



**UNIVERSIDAD DE CHILE
DOCTORADO EN NUTRICION Y ALIMENTOS**

TÍTULO DE LA TESIS

**DISEÑO DE MICROPARTÍCULAS DE FLAVONOIDES. ESTUDIO DE LA
CRISTALINIDAD Y AGENTE CANALIZANTE SOBRE LA ESTABILIDAD
OXIDATIVA DE MATRICES LIPÍDICAS.**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Nutrición y Alimentos**

Por:

GUIBETH LILIANA MORELO HERNÁNDEZ

Director de Tesis Profesor:

Dra. Paz Robert Canales

Co-director de Tesis

Gloria Márquez-Ruiz

SANTIAGO-CHILE

MAYO DE 2019

**DISEÑO DE MICROPARTÍCULAS DE FLAVONOIDES. ESTUDIO DE LA
CRISTALINIDAD Y AGENTE CANALIZANTE SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA
DE MATRICES LIPÍDICAS.**

**Por
GUIBETH LILIANA MORELO HERNÁNDEZ**

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

COMITÉ DE TESIS

DIRECTORES DE TESIS

Prof. Paz Robert

Aprobado

Prof. Gloria Márquez-Ruiz

Aprobado

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Lilian Abogouch

Aprobado

Prof. María Luz Hurtado

Aprobado

Prof. Rubén Bustos C.

Aprobado

Prof. Mehrdad Yazdani-Pedram Z.

Aprobado

DEDICATORIA

A mis padres Gilberto y Gloria Rosa

A mi esposo Edwin, por todo el apoyo, amor y comprensión.

A María Victoria, nuestra hija por llenar mi vida de felicidad

A mis hermanas y hermanos por su cariño

¡Cantaré al Señor todo el bien que me ha hecho!

RESUMEN BIOGRAFICO

Guibeth Liliana Morelo Hernández, nace en Montería-Córdoba, una ciudad ubicada en el Caribe Colombiano. Terminó sus estudios secundarios en el año de 1996 y en el año 1997 ingresó a la Universidad de Córdoba donde inicio sus estudios de Licenciatura en Química y Biología, egresó en Diciembre del 2001 y en Mayo del 2002 obtuvo el Título de Licenciada en Química y Biología. Trabajó como profesora de Biología y Química durante los años 2001 al 2003. Continuó sus estudios de Postgrado en Chile, cursó un Magíster en Ciencia de los Alimentos y un Diplomado en Tecnología Aplicada a grasas y aceites, paralelamente trabajó como Docente en instituciones privadas y municipales de la Ciudad de Santiago. Ingresa el año 2012 al programa de Doctorado en Nutrición y Alimentos de la Universidad de Chile. La Tesis Doctoral la realizó en el Laboratorio de Química de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la Dirección de la Dra. Paz Robert y la Dra. Gloria Márquez-Ruiz (ICTAN, Madrid- España), adicionalmente participó en actividades académicas de pregrado y de investigación en el Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina y en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, ambos de la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

A ti mi Señor Dios, gracias por sostenerme, por iluminarme y darme la fuerza para seguir adelante.

A mi madre Gloria, a mi Padre Gilberto por todo el amor, dedicación y el esfuerzo con que me educaron.

A mi esposo Edwin por su cariño, sus consejos y su permanente apoyo durante todos estos años, con tu ayuda esto fue posible.

A la Dra. Paz Robert, mi directora de tesis por recibirme en su grupo de trabajo, por dirigir mi Tesis, por sus enseñanzas, su dedicación y su tiempo. Por escucharme, por cada uno de los consejos para mi formación académica y para la vida. Por ayudarme a seguir creciendo como persona. ¡Gracias por todo profesora Paz!

A mi Co-directora de Tesis la Dra. Gloria Marquéz-Ruiz por su participación activa en el desarrollo de esta Tesis, por su excelente disposición, por recibirme en su laboratorio ICTAN-CSCI.

A los profesores y profesoras de la Comisión informante, María Luz Hurtado, Rubén Bustos, Yazdani-Pedram Mehrdad, Lilian Abogouch por su disposición, su orientación y apoyo durante el desarrollo de esta Tesis.

A la Dra., Paula Jiménez por su amistad incondicional, por acompañarme, escucharme y orientarme, siempre que te necesité estuviste presente.

A Francisca Holgado, que conocí en el laboratorio del ICTAN-CSCI, por toda su generosidad, por su extraordinaria disposición y los lazos de amistad. ¡Gracias Paquita!

A mis amigos Paula García, Cristian Encina, Cristina Vergara y Manuel Palma conocerlos y haber compartido durante estos años con ustedes fue positivo y enriquecedor. A Begoña Giménez por su colaboración, a Inés Cea, Estefanía Gonzáles, Ana Sandoval, Juan Carlos Moreno y todos aquellos que me acompañaron durante esta experiencia.

A los amigos que se volvieron familia, Andrea Ramos, Maximiliano Méndez, Milena Vega y Didier.

A la profesora Nalda Romero, por su colaboración y amistad durante estos largos años.

A Conicyt por la Beca de Doctorado en Chile N° 21140720

Al proyecto Fondecyt N° 1120308 por el financiamiento para llevar a cabo esta tesis.

A la Universidad de Chile y en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

ÍNDICE DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN	1
1.1 OXIDACIÓN LÍPIDICA	2
1.1.1. Compuestos de autooxidación lipídica.....	3
1.1.2. Evaluación de la oxidación lipídica y la estabilidad oxidativa.....	4
1.2. ANTIOXIDANTES	5
1.2.1. Flavonoides.....	5
1.2.2. Acción antioxidante de los flavonoides.....	6
1.2.3. Uso de flavonoides libres en la estabilización de matrices lipídicas.....	7
1.3. MICROENCAPSULACIÓN	9
1.3.1. Encapsulación de flavonoides	10
1.3.2. Secado por atomización.....	11
1.3.3. Uso de micropartículas de flavonoides en la estabilización de matrices lipídicas	12
1.3.4. Diseño de micropartículas con flavonoides.....	13
1.4. CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS	14
1.5. INTERACCIÓN ENTRE FLAVONOIDEOS Y TOCOFEROLES	16
1.6. HIPÓTESIS	18
1.7. OBJETIVOS	18
1.7.1. Objetivo general	
1.7.2. Objetivos específicos	
MATERIALES Y METODOS	19
2.1. MATERIALES	19
2.2. MÉTODOS	19
PARTE I: EFECTO DEL GRADO DE CRISTALINIDAD DE LAS MICROPARTÍCULAS SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE MATERIAS LIPÍDICAS	19
2.2.1. Preparación de micropartículas flavonoides-inulina con distintos grados de cristalinidad	19

2.2.2. Caracterización de las micropartículas	20
2.2.2.1. Determinación de eficiencia de encapsulación de los flavonoides.....	20
2.2.2.2. Humedad.....	21
2.2.2.3. Actividad de Agua.....	21
2.2.2.4. Higroscopicidad.....	21
2.2.2.5. Determinación de cristalinidad.....	21
2.2.2.6. Termogramas de micropartículas	21
2.2.2.7. Morfología de las micropartículas	22
2.2.2.8. Tamaño y distribución de las micropartículas	22
2.2.3. Ensayos de estabilidad oxidativa con micropartículas con distinto grado de cristalinidad.....	22
2.2.3.1. Caracterización inicial del aceite de girasol.....	22
2.2.3.1.1. Determinación de la composición de ácidos grasos	22
2.2.3.1.2. Índice de peróxidos.....	22
2.2.3.1.3. Determinación de tocoferoles.....	22
2.2.3.2. Ensayos de estabilidad oxidativa	23
2.2.3.2.1. Tiempo de Inducción (Rancimat)	23
2.2.3.2.2. Estabilidad oxidativa durante almacenamiento en placa.....	23
2.2.3.2.3. Compuestos polares (CP)	23
2.2.3.2.4. Cromatografía de exclusión por tamaño (HPSEC)	23
PARTE II. EFECTO DEL AGENTE CANALIZANTE SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE MATRICES LIPÍDICAS	24
2.2.4. Preparación de micropartículas flavonoides-inulina-aislado proteico de soya	24
2.2.5. Caracterización de micropartículas de flavonoides con inulina	24
2.2.5.1. Liberación de flavonoides (LH) desde las micropartículas a los 14 días (t ₁₄) de almacenamiento en hexano.....	25
2.2.5.2. Preparación y caracterización de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas	25
2.2.5.3. Morfología y tamaño de partículas	25
2.2.5.4. Tamaño y distribución de partícula	26
2.2.5.5. Estudio de la formación de canales en las micropartículas	26
2.2.6. Ensayos de estabilidad oxidativa.....	26
2.2.6.1. Tiempo de Inducción (Rancimat).....	26
2.2.6.2. Estabilidad oxidativa de LM y AG durante almacenamiento.....	26
2.2.6.2.1 Almacenamiento con burbujeo de oxígeno	26
2.2.6.2.2. Almacenamiento sin burbujeo de oxígeno	27
2.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28

3.1. PARTE I: Efecto del grado de cristalinidad de micropartículas de flavonoides con inulina sobre la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas	28
3.1.1 Grado de cristalinidad de las micropartículas: Difracción de Rayos X (DRX).....	28
3.1.2. Termogramas de las micropartículas por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	31
3.1.3. Caracterización fisicoquímica de micropartículas por secado con atomización ..	33
3.1.3.1. Microscopía electrónica de Barrido (SEM) y distribución de tamaño de partícula por difracción de luz láser (DLL) de las micropartículas	35
3.1.4. Estabilidad oxidativa de LM y AG con micropartículas de flavonoides con distinto grado de cristalinidad.....	38
3.1.4.1. Tiempo de Inducción (Rancimat).....	38
3.1.4.2. Almacenamiento en placa.....	39
3.1.4.3. Evolución de tocoferoles en sistemas con AG	42
3.2. PARTE II: EFECTO DEL AGENTE CANALIZANTE SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE MATRICES LIPÍDICAS	44
3.2.1. Preparación de micropartículas flavonoides-inulina-aislado proteico de soya	45
3.2.2. Caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas	50
3.2.2.1. Estudio de la morfología de las micropartículas	51
3.2.2.2. Estudio de la formación de los canales en las micropartículas con APS	52
3.2.3. Ensayos de estabilidad oxidativa.....	54
3.2.3.1. Estabilidad oxidativa en condiciones aceleradas.....	54
3.2.3.1.1. Tiempo de Inducción (Rancimat).....	54
3.2.3.1.2. Formación y distribución de compuestos de oxidación.....	56
3.2.3.2. Estabilidad oxidativa durante almacenamiento en placa.....	58
3.2.3.2.1. Formación de compuestos polares durante el almacenamiento en placa	59
3.2.3.2.2. Distribución de compuestos polares durante el almacenamiento en placa...	59
3.2.3.2.3. Evolución de tocoferoles en sistemas con AG durante el almacenamiento en placa.....	61
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFIA	69
ANEXOS	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diferentes métodos de encapsulación de flavonoides	11
Tabla 2. Caracterización de micropartículas de flavonoides con inulina a dos temperaturas de alimentación	34
Tabla 3. Tiempo de inducción y factor de protección para linoleato de metilo y aceite de girasol sin y con adicción de micropartículas de flavonoides E-In-15, E-In-90, Q-In 15 y Q-In-90 almacenados en placa a 60°C	38
Tabla 4. Evolución de la formación de compuestos polares en AG con y sin la adición de micropartículas de flavonoides de E-In-15, E-In-90, Q-In 15 y Q-In-90 (200mg/kg AG) almacenados en placa a 60°C	39
Tabla 5. Distribución de compuestos polares para aceite de girasol sin y con la adición de micropartículas de flavonoides de distinto grado de cristalinidad, almacenados en placa a 60°C	40
Tabla 6. Constante de velocidad de degradación de primer orden para α -tocoferol en sistemas de aceite de girasol sin y con la adición de micropartículas de flavonoides sin APS y con APS.....	43
Tabla 7. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación, recuperación de epicatequina y liberación en hexano para el diseño Box Bhenken de E-(In-APS)	44
Tabla 8. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación, y liberación de naringenina, en hexano para el diseño Box Bhenken de N-(In-APS)	45
Tabla 9. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y liberación de quercetina en hexano para el diseño Box Bhenken de Q-(In-APS)	45
Tabla 10. Condiciones óptimas para la EE y LH de los sistemas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS) obtenidas por superficie de respuesta	49
Tabla 11. Características físicas y químicas de los sistemas de micropartículas E-In, Q-In y E-(In-APS) y Q-(In-APS) obtenidas bajo condiciones óptimas de encapsulación	51
Tabla 12. Tiempo de inducción y factor de protección de linoleato de metilo y aceite de girasol sin y con adicción de micropartículas.....	54
Tabla 13. Evolución del contenido de compuestos polares en AG sin y con la adición de micropartículas de flavonoides con APS y sin APS, almacenados en placa a 60°C.....	58

