayuden a mejorar la salud. En esta investigación se utilizó la Tara, *Caesalpinia spinosa*, árbol de leguminosas nativo de América del Sur que posee polifenoles, los cuales una vez que se extraen, son altamente susceptibles a degradación frente a condiciones del medioambiente. Así, la tecnología de microencapsulación permite estabilizarlos para ser agregados en un alimento. El objetivo de esta investigación fue estudiar la encapsulación de un extracto de vaina de tara con maltodextrina e inulina por secado por atomización y evaluar su estabilidad durante el almacenamiento. La optimización de la extracción de polifenoles en el polvo de vaina de tara (PVT) se realizó aplicando un diseño estadístico Box-Behnken. Las condiciones óptimas de temperatura (24°C), proporción de etanol (100%) y relación sólido:solvente (1:18), entregaron un extracto de vaina de tara (EVT) con contenido de polifenoles totales de $600,3 \pm 0,6$ mg EAG/g PVT, ORAC $17,4 \pm 0,9$ mmol ET/100 g PVT, sólidos totales $25,6 \pm 0,1$ °Brix y pH $5,01 \pm 0,01$.

La optimización de la encapsulación del EVT por secado por atomización se realizó aplicando un diseño Compuesto Central. Las condiciones óptimas fueron temperatura del aire de entrada al secador y relación EVT:AE de 187°C y 1:1,25, respectivamente para MD; 169°C y 1:1,25, respectivamente para In. La EE alcanzó valores sobre 97% para ambos sistemas (EVT-MD y EVT-In), lo cual se atribuye a la interacción polifenoles-polímero por puentes de hidrógeno. EVT-MD y EVT-In mostraron valores de humedad de $6,3 \pm 0,08\%$ y $6,0 \pm 0,05\%$, respectivamente, y actividad de agua de $0,3 \pm 0,001$ y $0,22 \pm 0,001$, respectivamente, asegurando así la estabilidad microbiológica de las micropartículas. La higroscopicidad para EVT-MD y EVT-In fue de $25 \pm 0,9$ y $17 \pm 0,6$ g/100 g, respectivamente; mostrando que la higroscopicidad es específica de cada polímero. Las microfotografías (SEM) mostraron micropartículas esféricas con algunas abolladuras sobre la superficie. La estabilidad de los polifenoles encapsulados de los sistemas EVT-MD y EVT-In, no

mostraron degradación de los polifenoles durante las 19 semanas de almacenamiento a 60°C. Los resultados permitieron desarrollar micropartículas de polifenoles de vaina de tara utilizando MD e In como recubrimiento, para su potencial aplicación como un ingrediente saludable.

ABSTRACT

Currently, there is a great demand for foods with natural ingredients, since it provides nutrients, and improves the health. In this research, Tara (*Caesalpinia spinosa*), leguminous tree native to South America was studied as source of polyphenols. However, when polyphenols are extracted, they are highly susceptible to degradation against environmental conditions. Thus, the use of encapsulated polyphenols as food ingredient, should allow the protection of polyphenols until they are added to food vehicle. The aim of this research was to study the encapsulation from Tara pod extract by spray drying, using maltodextrin (MD) and inulin (In) as encapsulating agents and evaluate its stability during storage. The optimization of the extraction of the polyphenols from Tara pod powder (TPP) was performed using a Box-Behnken statistical design. The optimal conditions of temperature (24°C), ethanol percentage (100%) and solid:solvent ratio (1:18), giving Tara pod extract (TPE) with total polyphenol content of 600.3 ± 0.6 mg EGA/g TPP, ORAC 17.4 ± 0.9 mmol ET/100g TPP, total solids 25.6 ± 0.1 °Brix and pH 5.01 ± 0.01 . The optimization of the encapsulation of TPE by spray drying was performed applying a Central Composite design. The optimal conditions were inlet air temperature and TPE:EA ratio of 187 °C and 1:1.25, respectively for MD; 169 °C and 1:1.25, respectively for In. The EE reached values over 97% for both systems (TPE-MD and TPE-In), which could be attributed to polyphenol-polymer interaction by hydrogen bonds. TPE-MD and TPE-In microparticles showed moisture values of $6.3 \pm 0.08\%$ and $6.0 \pm 0.05\%$, respectively, and water activity of 0.3 ± 0.001 y 0.22 ± 0.001 , respectively), ensuring microbiological quality of the microparticles. The hygroscopicity for EVT-MD and EVT-In was 25 ± 0.9 y 17 ± 0.6 g/100g, respectively; showing that the hygroscopicity is polymer-specific. The microphotographs (SEM) showed spherical microparticles with some dents on the surface. Polyphenols stability in TPE-MD and TPE-In, did not show polyphenols degradation during 19 weeks of storage at 60 °C. The Tara pod polyphenol microparticles were developed using MD and In as coating, for their potential application as a healthy ingredient.

INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que el 52% de las muertes prematuras en el año 2012 se atribuyeron a enfermedades no transmisibles, con más del 75% de ellas relacionadas a enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades respiratorias crónicas. La OMS recomendó el incremento en el consumo de frutas, vegetales y fibra, como un cambio clave en el estilo de vida, pudiendo así reducir el riesgo de las enfermedades no transmisibles.

Además de los nutrientes que se han encontrado en frutas y vegetales, como las vitaminas y minerales esenciales, hay una gran cantidad de compuestos bioactivos sintetizados por las plantas, como los polifenoles, que pueden entregar beneficios a la salud humana (Fraga *et al.*, 2019). Es por esto que actualmente hay un creciente interés por elaborar alimentos, suplementos e ingredientes en base a materias primas funcionales de origen natural, que generen beneficios al consumidor, como es el caso de los antioxidantes (FIA, 2017).

1.2 Los Polifenoles: Taninos.

Los polifenoles son compuestos antioxidantes que constituyen un gran grupo de fitoquímicos que incluyen múltiples sub-clasificaciones como los flavonoides, estilbenos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y taninos. Estos no se identifican como nutrientes esenciales, pero se les atribuyen efectos positivos sobre la salud de las personas debido a su actividad antioxidante. Varían en su estructura y se han identificado más de 4000 compuestos polifenólicos, los cuales se clasifican en flavonoides y no flavonoides. Los compuestos flavonoides y no flavonoides se pueden encontrar formando compuestos de muy alto peso molecular (>500 u.m.a., unidad de masa atómica) llamados taninos (Fraga *et al.*, 2019; Liu, 2013).

Los taninos son compuestos fenólicos de alto peso molecular relativo, que se oxidan al contacto con oxígeno atmosférico, son inodoros, de sabor amargo y astringente,

solubles en agua, alcohol y acetona; son combustibles con un punto de inflamación de 199°C, una temperatura de autoignición de 528,5°C; con baja toxicidad por ingestión o inhalación (Basurto, 2006). Los taninos presentan grupos hidroxilos unidos a estructuras fenólicas que les confieren la característica de formar complejos con proteínas, minerales y otras macromoléculas. Son sustancias que se producen en diversas partes de las plantas, como corteza, frutos, hojas, raíces y semillas; a pesar de tener un origen común, la especificidad de las plantas le da a los taninos diferencias en color, calidad y concentración (Basurto, 2006). Su clasificación dependerá del tipo de polifenol que se polimeriza, de esta forma los no flavonoides se polimerizan para formar taninos hidrolizables, mientras que ciertos flavonoides polimerizan para formar taninos condensados.

Los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, provienen de la esterificación de compuestos como el ácido gálico o elágico, son fácilmente hidrolizados por ácidos, álcalis o enzimas en un azúcar o un alcohol polihídrico, poliol relacionado y un ácido carboxílico fenólico (Aouf *et al.*, 2014). Se consideran uno de los antioxidantes más potentes de origen vegetal debido a que se encuentran listos para formar complejos con metales reactivos, evitando la generación de radicales libres que da lugar a daño oxidativo de membranas celulares y ADN (Khan *et al.*, 2000).

Las características de éstos son las siguientes:

- Compuestos químicos o cristalizables cuyas soluciones acuosas son coloidales, de reacción ácida y de sabor amargo.
- Precipitan con gelatina, albúmina y alcaloides en solución.
- Con sales férricas dan coloraciones negro azuladas o verdosas.
- Producen un color rojo intenso con ferricianuro de potasio y amoníaco.
- Precipitan a las proteínas en solución y se combinan con ellas, haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas.
- Dependiendo de la naturaleza del ácido carboxílico fenólico, los taninos hidrolizables son usualmente subdivididos en galotaninos y elagitaninos (Garro *et al.*, 1997). Esta subdivisión se muestra en la Figura 1.

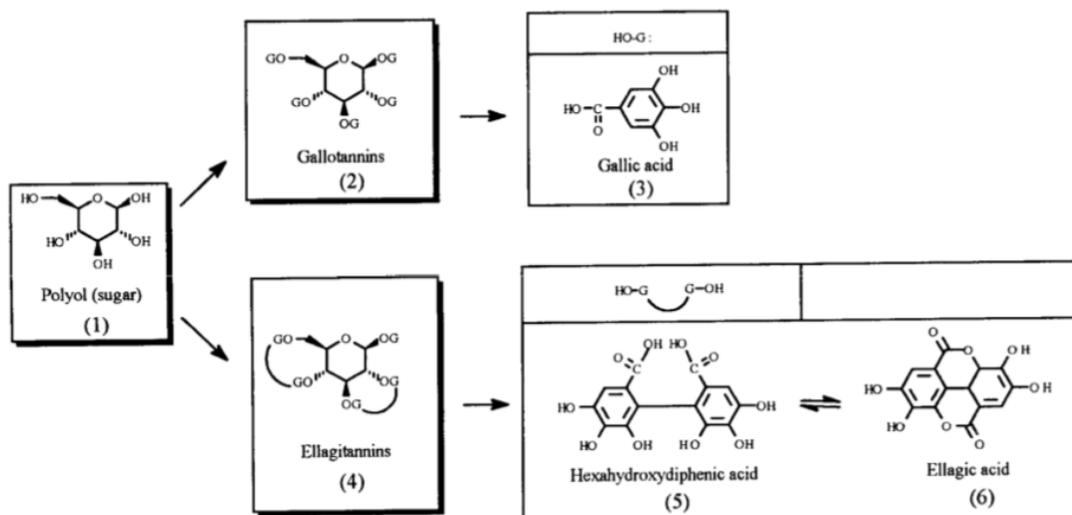


Figura 1. Taninos hidrolizables (Fuente: Garro *et al.*, 1997).

Los taninos condensados o proantocianidinas son poliflavonoides naturales, los cuales consisten en cadenas de unidades de flavan-3,4-diol. Estos taninos se encuentran en tres formas principales: (a) extractable, lo que indica que son reactivos con proteína, (b) ligados a la proteína, y (c) ligados a la fibra. Se ha demostrado que el secado de una muestra puede afectar la distribución de taninos en el tejido de una planta, y se ha observado que en varias leguminosas secadas en horno a 60°C existió una reducción de taninos extractables y un aumento de taninos ligados en comparación con muestras liofilizadas. La clase más común de proantocianidinas son las procianidinas, las cuales consisten en cadenas de catequinas y/o epicatequinas, como se muestra en la Figura 2 (Garro *et al.*, 1997).

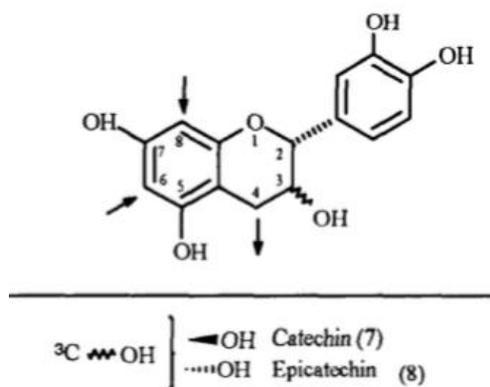


Figura 2. Precursor de los taninos condensados (Fuente: Garro *et al.*, 1997).

El componente principal de los taninos de tara se basa en una estructura de ácido quínico galoilado (Figura 3).

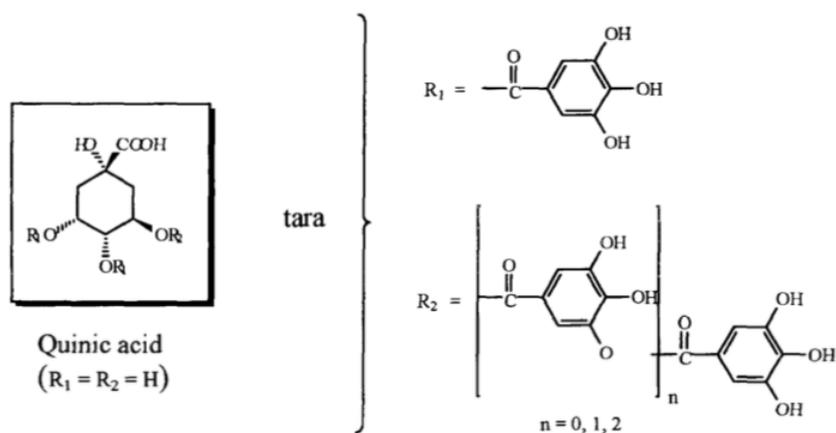


Figura 3. Estructura de ácido quínico galoilado del tanino de tara (Fuente: Garro *et al.*, 1997).

Las características de los taninos condensados son las siguientes:

- Son derivados de unidades de flavan-3,4-dioles, proantocianidinas monómeras, conocidas actualmente también como proantocianidinas condensadas.
- Al ser tratados con ácidos en caliente, se origina una polimerización progresiva hasta dar taninos amorfos, llamados flobafenos o taninos rojos.
- En ellos, los núcleos bencénicos están unidos por átomos de carbono (por ejemplo C-4 a C-8, C-4 a C-6).
- Dan coloración verde con FeCl_3 .
- Precipitan con soluciones de bromo.

1.3 La Tara.

El género *Caesalpinia* L. *sensu lato*, pertenece a la familia Caesalpiniaceae, de distribución pantropical en bosques, sabanas y semidesiertos, e incluye alrededor de 150 especies, de las cuales 40 están presentes en Sudamérica (Ulibarri, 1996). Aparte de *C. spinosa*, se reconoce la presencia de otras seis especies en Perú: *C. ancashiana* Ulibarri, *C. cassioides* Willd., *C. decapetala* (Roth) Alston, *C. glabrata* Kunth, *C. pulcherrima* (L.) Swartz y *C. trichocarpa* Griseb (Macbride, 1943; Ulibarri,

1996). Las especies son diferenciables con la ayuda de algunos caracteres, como largo de la flor, grado de división de la hoja y la naturaleza de tronco y ramas, donde, por ejemplo, sólo el tronco y ramas de *C. spinosa* son espinosas. El cáliz asimétrico, con el sépalo abaxial más desarrollado y con los dientes del ápice notorios, en combinación con la alta densidad de espinas, son buenos caracteres para reconocer *C. spinosa* en Perú (Dostert *et al.*, 2009). A continuación se presenta la Tabla 1 con las características de las especies peruanas de *Caesalpinia*.

Tabla 1. Caracteres de las especies peruanas de *Caesalpinia*.

Caracter	<i>C. spinosa</i>	<i>C. ancashiana</i>	<i>C. cassioides</i>	<i>C. decapetala</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. pulcherrima</i>	<i>C. trichocarpa</i>
Forma de crecimiento	Arbusto o árbol 3-5 m	Subarbusto 0,3 m	Arbusto o árbol 1-4 m	Arbusto trepador 2,5-10 m	Arbusto o árbol 3-6 m	Arbusto o árbol 1-9 m	Arbusto 0,3-1,5 m
Tallo y ramas	Generalmente aculeada	Inerme	Subinerme	Parte viejas de la planta aculeadas	Subinerme	Subinerme	Inerme
Foliolos	2-3 pares	1 par y 1 terminal	2-5 pares y 1 terminal	4-10 pares	3-8 pares	5-8 pares	2-5 pares
Foliolulos	5-8 pares	8-10 pares	3-7 pares	8-12 pares	4-7 pares	6-10 pares	6-8 pares
Largo de la flor	9-10 mm	10-12 mm	13-17 mm	13-17 mm	8-9 mm	20-25 mm	8-11 mm

(Fuente: Dostert *et al.*, 2009)

La tara, *Caesalpinia spinosa*, es un árbol de leguminosas nativas de América del Sur que está formado por vainas de color rojo o amarillo claro de 8-10 cm de longitud. El fruto de tara está constituido aproximadamente en un 65% por la vaina y en un 32-38% por las semillas (Aouf *et al.*, 2014). Su cultivo se extiende desde la región de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, hasta el norte de Chile. En el pasado, la especie se encontraba en las lomas de Perú a menos de 1000 m s.n.m., donde fue prácticamente extinguida debido a su sobreutilización como combustible y material de construcción (Dostert *et al.*, 2009). La tara crece en forma

silvestre en la costa peruana y en la región andina a altitudes de 1000 a 2900 m s.n.m. Perú es considerado el productor más importante de tara a nivel mundial con más del 80% de la producción mundial (Chambi *et al.*, 2013). La cosecha de frutos se realiza en diferentes épocas dependiendo de la región (Dostert *et al.*, 2009) y cada árbol de tara puede rendir un promedio de 20 a 40 kg de vaina anual, cosechándolos dos veces al año (De la Cruz, 2004). Su producción se inicia a los 4 años, alcanzando su mayor productividad a partir de los 15 años para disminuir a los 65. En terrenos de secano y posiblemente en bosques naturales, el promedio de vida es de 65 años (Dostert *et al.*, 2009).