Tabla 14. Distribución de los compuestos de oxidación en aceite de girasol sin y con micropartículas de flavonoides, sin y con agente canalizante (APS), almacenados en placa a 60°C 60

Tabla 15. Constante de velocidad de degradación de primer orden para α -tocoferol en sistemas de aceite de girasol sin y con la adición de micropartículas de flavonoides sin APS y con APS..... 62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ecuaciones del mecanismo de autooxidación de lípidos	2
Figura 2. Mecanismo de formación de compuestos secundarios de oxidación con funciones hidroxil y cetona	3
Figura 3. Estructura química de flavonoides.....	6
Figura 4. Ecuaciones que describen la acción antioxidante de los polifenoles y radical antioxidante en la reacción de terminación	6
Figura 5. Estructura química de los flavonoides, epicatequina, naringenina y quercetina utilizados en esta investigación	9
Figura 6. Representación de distintos tipos de micropartículas; reservorio, matricial y matriz revertida.....	10
Figura 7. Estructura de la inulina	13
Figura 8. Estructura química de los tocoferoles	16
Figura 9. Espectro de Difracción de Rayos X para quercetina, epicatequina, micropartículas vacías In-15, In-90 y micropartículas con flavonoides E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90	29
Figura 10. Termogramas de DSC para epicatequina, quercetina, micropartículas de inulina (In-15, In-90) y micropartículas de flavonoides E-In-15, E-in-90, Q-In-15 y Q-In-90	32
Figura 11. Microfotografías por microscopía electrónica de Barrido y distribución de tamaño de partículas para E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90.....	37
Figura 12. Distribución de compuestos polares para aceite de girasol (AG) sin y con la adición de micropartículas de flavonoides de distinto grado de cristalinidad E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90.....	41
Figura 13. Formación de CP y la retención del α -tocoferol para aceite de girasol (AG) sin y con la adición de micropartículas de flavonoides de distinto grado de cristalinidad E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90.....	42

Figura 14. Diagramas de Pareto para la eficiencia de encapsulación de los sistemas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS).....	47
Figura 15. Diagramas de Pareto para la liberación de flavonoides en hexano de los sistemas a E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS).....	47
Figura 16. Gráficos de superficie de respuesta para el diseño Box-Behnken de los sistemas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS)	50
Figura 17. Microfotografías por microscopía electrónica de barrido (SEM) para micropartículas sin flavonoide, micropartículas sin APS, E-In y Q-In, y micropartículas con APS E-(In-APS), y Q-(In-APS).....	53
Figure 18. Imágenes de Microscopia Confocal Laser de los sistemas de aceite de girasol con Q-(In-APS) y Q-In	54
Figura 19. Gráficos de la formación y distribución de compuestos de oxidación en LM y AG sin y con micropartículas flavonoides-In-APS, sometidos a condiciones aceleradas de oxidación a 60°C	58
Figura 20. Gráficos de la formación de CP y retención de α -tocoferol en aceite girasol AG sin y con micropartículas flavonoides-In-APS durante los ensayos de almacenamiento en placa a 60°C	61

ABREVIATURAS

F: flavonoides

E: epicatequina

N: naringenina

Q: quercetina

In: inulina

APS: aislado proteico de soya

LM: linoleato de metilo

AG: aceite de girasol

PI: período de inducción

FP: factor de protección

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

GC: cromatografía gaseosa

HPSEC: cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño de partícula

AT: alfa-tocoferol

CP: compuestos polares

PTG: polímeros de triglicéridos

DTG: dímeros de triglicéridos

TGOx: triglicéridos oxidados

DG: diglicéridos

AGL: ácidos grasos libres.

RESUMEN

Es conocido que la presencia de antioxidantes puede incrementar la estabilidad oxidativa de los aceites y retardar su oxidación, debido a que la oxidación lipídica es la reacción que causa el deterioro de las materias grasas, conduciendo a la formación de compuestos que causan alteraciones organolépticas y nutricionales. Los flavonoides, debido a su actividad antioxidante y sus propiedades biológicas podrían ser usados como una potencial alternativa a los antioxidantes sintéticos. Sin embargo, debido a su inestabilidad y solubilidad, su aplicación directa a matrices alimenticias es limitada. La microencapsulación representa una estrategia que permite proteger y controlar la liberación de los flavonoides y superar la utilización inefectiva del flavonoide en matrices lipídicas.

El diseño de micropartículas por secado con atomización conduce a la formación de partículas sólidas que generalmente son de naturaleza amorfa. Diferentes grados de cristalización de los polvos, pueden ser obtenidos controlando las condiciones operacionales en el secado y la formulación de las dispersiones, lo que representa una buena estrategia para controlar otras propiedades físicas de las micropartículas y sus aplicaciones. Otra alternativa importante en la encapsulación de flavonoides es el diseño de micropartículas de liberación controlada, mediante la utilización de polímeros con distinta solubilidad en la matriz lipídica, un polímero insoluble en lípidos (agente encapsulante) y un polímero soluble en lípido (bajo porcentaje) que podrían permitir la liberación controlada de los flavonoides para incrementar la estabilidad oxidativa.

Con base a estos antecedentes, el objetivo de esta investigación fue estudiar dos modelos de micropartículas de flavonoides: primero micropartículas con distinto grado de cristalinidad (amorfo-semicristalino) y después micropartículas sin y con la incorporación de un agente canalizante (polímero formador de canales), para evaluar su efecto en el incremento de la estabilidad oxidativa de dos matrices lipídicas: linoleato de metilo (LM) y aceite de girasol (AG).

Micropartículas de epicatequina (E) y quercetina (Q) con distinto grado de cristalinidad, se encapsularon utilizando inulina (E-In y Q-In), la relación flavonoide/In fue de 1:41 y 1:43 respectivamente, la temperatura del aire de entrada al secador fue de 160 °C y se emplearon dos temperaturas de alimentación (15 y 90 °C) de las soluciones (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) y micropartículas de inulina sin flavonoides (In-15 y In-90), fueron usadas como control. Las propiedades físicas de las micropartículas (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90, In-15 y In-90) fueron estudiadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de rayos X (DRX). Además, se usó microscopía electrónica de barrido (SEM) y difracción de luz laser (DLL) para la caracterización de las partículas.

Todos los sistemas elaborados con temperatura de alimentación de 15 °C (In-15, E-In-15, Q-In-15) presentaron mayor grado de cristalinidad y la eficiencia de encapsulación (EE)

fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$), sobre el 67% con respecto a las formuladas a mayor temperatura (90 °C) de alimentación (E-In-90 y Q-In-90) que se caracterizaron por presentar predominio de zonas amorfas. La recuperación de flavonoides (E y Q) alcanzó valores sobre 75% para todos los sistemas estudiados (amorfo-semicristalino). La estabilidad oxidativa se evaluó a través de almacenamiento acelerado a 60 °C (Rancimat), formación de compuestos polares (columna de adsorción) y la distribución de compuestos de oxidación (HPSEC), empleando LM y AG como matrices lipídicas.

Se realizaron ensayos de estabilidad oxidativa en LM y AG con la adición de micropartículas (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) a razón de 200 mg/k LM y AG durante almacenamiento acelerado (Rancimat) a 60 °C. Se observó que los tiempos de inducción (TI) fueron significativamente mayores ($p \leq 0,05$) para los sistemas con LM+Q-In-90 y AG+Q-In-90. En los estudios realizados por almacenamiento en placa (60 °C), la formación de compuestos polares (columna de adsorción) también fue significativamente menor para los sistemas con AG+Q-In-90. En general, los resultados mostraron que el estado físico de las micropartículas (grado de cristalinidad), la estructura química del flavonoide y en particular de la Q, tiene una considerable importancia en la aplicación y el incremento de la estabilidad oxidativa de aceites.

Con respecto a la optimización de micropartículas de flavonoides (epicatequina E, naringenina N y quercetina Q) con inulina como agente encapsulante y aislado proteico de soya (APS) como agente formador de canales, se elaboraron de acuerdo con un diseño de Box-Behnken, con 15 experimentos para cada sistema (E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS)). Las variables independientes fueron: la relación flavonoide/agente encapsulante, temperatura del aire de entrada y contenido de APS. Las variables dependientes fueron: la EE y liberación de los flavonoides en hexano a los 14 días (t14) de almacenamiento. Las condiciones óptimas de encapsulación se determinaron por la metodología de superficie de respuesta (MSR) y aplicando la función deseabilidad. En todos los sistemas de micropartículas (E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS) mostraron que el contenido de agente canalizante (APS) presentó un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre la liberación de los flavonoides indicando que fue la variable independiente con un efecto positivo mayor.

El estudio de la formación de canales en las micropartículas de flavonoides-(In APS) que contienen APS se realizó mediante la técnica de microscopía confocal utilizando rojo nilo (0,1%) como fluorocromo el cual se disolvió en el AG (sistemas de 3 g de AG con rojo de Nilo y micropartículas sin y con APS (Q-In y Q-(In-APS)) en concentración equivalente a 200 mg flavonoide/Kg que fueron agitadas constantemente durante 14 días en una placa calefactora a 60 °C. Los resultados mostraron que el APS es capaz de inducir la formación de canales dentro de la micropartícula mediante la disolución del APS por el aceite, favoreciendo la interacción entre los flavonoides y el AG y su difusión hacia el aceite donde ejerce su actividad antioxidante. Para evaluar el efecto del agente canalizante (APS) se realizaron ensayos de estabilidad oxidativa (Rancimat), se prepararon sistemas de micropartículas con APS de E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS) (200 mg/kg) con la formulación óptima de F/In y temperatura del aire de entrada al secador, mientras que el contenido de APS se fijó en un 5% (respecto a la inulina), para que los sistemas fueran comparables. Micropartículas de flavonoide-In sin agente

canalizante fueron usadas como control (E-In, N-In y Q-In). El estudio de la estabilidad oxidativa mostró que la adición de flavonoides encapsulados al LM y AG produjo un aumento significativo en el TI y el factor de protección y fue mayor para los sistemas de LM + Q-(In-APS) y AG+ Q-(In-APS). Además, disminuyeron significativamente la formación de compuestos polares y se retardaron las reacciones de polimerización. Contrariamente los sistemas con N sin y con APS no ejercieron ningún efecto sobre la estabilidad oxidativa (TI) y por lo tanto no fueron considerados en los estudios posteriores.

En esta investigación se observó que la encapsulación de flavonoides en los distintos sistemas de micropartículas (distinto grado de cristalinidad) y en micropartículas con la incorporación de APS (agente formador de canales) constituyen efectivos diseños para la liberación de los flavonoides y determinan la aplicabilidad de las micropartículas en matrices lipídicas.

ABSTRACT

It is well known that the presence of antioxidants can increase the oxidative stability and delay the oxidation of oils due to the fact that lipid oxidation is one of the main reactions that cause the deterioration of fats, giving rise to compounds that are responsible for organoleptic and nutritional changes. The flavonoids, due to their antioxidant activity and biological properties, represent a potential alternative to synthetic antioxidants. However, the incorporation of free flavonoids into food systems has some drawbacks since they show limited solubility and stability. Microencapsulation could enhance the stability of flavonoids, control their release into lipid systems, and overcome their ineffectual usage in lipid matrices.

The design of microparticles prepared by spray drying leads to solid particles, but these are usually amorphous. Different degrees of crystallization can be achieved in the powder materials and controlled by maintaining appropriate operating conditions within the dryer and formulation of the liquid materials, and this is a useful strategy to control other physical properties of microparticles and their applications. Another important possibility is the design of flavonoid microparticles for controlled release using polymers with different solubility in the lipid matrix. A lipid-insoluble polymer (encapsulating agent) and a lipid-soluble polymer (in a low percentage), could allow the release of flavonoids, to improve oxidative stability in a lipid system.

Based on the abovementioned background, the goal of this research was to study two models of flavonoid microparticles: first, microparticles with different degrees of crystallinity (amorphous or semicrystalline) and then, microparticles with and without the addition of a channeling agent (a channel-forming polymer), to assess their effects on the oxidative stability of two lipid matrices, methyl linoleate (ML) and sunflower oil (SO).

Epicatechin (E) and quercetin (Q) microparticles with different degrees of crystallinity were encapsulated by spray-drying, using inulin (E-In and Q-In), in the flavonoid/encapsulating agent ratios 1:41 and 1:43 respectively, with inlet air temperature 160 °C, and feed temperatures 15 and 90 °C (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90). Inulin microparticles without flavonoids were used as controls (In-15 y In-90). The physical properties of the microparticles were evaluated by differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (DRX). In addition, scanning electron microscopy (SEM) and laser light diffraction (DLL) were used to characterize the surface and particle shape of the powder.

All the systems prepared with a feed temperature of 15 °C (In-15, E-In-15, Q-In-15) were more highly crystalline, and the encapsulation efficiency (EE) was significantly higher ($p \leq 0,05$) by 67%, whereas at higher feed temperatures (E-In-90 y Q-In-90),

predominantly amorphous samples were obtained. The recovery of flavonoids (E and Q) was greater than 75% for all the studied systems (amorphous-semicrystalline). The oxidative stability was evaluated through accelerated storage at 60 °C (Rancimat), formation of polar compounds were determined (by adsorption column chromatography), and the distribution of oxidation compounds was studied using HPSEC in ML and SO.

Oxidative stability tests were performed in LM and AG with the addition of microparticles (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) in amounts equivalent to 200 mg flavonoid/kg LM and AG using a Rancimat at 60°C. The induction periods (IP) were significantly higher ($p \leq 0,05$) for systems with LM + Q-In-90 and AG + Q-In-90. Assays after long-term storage (60° C), showed that the formation of polar compounds (adsorption column) was also significantly ($p \leq 0,05$) lower for systems with AG + Q-In-90. Overall, the results showed that the physical state of the microparticles (degree of crystallinity), and the chemical structure of the flavonoid, particularly Q, is very important for this application and to increase the oxidative stability of oils.

Regarding the optimization of flavonoid microparticles (epicatechin E, naringenin N and quercetin Q) using Inulin (In) as the encapsulating agent, and soy protein isolate (SPI) as the channeling agent, a Box–Behnken design was used with 15 runs each (E–In–SPI, N–In–SPI and Q–In–SPI). The flavonoid/In ratio (1:20–1:50), inlet air temperature (120–160 °C), and SPI content (0–1.7 g) were evaluated as independent variables, whereas EE and flavonoid release into hexane at day 14 of storage (t14) were the dependent variables. Response surface methodology (RSM) and desirability function were used to determine the optimal conditions of flavonoid encapsulation for each system. All the microparticle systems (E-(In-APS), N-(In-APS) and Q-(In-APS) showed that the SPI content had a significant effect ($p \leq 0,05$) on flavonoid release, suggesting a larger positive effect of this independent variable.

Confocal laser scanning microscopy was used to confirm the formation of channels within the flavonoid microparticle (In SPI) systems with SPI (Nile red 0.1% as the fluorochrome) was dissolved in SO (3g), and flavonoid microparticles (E–In, Q–In, E–In–SPI, and Q–In–SPI) were dispersed in amounts equivalent to 200 mg flavonoid/kg oil. The dispersions were stirred for 14 days on a heating block at 60 °C. The image results showed that SPI induces the formation of channels within the microparticle by dissolution of SPI molecules, forming channels inside the network and thus favoring the oil-encapsulated flavonoid interaction and its diffusion into the bulk oil.

To evaluate the effect of the channeling agent (SPI), oxidative stability trials were done using flavonoid microparticles with SPI (E-(In-SPI), N-(In-SPI) and Q-(In-SPI) obtained under optimal conditions of flavonoid encapsulating agent ratio and inlet temperature of the dryer, keeping the SPI content at 5% (with respect to inulin), so that the systems were comparable. Flavonoid microparticles without SPI were used as controls (E-In, N-In and Q-In). The addition of encapsulated flavonoids to ML and SO caused a significant increase in the IP and the protection factor, and was higher for the LM + Q-(In-SPI) and AG+ Q-(In-SPI) systems. In addition, the formation of polar compounds decreased

significantly and polymerization reactions were delayed. Conversely, systems with N either without or with SPI did not have any effect on oxidative stability (IP).

This research showed that flavonoid encapsulation in the different microparticle systems (different degree of crystallinity) and microparticles with the incorporation of SPI (channel forming agent) are effective design features for flavonoid release and determine the applicability of microparticles in lipid matrices.

INTRODUCCION

Las grasas y los aceites pueden experimentar reacciones de oxidación durante el procesamiento y almacenamiento, conduciendo a la formación de olores y sabores desagradables (*off-flavours*), pérdida de nutrientes y formación de compuestos potencialmente tóxicos (Frankel, 1998; Valenzuela *et al.*, 2003; Pool *et al.*, 2012). Entre los métodos empleados para retardar el deterioro oxidativo, se destaca el uso de antioxidantes naturales o sintéticos. Sin embargo, los antioxidantes sintéticos están siendo cuestionados por sus posibles efectos adversos sobre la salud de los consumidores (Ito *et al.*, 1985), siendo la tendencia actual su remplazo por antioxidantes naturales. Entre los antioxidantes naturales, se encuentran los polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos), algunos de ellos han mostrado efectos protectores frente a la oxidación lipídica (Yu *et al.*, 2005; Schinella *et al.*, 2000; Sultana *et al.*, 2007), mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno o electrones al radical peroxil y quelación de metales (Huber *et al.*, 2009; Madsen *et al.*, 2000).

En este contexto, la utilización de flavonoides como antioxidantes naturales, representa una buena alternativa para incrementar la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas. Sin embargo, la adición de flavonoides en forma libre a materias grasa puede presentar algunas desventajas, debido a su limitada solubilidad e inestabilidad por efecto de factores ambientales (oxígeno, luz, temperatura entre otros), siendo necesario en algunos casos adicionar altas cantidades para lograr el efecto deseado. En este contexto, la encapsulación de los flavonoides mediante la técnica de secado por atomización representa una herramienta que permite proteger y controlar la liberación de flavonoides.

En esta tesis se plantea diseñar micropartículas de flavonoides con inulina como agente encapsulante ya que es un polímero insoluble en matrices lipídica. Se estudiaron dos modelos de micropartículas:

1.- *Micropartículas con distinto grado de cristalinidad* (amorfo o sólido cristalino). Dependiendo de las condiciones operacionales del secado y en particular de la temperatura de alimentación de la inulina, se pueden obtener micropartículas con distinto grado de cristalinidad (Ronkart *et al.*, 2007).

2.- *Micropartículas con agente canalizante*. Incorporación de un polímero como aislado proteico de soya (APS) que facilite la formación de canales en las micropartículas (Song *et al.*, 2005) favoreciendo la liberación gradual de los flavonoides al medio lipídico (AG y LM) e incrementando la estabilidad oxidativa.

1.1. Oxidación lipídica

La oxidación lipídica es un proceso complejo, que conduce a alteraciones en las características organolépticas (rancidez), pérdida de nutrientes esenciales y formación de productos de oxidación potencialmente tóxicos (Frankel, 1998; Gordon, 1991; Guardiola *et al.*, 2002).

La estabilidad oxidativa de los lípidos depende de factores intrínsecos y extrínsecos que incluyen el grado de insaturación de los ácidos grasos, la presencia de componentes minoritarios (trazas de metales, clorofila y antioxidantes endógenos), las condiciones ambientales (luz, temperatura, oxígeno) y el uso de antioxidantes entre otros (Márquez-Ruiz *et al.*, 2008; Choe y Min, 2006; Pool *et al.*, 2012; Shahidi y Zhong, 2010).

La autooxidación lipídica comprende una serie de reacciones, vías radicales libres en tres etapas: iniciación, propagación y término (Yanishlieva y Marinova, 2001). Durante la iniciación, un radical libre o iniciador extrae el átomo de hidrógeno desde un ácido graso o acilglicerol insaturado (RH) produciendo un radical alquil (R^\bullet). El átomo de hidrógeno no es liberado espontáneamente de la molécula lipídica, requiere la presencia de un iniciador o catalizador como: luz, trazas de metales e impurezas presentes en los lípidos (Frankel, 2005). El radical alquil formado (R^\bullet) en la etapa de iniciación, reacciona difusionalmente con el oxígeno formando un radical peroxil (ROO^\bullet). A su vez, ROO^\bullet puede abstraer un átomo de hidrógeno desde otra molécula de un ácido graso insaturado (RH) para formar un hidroperóxido (ROOH) y un radical alquil (R^\bullet) que propaga la reacción en cadena (Belitz, 1997). Finalmente, en la etapa de terminación, los radicales reaccionan entre sí para producir compuestos no radicalarios relativamente estables. El mecanismo de la reacción se describe en el esquema de la Figura 1.

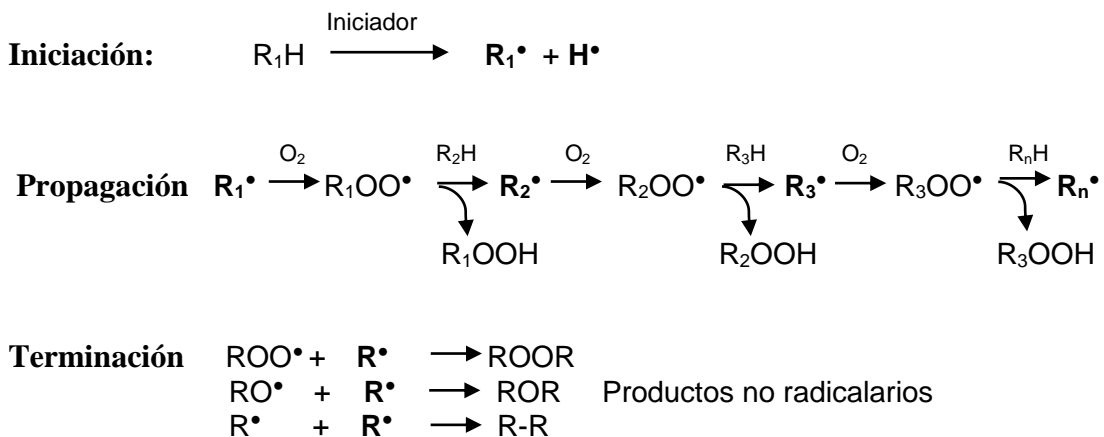


Figura 1. Ecuaciones del mecanismo de autooxidación de lípidos (Shahidi y Zhong, 2010)

Se conoce que el paso que determina la velocidad de la reacción es la propagación, la cual conduce a la formación de hidroperóxidos (ROOH), los cuales corresponden a los compuestos primarios de oxidación. Sin embargo, cuando los hidroperóxidos se acumulan en altas concentración, la velocidad de descomposición puede ser mayor que su formación (Velasco *et al.*, 2010). El proceso puede acelerarse a altas temperaturas y se denomina deterioro termooxidativo.