Características botánicas: el árbol de tara es pequeño, de dos a tres metros de altura, de fuste corto, cilíndrico y a veces tortuoso y su tronco está provisto de una corteza gris espinosa, con ramillas densamente pobladas. En muchos casos las ramas se inician desde la base dando la impresión de varios tallos. La copa de la tara es irregular, aparasolada y poco densa, con ramas ascendentes. Sus hojas son en forma de plumas, ovoides y brillante ligeramente espinosa de color verde oscuro y miden 1,5 cm de largo. Sus flores son de color amarillo rojizo, dispuestos en racimos de 8 cm a 15 cm de largo (De la Cruz, 2004). La *C. spinosa* muestra un crecimiento juvenil muy lento, limitando su uso en programas de reforestación. El crecimiento anual en los primeros años es de sólo 5-15 cm, sin embargo, cuando el árbol está arraigado, muestra una alta resistencia a la sequía fisiológica, de la que hace uso en situaciones marginales para el crecimiento arbóreo así como en altitudes sobre 3000 m s.n.m. (Dostert *et al.*, 2009).

Las vainas de tara tienen un alto potencial de uso en aplicaciones médicas, industriales y alimentarias, ya que pueden ser utilizadas como materia prima para producir gomas o hidrocoloides, ácido gálico y taninos, entre otros productos. El ácido tánico obtenido a partir de vainas de tara es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica, química y de la pintura, entre otras, y es especialmente útil en la industria de la curtiembre (Romero *et al.*, 2012). Además, se ha informado de la actividad antimutagénica y anticancerígena in vitro del ácido tánico (Chambi *et al.*, 2013).

La Figura 4 muestra fotografías de vainas de tara cosechadas y en el árbol. Se observa que la vaina es la parte más importantes del fruto de la tara, ya que allí se concentran los mayores niveles de taninos, los cuales se obtienen a partir de la molienda de la vaina (López *et al.*, 2011).



Figura 4. Fotografías de vainas de tara (Dostert *et al.*, 2009).

Además, las vainas de tara son fuente de antioxidantes fenólicos, como ácido gálico y taninos, los cuales son extraídos comúnmente con solventes de diferentes polaridades para evaluar su actividad antioxidante, en donde la composición, los rendimientos y las respuestas observadas serán notablemente influenciados tanto por la naturaleza del disolvente, como por las condiciones de extracción. Estos antioxidantes se pueden degradar frente a las condiciones del medioambiente (Bustos-Hipólito *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2012), de tal forma que la tecnología de encapsulación puede ser una herramienta para su estabilización.

1.3.1 Extracción de polifenoles de vaina de tara.

La Tara es una leguminosa con un alto contenido de taninos, en donde las infusiones de ésta se han utilizado tradicionalmente y ampliamente por la medicina popular peruana para tratar las amígdalas inflamadas, la fiebre, el resfrío y los dolores de estómago. Los taninos de tara también se emplean como componente de los medicamentos gastroenterológicos para curar úlceras y ayudar a la cicatrización. Además, algunas propiedades como antiinflamatorias, antifúngicas,

antibacterianas, antisépticas y antidiarreicas se han atribuido a los taninos (Chambi *et al.*, 2013).

Los polifenoles se extraen utilizando diversos métodos como extracción con solvente y extracción supercrítica, entre otros. Para separar los analitos de las muestras sólidas, los solventes más utilizados son aquellos que poseen un bajas capacidades caloríficas de evaporación y ebullición. Los solventes además no deben ser tóxicos, inflamables y deben ser químicamente neutros. Éstos no deben influir negativamente en la instrumentación y la estabilidad de las sustancias analizadas. Los solventes como metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y sus mezclas con agua se usan comúnmente (Viapiana *et al.*, 2013), los rendimientos y las respuestas observadas son notablemente influenciadas tanto por la naturaleza del disolvente como por las condiciones de extracción (Bustos-Hipólito *et al.*, 2012). Además de realizarse extracciones con solventes, también existen otras técnicas como extracción Soxhlet, extracción asistida con ultrasonido, extracción con fluido supercrítico, extracción a altas presiones y temperaturas, extracción con agitación, entre otros (Viapiana *et al.*, 2013).

Saavedra (2016) reportó un contenido de polifenoles totales de $693,49 \pm 54,52$ mg EAG/g para una relación sólido-líquido de 1:60 a 40°C. En el caso de una extracción con 100% agua se reportó un contenido de polifenoles totales de 349,7 mg EAG/g, de 445,3 mg EAG/g con agua:etanol (50:50) y de 460,2 mg EAG/g con agua:etanol (25:75) (Garro *et al.*, 1997). Investigaciones anteriores, utilizando extracción supercrítica de vaina de tara, reportaron un contenido de polifenoles totales de 4107 ± 80 µg EAG/g a 40°C, 500 bar y 5% de etanol (Fernández, 2008) y de 3946 µg EAG/g a 70°C, 550 bar y 10% de etanol (Silva, 2011).

En la Tabla 2 se encuentran algunas investigaciones en las cuales se han realizado extracciones de polifenoles de vaina de tara con distintos solventes.

Tabla 2. Extracción de polifenoles de vaina de tara.

Fuente	Metodología	Polifenoles	Referencias
Vaina	Agua 65°C/1h	Galotaninos totales y elagitaninos totales por espectrofotometría y HPLC.	Garro <i>et al.</i> , 1997
Vaina	Agua	Capacidad antioxidante por DPPH y ABTS. Determinación de fenoles y flavonoides por Folin-Ciocalteu.	López <i>et al.</i> , 2011
Vaina	Extracción con fluido supercrítico 40°C/350-550 bar de CO2	Estabilización oxidativa con Rancimat. Prueba de estabilidad de almacenamiento a 60°C por 39 días. Composición de ácidos grasos con Cromatografía gaseosa. Análisis de tocoferoles con HPLC con detector de fluorescencia.	Romero <i>et al.</i> , 2012
Vaina	Acetona/agua 80% v/v y razón material/solvente = 1/100 p/v 4°C por 20h	Contenido total de fenoles y ácido gálico determinado por método colorimétrico. Capacidad antioxidante determinada con ABTS, FRAP y ORAC. Capacidad antioxidante con calorimetría diferencial de barrido (DSC). Componente fenólico se determinó con HPLC-PAD	Chambi <i>et al.</i> , 2013
Hojas	Etanol:Agua=1:1 v/v a 40°C por 24h	Determinación del total de polifenoles por método de Folin-Ciocalteu. Identificación de las especies antioxidantes y seguimiento de su evolución se determinó mediante cromatografía líquida combinada con espectrometría de masa	Gallegos <i>et al.</i> , 2016

1.4 Microencapsulación.

La microencapsulación ha sido una técnica que ha incrementado en importancia en la industria alimentaria, particularmente en el desarrollo de alimentos funcionales y saludables. Es una tecnología donde un componente activo (líquido o gas) es introducido o atrapado en una matriz (sistema homogéneo) o muralla polimérica (sistema heterogéneo) para protegerlo de condiciones ambientales (oxígeno, luz, humedad), del tracto gastrointestinal (pH, enzimas), de su interacción con otros componentes del alimento o bien para controlar su liberación (Yáñez *et al.*, 2002; Mozafari *et al.*, 2008; Robert *et al.*, 2016)

La selección del proceso de microencapsulación está dada por las propiedades físicas y químicas del activo y el recubrimiento como composición de los ingredientes, el mecanismo de liberación, el tamaño de partícula, la forma final y el costo, entre otros, definirá la aplicación de las micropartículas. Para obtener una buena eficiencia de encapsulación, incluso si el material de encapsulación es adecuado, se deben optimizar las condiciones de formulación y del proceso (Desai y Park, 2005; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

La encapsulación es una tecnología que puede ser una estrategia para mejorar la estabilidad de los polifenoles y extender su vida útil. Existen diferentes técnicas que se utilizan para la encapsulación de polifenoles, tales como fase dispersa en aceite – secado por atomización (Zheng *et al.*, 2011), emulsión (Betz *et al.*, 2012), doble emulsión w/o/w (Frank *et al.*, 2012), extrusión, emulsificación/gelificación térmica (Baum *et al.*, 2014; Oidtmann *et al.*, 2012), síntesis de microgel (Wang *et al.*, 2013), secado en frío (Gurak *et al.*, 2013; Pasrija *et al.*, 2015; Mourtzinou *et al.*, 2007), extracción con fluido supercrítico (Santos *et al.*, 2013), extrusión electrostática (Belseak-Cvitanovic *et al.*, 2011), adsorción (Deladino *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2015), entre otros.

El secado por atomización es el método de encapsulación que se usará en esta investigación debido a que es el más utilizado en la industria de alimentos para encapsular compuestos activos y proteger materiales, de forma económica, simple y continua (Ré, 1998; Desai y Park, 2005; Gharsallaoui *et al.*, 2007). El proceso de secado por atomización se lleva a cabo con una solución acuosa de alimentación.

La solución, dispersión o emulsión de alimentación es atomizada, produciendo gotitas pequeñas que se encuentran con el aire caliente y se produce transferencia de calor y masa entre las gotitas atomizadas y el medio de secado, debido a una mayor superficie de contacto. En consecuencia, las gotitas se deshidratan por causa del medio de secado caliente, lo cual ocurre debido a que el agua se evapora rápidamente en la cámara caliente. Así, la evaporación de la humedad de las gotitas forma rápidamente una costra en su superficie y la humedad residual difunde hacia el exterior de las partículas. Las partículas en polvo deshidratadas son luego transportadas a un separador ciclónico para su recuperación. El secado se termina cuando la temperatura de la partícula es igual a la temperatura del aire. Este proceso toma unos segundos, y el líquido de alimentación se convierte en partículas en polvo (Encina *et al.*, 2016; Hayashi, 1989).

La elección del material encapsulante para el secado por atomización es muy importante para la eficiencia de encapsulación y estabilidad de la micropartícula, pueden seleccionarse a partir de una amplia gama de biopolímeros naturales y sintéticos. El criterio de selección se basa en las propiedades fisicoquímicas de éste, tales como peso molecular, punto de ebullición, solubilidad, viscosidad, difusividad, cristalinidad, capacidad de formación de películas y propiedades emulsificantes (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Dentro de algunos materiales de uso común para recubrimiento biocompatible y de calidad alimentaria están presentes los carbohidratos (almidón, maltodextrina, quitosano), celulosas (carboximetilcelulosa, metil y etil celulosa) y gomas (gluten, caseinatos, gelatina, albúminas, péptidos) (Desai y Park, 2005). Los requisitos para que un material encapsulante sea utilizado en secado por atomización, incluyen un alto grado de solubilidad, baja viscosidad que permita formar soluciones, dispersiones o emulsiones con un alto contenido de sólidos, buenas propiedades emulsificantes, carácter no higroscópico, sabor suave, no reactivo y bajo costo (Murúa-Pagola *et al.*, 2009).

1.4.1 Encapsulación de antioxidantes por secado por atomización.

La microencapsulación permite a un material sensible ser recubierto por un polímero para su protección frente a las condiciones ambientales adversas. Diversos materiales de interés biológico han sido microencapsulados, desde pequeñas moléculas y proteínas hasta células bacterianas y levaduras (Borgogna *et al.*, 2010). El secado por atomización es el método más utilizado en la industria de alimentos, tiene la ventaja de convertir un líquido en un polvo con baja humedad, lo cual simplifica el transporte, el manejo y almacenamiento del producto final, junto con asegurar la calidad microbiológica de éste (Gouin, 2004).

En la Tabla 3 se muestran algunas investigaciones en las cuales se realizó secado por atomización a materias primas, utilizando diversos agentes encapsulantes.

Tabla 3. Investigaciones de microencapsulación de polifenoles.

Material	Agente encapsulante	Referencias
Mora andina (extracto)	Maltodextrina, goma arábica, almidón de maíz, almidón de yuca, Capsul ®	Villacrez <i>et al.</i> (2014)
Arándano (extracto de pulpa)	Maltodextrina + pectina	Baum <i>et al.</i> (2014) Oidtmann <i>et al.</i> (2012)
Grosella (extracto de pulpa)	Maltodextrina o inulina	Bakowska-Barezak y Kolodziejczyk (2011)
Té verde (extracto)	Maltodextrina, β -ciclodextrina o mezcla	Pasrija <i>et al.</i> (2015)
Granada (jugo de fruta, extracto de fruta)	Maltodextrina o proteína aislada de soya	Robert <i>et al.</i> (2010)
Granada (extracto de cáscara)	Maltodextrina	Çam <i>et al.</i> (2014)

1.4.2 Agentes encapsulantes.

La maltodextrina es un polisacárido que está formado por unidades de D-glucosa con enlaces α -1-4. Se obtiene por hidrólisis parcial del almidón, empleando ácidos o enzimas y se utiliza como estabilizante de emulsiones (Pastuña – Pullutasig *et al.*, 2016), formación de películas y reducción de la permeabilidad al oxígeno (Sansone *et al.*, 2011).

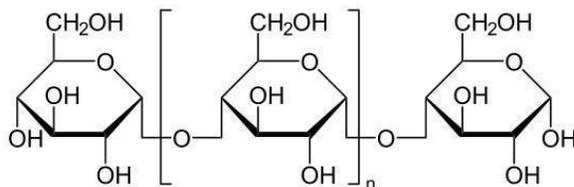


Figura 5. Molécula de maltodextrina

Este agente encapsulante es soluble en agua e insoluble en etanol. Se utiliza en la industria como agente gelificante y espesante, posee un bajo sabor dulce y alto índice glicémico. Teniendo un equivalente de dextrosa sobre 15 es ideal para encapsular vitaminas, minerales, aromas y saborizantes, para mejorar la vida útil y aumentar el volumen de productos, entre otros (Hofman *et al.*, 2016). Por todo lo anterior, más su bajo costo y digestión más lenta al ser consumido, resulta ser ideal para la utilización como agente encapsulante para este estudio.

La inulina es un fructooligosacárido obtenido directamente de la raíz de la achicoria, el cual está compuesto por unidades de fructosa con enlaces β -2-1 y es ligeramente ramificado (Stevens *et al.*, 2001). Presenta buenas propiedades gelificantes, emulsificantes, capacidad para absorber grasa y propiedades de unión al agua (Nesterenko *et al.*, 2012). Es moderadamente soluble en agua e insoluble en hexano y en sistemas lipídicos.

La inulina tiene efectos prebióticos, es decir que es un ingrediente alimentario no digerible que produce efectos benéficos debido a la estimulación del crecimiento y actividad metabólica de las bacterias del colon, y actúa como fibra dietaria. Es hidrolizada en pequeñas cantidades en el estómago e intestino grueso sin la formación de monosacáridos, sin embargo es fermentada a lo largo del colon,

produciendo gases y ácidos grasos de cadena corta que facilitaría la absorción de minerales como el calcio y contribuiría a disminuir los niveles circulantes de colesterol y triglicéridos (Gotteland y Brunser, 2006; Sáenz *et al.*, 2009). Por lo tanto, no hay un incremento en el índice glicémico, proyectándose como un ingrediente potencial para alimentos para diabéticos. Se ha demostrado también que la incorporación de inulina en la dieta reduce los niveles de colesterol y lípidos séricos. (Stevens *et al.*, 2001).

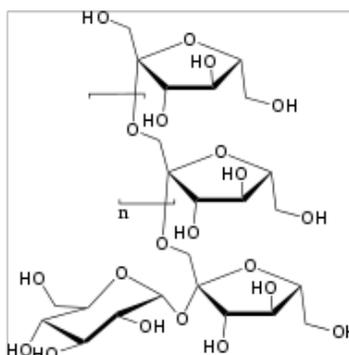


Figura 6. Molécula de inulina.

Se utiliza en la industria alimentaria para modificar la textura de productos lácteos, congelados, untables y en reemplazo de las grasas en productos cárnicos. Además tiene un amplio uso como sustituto de azúcares debido a su sinergismo con edulcorantes (Madrigal y Sangronis, 2007). La inulina es un agente encapsulante utilizado en este estudio debido a su capacidad de interacción con moléculas activas como los polifenoles, por sus propiedades tecnológicas y de beneficio para el consumidor (Robert *et al.*, 2012).

1.5 Método de Superficie de Respuesta.

El Método de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas útiles para el desarrollo, la mejora y la optimización de los procesos. También tiene importantes aplicaciones en el diseño, desarrollo y formulación de nuevos productos, así como en la mejora de los diseños de productos ya existentes (Myers y Montgomery, 1995). La optimización mediante el método de superficie de respuesta tiene la ventaja de ser un método rápido y económico para la recopilación

de los resultados de investigación de una variable o un experimento factorial (Wanasundara y Shahidi, 1999; Liu *et al.*, 2007). Los factores utilizados corresponden a las condiciones del proceso que influyen las variables de respuesta, las cuales pueden ser cuantitativas o cualitativas. Las respuestas son cantidades medibles cuyo valor se ve afectado al cambiar los niveles de los factores, así el interés principal es optimizar dicho valor. Existen distintos tipos de diseños que se pueden utilizar y su uso dependerá de las características de experimentación.

HIPÓTESIS.

La eficiencia de encapsulación y la estabilidad de los polifenoles del extracto de vaina de tara dependerá del tipo de agente encapsulante; una mayor interacción polifenol-polímero conducirá una mayor estabilidad de los polifenoles durante el almacenamiento acelerado. Así, maltodextrina presentará una mayor eficiencia de encapsulación y mayor porcentaje de retención de polifenoles en el tiempo respecto a inulina.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Estudiar la encapsulación de polifenoles de un extracto de vaina de tara con maltodextrina e inulina por secado por atomización y evaluar su estabilidad durante el almacenamiento.

Objetivos específicos.

- Determinar el efecto de las variables independientes (temperatura, relación sólido/solvente y porcentaje de etanol/agua) sobre la extracción de polifenoles totales de vaina de tara.
- Caracterizar fisicoquímicamente el extracto de vaina de tara obtenido bajo condiciones óptimas de temperatura, relación sólido/solvente y porcentaje de etanol/agua.
- Determinar el efecto de la relación de las variables independientes de proceso (temperatura del aire de entrada al secador) y formulación (relación de extracto de vaina de tara/material encapsulante) sobre la eficiencia de encapsulación de polifenoles en micropartículas de extracto de vaina de tara con maltodextrina e inulina.
- Caracterización de las micropartículas de extracto de vaina de tara con maltodextrina e inulina, obtenidas bajo condiciones óptimas.
- Estudiar la estabilidad de polifenoles en micropartículas de extracto de vaina de tara, obtenidas bajo condiciones óptimas y almacenadas a 60°C.