1.1.1. Compuestos de autooxidación lipídica

En las reacciones de autooxidación lipídica se producen hidroperóxidos (ROOH), son compuestos intermediarios e inestables y que constituyen una fracción importante de los compuestos de oxidación. En condiciones de temperaturas moderadas los hidroperóxidos se acumulan y a altas temperaturas se descomponen rápidamente (Dobarganes, 1988), produciendo una gran variedad de productos de oxidación secundarios como: aldehídos, cetonas, alcanos, alcoholes, siendo los principales responsables de la típica rancidez *off-flavours*.

Las posibles vías de descomposición de hidroperóxido y formación de productos secundarios volátiles y no volátiles se muestran en la Figura 2. La descomposición de hidroperóxidos a través de la escisión del enlace O-O del hidroperóxido (ΔE 44 Kcal/mol) a la forma alcoxil e hidroxil, es termodinámicamente más favorable que la escisión del enlace O-H que requiere una alta energía de activación (ΔE 90 Kcal/mol) (Shahidi y Zhong, 2010).

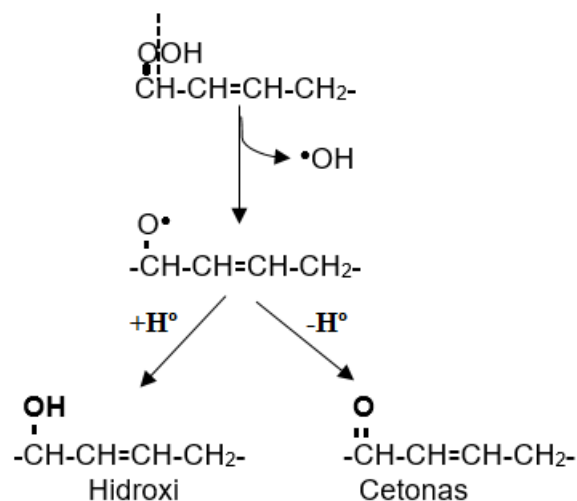


Figura 2. Mecanismo de formación de compuestos secundarios de oxidación con funciones hidroxil y cetona (Shahidi y Zhong, 2010).

Los compuestos secundarios que se forman durante la autooxidación lipídica se conocen como compuestos polares (CP), porque poseen una polaridad mayor que los triglicéridos

no alterados. Los CP incluyen: triglicéridos oxidados (TGOx), dímeros de triglicéridos (TGD), polímeros de triglicéridos (PTG), diglicéridos (DG) y ácidos grasos libres (AG) (Holgado, 2011). Los CP se forman y se acumulan desde el inicio del proceso, permanecen en la materia grasa, en consecuencia, tienen un impacto nutricional y biológico al ser ingeridos con el alimento.

1.1.2. Evaluación de la oxidación lipídica y la estabilidad oxidativa

Para determinar el nivel de oxidación de aceites y materias grasas se han desarrollado un gran número de métodos analíticos, no obstante, no existe un único método que permita evaluar el grado de oxidación de manera precisa, por lo tanto, la aplicación de métodos combinados resulta ser lo más adecuado (Frankel, 2005).

Las técnicas cromatográficas pueden ser utilizadas tanto para la detección de compuestos primarios (hidroperóxidos) como de compuestos secundarios (compuestos polares) de oxidación. Para evaluar los compuestos secundarios de oxidación, la determinación de CP ha resultado ser uno de los métodos más exactos, representativos y reproducibles, proporcionando una medida directa de la degradación de un lípido (Dobarganes *et al.*, 1988; 2007). La determinación de CP se realiza por cromatografía de adsorción (AOCS, 1993), la cual se basa en separar la fracción polar (triglicéridos alterados) de la fracción no polar (triglicéridos no alterados) de una muestra de aceite o grasa, a través de una columna de adsorción de sílica gel activada, utilizando solventes orgánicos (éter de petróleo y éter dietílico) como fase de elución. Por otra parte, la cromatografía de exclusión por tamaño HPSEC (Márquez-Ruiz *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2010) permite determinar la distribución de compuestos polares en especies de deterioro térmico, oxidativo e hidrolítico. Algunos estudios realizados demostraron que el uso de columnas de 500 Å permite la separación mediante inyección directa, pero si estas columnas se utilizan en serie con columnas de 100 Å la separación es más efectiva. La cromatografía líquida de exclusión por tamaño (HPSEC) se correlaciona bien con el método de cromatografía en columna abierta, los resultados son reproducibles y requiere menor cantidad de muestra y de solventes (Márquez-Ruiz *et al.*, 2007). Existen otras técnicas como Rancimat (AOCS, 1993), que permiten medir la estabilidad oxidativa de lípidos en forma acelerada, donde la materia grasa es sometida a calentamiento en presencia de un flujo de aire, determinando el tiempo de inducción (TI).

Para prevenir y retardar la formación de productos de oxidación en las matrices lipídicas, la herramienta más utilizada es la adición de antioxidantes sintéticos y/o naturales (Yanishlieva, 2004).

1.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos orgánicos de origen natural o sintético, que en determinadas concentraciones son capaces de retrasar o prevenir la oxidación de sustratos oxidables (Halliwell, 1995). Los antioxidantes sintéticos como: hidroxibutilanisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terbutil-hidroquinona (TBHQ) y galato de propilo (GP) son ampliamente utilizados en la industria de alimentos, debido a su bajo costo. Sin embargo, estos compuestos son volátiles y se descomponen a altas temperaturas. Además, existen controversias por su potencial toxicidad y los posibles efectos adversos a la salud (Sultana *et al.*, 2007; Schinella *et al.*, 2000). En este contexto, la tendencia actual en la industria de alimentos es emplear antioxidantes naturales, eficientes y seguros como sustitutos a los antioxidantes sintéticos (Yu *et al.*, 2005; Kosaraju *et al.*, 2006).

Los antioxidantes naturales son metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en vegetales, hongos y en los tejidos de algunos animales donde cumplen funciones biológicas y de protección (Halliwell, 1995; Barclay y Vinquist, 2003). Entre los principales antioxidantes naturales se encuentran los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles), carotenoides y uno de los grupos mayoritarios corresponde a los polifenoles (Harbone y Williams, 2000). Los polifenoles incluyen una amplia gama de compuestos, desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados como taninos y lignanos, siendo los flavonoides uno de grupos más numerosos e importantes (Manach *et al.*, 2004). Los flavonoides han demostrado ser eficientes antioxidantes, por lo tanto, representan una alternativa a los antioxidantes sintéticos (Yanishela y Marinova, 2001; Chambi *et al.*, 2013).

1.2.1. Flavonoides

Los flavonoides son sintetizados como metabolitos secundarios de las plantas y se encuentran distribuidos en hojas, frutas y flores, donde brindan protección frente a agentes oxidantes y absorben cierta radiación ultravioleta (Manach *et al.*, 2004; Sansone *et al.*, 2011).

Los flavonoides (Figura 3) derivan de la benzo- γ -pirona, presentan una estructura básica común de difenilpiranos compuesto por dos anillos fenil (A y B) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, que usualmente forman un heterociclo oxigenado (anillo C) (Rice-Evans *et al.*, 1996; Manach *et al.*, 2004). La biosíntesis de esta unidad C₆-C₃-C₆ deriva de dos rutas. El anillo A proviene de una molécula de resorcinol o floroglucinol sintetizada en la ruta del acetato, mientras que el anillo B se origina en la ruta del shikimato (Harborne, 1989). Los flavonoides pueden encontrarse en forma libre (aglicona) o en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar (*O*-glicósidos), siendo la D-glucosa el azúcar más frecuente, en la posición C₃ del anillo C y con menor frecuencia en la posición C₇ del anillo A (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

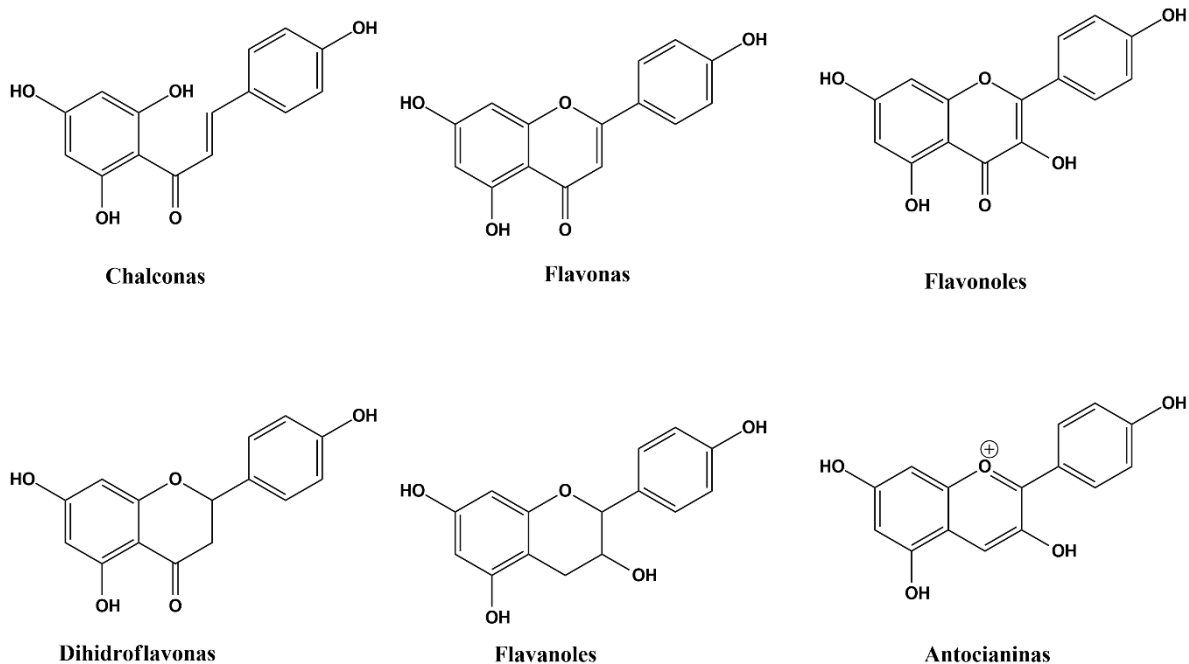


Figura 3. Estructura química de flavonoides

1.2.2. Acción antioxidante de los flavonoides.

La capacidad antioxidante de los flavonoides (AH) se atribuye a su habilidad para transferir un átomo de hidrógeno o electrones a radicales libres (como el radical peroxil), actuando como quebradores de cadena. El radical fenoxil (A^\bullet) formado es estabilizado por resonancia, pero también pueden reaccionar con otros radicales libres para formar aductos neutros no reactivos (Sansone *et al.*, 2011; Velasco *et al.*, 2010 y Madsen *et al.*, 2000). Al mismo tiempo, los radicales fenoxil pueden promover el atrapamiento de radicales libres favoreciendo la terminación de la oxidación. La representación de este mecanismo se muestra en las figuras 4 (A y B) (Shahidi y Zhong, 2010).

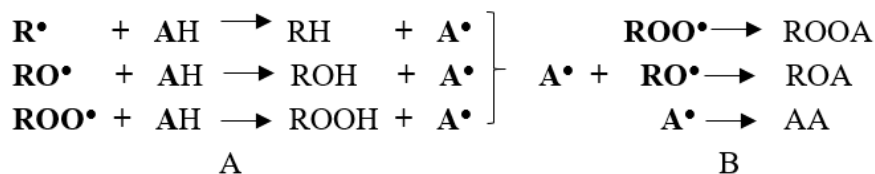


Figura 4. Ecuaciones que describen la acción antioxidante de los flavonoides (A) y reacciones de terminación con el radical flavonoide (B).