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Materiales.

- **Vaina de tara.**

Caesalpinia spinosa, se obtuvieron de la Cosecha 2017 del Parque Urbano Natural de La Ligua, de la Corporación Nacional Forestal CONAF, La Ligua, Chile (32°26'59.1''S 71°13'48.9''W).

- **Maltodextrina.**

Maltodextrina DE=18-20, obtenida de Prinal, Chile.

- **Inulina.**

Inulina HP (DP>23) Raftilina®, obtenida de Alfa Chilena S.A. Santiago, Chile.

2.2 Métodos.

2.2.1 Preparación y caracterización del polvo de vaina de tara.

Obtención de polvo de tara.

Las vainas de tara se limpiaron, se separaron las semillas y se trituraron en un procesador de alimentos Moulinex, obteniéndose el polvo de vaina de tara (PVT).

Caracterización del polvo de tara mediante análisis fisicoquímico.

El polvo de tara se caracterizó físicoquímicamente mediante los siguientes análisis:

- **Determinación de tamaño de partícula:** Se determinó de acuerdo al método de tamizado con 7 tamices (nº tamiz: #16, #35, #50, #60, #80, #100 y #140) y un agitador de tamices ERWEKA AR 400. (Anexo 1)

- **Contenido de humedad:** Se determinó utilizando el método termogravimétrico a 105°C y presión atmosférica (AOCS Ad 2-52, 1993), utilizando una estufa de aire forzado Memmert, modelo BE 500, Schwabach, Alemania.
- **Contenido de proteínas:** Se determinó utilizando la metodología de Kjeldahl de acuerdo con el Método Oficial AOCS Ac 4-91 (1993). Este se basa en la destrucción de la materia orgánica mediante la acción de ácido sulfúrico.
- **Contenido de materia grasa:** Se determinó de acuerdo al método de Soxhlet según Método Oficial AOCS Ac 3-44 (1993).
- **Contenido de cenizas:** Se determinó según Método Oficial AOCS Bc 5-49 (1993). Se determinó realizando una calcinación de la muestra en una Mufla NEY M-525 SII, Estados Unidos.
- **Contenido de hidratos de carbono:** Se determinó de acuerdo al método colorimétrico de reacción de antrona según método descrito por Osborne y Voogt (1986).
- **Contenido de fibra:** El contenido de fibra se calculó por diferencia de los demás componentes.
- **Contenido de polifenoles totales:** Se determinó de acuerdo a la reacción de Folin-Ciocalteu según método descrito por Singleton y Rossi (1965), mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro UV/Vis ATI UNICAM (Cambridge, UK)

Curva de calibración $y = 0,001x - 0,0175$ ($r^2=0,9992$) (Anexo 2)

siendo x: concentración ($\mu\text{g/mL}$); y: absorbancia.

2.2.2 Extracción de polifenoles del polvo de vaina de tara: Diseño de variables.

La extracción sólido-líquido es una operación unitaria la cual consta de una separación de uno o varios componentes solubles contenidos en un sólido, mediante la utilización de un solvente adecuado. Está influenciado por el tipo y cantidad de solvente, el cual debe tener afinidad con el soluto, además de la temperatura de extracción, la agitación y el tamaño de las partículas debido a la superficie de contacto que tendrá con el solvente (Mc Cabe, 2007).

Para estudiar el efecto de los distintos parámetros de extracción sobre el contenido de polifenoles del polvo de tara, se formuló un diseño de experimentos: Diseño de método de superficie de respuesta Box-Behnken con tres repeticiones del punto central con 15 experimentos (12 puntos medios y 3 puntos centrales). Los diseños resultantes suelen ser más eficientes en términos del número de corridas requerido (Peregrina, 2000). Este diseño consiste en un conjunto de corridas donde cada par de factores es variado entre sus niveles bajo y alto, mientras los demás factores experimentales se fijan en el nivel medio (StatPoint Inc., 2006).

Los parámetros considerados son la temperatura (mínimo 20°C y máximo 60°C), proporción etanol/agua (mínimo 0% y máximo 100%) y relación sólido solvente (mínimo 1:5 y máximo 1:20), manteniendo 1,5 g de sólido por experimento. Los resultados de los experimentos pueden ser analizados por el programa Statgraphics Centurion XVI.

La extracción se realizó en un equipo Shaker con incubadora JSR serie JSSI-100, Corea a 70 rpm y a la temperatura que entregó el diseño, durante 24 horas. El extracto obtenido se filtró en embudo Büchner al vacío con papel Wathman n°1. El filtrado se refrigeró a 5°C en una botella protegida de la luz, y el residuo se sometió a dos extracciones sucesivas de 24 h siguiendo la metodología anterior. Los filtrados recolectados se llevaron a rotavapor entre un rango de temperatura de 40°C a 60°C, dependiendo de la composición del extractante, hasta la obtención de un volumen constante final de 10 mL. Este extracto se diluyó 100 veces para la medición de polifenoles totales.

2.2.2.1 Caracterización del extracto de polvo de vaina de tara.

- *Contenido de polifenoles totales*: Se determinó por reacción de Folin-Ciocalteu según método descrito por Singleton y Rossi (1965), mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro UV/Vis ATI UNICAM (Cambridge, UK)

Curva de calibración $y = 0,001x - 0,0175$ ($r_2=0,9992$) (Anexo 2)

siendo x: concentración ($\mu\text{g/mL}$); y: absorbancia.

- *Capacidad antioxidante (ORAC)*: Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Huang *et al.* (2002), en un Fluorímetro FLx 800-BID, Biotek.
- *Sólidos totales ($^{\circ}\text{Brix}$)*: Se realizó medición con refractómetro digital Hanna Instruments HI 96801.
- *Contenido de hidratos de carbono*: Se determinó por método colorimétrico de reacción de antrona según método descrito por Osborne y Voogt (1986), utilizando un espectrofotómetro UV/Vis ATI UNICAM (Cambridge, UK), a una longitud de onda de 620 nm. (Anexo 2)

Curva de calibración $y = 5,7952x - 0,0006$ ($r_2=0,999$) (Anexo 3)

- *pH*: Se determinó por medición con pH-metro JENCO 6177 pH/ORP.

2.2.3 Microencapsulación: Diseño de variables.

Para estudiar el efecto de los distintos parámetros de la microencapsulación del extracto de vaina de tara, se formuló un diseño de experimentos: Diseño de método de superficie de respuesta con el modelo de Composito central más punto axial con un total de 12 experimentos. Los parámetros a considerar fueron la temperatura del aire de entrada al secador, relación de material encapsulante/extracto hidroalcohólico de vaina de tara con los agentes de microencapsulación

maltodextrina e inulina. Los resultados de los experimentos pueden ser analizados por el programa Statgraphics Centurion XVI.

2.2.3.1 Caracterización de micropartículas.

- *Humedad y actividad de agua:* Se realizó según el método termogravimétrico a 105°C y presión atmosférica (AOCS Ad 2-52, 1993), utilizando una estufa de aire forzado Memmert, modelo BE 500, Schwabach, Alemania.
- *Higroscopicidad:* se determinó según método descrito por Cai y Corke (2000), que consta en colocar las muestras en un desecador sellado herméticamente que contenía una solución saturada de Na₂SO₄ a 25°C y humedad relativa de 93%. Luego de 7 días se pesó cada sistema y los resultados se expresaron en gramos de humedad por 100 g de sólido seco (g/100g).
- *Contenido de polifenoles totales:* Para el sistema EVT-MD se pesaron 200 mg de micropartículas y se adicionaron 5 mL de agua, 5 mL de metanol y 2 gotas de ácido acético glacial. La solución se agitó en un vórtex hasta completar disolución. Para el sistema EVT-In se pesaron 200 mg de micropartículas y se adicionaron 10 mL de agua y 2 gotas de ácido acético glacial. La solución se agitó en un vórtex durante 2 min y luego se sonicó por 3 min a 40°C; esta metodología se realizó 3 veces consecutivas para cada muestra. El contenido de polifenoles totales se cuantificó espectrofotométricamente de acuerdo a la medición por reacción de Folin-Ciocalteu según método descrito por Singleton y Rossi (1965).
- *Contenido polifenoles superficial:* Para el sistema EVT-MD se pesaron 500 mg de micropartículas y se adicionaron 2 mL de etanol y 2 gotas de ácido acético glacial. Para el sistema EVT-In se pesaron 500 mg de micropartículas y se adicionaron 2 mL de hexano y 2 gotas de ácido acético glacial. En ambos sistemas, la solución fue agitada manualmente para que el solvente estuviese en completo contacto con las micropartículas. Luego, fueron

centrifugadas a 11200 g por 5 min. El sobrenadante fue medido por espectrofotometría de acuerdo a la medición por reacción de Folin-Ciocalteu según método descrito por Singleton y Rossi (1965), para obtención del contenido de polifenoles superficiales.

- *Eficiencia encapsulación (EE) y recuperación de polifenoles (R)*: La EE y la R se calcularon de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{Contenido de polifenoles totales} - \text{contenido de polifenoles superficiales}}{\text{Contenido de polifenoles totales}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Contenido de polifenoles totales}}{\text{Contenido de polifenoles teóricos}} \times 100 \quad (2)$$

- *Morfología de micropartículas*: Se analizó la estructura externa de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las micropartículas se cubrieron con oro/paladio utilizando un Varian Vacuum Evaporator PS 10E y se analizaron utilizando un microscopio LEO 1420VP (LEO Microscopía electrónica Ltda., Cambridge, Reino Unido) operado a 20 kV. Las imágenes se obtuvieron digitalmente utilizando un software EDS 7424 (Oxford Instruments, Oxford, UK).

2.2.4 Estudio de la estabilidad de las micropartículas de polifenoles durante el almacenamiento a 60°C.

Las micropartículas (EVT-MD y EVT-In) (200 mg) en tubos de ensayo de vidrio sin tapa, se almacenaron en estufa con aire forzado (Mettler, modelo BE 500, Schwabach, Alemania) y oscuridad a 60°C. Se retiraron tubos en duplicado: cada 7 días los primeros 5 tubos y luego cada 14 días los 7 tubos restantes, los cuales fueron congelados a -20°C. Se determinó el contenido de polifenoles totales como se describió en la metodología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Obtención y caracterización del polvo de vaina de tara (*Caesalpinia spinosa*).

El polvo de vaina de tara *Caesalpinia spinosa* (PVT) se obtuvo mediante molienda mecánica (De La Cruz, 2004). En la Tabla 4, se presenta el análisis proximal del PVT *Caesalpinia spinosa*.

Tabla 4. Caracterización del polvo de vaina de tara *Caesalpinia spinosa*.

Parámetros	X ± DE
Tamaño de partícula (µm)	1320 ± 10
Humedad (%)	8,3 ± 0,04
Proteínas (%)	4,0 ± 0,09
Materia grasa (%)	0,4 ± 0,02
Cenizas (%)	2,5 ± 0,02
Hidratos de carbono (%)	0,9 ± 0,05
Fibra* (%)	83,9 ± 0,09

X: promedio; DE: desviación estándar

* Calculado por diferencia

Los valores del análisis proximal y de tamaño de partícula obtenidos experimentalmente para PVT (*Caesalpinia spinosa*) fueron muy similares a lo indicado en otras investigaciones por Fernández (2008) y Pedreschi *et al.* (2016). Fernández (2008), informó contenidos de humedad de 9,5%, proteínas de 3,14%, materia grasa de 0,28%, cenizas de 3,4%, hidratos de carbono de 5,9% y fibra total de 77,9% para PVT pretratado (desgomado). En otro estudio para PVT se reportaron valores de 7,93% de humedad, 2,9% de proteínas, 0,4% de materia grasa, 3,23% de cenizas, 9% de hidratos de carbono y un 3,6% de fibra cruda (Pedreschi *et al.*, 2016). Por otro lado, De la Cruz (2004) reportó valores de 11,70% de humedad, 7,17% de proteínas, un 6,24% de cenizas y 1,05% de fibra para el fruto completo de vaina de tara (vainas y semillas). Las diferencias en el perfil de

análisis proximal de PVT entre los estudios de *Caesalpinia spinosa* se pueden atribuir a factores como la temporada de cosecha, lugar geográfico del cultivo, presencia de nutrientes minerales en el suelo, madurez, pre-tratamientos (desgomado) y tipo de molienda, entre otros (Miletic *et al.*, 2012). La caracterización fisicoquímica de las leguminosas es similar independiente de la variedad; destacan por su contenido proteico y de carbohidratos no digeribles como los componentes de la fibra alimentaria. Presentan bajo contenido de lípidos y una humedad menor al 10%. Esto ocurre en leguminosas como lentejas, garbanzos, guisantes, habas, entre otros (Sarmiento, 2012). En el caso de la vaina de algarroba (*Ceratonia siliqua* L.), Sciammaro (2015) y Avallone *et al.* (1997) realizaron estudios en donde reportaron una composición proximal similar a la de PVT; con una humedad de 4,76 y 7%, cantidad de proteínas de 7,73 y 3%, materia grasa de 0,67 y 0,6% y cantidad de cenizas de 3,09 y 3%, respectivamente, debido a que también corresponde a una leguminosa.

3.2 Extracción de polifenoles de vaina de tara.

Se estudiaron parámetros de extracción de polifenoles (temperatura, relación sólido/solvente y proporción de etanol) desde el PVT, aplicando un diseño Box-Behnken con tres repeticiones del punto central. La Tabla 5 muestra las variables independientes: temperatura de extracción (20-60°C), proporción de etanol (0-100%) y relación sólido:solvente (1:5-1:20), así como el contenido de polifenoles totales como variable respuesta.

El rango en el contenido de polifenoles del extracto de vaina de tara (EVT) para el diseño de Box-Behnken se encontró entre 113 y 644 mg EAG/g (Tabla 5). Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para optimizar la variable contenido de polifenoles totales, considerando las formas lineales, cuadráticas e interacción de las variables independientes a un nivel de confianza de 95%. El criterio general para determinar el ajuste de la variable respuesta fue el coeficiente de determinación (R^2 ajustado corregido por grados de libertad) (Romero y Zuñica, 2005).

Tabla 5. Diseño de experimentos de Box-Behnken para la extracción de polifenoles en el polvo de vaina de tara (*Caesalpinia spinosa*).

Experimento	Temperatura (°C)	Proporción etanol (%)	Relación sólido:solvente	Contenido polifenoles (mg EAG/g)
1	20 (-1)	0 (-1)	1:12,5 (0)	351 ± 0,9
2	60 (1)	0 (-1)	1:12,5 (0)	360 ± 0,4
3	20 (-1)	100 (1)	1:12,5 (0)	161 ± 1,0
4	60 (1)	100 (1)	1:12,5 (0)	362 ± 0,7
5	20 (-1)	50 (0)	1:5 (-1)	483 ± 0,8
6	60 (1)	50 (0)	1:5 (-1)	644 ± 0,7
7	20 (-1)	50 (0)	1:20 (1)	113 ± 0,5
8	60 (1)	50 (0)	1:20 (1)	438 ± 0,9
9	40 (0)	0 (-1)	1:5 (-1)	297 ± 0,1
10	40 (0)	100 (1)	1:5 (-1)	272 ± 0,8
11	40 (0)	0 (-1)	1:20 (1)	337 ± 0,8
12	40 (0)	100 (1)	1:20 (1)	246 ± 0,7
13	40 (0)	50 (0)	1:12,5 (0)	458 ± 0,5
14	40 (0)	50 (0)	1:12,5 (0)	454 ± 0,3
15	40 (0)	50 (0)	1:12,5 (0)	455 ± 0,8

De acuerdo a los resultados de la variable respuesta, se observó que utilizando agua como solvente, el contenido de polifenoles totales en el EVT fue considerablemente inferior al obtenido con etanol; mostrando el efecto de la constante dieléctrica del solvente extractante sobre el contenido de polifenoles (Boyko *et al.*, 2018). Al mismo tiempo, el etanol es un solvente que permite aumentar la solubilidad de polifenoles con menor polaridad. Un comportamiento similar se reportó para la extracción de polifenoles en *Pinus radiata*, en donde se estudió el efecto del solvente en la extracción de compuestos bioactivos como lo son los compuestos fenólicos (Soto-García y Rosales-Castro, 2016).

El análisis estadístico (Anexo 4) para el diseño de extracción de polifenoles de PVT mostró que la forma lineal y cuadrática de la relación sólido:solvente y la interacción entre la relación sólido:solvente y la proporción de etanol, influyeron significativamente ($p < 0,05$) sobre el contenido de polifenoles, como se muestra en el Diagrama de Pareto (Figura 7). El modelo explicó un 72,8% de la variabilidad (R^2 ajustado por grado de libertad) para el contenido de polifenoles del EVT.