Algunos criterios estructurales que confieren una mayor actividad antioxidante a los flavonoides son:

- Presencia de estructura orto-dihidroxi en el anillo B; que le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones (Bors *et al.*, 1997; Rice-Evans *et al.*, 1996).
- Presencia de un doble enlace 2,3 en conjunción con la función 4-oxo del anillo C (Letan, 1996).
- Presencia de grupos hidroxilos en posición 3 y 5 (OH) en el anillo A y función 4-oxo en el anillo C desglicosilado. Así, por ejemplo, el potencial antioxidante de quercetina es más activo que su glicósido 3-*O*-rutinina (Quideau *et al.*, 2011).
- La actividad antioxidante depende de los sustituyentes en la molécula, esta habilidad decrece con sustituyentes voluminosos que dificultan la reacción por impedimento estérico (Velasco *et al.*, 2010).

La actividad antioxidante de los flavonoides dependerá de diversos factores, principalmente de la estructura química, la estabilización del antioxidante radical, la cinética de la reacción la cual involucra la velocidad a la cual el antioxidante reacciona con radicales específicos, las condiciones experimentales, la concentración del antioxidante y accesibilidad del antioxidante al lugar de acción, determinado por el carácter lipofílico o hidrofílico, la naturaleza del sustrato y la presencia de otros componentes en la matriz alimenticia (Shahidi y Zhong, 2010; Frankel, 2005).

1.2.3. Uso de flavonoides libres en la estabilización de matrices lipídicas

En general, la relación estructura-actividad antioxidante de los flavonoides se ha estudiado principalmente en matrices hidrofílicas y en matrices lipídicas los estudios aún son limitados. Algunas investigaciones han evaluado la actividad antioxidante de los flavonoides en la estabilidad de materias grasas, por ejemplo en linoleato de metilo a temperaturas menores a 60 °C, encontrando que la actividad antioxidante de los flavonoides depende del número de grupos hidroxilos en el anillo B, principalmente en posición orto y para; así como la presencia de un doble enlace en la posición 2,3 del anillo C y de la glicosilación de la molécula (Pekkarinen *et al.*, 1999; Pedrielli y Skibsted, 2002).

Se reportó que el uso de polifenoles impide o retarda la formación de hidroperóxidos en linoleato de metilo almacenado a temperaturas moderadas (40 °C), de acuerdo con el siguiente orden: miricetina > quercetina > alfa-tocoferol > (+)-catequina > kaempferol > rutina (Pekkarinen *et al.*, 1999). Pedrielli y Skibsted (2002), reportaron que la quercetina

fue más eficiente para inhibir la oxidación de linoleato de metilo, respecto a (-)-epicatequina y (+)-catequina, a temperaturas de almacenamiento de 50 °C. En aceites de origen vegetal se evaluó el efecto de la adición de flavonoides libres (pelargonina, cianidina, quercetina y mirecitina) y ácido gálico, en aceite de maíz refinado a distintos tiempos de fritura, mostrando un aumento de la estabilidad oxidativa del aceite de maíz, de acuerdo con el siguiente orden ácido gálico>quercetina, mirecitina > cianidina > pelargonina (Naz *et al.*, 2008). Estudios realizados en aceite de algodón con la adición de quercetina, (+)-catequina y luteolina, almacenados a 70 °C, reportaron un alto efecto antioxidante de los flavonoides (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2007). En aceite de linaza prensado en frío almacenado a 60°C, la adición de las isoflavonas, como genisteína presentó un efecto limitado, en la protección contra la oxidación (Russin *et al.*, 2006). En aceite de canola almacenado a 95°C, la adición de polifenoles extraídos y purificados del té negro (teaflavinas y catequinas) mostraron una mayor protección antioxidante de las catequinas respecto a las teaflavinas (Su *et al.*, 2004). En otra investigación realizada con aceite de canola (65°C) con antioxidantes mirecitina, (-) epicatequina, rutina, quercetina y morina, se encontró una alta protección de todos los flavonoides (Wanasundara y Shahidi, 1998). Con respecto a la estabilidad oxidativa de grasas de origen animal con flavonoides se han realizado estudios en matrices como grasa de cerdo (70°C), donde se evaluó el potencial antioxidante de baikaleína, quercetina, dihidroquercetina, genisteína y daidzeína, siendo la baikaleína la que presentó la más alta protección (Antoshina *et al.*, 2005). En aceite de sardina (60 °C) adicionado de catequina, morina ó quercetina, mostraron un alto efecto protector (Nieto *et al.*, 1993).

La variabilidad de los resultados encontrados en los distintos estudios de estabilidad oxidativa realizados con flavonoides, han demostrado un efecto alto, moderado o bajo en matrices lipídicas, lo que indica que la actividad antioxidante depende del tipo de flavonoides, el tipo de matriz (insaturación de la materia grasa), condiciones experimentales (temperatura de almacenamiento y presencia o ausencia de oxígeno, entre otras) y las técnicas utilizadas para medir la oxidación lipídica (formación de peróxidos, tiempo de inducción y formación de compuestos polares, entre otros).

No obstante, el inconveniente de aplicar flavonoides en forma libre a materias grasas es su inestabilidad frente a condiciones ambientales, procesamiento y/o almacenamiento (oxígeno, luz y temperatura). Por otro lado, su limitada solubilidad podría afectar la disponibilidad del flavonoide (Chebil *et al.*, 2007, Sansone *et al.*, 2011), siendo necesaria la adición de concentraciones elevadas para obtener los efectos deseados. Sin embargo, los niveles excesivos pueden causar la prooxidación y la aceleración de la oxidación lipídica (Stöckmann y Schwarz, 2005).

En este contexto, la pregunta que surge es: ¿cómo mejorar la permanencia del flavonoide en la matriz lipídica y su efectividad? En este sentido, la encapsulación representaría una potencial tecnología para proteger, aumentar la estabilidad de los

flavonoides y controlar su liberación en matrices lipídicas (Fang y Bhandari, 2010, Deladino *et al.*, 2008; Sansone *et al.*, 2011, Palma *et al.*, 2014). Actualmente, se dispone de limitada información sobre el efecto de la adición de micropartículas de flavonoides sobre la oxidación de matrices lipídicas. En esta investigación se encapsulará epicatequina (E), naringenina (N) y quercetina (Q) (seleccionados en base a sus diferencias estructurales, Figura 5), considerando que las micropartículas de flavonoides adicionados a matrices lipídicas podrían aumentar el tiempo de inducción e incrementar la estabilidad oxidativa.

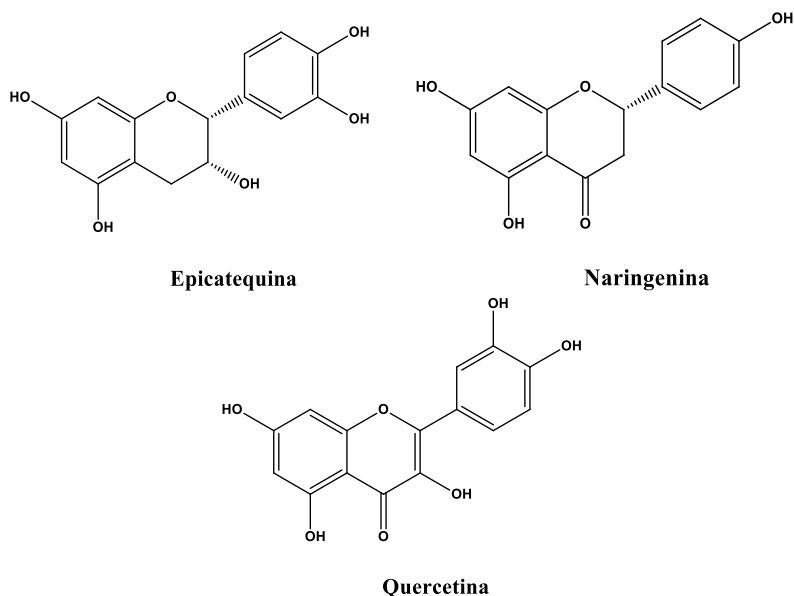


Figura 5. Estructura química de los flavonoides epicatequina (E), naringenina (N) y quercetina (Q).

1.3. Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica mediante la cual compuestos activos, sólidos o líquidos, dispersos en una solución o medio líquido, se introducen en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica, con el propósito de proteger los activos de distintos factores ambientales (humedad, pH, oxígeno y temperatura entre otros), de su interacción con otros componentes del alimento o bien para controlar la liberación del activo (Desai y Park, 2005; Zuidam y Shimoni, 2010).

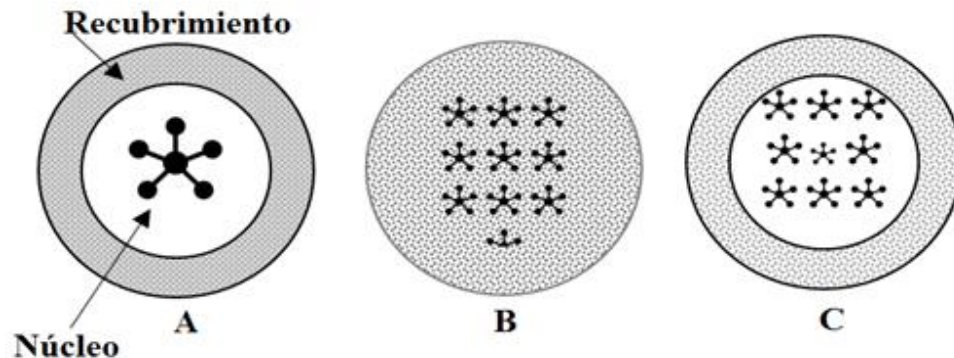


Figura 6. Representación de distintos tipos de micropartículas: A) reservorio B) matricial y C) matriz revertida. Únicamente se muestran encapsulados de forma esférica, pero también pueden ser de forma cilíndrica, ovalada o irregular (Adaptado de Zuidam y Shimoni, 2010 y Desai y Park, 2005).

La microencapsulación en general permite producir microcápsulas o microesferas dependiendo del tipo de material y del proceso de encapsulación (Gharsallaoui *et al.*, 2007). En la Figura 6, se muestra una representación esquemática de los principales tipos de micropartículas.

Los sistemas tipo reservorio presentan una estructura más simple, el material activo o núcleo se encuentran en el interior incluido en una especie de reservorio, rodeado por un material de recubrimiento, pared o encapsulante, formando una o varias capas concéntricas uniforme (Figura 6A). Mientras que, en los sistemas de micropartículas tipo matricial el compuesto activo se encuentra altamente disperso y en forma continua en la matriz polimérica. Parte del compuesto activo puede quedar expuesto superficialmente en la partícula (Figura 6B). También se pueden obtener sistemas mixtos o de matriz revertida (Figura 6C), cuando se usa más de un método de encapsulación y/o se adiciona otro encapsulante para aumentar la protección y controlar la liberación (Zuidam y Shimoni, 2010; Desai y Park, 2005; Krishnaiah *et al.*, 2014).

1.3.1. Encapsulación de flavonoides.

En la actualidad, las técnicas usadas para la encapsulación se basan en procesos químicos y procedimientos físicos. Cada método presenta ventajas y limitaciones, de este modo la selección del método de encapsulación dependerá de las propiedades del activo o producto que se quiera encapsular, el tamaño deseado y el estado físico de las micropartículas, así como la aplicación y la liberación en un sistema (Guevara-Bretón y Jiménez-Munguía, 2008).