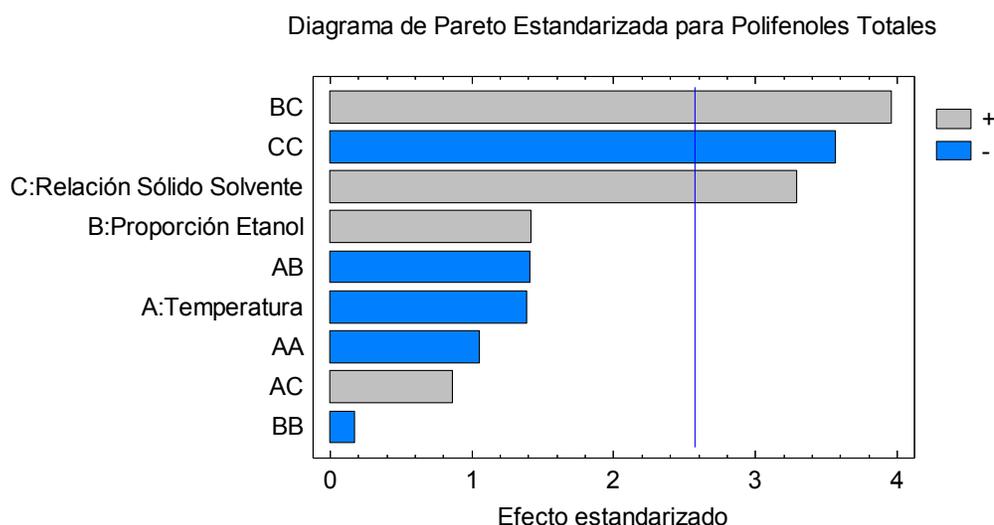


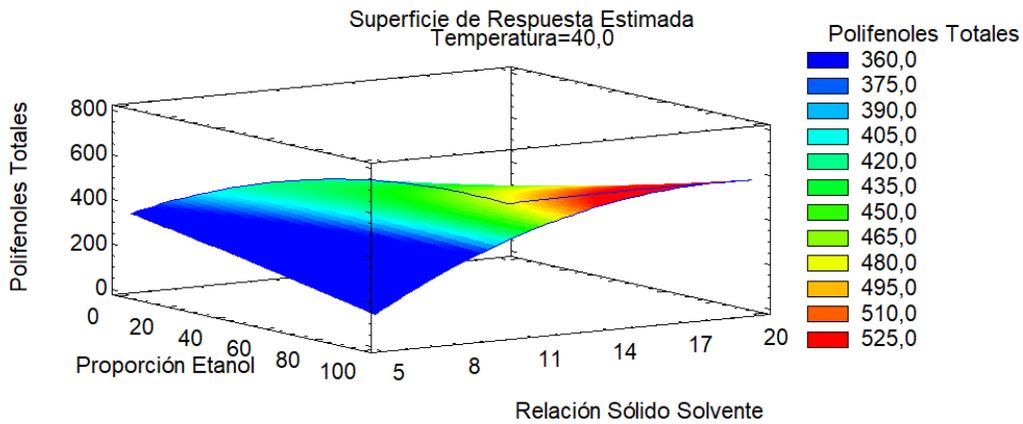
Figura 7. Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño de extracción de polifenoles totales del PVT.

Como la interacción entre proporción de etanol y relación sólido:solvente fue significativa, la proporción de etanol lineal también se consideró en la ecuación porque forma parte del modelo. La ecuación de regresión cuadrática que describe el efecto de las variables independientes sobre el contenido de polifenoles en el EVT, se muestra en la siguiente ecuación:

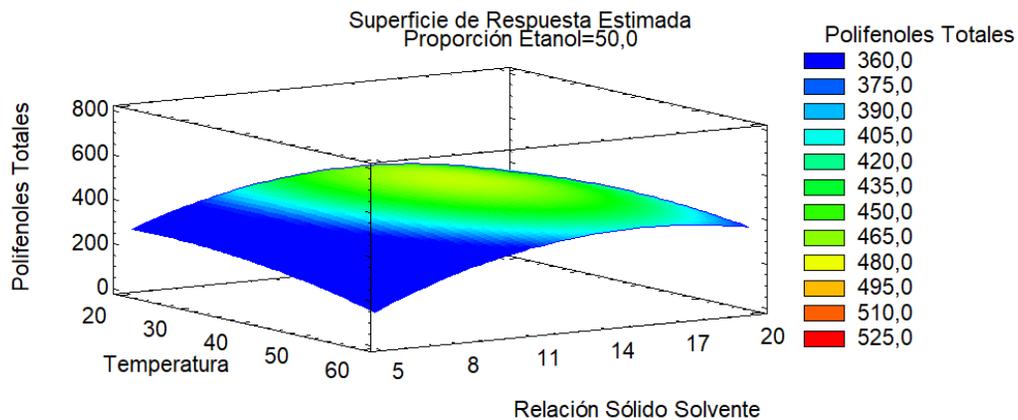
$$\begin{aligned}
 \text{Polifenoles Totales} = & 64,06 - 1,69 * \text{Proporción etanol} + 42,25 * \text{Relación} \\
 & \text{sólido:solvente} + 0,37 * \text{Proporción etanol} * \text{Relación sólido:solvente} - 2,32 * (\text{Relación} \\
 & \text{sólido:solvente})^2 \quad (3)
 \end{aligned}$$

Esto quiere decir que la ecuación que modela la cantidad de polifenoles totales va a estar influida por las variables indicadas, de acuerdo a los factores que las acompañan, pudiendo predecir la cantidad de polifenoles que se podrán obtener al modificar cada una de ellas.

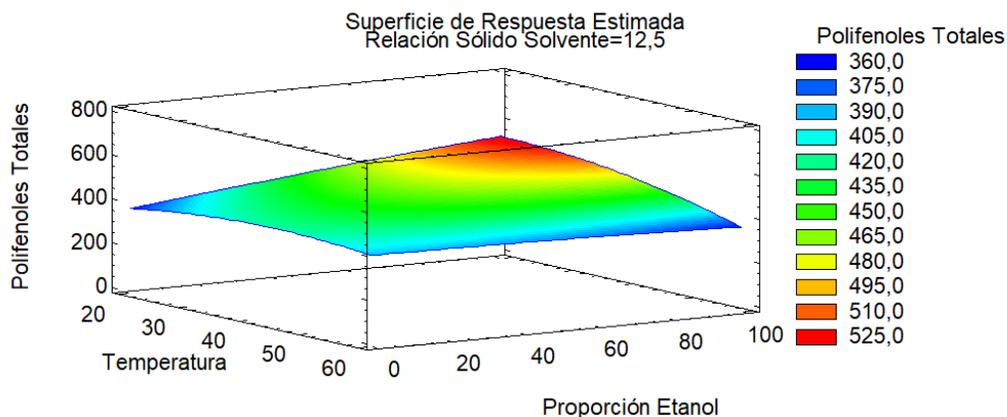
La Figura 8 (A-C) muestra los gráficos de superficie de respuesta para el diseño de Box Behnken de la extracción de polifenoles del PVT con etanol-agua.



A



B



C

Figura 8. Gráficos de superficie de respuesta para la extracción de polifenoles de PVT.

De acuerdo a los gráficos de superficie de respuesta de la Figura 8, el contenido de polifenoles en el EVT aumenta a medida que aumenta el contenido de solvente en la relación sólido:solvente (Figura 8A), debido a un aumento en la superficie de contacto PVT con el solvente. En el caso de la temperatura de extracción no se encontró un efecto significativo sobre el contenido de polifenoles en el EVT (Figura 8B y 8C), mostrando la que los polifenoles son estables en el rango de temperatura de extracción estudiado (20-60 °C) y en línea con otros trabajos de extracción de polifenoles desde otras materias primas como manzana, granada, entre otras (Restrepo-Sánchez *et al.*, 2009; Bustos-Hipólito *et al.*, 2012; Alvis *et al.*, 2012).

La Tabla 6 entrega las condiciones óptimas para la extracción de polifenoles desde el PVT, donde las variables óptimas de temperatura, proporción de etanol y relación sólido:solvente se encontraron dentro del dominio estudiado, aunque la temperatura se encontró en el límite inferior y la proporción de etanol en el límite superior del rango estudiado.

Tabla 6. Condiciones óptimas para la extracción del polifenoles del polvo de vaina de tara.

Factor	Valor óptimo
Temperatura (°C)	24
Proporción etanol (%)	100
Relación sólido:solvente	1:18
Contenido polifenoles totales predicho por modelo (mg EAG/g PVT)	601,5

En forma similar a este estudio, Skowryra *et al.* (2014) reportó que un incremento de etanol en la relación agua:etanol del solvente de extracción aumentó el contenido de polifenoles en el EVT (349,7, 445,3 y 460,2 mg EAG/g PVT; en agua, agua:etanol (50:50 v/v) y agua:etanol (25:75 v/v), respectivamente. Temperaturas mayores al óptimo obtenido en este trabajo, entre 40 y 60 °C reportaron Garro *et al.* (1997) y López *et al.* (2011).

Para estudios en vaina de Algarroba, Sciammaro (2015) y Avallone *et al.* (1997) obtuvieron extractos con acetona (50% y 70%) como solvente, una proporción de sólido:solvente de 1:6 y 1:10, a temperaturas de 4 °C y 25 °C, respectivamente. De esta manera, se obtuvo un contenido de polifenoles totales según Folin-Ciocalteu de 7 mg EAG/g y 17 mg EAG/g, respectivamente, siendo ambos valores muy bajos en comparación a los 601,5 mg EAG/g PVT predicho estadísticamente para el extracto óptimo de este estudio.

Todas estas variables y su influencia en la extracción dependerán de la solubilidad de los componentes a extraer en el solvente extractante, de la naturaleza de la materia prima y además del tipo de polifenoles que se obtendrán (Soto-García y Rosales-Castro, 2016; McCabe, 2017).

3.3 Caracterización fisicoquímica del extracto de vaina de tara obtenido bajo condiciones óptimas.

El extracto de vaina de tara se caracterizó de acuerdo al contenido de polifenoles totales según Folin-Ciocalteu, capacidad antioxidante ORAC, sólidos totales por refractometría y pH. La Tabla 7 muestra la caracterización del extracto de vaina de tara (EVT) obtenido bajo condiciones óptimas.

Tabla 7. Caracterización del extracto de vaina de tara (EVT) obtenido bajo condiciones óptimas.

Parámetros	X ± DE
Polifenoles totales (mg EAG/g PVT)	600,3 ± 0,6
ORAC (mmol ET/100 g PVT)	17,4 ± 0,9
Sólidos totales (°Brix)	25,6 ± 0,1
pH	5,01 ± 0,01

EAG: equivalente ácido gálico; ET: equivalente trolox; PVT: polvo de vaina de tara; X: promedio; DE: desviación estándar.

El contenido de polifenoles obtenido bajo condiciones óptimas alcanzó un valor de 600,3 mg EAG/g PVT, valor cercano al predicho por el modelo estadístico (601,5 mg EAG/g PVT). Un contenido de polifenoles menor a este estudio reportó Skowryra *et al.* (2014), utilizando agua:etanol (25:75 v/v, 460,2 mg/EAG/g PVT). Las diferencias entre estudios se pueden atribuir a diferencias en la composición del solvente (menor contenido de etanol). En extractos acuosos de vaina de tara (*C. spinosa*) provenientes de Santa Fe y Picoy se reportó un contenido de polifenoles totales 413,20 mg EAG/g PVT (López *et al.*, 2011) y 563,70 mg EAG/g PVT (Garro *et al.*, 1997), respectivamente, menores al de este estudio, mostrando además el efecto de la localización geográfica sobre el contenido de polifenoles.

La capacidad antioxidante se define como la capacidad que tienen los compuestos antioxidantes para reaccionar con un radical libre determinado. El valor de ORAC constituye uno de los índices más reconocidos para definir el potencial aporte de un alimento a la capacidad antioxidante de nuestro organismo (Portal antioxidante, 2019). La capacidad antioxidante del EVT obtenido bajo condiciones óptimas

alcanzó un valor de $17,4 \pm 0,9$ mmol ET/100 g PVT, comparable con materias primas reconocidas por su alta capacidad antioxidante como: arándano fresco (21,08 mmol ET/100g), frambuesa fresca (14,9 mmol ET/100g), granada (16,9 mmol ET/100g), uva variedad Chardonnay (19,8 mmol ET/100g), entre otros (Portal antioxidante, 2019). Ydjedd, *et al.* (2017) obtuvo un valor de ORAC para la vaina de Algarroba de 29,58 mmol ET/100g, el cual es mayor que el obtenido en vaina de tara, indicando que posee una mayor capacidad antioxidante. Estos valores de ORAC no solo reflejan el contenido total de compuestos antioxidantes, sino también la interacción sinérgica que resulta de la presencia simultánea de éstos, dando como resultado un valor que refleja la capacidad global antioxidante de un alimento y permite además comparar alimentos de diferente naturaleza en cuanto a su riqueza antioxidante. Estos valores finalmente serán útiles y significativos para el consumidor dependiendo de la biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos y del perfil de acción biológica de éstos (Huang *et al.*, 2005; Portal antioxidante, 2019).

3.4 Encapsulación de extracto de vaina de tara con maltodextrina e inulina por secado por atomización.

Para estudiar el efecto de los distintos parámetros de la microencapsulación del EVT, se aplicó un diseño experimental Composito Central para los sistemas EVT con maltodextrina (EVT-MD) e inulina (EVT-In). La Tabla 8 muestra las variables independientes para dicho diseño experimental.

Las variables independientes fueron la temperatura del aire de entrada al secador (150-190°C) y la relación EVT:agente encapsulante (1:1-2:1). La variable respuesta fue la eficiencia de encapsulación de polifenoles del EVT (EE) (Tabla 8).

La variable respuesta eficiencia de encapsulación, representa la interacción entre polifenoles y agente encapsulante (MD o In), principalmente por puentes de hidrógeno entre los OH de los polifenoles y los OH del polímero. Así, la EE corresponde a aquellos polifenoles que están dentro de las micropartículas. Sin embargo, como el secado por atomización es más bien un método de inmovilización

algunos polifenoles quedan expuestos en la superficie de la micropartícula (De Vos *et al.*, 2010).

Tabla 8. Diseño de experimentos de compósito central y eficiencia de encapsulación para los sistemas EVT-MD y EVT-In.

Experimento	Temperatura del aire de entrada al secador (°C)	Relación extracto:agente encapsulante	EVT-MD EE (%)	EVT-In EE (%)
1	150 (-1)	1:1 (-1)	98,0	99,5
2	190 (1)	1:1 (-1)	98,5	99,8
3	150 (-1)	1:2 (1)	96,0	99,1
4	190 (1)	1:2 (1)	96,2	99,5
5	145,8 (-1,21)	1:1,5 (0)	98,5	99,7
6	194,2 (1,21)	1:1,5 (0)	98,7	99,8
7	170 (0)	1:0,895 (-1,21)	98,5	99,7
8	170 (0)	1:2,105 (1,21)	95,4	99,3
9	170 (0)	1:1,5 (0)	98,7	99,7
10	170 (0)	1:1,5 (0)	98,4	99,7
11	170 (0)	1:1,5 (0)	98,6	99,6
12	170 (0)	1:1,5 (0)	98,6	99,6

EE: Eficiencia de encapsulación, EVT: extracto vaina de tara; MD: Maltodextrina; In: Inulina.

Se utilizó la Metodología de superficie de respuesta (MSR) para optimizar la variable respuesta (EE), considerando las formas lineales, cuadráticas e interacción de las variables independientes (temperatura del aire de entrada al secador y relación extracto:agente encapsulante) a un nivel de confianza de 95%. Los criterios para determinar el ajuste de la variable respuesta fue el coeficiente de determinación (R_2 ajustado por grados de libertad), la obtención de residuales bajos (<5) y un valor de falta de ajuste no significativo (Romero y Zuñica, 2005).

3.4.1 Maltodextrina como agente encapsulante de EVT.

La eficiencia de encapsulación de polifenoles del EVT para el sistema EVT-MD se encontró en un rango de 95,4 - 98,7% (Tabla 8). Los altos valores de EE se pueden explicar por una alta interacción polifenol-polímero por puentes de hidrógeno. El análisis estadístico (Anexo 5) para la encapsulación de polifenoles del EVT con maltodextrina (MD), mostró que la forma lineal y cuadrática de la relación EVT:MD fueron significativas ($p < 0,05$) sobre la eficiencia de encapsulación de polifenoles en el sistema EVT-MD, como se muestra en el Diagrama de Pareto (Figura 9). El diseño del sistema EVT-MD tuvo un ajuste del 97,1% (R_2 ajustado por grados de libertad), los valores residuales fueron menores a 0,3 y el valor de falta de ajuste no fue significativo.

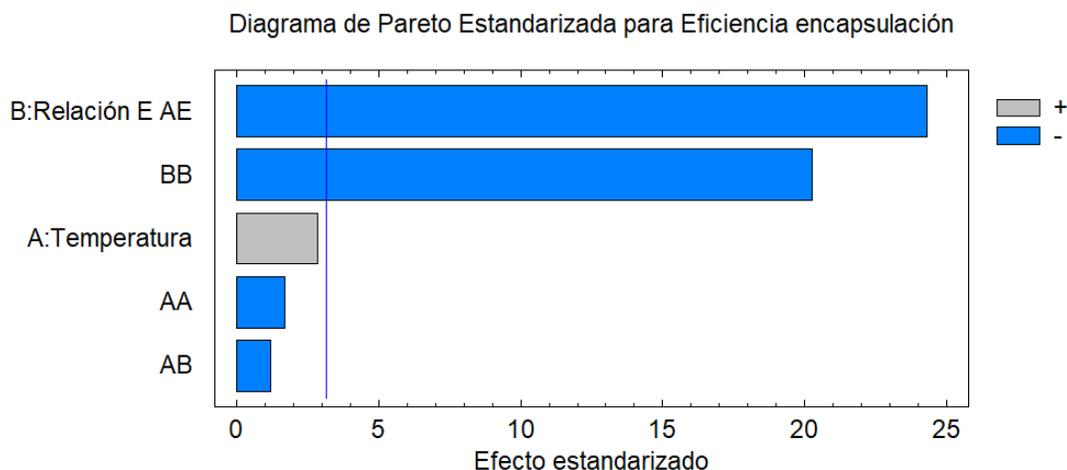


Figura 9. Diagrama de Pareto estandarizado para eficiencia de encapsulación de polifenoles para el sistema EVT-MD.

La ecuación de regresión cuadrática que describe el efecto de las variables independientes sobre la eficiencia de encapsulación de los polifenoles del EVT, se muestra en la ecuación 4.

$$\text{Eficiencia encapsulación} = 80,43 + 13,72*(EVT-MD) - 4,92*(EVT-MD)^2 \quad (4)$$

La Figura 10 muestra el gráfico de superficie de respuesta para la maximización de la eficiencia de encapsulación de polifenoles. La temperatura del aire de entrada al secador tuvo una variación mínima no significativa ($p > 0,05$) sobre la eficiencia de encapsulación. La relación EVT-MD, muestra un ajuste cuadrático, donde un aumento en el contenido de MD aumenta la EE, ya que un aumento en el contenido de sólidos en la solución de alimentación y/o altas temperaturas de secado, favorecen la rápida formación de la costra sobre la superficie de la gota, que permite la difusión del agua desde las micropartículas y la retención de los polifenoles (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

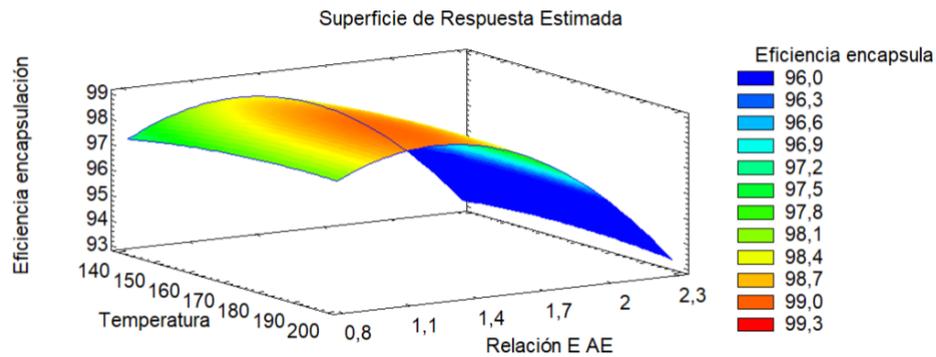


Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta para optimización de la microencapsulación de polifenoles del EVT en MD.

De acuerdo al análisis por MSR, las condiciones óptimas para la encapsulación de polifenoles de EVT con maltodextrina fueron una temperatura del aire de entrada al secador de 187°C y una relación de EVT-MD de 1:1,25, las cuales están dentro del dominio estudiado para cada una de las variables independientes. El valor óptimo de eficiencia de encapsulación para EVT-MD fue de 99%.

Si bien no existe literatura específica para la encapsulación de polifenoles del EVT, se utilizaron como comparación otros estudios de encapsulación de polifenoles con maltodextrina. En el caso de encapsulación de un extracto de polifenoles de granada, las condiciones óptimas de encapsulación fueron: temperatura del aire de entrada al secador de 153°C y una relación extracto:agente encapsulante de 2:1, obteniéndose una eficiencia de encapsulación del 71% (Robert *et al.*, 2010), menor a la encontrada en este estudio. Otros autores, que encapsularon polifenoles de

cáscara de granada, obtuvieron condiciones óptimas de temperatura de 160°C y de relación de extracto:agente encapsulante de 1:1 y 1:3 (Çam *et al.*, 2014).

3.4.2 Inulina como agente encapsulante de EVT.

La eficiencia de encapsulación de polifenoles para el sistema EVT-In se encontró en un rango de 99,1 - 99,8% (Tabla 8), lo cual indica que los polifenoles presentan una alta interacción polifenol-inulina. El diseño del sistema EVT-In tuvo un ajuste del 90,32%, los valores residuales fueron menores a 0,08 y el valor de falta de ajuste no fue significativo. El análisis estadístico (Anexo 6) para la encapsulación de polifenoles del EVT con inulina mostró que la relación EVT/In en su forma lineal y cuadrática, y la forma cuadrática de la temperatura del aire de entrada al secador fueron significativas sobre la encapsulación de EVT-In, como se muestra en el Diagrama de Pareto (Figura 11).

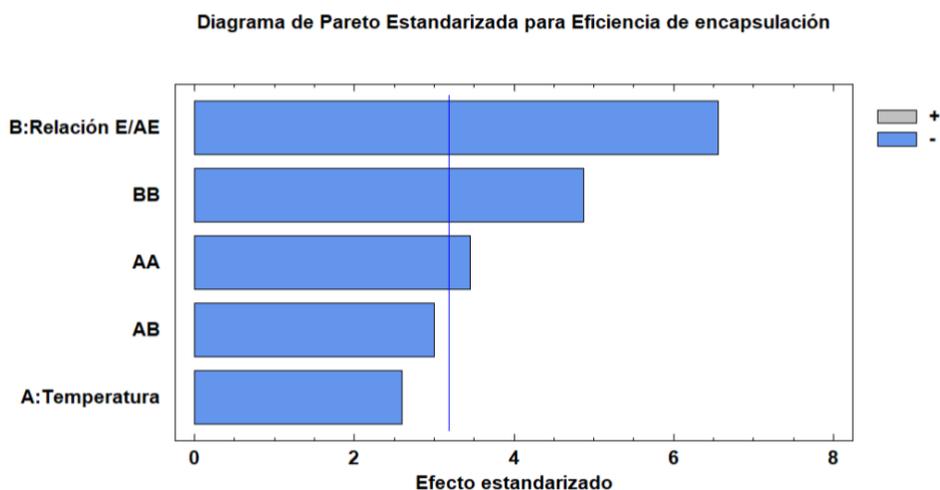


Figura 11. Diagrama de Pareto estandarizado para la eficiencia de encapsulación de polifenoles para el sistema EVT-In.

La ecuación de regresión cuadrática que describe el efecto de las variables independientes sobre la eficiencia de encapsulación de los polifenoles del EVT, se muestra en la ecuación 5. Como la forma cuadrática de la temperatura fue significativa, la temperatura en su forma lineal también se consideró debido a que forma parte del modelo.

$$EE (\%) = 91,52 + 0,08*Temperatura + 2,44*EVT:In - 0,0002*Temperatura^2 - 0,47*(EVT:In)^2$$

(5)

La Figura 12 muestra el gráfico de superficie de respuesta para la maximización de la eficiencia de encapsulación de polifenoles para el sistema EVT-In. Un aumento en el contenido de inulina (contenido de sólidos) en la relación EVT-In aumentó la EE (hasta alcanzar un máximo), debido a un aumento de sólidos que permite una rápida formación de la costra en la superficie de la gota. La temperatura de entrada al secador no afectó la EE de polifenoles, manteniéndose más bien constante durante todo el dominio de temperatura estudiado.

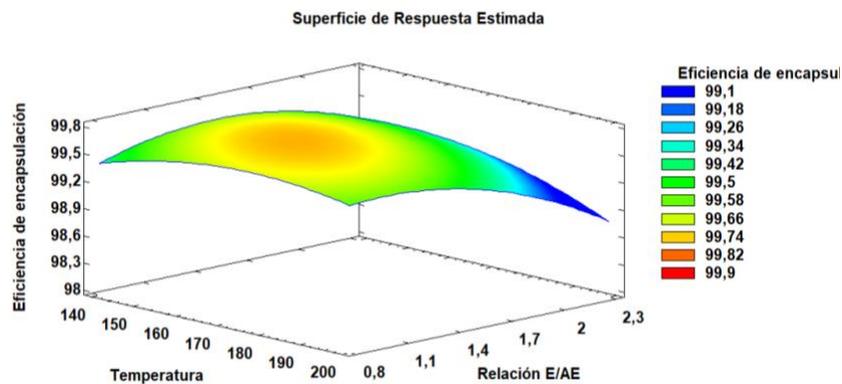


Figura 12. Gráfico de Superficie de respuesta para la optimización de microencapsulación de polifenoles del EVT en inulina.

Las condiciones óptimas para la encapsulación de polifenoles de EVT con inulina fueron temperatura del aire de entrada al secador de 169°C y una relación de EVT-In de 1:1,25, dentro del dominio estudiado para cada una de las variables independientes. El valor óptimo de eficiencia de encapsulación para EVT-In fue de 99,8%. Estudios de microencapsulación de los polifenoles de tuna (*Opuntia ficus-indica*) reportaron una temperatura de aire de entrada óptima de 120°C y una relación de extracto:inulina de 5:1, con una eficiencia de encapsulación de 74,6% (Robert *et al.*, 2015). Las diferencias en las condiciones óptimas se pueden atribuir a la diferencia en la materia prima utilizada y/o el tipo de polifenoles, la inulina fue

menos efectiva que la maltodextrina en la encapsulación de polifenoles de grosellas negras (Robert *et al.*, 2016).

3.4.3. Micropartículas EVT-MD y EVT-In obtenidas bajo condiciones óptimas.

La Tabla 9 muestra las condiciones óptimas de encapsulación de EVT para los sistemas EVT-MD y EVT-In.

Tabla 9. Caracterización de las micropartículas EVT-MD y EVT-In, obtenidas bajo condiciones óptimas.

Parámetros	EVT-MD X ± DE	EVT-In X ± DE
Temperatura del aire de entrada (°C)	187	169
Relación EVT:polímero	1:1,25	1:1,25
Eficiencia de encapsulación (%)	97,4 ± 0,10 _a	97,7 ± 0,03 _a
Humedad (%)	6,3 ± 0,084 _a	6,0 ± 0,046 _a
Actividad de agua	0,30 ± 0,001 _a	0,22 ± 0,000 _b
Higroscopicidad (g/100g MP secas)	25 ± 0,9 _a	17 ± 0,6 _b

EVT: extracto de vaina de tara; X: promedio; DE: desviación estándar

La condición óptima de temperatura del aire de entrada fue mayor para el sistema EVT-MD (187°C) respecto al sistema EVT-In (169°). A pesar de obtener altos valores de temperatura para el secado por atomización, los cuales podrían generar algún grado de degradación en los compuestos activos presentes en el extracto por su termosensibilidad, los tiempos de secado son cortos para la materia prima estudiada y esta alta temperatura es necesaria para la obtención de micropartículas de buena calidad y morfologías típicas. Si se utilizaran temperaturas más bajas de aire de entrada al secador, la morfología de las micropartículas se vería afectada debido a que serán propensas a aglomerarse por tener un mayor contenido de humedad (Wang *et al.*, 2011).

Para ambos sistemas la relación EVT:polímero fue de 1:1,25, similar a lo reportado para un extracto de polifenoles de granada por Robert *et al.* (2010) y Çam *et al.* (2014) con valores de 1:2 y 1:3, respectivamente. Estos resultados demuestran que

las condiciones óptimas de las variables independientes en el secado por atomización son características de cada sistema. La eficiencia de encapsulación alcanzó valores sobre 97% para los sistemas EVT-MD y EVT-In obtenidos bajo condiciones óptimas. Estos resultados se atribuyen a la fuerte interacción polifenol-polímero por puente de hidrógeno.

La temperatura del aire de entrada es directamente proporcional a la velocidad de secado de la micropartícula y a su contenido de agua final (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Zbicinski *et al.*, 2002). En este estudio temperaturas del aire de entrada al secador mayores de 160°C condujeron a un bajo contenido de humedad y actividad de agua para EVT-MD ($6,3 \pm 0,084\%$ y $0,30 \pm 0,001$, respectivamente) y EVT-In ($6,04 \pm 0,046\%$ y $0,22 \pm 0,000$, respectivamente). Estos valores de humedad y actividad de agua son comunes para micropartículas obtenidas mediante secado por atomización que permiten la estabilidad microbiológica de los productos, evitando el riesgo de degradaciones químicas y/o biológicas (Cai y Corke, 2000; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2005; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Sáenz *et al.*, 2009; Obón *et al.*, 2009).

La higroscopicidad de las micropartículas fue característica de cada agente encapsulante estudiado. La higroscopicidad fue mayor para el sistema EVT-MD respecto al sistema EVT-In, lo cual indica que hay una mayor absorción de humedad en el sistema con MD, haciéndolo poco apropiado para ser utilizado en un medio ambiente de alta humedad, donde necesitaría un envase impermeable a la humedad.

De esta manera, se indica que las micropartículas del sistema EVT-In podrían ser una buena alternativa de uso como un potencial ingrediente alimentario, debido a que, además de tener un contenido de humedad y actividad de agua apropiada para este fin, posee una baja higroscopicidad que lo hace más estable en el tiempo y útil para ser añadido a un producto alimentario. Estas características, más las propiedades intrínsecas de la inulina, como su acción prebiótica y bajo índice glicémico, hacen que este sistema de micropartículas tenga un gran potencial para su uso, siempre y cuando sean capaces de retener los polifenoles en el tiempo (Gotteland y Brunser, 2006; Stevens *et al.*, 2001; Sáenz *et al.*, 2009).

La Figura 13 (A y B) muestra las microfotografías SEM de los sistemas EVT-MD y EVT-In, respectivamente obtenidas bajo condiciones óptimas.

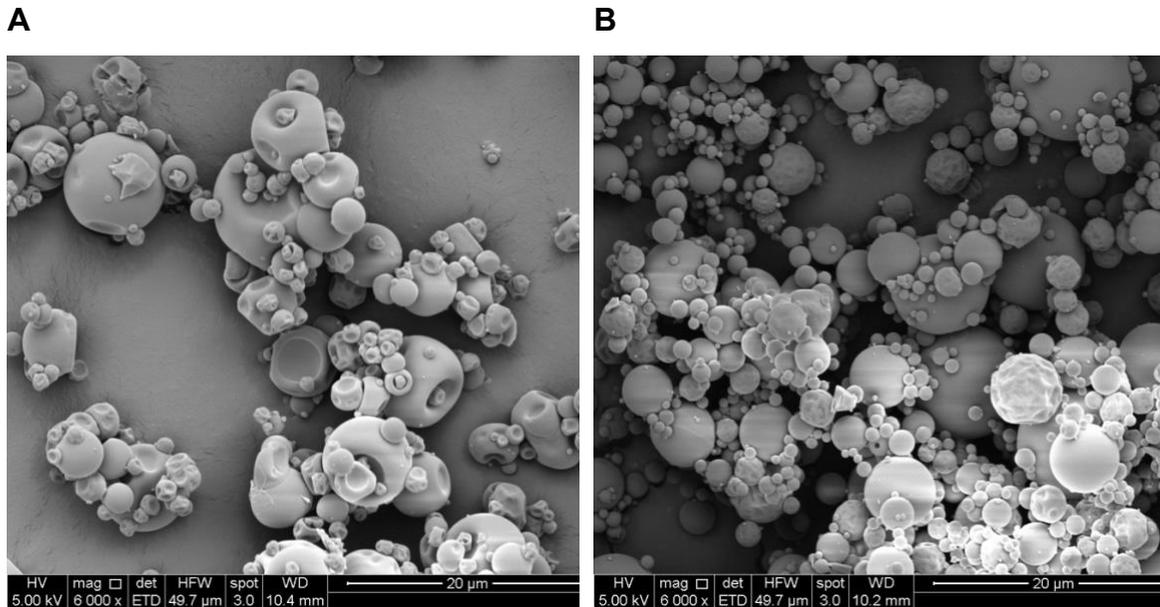


Figura 13. Microfotografías de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas EVT-MD y EVT-In (Mag 600x).

Las micropartículas del sistema EVT-MD presentaron forma esférica con superficie rugosa, con numerosas indentaciones, mientras que, las micropartículas del sistema EVT-In fueron esféricas con superficie lisa, escasas indentaciones y aglomeraciones. La formación de indentaciones ha sido atribuido al encogimiento de las micropartículas durante el proceso de secado y se podría producir a altas o bajas temperaturas de entrada al secador (Alamilla-Beltran *et al.*, 2005). A bajas temperaturas existe una menor difusión de agua y las partículas tienen más tiempo para encogerse, mientras que a altas temperaturas la rápida evaporación de agua y la alta presión en el interior de las partículas, generan el mismo resultado. Para micropartículas de jugo de tuna (Díaz *et al.*, 2006) y pulpa de tuna (Sáenz *et al.*, 2009) obtenidas por secado por atomización con maltodextrina e inulina, se obtuvieron morfologías similares.

3.5 Estabilidad de micropartículas.

La encapsulación es una tecnología que puede ser usada como una estrategia para mejorar la estabilidad de compuestos bioactivos y extender su vida útil. Condiciones de almacenamiento como la luz, temperatura, oxígeno y humedad relativa se consideran como factores críticos en la estabilidad de compuestos bioactivos encapsulados. Por lo cual, en este trabajo se estudió la evolución de la retención de los polifenoles en los sistemas EVT-MD y EVT-In, durante el almacenamiento a 60°C (Figura 14).

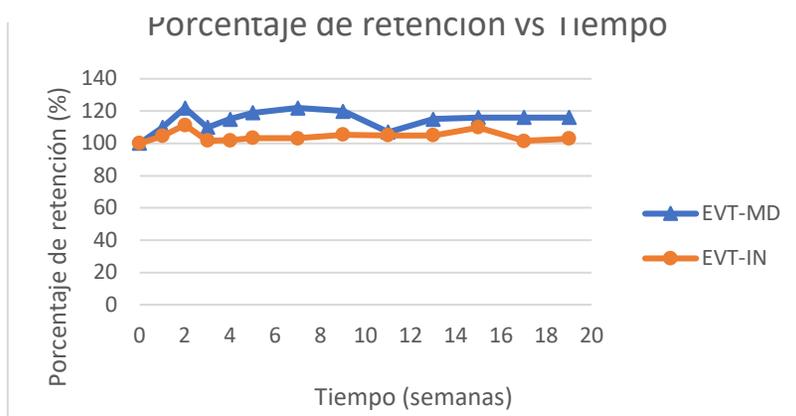


Figura 14. Gráfico de porcentaje de retención de polifenoles vs tiempo para los sistema EVT-MD y EVT-In.