Para la encapsulación de flavonoides, se han utilizado distintas técnicas: coacervación (Deladino *et al.*, 2008), atrapamiento por liposoma, inclusión en complejos, co-cristalización, nano-encapsulación (Hu *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2008), liofilización, emulsificación y secado por atomización (Fang y Bhandari, 2010; Robert *et al.*, 2016). En la Tabla 1 se presenta un resumen de estudios realizado sobre encapsulación de flavonoides empleando distintas técnicas de microencapsulación.

En esta investigación se empleará la técnica de secado por atomización (*spray-drying*), que es el método de encapsulación más empleado en la industria de alimentos, por la versatilidad de las aplicaciones, la facilidad de industrialización y por los bajos costos de producción (Krishnaiah *et al.*, 2014; Nazzaro *et al.*, 2012; Fang y Bhandari, 2010).

Tabla 1. Diferentes métodos de encapsulación de flavonoides.

Flavonoides	Agente Encapsulante	Método	Referencias
Quercetina	PCL (<i>E</i> -caprolactone) Pluronic F127 (mg)	Nanopartículas	Kumar <i>et al.</i> , 2015
Quercetina	Alginato y quitosano	Reticulación iónica	Hazra <i>et al.</i> , 2015
Epicatequina, quercetina y naringenina	Inulina e Hidroxipropil celulosa	Secado por atomización	Palma <i>et al.</i> , 2014
Quercetina	Quitosano/Goma Xantan Hidrogel	Secado por atomización	Caddeo <i>et al.</i> , 2014
Naringenina y Rutinina.	Glicerina y propilenglicol.	Vesículas de multicapas	Kerdudo <i>et al.</i> , 2014
Quercetina y catequina	Poli (D-ácido láctico-co glicólico)	Nanopartículas	Pool <i>et al.</i> , 2012
Quercetina y Naringenina	Acetato-ftalato de celulosa (CAP)	Secado por atomización	Sansone <i>et al.</i> , 2011
Quercetina	Polivinil alcohol (PVA) y Eudragit	Nanopartículas	Wu <i>et al.</i> , 2008
Naringina y Naringenina	Acetato ftalato de celulosa (CAP)	Secado por atomización	Lauro <i>et al.</i> , 2007
Quercetina y Rutina	Acetato ftalato de celulosa (CAP),	Secado por atomización	Lauro <i>et al.</i> , 2005

1.3.2. Secado por atomización.

La encapsulación por secado por atomización o aspersión (*spray-drying*) ha tenido un crecimiento importante en el área de alimentos, inicialmente para la producción de sólidos a partir de líquidos. Actualmente, su aplicación se ha ampliado a la estabilización de compuestos lábiles (Fang y Bhandari, 2010; Sansone *et al.*, 2011; de Souza *et al.*,

2013) y a la liberación controlada de activos bajo condiciones específicas (Beirao da Costa *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013).

El secado por atomización es un método físico, que involucra distintas etapas: 1) preparación de la solución, dispersión o emulsión y 2) atomización continua de un líquido (solución, dispersión o emulsión) en forma de finas gotas, en una corriente de aire caliente, donde se produce transferencia de calor y masa, dando como producto final un polvo. Entre las ventajas de esta técnica, se encuentra que es un método recomendado para materiales sensibles a altas temperatura, porque los tiempos de secado son cortos (5 a 30 s). En esta técnica se obtienen micropartículas en polvos principalmente del tipo matricial (Figura 6B), las partículas obtenidas presentan bajos contenidos de humedad y baja actividad de agua (Murugesan y Orsat, 2011; Gharsallaoui *et al.*, 2007, de Vos *et al.*, 2010) favoreciendo la preservación del producto durante el almacenamiento y la estabilidad microbiológica.

Para la encapsulación de compuestos bioactivos por secado por atomización, los agentes encapsulantes deben presentar una alta solubilidad del polímero o al menos ser dispersables en medio acuoso, permitiendo incorporar una alta cantidad de sólidos, y una baja viscosidad en las soluciones concentradas (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Entre los principales polímeros utilizados se encuentran las proteínas (lácteas, de origen vegetal y las extraídas a partir del colágeno de animales como la gelatina), lípidos y polisacáridos (gomas y alginato entre otros). La selección del agente encapsulante dependerá del material a encapsular, de las características deseadas en el producto final y de la aplicabilidad de las micropartículas (García-Ceja y López-Malo, 2012). En esta investigación, la inulina (In) se seleccionó como agente encapsulante, por su habilidad para encapsular compuestos bioactivos y porque es insoluble en sistemas lipídicos, actuando como una matriz inerte (García *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014).

1.3.3. Uso de micropartículas de flavonoides en la estabilización de matrices lipídicas

Se dispone de limitada información sobre el efecto de la adición de micropartículas de antioxidantes sobre la oxidación de matrices lipídicas. En investigaciones previas, micropartículas de polifenoles de té (Deng y Yu, 2004), micropartículas de quercetina con etilcelulosa y proteína de soya (Chun *et al.*, 2005) y micropartículas de flavonoides extraídos de *Cuscuta chinensis* con β -ciclodextrina, goma arábica y etilcelulosa (Chun *et al.*, 2006) exhibieron actividad antioxidante, mostrando un efecto protector frente a la oxidación de aceites. En la investigación realizada por Palma *et al.* (2017) adicionó a metil linoleto micropartículas de E y Q con inulina y capsul, encontrando que las micropartículas de Q aumentaron la estabilidad oxidativa (TI) y retardaron la formación de compuestos de oxidación.

1.3.4. Diseño de micropartículas con flavonoides

En esta tesis se diseñaron micropartículas de flavonoides con inulina como agente encapsulante (polímero insoluble en matrices lipídicas), utilizando dos tipos de formulaciones:

- micropartículas con inulina de diferentes grados de cristalinidad (Parte I)
- micropartículas con inulina y la incorporación de un agente canalizante que sea soluble en matrices lipídicas (aislado proteico de soja (APS)) (Parte II)

La inulina es un polisacárido de origen natural, que se extrae principalmente de la chicoria (*Cichorium intybus*), químicamente es un fructooligosacárido (FOS) ligeramente ramificado (1-5%), compuesto principalmente por unidades de fructosa unidas mediante enlaces β -(2-1) con una unidad de glucosa al final de la cadena (Figura 7). La inulina es un biopolímero reconocido generalmente como seguro (GRAS) (Stevens *et al.*, 2001).

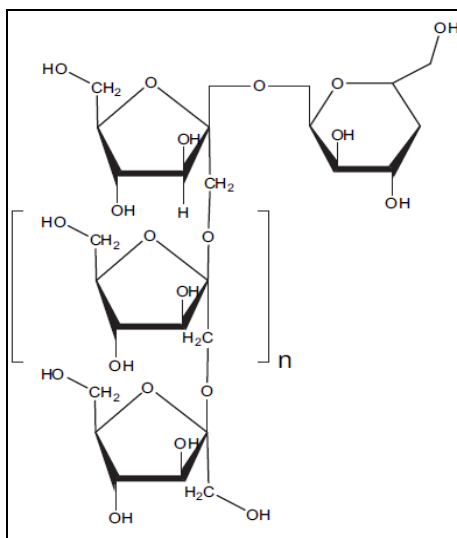


Figura 7. Estructura de la inulina
(Fuente: de Vos *et al.*, 2010).

En la encapsulación por secado con atomización, la evaporación rápida de la solución durante el secado conduce a un material en forma sólida principalmente de naturaleza amorfo. Los sólidos en estado amorfo son definidos como no cristalinos, donde las moléculas se encuentran en un estado desordenado con movilidad molecular limitada. Además, las micropartículas amorfas se asocian con pegajosidad (*stickiness*), es decir, a fenómenos de cohesión partícula-partícula y partícula-pared del secador (Chiou y Langrish, 2007; Woo *et al.*, 2008), lo cual lleva a un bajo rendimiento y además puede afectar las propiedades de flujo (Das y Langrish, 2012). En contraste, los sólidos cristalinos tienen una estructura molecular ordenada, reduciendo significativamente el

efecto de peajosidad “*stickines*” e incrementando la estabilidad durante el almacenamiento (Chiou y Langrish, 2007, Das y Langrish, 2012). Previos reportes, sugieren que diferentes grados de cristalización en polvos pueden ser obtenidos controlando las condiciones operacionales durante el proceso de secado (Islam *et al.*, 2010a; Langrish, 2008). Estudios en lactosa y sucrosa, sugieren que la cristalinidad de los productos obtenidos por secado por atomización es fuertemente dependiente de la temperatura de transición vítrea de los componentes (Langrish, 2008). Por otra parte, la velocidad de cristalización de los sólidos durante el secado depende de la diferencia entre la temperatura de las micropartículas (que se aproxima a la temperatura del aire de salida del secador) y la temperatura de transición vítrea de las micropartículas (T_g) (Islam *et al.*, 2010b).

En el caso particular de la inulina, el grado de cristalinidad depende principalmente de la temperatura de alimentación de la dispersión y de la temperatura del aire de entrada al secador, que condiciona la solubilidad de la inulina y la viscosidad de la dispersión. Ronkart *et al.* (2007), encontraron que la temperatura de secado (120-230°C) y la temperatura de alimentación de la dispersión (40-95°C), tuvieron un efecto significativo en la morfología de las micropartículas y el grado de cristalinidad.

El aislado proteico de soja (APS), es un biopolímero reconocido como seguro (GRAS), se obtiene a partir de la proteína de soja desgrasada por extracción con álcali, seguida por precipitación ácida (pH 4,5) (Choa *et al.*, 2007). La inclusión de APS en la formulación de una micropartícula, se debe a su solubilidad en sistemas lipídicos, que permitiría la formación de canales en las micropartículas (Song *et al.*, 2005) y controlar la liberación de flavonoides encapsulados en sistemas modelos linoleato de metilo y aceite de girasol.

1.4. Caracterización de micropartículas

Para estudiar el estado físico de las micropartículas (amorfo-semicristalino) se emplean técnicas como: calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Difracción de Rayos X (DRX).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC): esta técnica de gran versatilidad, permite el análisis, caracterización del estado físico del compuesto activo dentro de la matriz polimérica y la determinación de las propiedades térmicas de materiales poliméricos y encapsulados. La técnica mide el flujo de calor suministrado a una muestra en un proceso de enfriamiento o calentamiento, con relación a una de referencia, lo que permite registrar los cambios endotérmicos y exotérmicos a un intervalo de temperaturas y una velocidad controlada. Es de gran utilidad para identificar las transiciones térmicas; como las de primer orden que producen peaks (ejemplo, la cristalización de grasa, agua y azúcares, gelatinización de almidones, desnaturalización de proteínas, entre otras) y las de segundo orden, que ocasionan un salto en el flujo calórico, sin calor latente asociado,

como la transición vítrea (T_g) su determinación es importante para inferir la estabilidad de los productos. Por otra parte, estas transiciones térmicas fusión (T_m) y degradación (T_d), permiten identificar la naturaleza amorfa o cristalina de un material polimérico.

Difracción de rayos X (DRX): esta técnica permite la determinación experimental de estructuras y especialmente la identificación cualitativa y cuantitativa de compuestos cristalinos. Por lo tanto, a partir de DRX es posible identificar el sistema cristalino de la muestra analizada y obtener información tridimensional acerca de la estructura interna del cristal. Esta técnica es ideal para muestras en polvo policristalinas, es decir, aquellas que presentan varios cristales diminutos con orientaciones completamente aleatorias. La Ley de Bragg, describe la difracción de rayos X, se fundamenta en la emisión de un haz de rayos X sobre los planos paralelos y la recepción de los rayos X difractados por un detector mientras se varía el ángulo de incidencia y la intensidad de rayos X difractados en función del ángulo 2θ . Cuando la onda que se difracta en el plano superior y la onda que se difracta en el plano inferior a la salida están en fase y se cumple esta condición se produce un reforzamiento de las ondas difractadas, que produce una señal de rayos X muy intensa. Que puede ser detectado con un detector adecuado en el extremo opuesto y nos indica el ángulo en que se produce la difracción.