En la figura 14, se puede observar que las micropartículas de EVT con inulina y con MD, presentaron un leve aumento de retención de polifenoles (120%) a las 2 semanas de almacenamiento y luego la retención de polifenoles en las micropartículas de EVT-In y EVT-MD permaneció constante (100% y 120%, respectivamente) durante las 19 semanas de almacenamiento a 60°C. Un aumento en la retención de polifenoles durante el almacenamiento se puede atribuir a la hidrólisis de polifenoles conjugados superficiales, como se ha reportado previamente (Robert *et al.*, 2010; Turkmen *et al.*, 2005).

En este estudio, ambos polisacáridos utilizados como agentes encapsulantes (In y MD) entregaron una protección a los polifenoles del EVT durante el almacenamiento. Las pequeñas diferencias entre el comportamiento de los

polisacáridos se pueden explicar por las propiedades de ellos, como permeabilidad al oxígeno, humedad, higroscopicidad, contenido de azúcares entre otros, los cuales juegan un rol importante en la estabilidad de polifenoles encapsulados. En el caso de los sistemas estudiados, las micropartículas con MD presentaron una mayor higroscopicidad y actividad de agua, respecto a aquellas con Inulina. De esta forma, una alta capacidad en la absorción de agua de las micropartículas podría aumentar la disponibilidad de agua para reacciones de hidrólisis (Fang y Bhandari, 2011; Ersus y Yourdagel, 2007).

Se observa además, que la encapsulación funciona como método de inmovilización de polifenoles, debido a que se mantienen relativamente constantes en el tiempo para los dos agentes encapsulantes utilizados. Algunos autores estudiaron extractos ricos en polifenoles como extractos de vaina de tara o jugos de materias primas con cantidades de polifenoles y capacidad antioxidante comparables con el EVT, los cuales no poseían protección polimérica. Estos reportaron disminución en la cantidad de polifenoles durante el almacenamiento debido a las degradaciones por hidrólisis, por lo cual la generación de micropartículas es una buena alternativa de protección para extractos con compuestos activos ya que para esta optimización son capaces de mantener los taninos activos al estar almacenados a 60°C. Además, el aumento de la temperatura de almacenamiento es otro factor que afecta a los polifenoles, como por ejemplo en estudios realizado en arándano y otras materias primas, donde se observa que los compuestos activos disminuyen al menos un 40% durante los 30 primeros días de almacenamiento, cuando no poseen una protección polimérica (Fernández, 2008; Busso, 2016).

CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto de polifenoles de vaina de tara en condiciones óptimas (24 °C, 100% etanol y relación sólido:solvente de 1:18) con una maximización del contenido de polifenoles totales de vaina de tara de 601,5 mg EAG/g PVT. La variable en su forma lineal y cuadrática de la relación sólido:solvente, la proporción de etanol y la interacción entre ambas variables, fueron significativas ($p < 0,05$) para esta optimización.
- Las micropartículas de los sistemas EVT-MD y EVT-In fueron obtenidas en condiciones óptimas (temperatura del aire de entrada de 187 °C y 169 °C, respectivamente y una relación EVT:polímero de 1:1,25) obteniéndose en ambos sistemas una eficiencia de encapsulación sobre el 97%. La microencapsulación por secado por atomización fue afectada significativamente por la relación EVT:polímero. Altos valores de la eficiencia de encapsulación reflejaron una alta interacción polifenol-polímero en los sistemas EVT-MD y EVT-In.
- La estabilidad de las micropartículas de los sistemas EVT-MD y EVT-In fue alta durante todo el tiempo de almacenamiento a 60 °C, mostrando poca variación del contenido de polifenoles totales para ambos sistemas estudiados.
- Los resultados permitieron desarrollar micropartículas de polifenoles de vaina de tara utilizando maltodextrina e inulina como polímeros, para su potencial aplicación como un ingrediente saludable.

BIBLIOGRAFÍA

- Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J.J., Jiménez-Aparicio, A.R. y Gutiérrez-López, G.F. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*, 67, 179-184.
- American Oil Chemists' Society AOCS. 1993. Official methods of analysis of AOCS International (3th ed.). Champaign, Illinois. Ad 2-52, Ac 4-91, Ac 3-44, Bc 5-49.
- Aouf, C., Benyahya, S., Esnouf, A., Caillol, S., Boutevin, B., y Fulcrand, H. 2014. Tara tannins as phenolic precursors of thermosetting epoxy resins. *European Polymer Journal*, 55, 186-198.
- Alvis, A., Martínez, W. y Arrazola, G. 2012. Obtención de extractos hidroalcohólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) como antioxidante natural. *Información Tecnológica*, 23(2), 3-10.
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M. y Monzani, A. 1997. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, fat, carbohydrates and tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 166-172.
- Bakowska-Barczak, A. y Kolodziejczyk, P. 2011. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34, 1301-1309.
- Basurto, L. 2006. Todo sobre la tara: *Caesalpinia spinosa* o *Caesalpinia tictoria*. Callao, Perú.
- Baum, M., Schantz y M., Leick, S. 2014. Is the antioxidative effectiveness of a bilberry extract influenced by encapsulation? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2301–2307.
- Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V. y Bugarski, B. 2011. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, 44, 1094–1101.

- Betz, M., Steiner, B. y Schantz, M. 2012. Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. *Food Research International*, 47, 51–57.
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., Cesàro, A. 2010. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterization of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416-423.
- Bosso Casati, Carolina Inés. 2016. Estabilidad de polifenoles y caracterización fisico-química y sensorial en pulpas de frutos rojos en relación a los procesos tecnológicos para la obtención de alimentos en ingredientes alimenticios. Universidad de Buenos Aires.
- Boyko, N., Pisarev, D., Zhilyakova, E., Novikov, O., Tsvetkova, Z., Kuznietsova, V., Sushchuk, N. 2018. The rol of solvent dielectric constant in modeling of the extraction process of phenolic compounds from *silybum marianum* l. Fruits. *Journal of Pharmacy Research*, 12, 4.
- Bustos-Hipólito, E., Legorreta-Siañez, A.V., Jofré, A.L., González-González, L., Arenas-Huertero, F., García-Gil de Muñoz, F. y Buenrostro-Zagal, J.F. 2012. Efecto de la extracción de los compuestos antioxidantes de la cáscara de manzana con solventes, sobre la bioactividad y su capacidad antioxidante. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, 11, 11.
- Çam, M., İçyer, C. y Eerdogan, F. 2014. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulación, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT – Food Science and Technology*, 55(1), 117 – 123.
- Cai, Y. y Corke, H. 2000. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65, 1248– 1252.
- Chambi, F., Chirinos, R., Pedreschi, R., Betalleluz-Pallardel, I., Debaste, F. y Campos, D. 2013. Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extract from tara (*Caesalpinia spinosa*) pods. *Industrial Crops and Products*, 47, 168 – 175.

- De la Cruz, P. 2004. Aprovechamiento integral y racional de la tara (*Caesalpinia spinosa* *Caesalpinia tinctoria*). *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG*, 7(14), 64-73.
- Deladino, L., Teixeira, A.S., Navarro, A.S., Alvarez, I., and Molina-García, A.D. y Martino, M. 2015. Corn starch systems as carriers for yerba mate (*Ilex araguarieensis*) antioxidants. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 463–472
- Desai, K., y Park, H. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1294.
- De Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M. y Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 292-302.
- Díaz, F., Santos, E.M., Filardo, S., Villagómez, R. y Scheinvar, L. 2006. Colorant extraction from a red prickly pear (*Opuntia lasiacantha*) for food application. *Electronic Journal Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 5, 1330-1337.
- Dostert, N., Roque, J., Brokamp, G., Cano, A., La Torre, M. y Weigend, M. 2009. Factsheet: Datos botánicos de Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Documento D38/08-11. Primera edición. Lima - Perú.
- Encina, C., Vergara, C., Giménez, B., Oyarzún-Ampuero, F. y Robert, P. 2016. Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 46-60.
- Ersus, S. y Yurdagel, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray dryer. *Journal of Food Engineering*, 80, 805-812.
- Fang, Z. y Bhandari, B. 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129, 1139-1147.
- Fernández Sotelo, Arturo Alejandro. 2008. Estudio de las propiedades antioxidantes de un extracto supercrítico de la vaina de tara (*Caesalpinia spinosa*) para su uso potencial como aditivo alimentario. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

- FIA – Fundación para la Innovación Agraria. 2017. Ingredientes funcionales “Una nueva industria para Chile” innova + agro.
- Fraga, C., Croft, K., Kennedy, D. y Tomás-Barberán, F. 2019. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & function*, 10, 514-528.
- Frank, K., Walz, E., Gräf, V., Greiner, R., Köhler, K. y Schuchmann, H.P. 2012. Stability of anthocyanin-rich w/o/w-emulsions designed for intestinal release in gastrointestinal environment. *Journal of Food Science*, 77, 50-57.
- Gallego, M.G., Rodríguez, T., Rodríguez, I. y Almajano, M.P. 2016. Analytical characterization of polyphenols from Tara and *Caesalpinia decapetala* as stabilizers of O/W emulsions. *Journal of Food Science*, 81, 11.
- Garro, J., Riedl, B. y Conner, H. 1997. Analytical Studies on tara tannins. *Holzforschung*, 51(3), 235-43.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chanbin, O., Voilley, A. y Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- Gouin, S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330-347.
- Gotteland, M. y Brunser, O. 2006. Effect of an inulin containing yoghurt on intestinal function healthy and constipated volunteers. *Revista chilena de Nutrición*, 33, 3.
- Gurak, P.D., Correa Cabral, L.M. y Rocha-Leão, M.H. 2013. Production of grape juice powder obtained by freeze-drying after concentration by reverse osmosis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56, 1011–1017.
- Hayashi H. 1989. Drying technologies of foods – their history and future. *Drying Technology*, 7, 315-369.
- Hofman, D.L., Van Buul, V.J. y Brouns, F.J. 2016. Nutrition, health and regulatory aspects of digestible maltodextrins. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56, 2091-2100.

- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M. y Flanagan, J.A., Prior RL. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437-4444.
- Huang D., Ou, B. y Prior, RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Khan, N.S., Ahmad, A. y Hadi, S.M. 2000. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chemico-Biological interactions*, 125, 177-189.
- Liu, R. H. 2013. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition*, 4, 2, 384-392.
- Liu, S., Zhang, C., Hong, P. y Ji, H. 2007. Lipase-catalysed acylglycerol synthesis of glycerol and n-3 PUFA from tuna oil: Optimisation of process parameters. *Food Chemistry*, 103, 1009-1015.
- López, A., Oré, R., Miranda, C., Trabucco, J., Orihuela, T., Linares, J., Villafani, Y., Ríos, S. y Siles, M. 2011. Antioxidant capacity of wild populations “tara” (*Caesalpinia spinosa*) of the locations Picoy and Santa Fe (Province of Tarma, Junín department). *Scientia Agropecuaria*, 2, 25-29.
- Macbride, J. F. 1943. Leguminosae, Flora of Peru. *Publications of the Field Museum of Natural History, Botanical Series*, 13, 1-506.
- Madrigal, L., Sangronis, E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57, 4.
- McCabe, W., Smith, J., Harriott, P. 2007. Operaciones unitarias en ingeniería química. Séptima edición. Mc Graw Hill.
- Miletic, N., Popovic, B., Mitrovic, O. y Kandie, M. 2012 Phenolic content and antioxidant capacity of fruits of plum cv. “Stanley” (*Prunus domestica* L.) as influences by maturity stage and on-tree ripening. *Australian Journal of Crop Science*, 6, 681-687.

- Mourtzinou, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A. y Karathanos, V.T. 2007. Encapsulation of olive leaf extract in β -cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8088–8094.
- Mozafari, M., Khosravi, K., Borazan, G., Cui, J., Pardakhty, A. y Yourdugul, S. 2008. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11, 833-844.
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C.I. y Martínez-Bustos, F. 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as Shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91, 380-386.
- Myers, R.H. y Montgomery, D.C. 1995. Response surface methodology. 1a ed. USA, John Wiley & Sons Inc.
- Nesterenko, A., Alric, I., Solvestre, F. y Durrieu, V. 2012. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International*, 48, 387-396.
- Obón, J.M., Castellar, M.R., Alacid, M. y Fernández-López, J.A. 2009. Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering* 90, 471-479.
- Oidtmann, J., Schantz y M., Mäder, K. 2012. Preparation and comparative release characteristics of three anthocyanin encapsulation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 844–851.
- Osborne, D. R. y Voogt, P. 1986. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
- Pasrija, D., Ezhilarasi, P.N., Indrani, D. y Anandharamakrishnan, C. 2015. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. *LWT: Food Science and Technology*, 64, 289–296.
- Pastuña-Pullutasig, A., López-Hernández, O., Debut, A., Vaca, A., Rodríguez-Leyes, E., Vicente, R., González, V., González-Sanabia, M. y Tapia-Hernández, F. 2016. Microencapsulación de aceite de sacha inchi

- (*Plukenetia volubilis* L.) mediante secado por aspersión. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45, 3.
- Pedreschi, F., Saavedra, I., Bunger, A., Zúñiga, R., Pedreschi, R., Chirinos, R., Campos, D. y Mariotti-Celis, M.S. 2016. Tara pod (*Caesalpinia spinosa*) extract mitigates neo-contaminant formation in Chilean bread preserving their sensory attributes. *LWT – Food Science and Technology*, 95, 116-122.
 - Portal Antioxidantes [en línea] <<http://www.portalantioxidantes.com>> [consulta: enero 2019].
 - Peregrina, P. 2000, Empleo de superficies de respuesta para la solución de problemas de inventarios estocásticos. Licenciatura en Ingeniería Industrial. Departamento de Ingeniería Industrial y Textil. Universidad de las Américas Puebla. México.
 - Ré, I. 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16, 195-1236.
 - Restrepo-Sánchez, D., Narvárez-Cuenca, C. y Restrepo-Sánchez, L. 2009. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Química Nova*, 32, 6, 1517-1522.
 - Robert, P., García, P. y Fredes, C. 2016. Chapter 9: Drying and Preservation of Polyphenols. *Advances in Technologies for Producing Food-Relevant Polyphenols*.
 - 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.
 - Robert, P., Torres, V., García, P., Vergara, C. y Sáenz, C. 2015. The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp using polysaccharide-proteins as encapsulating agents. *LWT – Food Science and Technology*, 60, 1039-1045.
 - Rodríguez-Hernández, G.R., Gonzáles, R., Grajales, A. y Ruiz, M.A. 2005. Spray-Drying of Cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): Effect on the

- physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technology*, 23, 955-973.
- Romero, R. y Zuñica, L. 2005. Métodos estadísticos en Ingeniería. 2ª edición. Ed. Universidad Politécnica de Valencia.
 - Romero, N., Fernández, A. y Robert, P. 2012. A polyphenol extract of tara pods (*Caesalpinia spinosa*) as a potential antioxidant in oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 951-957.
 - Saavedra Gatica, Ilse Elizabeth. 2016. Desarrollo de un extracto de tara (*Caesalpinia spinosa*) y estudio de su efecto sobre el contenido de neo-contaminantes, calidad y perfil sensorial de pan tipo hallulla. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
 - 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.
 - Sansone, F., Picerno, P., Mencherini, T., Villecco, F., D'Ursi, A.M., Aquino, R.P. y Lauro, M.R. 2011. Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability. *Journal of Food Engineering*, 103, 188-196.
 - Santos, D.T., Albarelli, J.Q., Beppu, M.M. y Meireles, M.A. 2013. Stabilization of anthocyanin extract from jabuticaba skins by encapsulation using supercritical CO₂ as solvent. *Food Research International*, 50, 617–624.
 - Sarmiento, T. 2012. Impacto del procesamiento sobre la pared celular y las propiedades hipoglucémicas y tecnofuncionales de leguminosas. Universidad Autónoma de Madrid.
 - Singleton, V.L. y Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
 - Sciammaro, Leonardo Pablo. 2015. Caracterización fisicoquímica de vainas y harinas de algarrobo (*Prosopis alba* y *Prosopis nigra*). Aplicaciones en productos horneados y fermentados. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires, Argentina.

- Silva Chandía, Sebastián Patricio. 2011. Optimización del proceso de extracción supercrítica de los polifenoles de la vaina de tara (*Caesalpinia spinosa*). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Soto-García, M. y Rosales-Castro, M. 2016. Effect of solvent and solvent-to-solid ratio on the phenolic extraction and the antioxidant capacity of extracts from *Pinus durangensis* and *Quercus sideroxylla* BARK. *Maderas, ciencia y tecnología*, 18(4), 701-714.
- StatPoint, Inc. 2006. Diseño de Experimentos – Diseño de Superficie de Respuesta. Statgraphics.
- Stevens, C., Meriggi, A. y Booten, K. 2001. Chemical modification of inulin, a valuable renewable resource, and its industrial applications. *Biomacromolecules*, 2, 1-16.
- Skowyra, M., Falguera, V., Gallego, G., Peiró, S. y Almajano, M.P. 2014. Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods in vitro and in model food emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 911-918.
- Teixeira, A.S., Navarro, A.S., Molina-García, A.D., Martino, M. y Deladino, L. 2015. Corn starch systems as carriers for yerba mate (*Ilex paraguariensis*) antioxidants: Effect of mineral addition. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 39–49.
- Turkmen, N., Sari, F. y Velioglu, Y. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93, 713-718.
- Ulibarri, E. A. 1996. Simposis de *Caesalpinia* y *Hoffmannseggia* (Leguminosae – Caesalpinioideae) de Sudamérica. *Darwiniana*, 34, 329.
- Viapiana, A., Konieczynski, P. y Wesolowski, M. 2013. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: A review. *Natural product communications*, 8, 12, 1821-1829.

- Villacrez, J., Carriazo, J. y Osorio, C. 2014. Microencapsulation of Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth.) aqueous extract by spray drying. *Food Bioprocess Technology*, 13.
- Wanasundara, U. y Shahidi, F. 1999. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. *Food Chemistry*, 5, 41-49.
- Wang, R., Tian, Z. y Chen, L. 2011. A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. *Food Research International*, 44, 2735-2741.
- Wang, Z., Li, Y., Chen, L., Xin, X. y Yuan, Q. 2013. A study of controlled uptake and release of anthocyanins by oxidized starch microgels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 5880–5887.
- Yáñez Fernández, J., Salazar Montoya, J., Chaires Martínez, I., Jiménez Hernández, J., Márquez Robles, M. y Ramos Ramírez, E. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21, 313-319.
- Ydjedd, S., Bouriche, S., López-Nicolás, R., Sánchez-Moya, T., Frontela-Saseta, C., Ros-Berruezo, G., Rezgui F., Louaileche, H. y Djamel-Edine, K. 2017. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on encapsulated and non-encapsulated phenolics compounds of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp extracts and their antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 65, 4, 827-835.
- Zheng, L., Ding, Z., Zhang, M. y Sun, J. 2011. Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. *Journal of Food Engineering*, 104, 89–95.
- Zbicinski, I., Smucerowicz, I., Strumillo, C. y Crowe, C. 2002. Application of pulse combustion technology in spray drying process. *Brazilian Journal Chemical Engineering*, 17, 441-450.

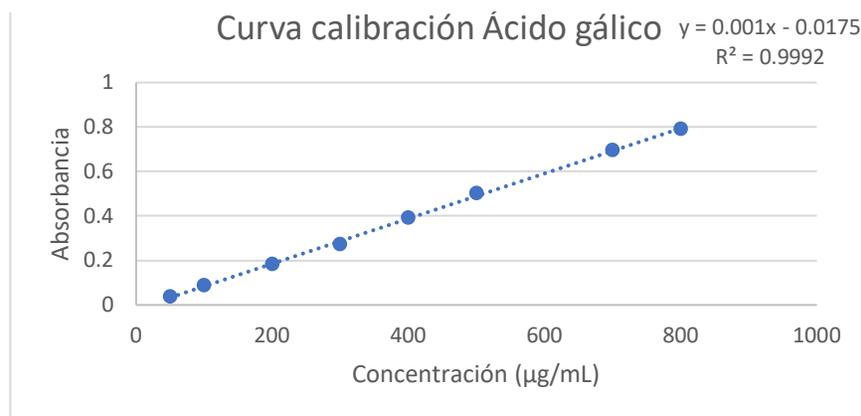
ANEXOS

Anexo 1: Denominaciones y dimensiones de los estándares estadounidenses y estándares Tyler.

U.S. Standard		Tyler Standard	
Micron	Mesh	Micron	Mesh
5660	3 1/2	5613	3 1/2
4760	4	4699	4
4000	5	3965	5
3360	6	3327	6
2830	7	2794	7
2380	8	2362	8
2000	10	1651	10
1680	12	1397	12
1410	14	1168	14
1190	16	991	16
1000	18	883	20
840	20	701	24
710	25	589	28
590	30	495	32
500	35	417	35
420	40	351	42
350	45	295	48
297	50	246	60
250	60	208	65
210	70	175	80
177	80	147	100
149	100	124	115
125	120	104	150
105	140	88	170
88	170	74	200
74	200		
62	230		
53	270		
44	325		
37	400		

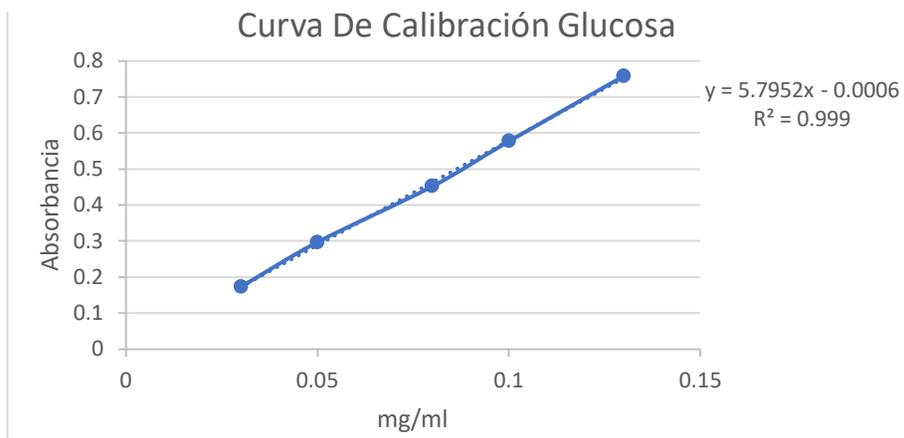
Anexo 2: Curva de calibración ácido gálico.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
50	0,037
100	0,086
200	0,181
300	0,273
400	0,392
500	0,502
700	0,694
800	0,789



Anexo 3: Curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0,03	0,173
0,05	0,297
0,08	0,452
0,1	0,577
0,13	0,758



Anexo 4: Optimización extracción de vaina de tara.

Efectos estimados para Polifenoles Totales (mg/g)			
<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	455,667	40,6201	
A:Temperatura	-69,25	49,7493	1,0
B:Proporción Etanol	70,5	49,7493	1,0
C:Relación Sólido	163,75	49,7493	1,0
Solvente			
AA	-77,1667	73,229	1,01111
AB	-99,5	70,3561	1,0
AC	61,0	70,3561	1,0
BB	-12,6667	73,229	1,01111
BC	278,5	70,3561	1,0
CC	-261,167	73,229	1,01111

Errores estándar basados en el error total con 5 g.l.

Análisis de Varianza para Polifenoles Totales

<i>Fuente</i>	<i>Suma Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	9591,13	1	9591,13	1,94	0,2227
B:Proporción Etanol	9940,5	1	9940,5	2,01	0,2156
C:Relación Sólido	53628,1	1	53628,1	10,83	0,0217
Solvente					
AA	5496,64	1	5496,64	1,11	0,3402
AB	9900,25	1	9900,25	2,00	0,2164
AC	3721,0	1	3721,0	0,75	0,4256
BB	148,103	1	148,103	0,03	0,8695
BC	77562,3	1	77562,3	15,67	0,0108
CC	62961,3	1	62961,3	12,72	0,0161
Error total	24749,9	5	4949,98		
Total (corr.)	255203,	14			

R-cuadrada = **90,3019** porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **72,8452** porciento

Error estándar del est. = **70,3561**

Error absoluto medio = **30,5111**

Estadístico Durbin-Watson = 2,581 (P=0,8919)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,299849

Coef. de regresión para Polifenoles Totales

<i>Coeficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	64,0602
A:Temperatura	5,93125
B:Proporción Etanol	-1,69333
C:Relación Sólido Solvente	42,2537
AA	-0,0964583
AB	-0,04975
AC	0,203333
BB	-0,00253333
BC	0,371333
CC	-2,32148

$$\text{Polifenoles Totales} = 64,0602 + 5,93125 * \text{Temperatura} - 1,69333 * \text{Proporción Etanol} + 42,2537 * \text{Relación Sólido Solvente} - 0,0964583 * \text{Temperatura}^2 - 0,04975 * \text{Temperatura} * \text{Proporción Etanol} + 0,203333 * \text{Temperatura} * \text{Relación Sólido Solvente} - 0,00253333 * \text{Proporción Etanol}^2 + 0,371333 * \text{Proporción Etanol} * \text{Relación Sólido Solvente} - 2,32148 * \text{Relación Sólido Solvente}^2$$

Matriz de Correlación para los Efectos Estimados

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
promedio	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-0,5547	0,0000	0,0000	-0,5547	0,0000	-0,5547
A:Temperatur	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
B:Proporción Etanol	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
C:RelaciónSólidoSolvente	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
AA	-0,5547	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0769	0,0000	0,0769
AB	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
AC	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
BB	-0,5547	0,0000	0,0000	0,0000	0,0769	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0769
BC	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
CC	-0,5547	0,0000	0,0000	0,0000	0,0769	0,0000	0,0000	0,0769	0,0000	1,0000

Resultados Estimados para Polifenoles Totales

	<i>Observados</i>	<i>Ajustados</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
<i>Fila</i>	<i>Valores</i>	<i>Valores</i>	<i>para Media</i>	<i>para Media</i>
1	351,0	372,5	215,874	529,126
2	360,0	361,625	204,999	518,251
3	161,0	139,5	-17,1265	296,126
4	362,0	360,375	203,749	517,001
5	483,0	530,375	373,749	687,001
6	644,0	575,125	418,499	731,751
7	113,0	132,875	-23,7515	289,501
8	438,0	390,625	233,999	547,251
9	297,0	364,25	207,624	520,876
10	272,0	340,875	184,249	497,501
11	337,0	269,75	113,124	426,376
12	246,0	226,125	69,4985	382,751
13	458,0	455,667	351,249	560,084
14	454,0	455,667	351,249	560,084
15	455,0	455,667	351,249	560,084

Camino de Máximo Ascenso para Polifenoles Totales

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Proporción Etanol (%)</i>	<i>Relación Sólido Solvente</i>	<i>Predicción Polifenoles</i> <i>Totales</i> (mg/g)
40,0	50,0	12,5	455,667
41,0	48,2638	11,5416	440,522
42,0	47,9996	10,444	419,031
43,0	48,9073	9,22901	387,78
44,0	50,7	7,92113	343,979
45,0	53,1521	6,54149	285,511

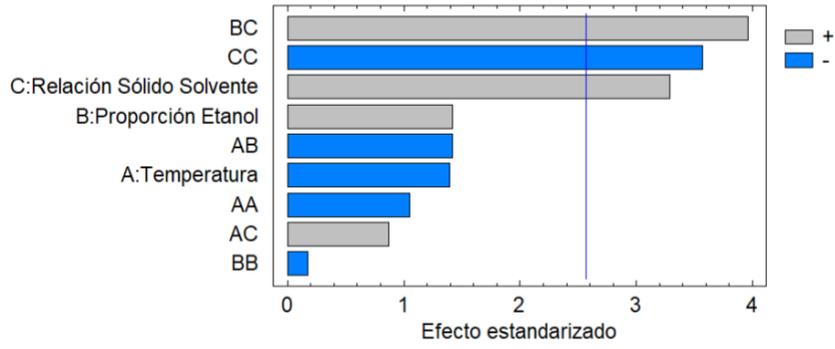
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar Polifenoles Totales

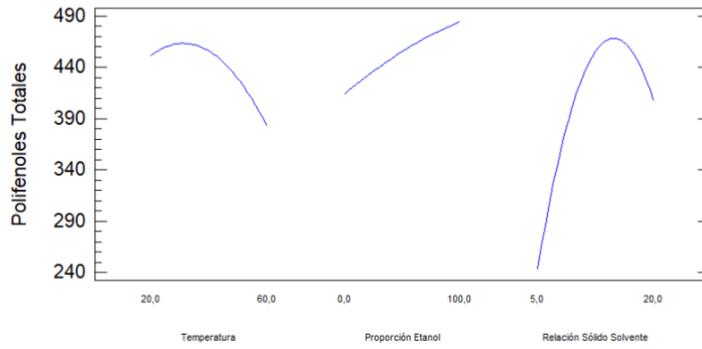
Valor óptimo = 601,483

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	20,0	60,0	24,0795
Proporción Etanol	0,0	100,0	100,0
Relación Sólido Solvente	5,0	20,0	18,1518

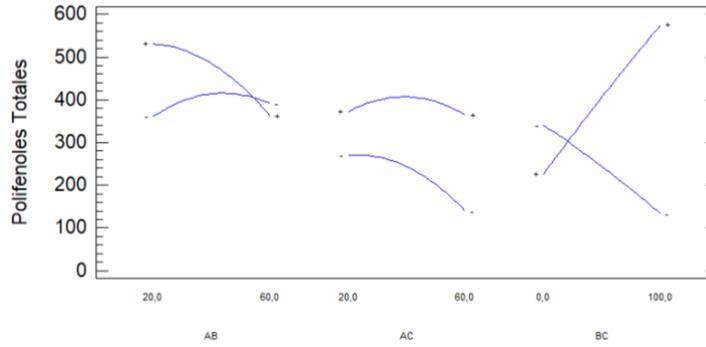
Diagrama de Pareto Estandarizada para Polifenoles Totales



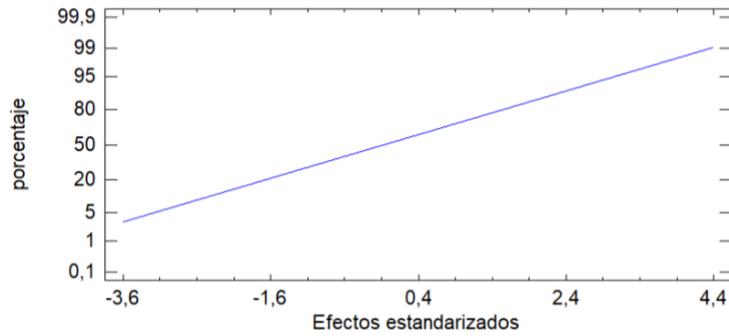
Gráfica de Efectos Principales para Polifenoles Totales

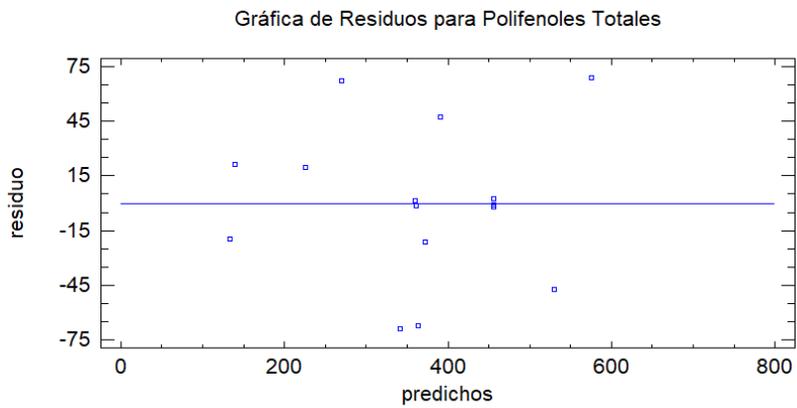
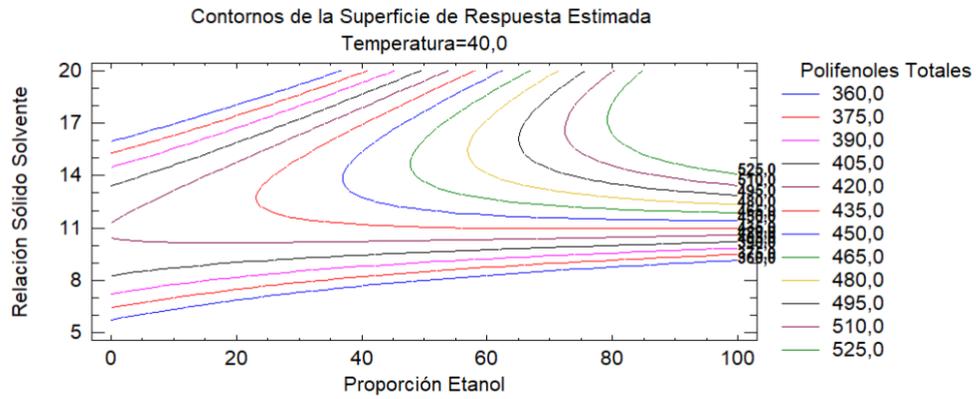
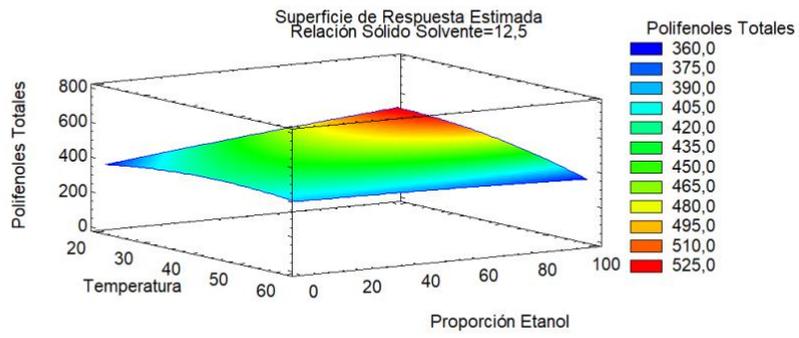


Gráfica de Interacción para Polifenoles Totales



Gráfica de Probabilidad Normal para Polifenoles Totales





Anexo 5: Optimización Sistema Micropartículas EVT-MD.

Efectos estimados para Eficiencia encapsulación (%)

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	98,6125	0,0614944	
A:Temperatura	0,271932	0,0956106	1,0
B:Relación E AE	-2,32412	0,0956106	1,0
AA	-0,208114	0,121543	1,0
AB	-0,15	0,125831	1,0
BB	-2,46206	0,121543	1,0

Errores estándar basados en el error puro con 3 g.l.