Microscopía electrónica de barrido: los métodos que se utilizan normalmente para analizar y caracterizar morfológicamente las micropartículas son la microscopía convencional de luz (LM) y Microscopía electrónica de barrido (SEM). Estas técnicas permiten determinar la forma y estructura externa de las micropartículas; sin embargo, ambos tienen ciertas limitaciones cuando se requiere analizar la estructura interna de tales partículas. En el caso de la microscopía convencional de luz está limitada por la dispersión o emisión de luz de las estructuras fuera del plano focal óptico, mientras que SEM, usualmente requiere de un pretratamiento y recubrimiento con un material conductor.

Microscopía confocal de luz polarizada: en esta investigación se utilizó la microscopía confocal de luz láser (CLSM) para la caracterización y el estudio de la formación de canales de las micropartículas de flavonoides-In-APS. La CLSM es una técnica que permite la reconstrucción tridimensional y el análisis de imagen de las micropartículas, permite alcanzar altos niveles de sensibilidad y resolución microscópica, proporciona imágenes de varias secciones coplanares en todo el objeto. Es necesario el uso de un *fluorocromo* (colorante fluorescente usado para crear contraste en determinadas zonas) el cual se usa como marcador de los compuestos activos, sustancias y/o polímeros. La selección del *fluorocromo* depende de su solubilidad en el medio o matriz donde se va a aplicar (Lamprecht *et al.*, 2000). Los ensayos de este estudio fueron diseñados empleando como fluorocromo Rojo de Nilo, por ser un compuesto soluble en matrices lipídicas

1.5. Interacción entre flavonoides y tocoferoles

Los flavonoides y los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles) son compuestos que pueden estar presentes en forma natural en distintos aceites vegetales. Los tocoferoles son moléculas formadas por un grupo cromano y una cadena lateral fitilo. Existen cuatro isómeros de los tocoles (α -, β -, γ - y δ -), que se diferencian estructuralmente dependiendo de la posición del grupo metilo (Figura 8).

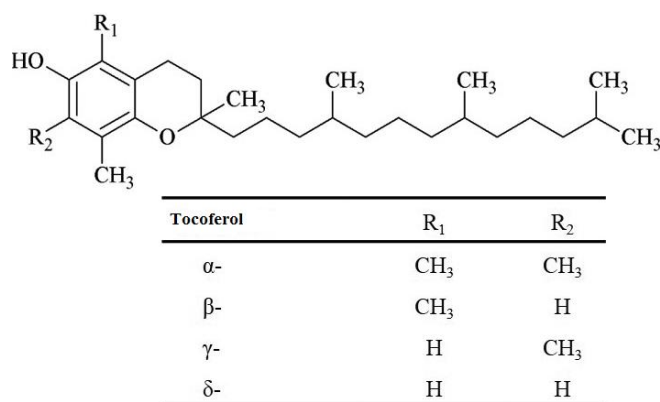


Figura 8. Estructura química de los tocoferoles (Shahidi y Zhong, 2010)

Tocoferoles y tocotrienoles han demostrado su efectividad en la inhibición de la oxidación lipídica en sistemas biológicos y en matrices lipídicas (Marmesat *et al.*, 2010). La interacción positiva entre tocoferoles y flavonoides ha quedado sustentada por la evidencia científica, aunque el mecanismo específico aún no está determinado. Se considera que la regeneración del α -tocoferol a partir de flavonoides, se debe a que los flavonoides presentan un menor valor redox, lo que favorece la transferencia de un protón al radical tocoferoxil reduciéndolo (Zhou *et al.*, 2000; Pazos *et al.*, 2007).

Algunas investigaciones han sugerido posibles interacciones entre polifenoles y tocoferoles, principalmente con el α -tocoferol. A temperaturas moderadas, se demostró que el α -tocoferol se puede regenerar a partir de uno o más flavonoides (quercetina mirecitina y rutina) en linoleato de metilo a 40°C (Pekkarinen *et al.*, 1999). Así también, se reportó la regeneración del α -tocoferol a partir de quercetina y catequina en linoleato de metilo a 50°C (Pedrielli y Skibsted, 2002). Mientras que, estudios realizados a mayor temperatura (100°C) en aceite de girasol, se encontró que el flavonoide mirecitina fue regenerado a partir de alfa-tocoferol (Marinova *et al.*, 2008).

En emulsiones (o/w) y liposomas se observó la regeneración del α -tocoferol a partir de quercetina (Pazos *et al.*, 2007). En liposomas de fosfatidilcolina se evaluó el efecto de (-)-epicatequina, galato de (-)-epicatequina y quercetina, en combinación con α -tocoferol en la prevención de la oxidación, encontrándose que todos los flavonoides previenen la

degradación del α -tocoferol (Terao *et al.*, 1994). La interacción entre flavonoides y α -tocoferol también ha sido demostrada en películas biodegradables que contienen tocoferol y quercetina de liberación controlada, para la prevención de la oxidación lipídica (Chen *et al.*, 2012). En la presente investigación se evaluó la interacción entre los flavonoides y el α -tocoferol por ser un antioxidante que se encuentra en forma natural en el aceite de girasol.

1.6. Hipótesis

La estabilidad oxidativa de sistemas lipídicos (linoleato de metilo y aceite de girasol) evaluada a través del tiempo de inducción y formación de compuestos polares mejorará con la adición de micropartículas de flavonoides. La estabilidad oxidativa de las matrices lipídicas dependerá de la estructura de los flavonoides y aumentará con un mayor grado de cristalinidad de las micropartículas y con la presencia de un agente canalizante, aumentando el tiempo de inducción y disminuyendo la formación de compuestos polares.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo general

Diseñar y elaborar sistemas de micropartículas de flavonoides (epicatequina, naringenina, quercetina) y estudiar el efecto del grado de cristalinidad (flavonoide-inulina) y agente canalizante (flavonoide-inulina-aislado proteico de soja) sobre la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas (linoleato de metilo y aceite de girasol).

1.7.2. Objetivos específicos

- 1.** Estudiar el efecto de la temperatura de alimentación en la elaboración de micropartículas de flavonoide-inulina bajo condiciones óptimas sobre la morfología, cristalinidad y propiedades físicoquímicas.
- 2.** Estudiar el efecto del grado de cristalinidad de las micropartículas de flavonoides sobre la oxidación de linoleato de metilo y aceite de girasol, evaluando tiempo de inducción y formación de compuestos polares.
- 3.** Estudiar la relación flavonoide/inulina, agente canalizante (APS) y temperatura de entrada al secador sobre la eficiencia de encapsulación y recuperación del flavonoide aplicando metodología de superficie de respuesta (MSR).
- 4.** Caracterizar físicoquímicamente las micropartículas flavonoide-inulina-APS, obtenidas bajo condiciones óptimas.
- 5.** Estudiar el efecto del agente canalizante (APS) sobre la oxidación de linoleato de metilo y aceite de girasol, evaluando tiempo de inducción y formación de compuestos polares.

MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

- Flavonoides: (-)-Epicatequina (E) > 90%, Naringenina (N) > 90%, y Quercetina (Q) > 90% se obtuvieron de Sigma-Aldrich.
- Agente encapsulante: inulina (In) HP Raftilina[®] (DP>23) se obtuvo de Alfa-Chile S.A.
- Agente canalizante: aislado proteico de soya (APS) se obtuvo de la empresa Prinal.
- Reactivos: alfa-tocoferol > 90% y Rojo de Nilo se adquirió en Sigma-Aldrich (Chile).
- Matrices lipídicas: linoleato de metilo (LM) > 99%, se adquirió en Sigma-Aldrich y aceite de girasol (*Helianthus annuus*), Natura AGD alimentos naturales sin antioxidantes añadidos, se adquirió de un supermercado local de la Región Metropolitana, Santiago.

2.2. METODOS

Parte I: Efecto del grado de cristalinidad de las micropartículas de flavonoides sobre la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas.

2.2.1. Preparación de las micropartículas flavonoides-inulina con distintos grados de cristalinidad

Las micropartículas de flavonoides de epicatequina (E) y quercetina (Q) con inulina (In) como agente encapsulante (E-In y Q-In), se elaboraron por secado por atomización bajo condiciones óptimas de relación E/In y Q/In (1:41 y 1:43, respectivamente) de acuerdo a Palma *et al.* (2014). La In (13,94 g y 14,62 g para E-In y Q-In, respectivamente) se disolvió en agua destilada (68,85 y 68,34 g respectivamente) a 70 °C, con agitación constante. Posteriormente, la solución resultante se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron los flavonoides E ó Q (0,34 g) disueltos en etanol (17,21 y 17,07 g para E-In y Q-In, respectivamente), agitando durante 30 min y sonicando durante 20 minutos (230 W, 50 H, FS-30H Fisher Scientific, USA).

La solución resultante se alimentó a un mini-secador Spray-Dryer B-290 (Buchi, Suiza) con alimentación y flujo de aire en paralelo, a dos temperaturas de alimentación $15 \pm 1^\circ\text{C}$ y $90 \pm 2^\circ\text{C}$ (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90). Además, se elaboraron micropartículas de inulina vacías (sin flavonoide) en las mismas condiciones experimentales, las cuales se utilizaron como controles (In-15 y In-90). Las condiciones de secado fueron: temperatura del aire de entrada al secador, flujo de aire, velocidad de alimentación y presión de atomización de: 160 °C, 600 L/h, 2 mL/min y 5 bar, respectivamente

2.2.2. Caracterización de las micropartículas

La caracterización de los seis sistemas de micropartículas (In-15, In-90, E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) obtenidas bajo las condiciones señaladas, se realizó de acuerdo con los parámetros que se describen a continuación:

2.2.2.1. Determinación de eficiencia de encapsulación de los flavonoides

Flavonoides superficiales: las micropartículas (100 mg) de los sistemas E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90, se trataron con 4 mL de metanol y agitación suave. El sobrenadante se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con una solución de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) que contenía ácido acético glacial (1%) (Robert *et al.*, 2012) y una alícuota de cada muestra se inyectó en el HPLC. Los análisis se realizaron en triplicado.

Los flavonoides totales: las micropartículas (100 mg) de los sistemas E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90, se trataron con 3 mL de agua:etanol:acetona (50:25:25 v/v/v), se agitaron en un vortex por 1 min, posteriormente se ultrasonificaron por 20 minutos y se centrifugaron a 452.8 g por 3 min. El sobrenadante se transfirió a un matraz aforado de 50 mL, este procedimiento se repitió dos veces, y posteriormente el matraz se aforó con una mezcla de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) que contenía un 1% de ácido acético glacial (Palma *et al.*, 2014) y una alícuota de cada muestra se inyectó en el HPLC. Los análisis se realizaron en triplicado.

La eficiencia de encapsulación y la recuperación de flavonoides se calcularon de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

$$EE (\%) = \frac{\text{Flavonoides totales} - \text{Flavonoides superficiales}}{\text{Flavonoides totales}} \times 100 \quad (1)$$

$$RF (\%) = \frac{\text{Flavonoides totales en el polvo}}{\text{Flavonoides totales en la solución de alimentación}} \times 100 \quad (2)$$

Procedimiento cromatográfico de determinación de flavonoides

El análisis de los flavonoides E y Q se realizó por HPLC, el equipo utilizado estaba compuesto por una bomba Merck Hitachi L-6200 y un detector de arreglo de diodo Waters 996 acoplado a un computador con software Empower 2. Se utilizó una columna C18 (3 μ m, 4,6 d.i. x 150 mm, Atlantis[®], Waters, Irlanda). Para la determinación de Q se utilizó una fase móvil isocrática de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) que contenía ácido acético glacial (1%) a un flujo de 1mL/min; mientras que para la determinación de E se utilizó una fase móvil isocrática de A:B (80:20 v/v); donde la fase A fue agua (Millipore, Merck) con 2,5 % de ácido acético glacial y la fase B fue una mezcla de acetonitrilo:fase A (80:20 v/v). El contenido de flavonoides de las micropartículas se cuantificó utilizando las curvas de calibración de E o Q (1-100 μ g/mL con un coeficiente de correlación $R^2=0,9983$ y $R^2=0,9980$, respectivamente). La detección de E y Q se realizó a 280 y 368 nm, respectivamente.