Análisis de Varianza para Eficiencia encapsulación

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	0,12808	1	0,12808	8,09	0,0654
B:Relación E AE	9,35576	1	9,35576	590,89	0,0002
AA	0,0464208	1	0,0464208	2,93	0,1854
AB	0,0225	1	0,0225	1,42	0,3189
BB	6,49693	1	6,49693	410,33	0,0003
Falta de ajuste	0,211968	3	0,0706559	4,46	0,1254
Error puro	0,0475	3	0,0158333		
Total (corr.)	16,3092	11			

R-cuadrada = 98,4091 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 97,0833 por ciento

Error estándar del est. = 0,125831

Error absoluto medio = 0,112457

Estadístico Durbin-Watson = 1,29254 (P=0,0804)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,252828

Coef. de regresión para Eficiencia encapsulación

<i>Coefficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	80,4331
A:Temperatura	0,106497
B:Relación E AE	13,7232
AA	-0,000260142
AB	-0,0075
BB	-4,92412

$$\text{Eficiencia encapsulación} = 80,4331 + 0,106497 \cdot \text{Temperatura} + 13,7232 \cdot \text{Relación E AE} - 0,000260142 \cdot \text{Temperatura}^2 - 0,0075 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Relación E AE} - 4,92412 \cdot \text{Relación E AE}^2$$

Matriz de Correlación para los Efectos Estimados

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
promedio	1,0000	0,0000	0,0000	-0,5706	0,0000	-0,5706
A:Temperatura	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
B:Relación E AE	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
AA	-0,5706	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
AB	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
BB	-0,5706	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000

Resultados Estimados para Eficiencia encapsulación

	<i>Observados</i>	<i>Ajustados</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
<i>Fila</i>	<i>Valores</i>	<i>Valores</i>	<i>para Media</i>	<i>para Media</i>
1	98,0	98,2285	97,8922	98,5648
2	98,5	98,6504	98,3141	98,9867
3	96,0	96,0544	95,718	96,3907
4	96,2	96,1763	95,84	96,5126
5	98,5	98,2956	97,9971	98,5942
6	98,7	98,6246	98,3261	98,9232
7	98,5	98,2162	97,9177	98,5148
8	95,4	95,404	95,1055	95,7026
9	98,7	98,6125	98,4168	98,8082
10	98,4	98,6125	98,4168	98,8082
11	98,6	98,6125	98,4168	98,8082
12	98,6	98,6125	98,4168	98,8082

Camino de Máximo Ascenso para Eficiencia encapsulación

<i>Temperatura</i>	<i>Relación E AE</i>	<i>Predicción Eficiencia encapsulación</i>
<i>(°C)</i>		<i>(%)</i>
170,0	1,5	98,6125
171,0	1,36278	98,8462
172,0	1,30555	98,8937
173,0	1,2801	98,9084
174,0	1,26866	98,9166
175,0	1,26345	98,9231

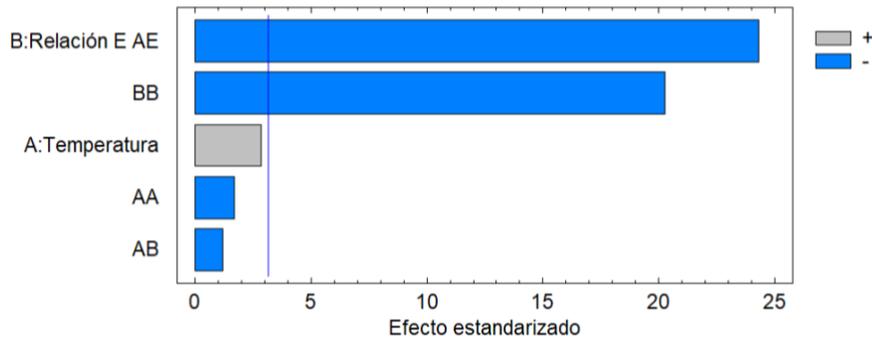
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar Eficiencia encapsulación

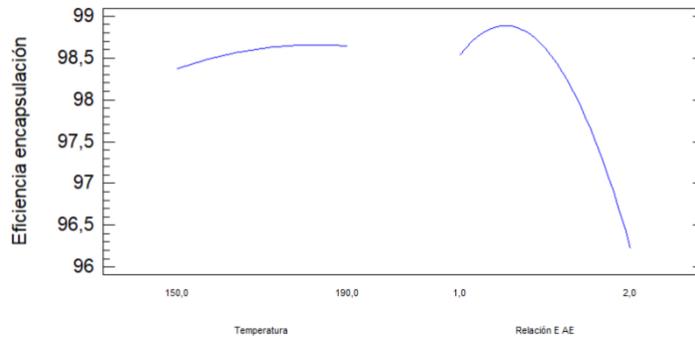
Valor óptimo = 98,9581

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	145,8	194,2	186,678
Relación E AE	0,895	2,105	1,25131

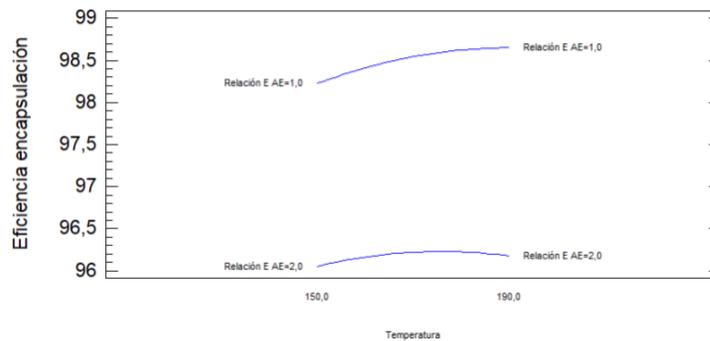
Diagrama de Pareto Estandarizada para Eficiencia encapsulación



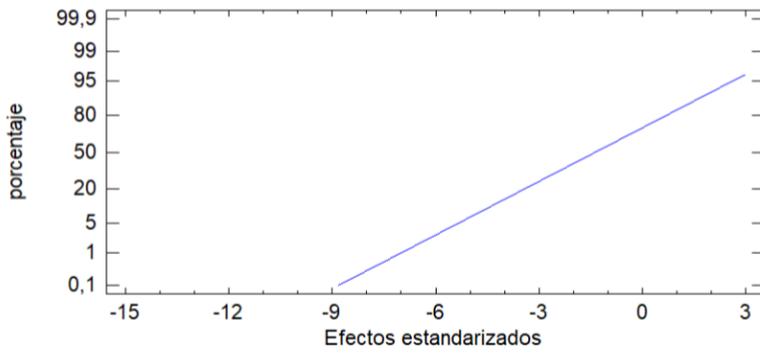
Gráfica de Efectos Principales para Eficiencia encapsulación



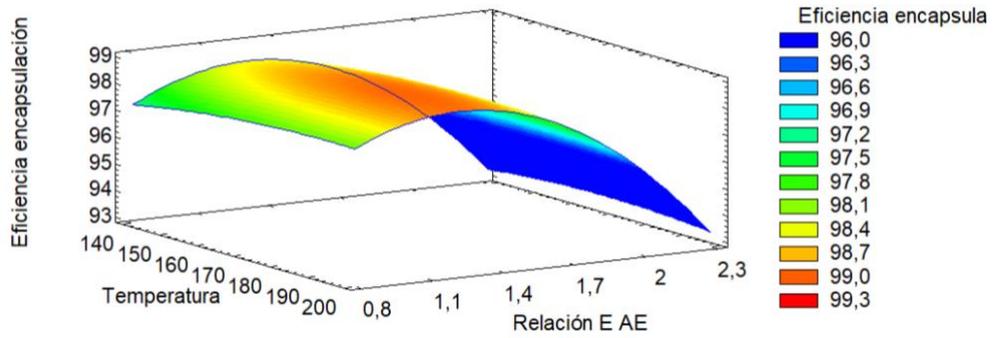
Gráfica de Interacción para Eficiencia encapsulación



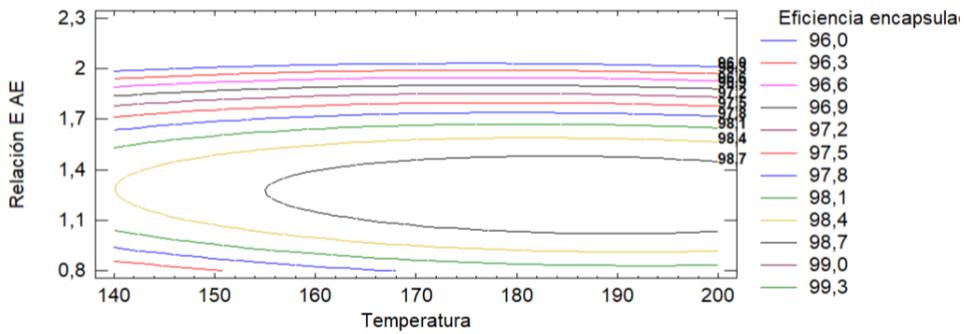
Gráfica de Probabilidad Normal para Eficiencia encapsulación



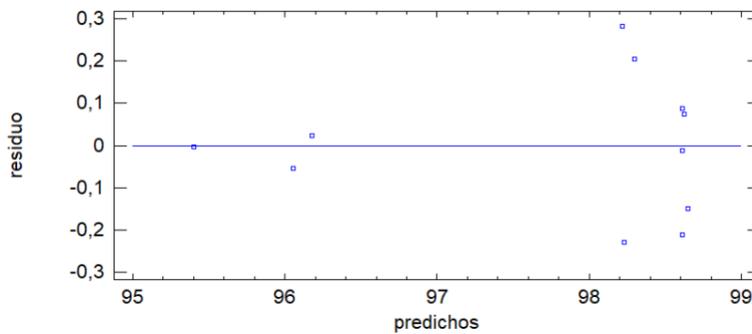
Superficie de Respuesta Estimada



Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada



Gráfica de Residuos para Eficiencia encapsulación



Anexo 6: Optimización Sistema Micropartículas EVT-In.

Efectos estimados para Eficiencia de encapsulación (%)

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	99,7244	0,0244354	
A:Temperatura	-0,0987269	0,0379918	1,0
B:Relación E/AE	-0,249127	0,0379918	1,0
AA	-0,166886	0,0482963	1,0
AB	-0,15	0,05	1,0
BB	-0,235187	0,0482963	1,0

Errores estándar basados en el error puro con 3 g.l.

Análisis de Varianza para Eficiencia de encapsulación

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	0,0168823	1	0,0168823	6,75	0,0805
B:Relación E/AE	0,107498	1	0,107498	43,00	0,0072
AA	0,0298504	1	0,0298504	11,94	0,0408
AB	0,0225	1	0,0225	9,00	0,0577
BB	0,0592841	1	0,0592841	23,71	0,0165
Falta de ajuste	0,00565156	3	0,00188385	0,75	0,5892
Error puro	0,0075	3	0,0025		
Total (corr.)	0,249167	11			

R-cuadrada = 94,7218 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 90,3233 por ciento

Error estándar del est. = 0,05

Error absoluto medio = 0,0276053

Estadístico Durbin-Watson = 1,97249 (P=0,4234)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,222417

Coef. de regresión para Eficiencia de encapsulación

<i>Coeficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	91,5181
A:Temperatura	0,0797082
B:Relación E/AE	2,437
AA	-0,000208607
AB	-0,0075
BB	-0,470374

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = 91,5181 + 0,0797082 \cdot \text{Temperatura} + 2,437 \cdot \text{Relación E/AE} - 0,000208607 \cdot \text{Temperatura}^2 - 0,0075 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Relación E/AE} - 0,470374 \cdot \text{Relación E/AE}^2$$

Matriz de Correlación para los Efectos Estimados

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
promedio	1,0000	0,0000	0,0000	-0,5706	0,0000	-0,5706
A:Temperatura	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
B:Relación E/AE	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
AA	-0,5706	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
AB	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
BB	-0,5706	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000

Resultados Estimados para Eficiencia de encapsulación

	<i>Observados</i>	<i>Ajustados</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
<i>Fila</i>	<i>Valores</i>	<i>Valores</i>	<i>para Media</i>	<i>para Media</i>
1	99,6	99,6223	99,4887	99,7559
2	99,7	99,6736	99,5399	99,8072
3	99,5	99,5232	99,3895	99,6568
4	99,3	99,2744	99,1408	99,4081
5	99,7	99,662	99,5433	99,7806
6	99,5	99,5425	99,4239	99,6611
7	99,7	99,703	99,5843	99,8216
8	99,4	99,4015	99,2829	99,5201
9	99,7	99,7244	99,6466	99,8022
10	99,7	99,7244	99,6466	99,8022
11	99,7	99,7244	99,6466	99,8022
12	99,8	99,7244	99,6466	99,8022

Camino de Máximo Ascenso para Eficiencia de encapsulación

<i>Temperatura</i>	<i>Relación E/AE</i>	<i>Predicción Eficiencia de encapsulación</i>
<i>(°C)</i>		<i>(%)</i>
170,0	1,5	99,7244
171,0	1,56069	99,7044
172,0	1,61794	99,6809
173,0	1,67294	99,6541
174,0	1,72631	99,6239
175,0	1,77845	99,5906

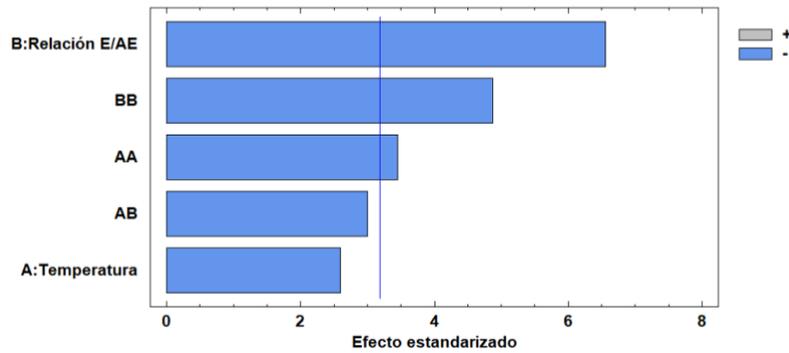
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar Eficiencia de encapsulación

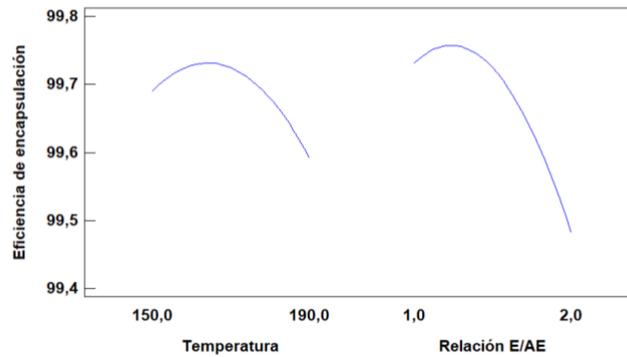
Valor óptimo = 99,7577

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	145,8	194,2	168,675
Relación E/AE	0,895	2,105	1,2452

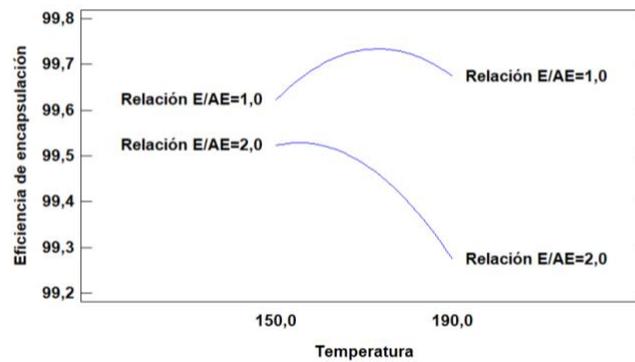
Diagrama de Pareto Estandarizada para Eficiencia de encapsulación



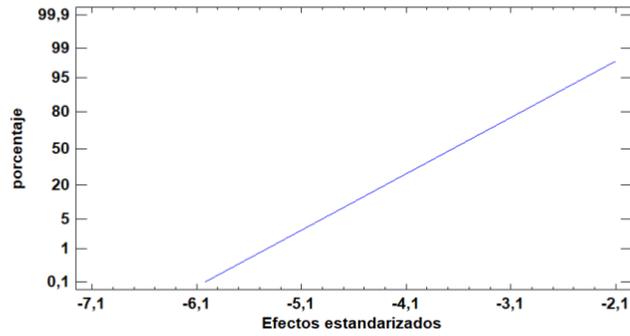
Gráfica de Efectos Principales para Eficiencia de encapsulación



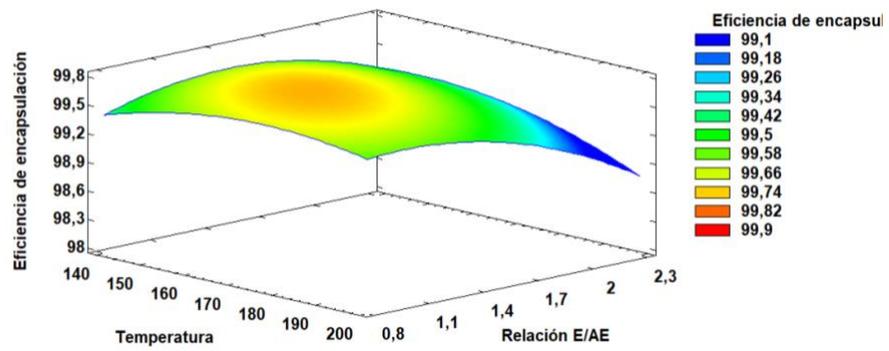
Gráfica de Interacción para Eficiencia de encapsulación



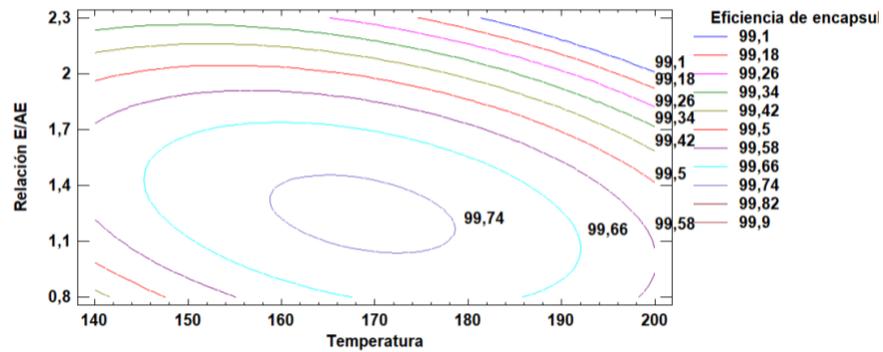
Gráfica de Probabilidad Normal para Eficiencia de encapsulación



Superficie de Respuesta Estimada



Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada



Gráfica de Residuos para Eficiencia de encapsulación