2.2.2.2. Humedad

El contenido de humedad en las micropartículas (In-15, In-90, E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) se determinó por el método gravimétrico en estufa de aire forzado a 105°C de acuerdo con el método AOAC 930.15 (AOAC, 1996).

2.2.2.3. Actividad de Agua

La determinación de actividad de agua en los sistemas de micropartículas (In-15, In-90, E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) se realizó a 25°C en un equipo Hygrolab 2 (Rotronic, Basserdorf, Suiza) por triplicado.

2.2.2.4. Higroscopicidad

La higroscopicidad de las micropartículas se determinó de acuerdo con el método descrito por Cai y Corke (2000). Las micropartículas (1g) (In-15, In-90, E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) se colocaron en vidrios de reloj, en un desecador sellado herméticamente que contenía una solución saturada de Na₂SO₄ a 25 °C (humedad relativa de 93 %). Después de una semana se pesó cada uno de los seis sistemas y la higroscopicidad se calculó de acuerdo a la ecuación 3:

$$\text{Higroscopicidad (\%)} = \frac{\text{humedad adsorbida (g)}}{\text{micropartículas (g)}} \times 100 \quad (3)$$

2.2.2.5. Determinación de cristalinidad

El grado de cristalinidad de flavonoides puros (E y Q) y micropartículas (In-15, In-90, E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) se determinó por difracción de rayos X (DRX), utilizando un Difractómetro D8 (AXS D8 Advance, Germany con detector lineal LynxEyer). Las condiciones de medición fueron: λ : 1,5406 Å correspondientes al ánodo de Cu (40 KV /30 mA). El difractograma se obtuvo a una velocidad de escaneo de 0,01° cada 0,5 segundos y rango angular de medición de 5 a 80°.

Todas las muestras se midieron entre 24 y 28 horas después del proceso de obtención. El grado de cristalinidad se calculó como la relación entre la diferencia de la intensidad de la región cristalina ($2\theta=20$) y la intensidad de la región amorfa, respecto a la intensidad de la región cristalina, utilizando el software Diffrac Suite 2 (Diffrac.EVA v2.1).

2.2.2.6. Termogramas de micropartículas

El análisis térmico de los flavonoides (E y Q) y las micropartículas (In-15, In-90, E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC-2STARe system, Suiza), utilizando el software Analysis Stare. Cada una de las muestras de micropartículas (10 mg) se colocaron en cápsulas de aluminio y se cerraron herméticamente, como referencia se utilizó una cápsula de aluminio vacía (control). El programa de temperatura cubrió desde 25°C hasta 300°C a una velocidad de 5°C/min y una velocidad de nitrógeno líquido de 20 mL/min.

2.2.2.7. Morfología de las micropartículas

Las características morfológicas de las micropartículas de flavonoides (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) se obtuvieron empleando un Microscopio electrónico de barrido (SEM) LEO 142 OVP (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK) operado a 20Kv. Las micropartículas se cubrieron con oro/Paladio usando una bomba de vacío Varian Vacuum Evaporator PS 10E. Las imágenes captadas se colectaron digitalmente usando el software EDS 7424 (Oxford Instruments, Oxford UK).

2.2.2.8. Tamaño y distribución de partícula.

El tamaño de partícula para las micropartículas de flavonoides (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) se determinó por difracción de luz láser (DLL, HORIBA light scattering LV 950-V2) con un lente de 300 mm. Las muestras en polvos se dispersaron en etanol. Los resultados entregados por el equipo incluyeron la distribución del tamaño de partícula y el valor $D_{(4,3)}$.

2.2.3. Ensayos de estabilidad oxidativa para aceite de girasol con y sin micropartículas de flavonoides con distinto grado de cristalinidad.

2.2.3.1. Caracterización inicial del aceite de girasol

El aceite de girasol (AG) se caracterizó, de acuerdo con la composición en ácidos grasos por cromatografía de gases, índice de peróxidos, compuestos polares y el contenido de tocoferoles por HPLC como se detalla a continuación:

2.2.3.1.1. Determinación de la composición de ácidos grasos

La elaboración de los ésteres metílicos se realizó de acuerdo al método AOCS Ce-2 66, (AOCS, 1993). Para la determinación del perfil de ácidos grasos del aceite se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (HP) 5890 serie II con detector de ionización de llama (FID) y columna SP-2560 (0,25 μm film x 0,20 d.i. x 100 m, Supelco, USA), utilizando como gas portador hidrógeno. Se utilizó un split de 1:100, con un flujo de 1 mL/min. El volumen inyectado fue de 0,5 μL . La temperatura inicial del horno fue de 160 $^{\circ}\text{C}$, durante 3 min y luego se incrementó con una velocidad de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta alcanzar 230 $^{\circ}\text{C}$. La temperatura del inyector y del detector se fijó en 240 $^{\circ}\text{C}$ (Anexo 1). La identificación se realizó en base a los tiempos de retención de un estándar conocido (GLC refere, Nu-check, USA). Los resultados se expresaron como porcentaje de ésteres metílicos.

2.2.3.1.2. Índice de peróxidos

El índice de peróxido (PV) se determinó según el método de IUPAC (1992). El índice de peróxido se expresó como miliequivalentes de peróxido/kg de aceite (Anexo 2).

2.2.3.1.3. Determinación de Tocoferoles

La determinación del contenido de tocoferoles del AG se realizó por HPLC, de acuerdo con el método AOCS Ce 8-89 (AOCS, 1993). El equipo de HPLC estuvo compuesto por una bomba Merck-Hitachi L-7110 A (Merck, Darmstadt, Alemania), inyector Rheodyne 7725i, loop 20 μL y un detector de fluorescencia Merck-Hitachi 5440 acoplado a un

computador con software Clarity. Se utilizó una columna LiChroCART Superspher Si-60 (5 µm tamaño de partícula, 4 mm d.i. x 250 mm, Merck, Alemania). Se utilizó como fase móvil hexano:2-propanol (99,5:0,5 v/v) con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 290 y 330 nm de excitación y emisión, respectivamente. La identificación y cuantificación se efectuó por comparación de los tiempos de retención de la muestra y un estándar de tocoferoles (Merck, Darmstadt, Germany) (Anexo 3).

2.2.3.2. Ensayos de estabilidad oxidativa

2.2.3.2.1. Tiempo de Inducción (Rancimat)

Las micropartículas vacías (In-15 e In-90) y las micropartículas de flavonoides (Q-In-15, Q-In-90, E-In-15 y E-In-90) se adicionaron a LM (3 g) (Sistemas: LM; LM+In-15; LM+In-90; LM+E-In-15; LM+E-In-90; LM+Q-In-15; LM+Q-In-90) y AG (3g) (Sistemas: AG; AG+In-15; AG+In-90; AG+E-In-15; AG+E-In-90; AG+Q-In-15; AG+Q-In-90) en una concentración equivalente a 200 mg flavonoide/kg (LM ó AG).

El tiempo de inducción en los sistemas señalados se determinó de acuerdo con el método oficial AOCS Cd 12b-92 (AOCS, 1993) (Anexo 6). Se utilizó un equipo Rancimat (679 Metrohm AG, Suiza) bajo condiciones aceleradas de oxidación a 60 °C y burbujeo de oxígeno (20 L/h). Los ensayos se realizaron en triplicado.

2.2.3.2.2. Estabilidad oxidativa durante almacenamiento en placa

Las micropartículas vacías (In-15 e In-90) y las micropartículas de flavonoides (Q-In-15, Q-In-90, E-In-15 y E-In-90) se adicionaron a AG en una concentración equivalente a 200 mg flavonoide/kg AG. Los sistemas de AG (3g) (AG; AG+E-In-15; AG+E-In-90; AG+Q-In-15 y AG+Q-In-90) se colocaron en tubos (1x10 cm) destapados en una placa de calentamiento (Merck, Darmstadt, Alemania), con agitación constante durante 35 días a 60°C. Los tubos se retiraron en intervalos de tiempos definidos (3, 7, 11,14, 21, 28 y 35 días). En cada muestra se analizó el contenido de tocoferoles por HPLC (AOCS, 1993, como se describió en el punto 2.2.3.1.3) compuestos polares (AOCS, 1993) y en la muestra inicial y final se determinó distribución de compuestos polares (Dobarganes *et al.*, 1988; IUPAC,1992). Los ensayos se realizaron en duplicado.

2.2.3.2.3. Compuestos polares (CP)

Los CP se determinaron mediante cromatografía de adsorción en columna abierta (AOCS, 1993). Se prepararon columnas de vidrio (15 x 1cm) con sílica gel (5g) como fase estacionaria. La sílica gel se activó previamente (160 °C por 4 h) y se ajustó a una humedad de un 5% con agua destilada. El aceite (1 g) se depositó en la parte superior de la columna y luego se aplicó la fase móvil. La primera fracción (60 mL éter de petróleo:éter etílico (87:13 v/v)) correspondió a los triglicéridos no alterados y la segunda fracción (50 mL de éter etílico) correspondió a los compuestos con polaridad mayor a los triglicéridos. Finalmente, en cada fracción se removió el solvente en un evaporador rotatorio. Los CP se determinaron gravimétricamente y se expresaron en porcentaje con respecto al contenido de aceite analizado (Anexo 4).

2.2.3.2.4. Cromatografía de exclusión por tamaño (HPSEC)

La separación y cuantificación de los compuestos polares se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (HPSEC), de acuerdo con el método IUPAC (1992) y Dobarganes *et al.* (1988) (Anexo 5). El equipo estuvo compuesto por una bomba Waters 510, un inyector Rheodyne 7725i con un loop de 10 μ L y un detector de índice de refracción HP 1037 (Agilent). La separación se realizó utilizando dos columnas Ultrastyrigel de 100 ^\circ A y 500 ^\circ A (25 cm x 0,77 cm d.i., Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA) conectadas en serie. La fase móvil correspondió a tetrahidrofurano (THF) grado HPLC, con un flujo de 1 mL/min. Las muestras (20 mg) se disolvieron en tetrahidrofurano (50 mg/mL) y se inyectaron en el equipo HPSEC. Los grupos de compuestos separados y cuantificados fueron: polímeros de triglicéridos (PTG), dímeros de triglicéridos (DTG), triglicéridos de monómeros oxidados (TGOx), diglicéridos (DG) y ácidos grasos libres (AGL).

PARTE II: Efecto del agente canalizante en micropartículas de flavonoides sobre la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas.

2.2.4. Preparación de micropartículas flavonoides-inulina-aislado proteico de soya

Las micropartículas de flavonoides epicatequina (E), naringenina (N) y quercetina (Q) con inulina (In) como agente encapsulante y aislado proteico de soya (APS) como agente canalizante ((E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS)) se prepararon aplicando un diseño Box-Behnken con 15 experimentos para cada sistema (12 experimentos y tres puntos centrales). La relación flavonoide/Inulina (1:20-1:50), temperatura de entrada de aire (120-160 ^\circ C) y APS (0-17 g) fueron las variables independientes, mientras que las variables de respuesta fueron la eficiencia de encapsulación (EE) y la liberación de flavonoides en hexano a los 14 días de almacenamiento (LH) a 30 ^\circ C. Las condiciones óptimas de formulación y proceso se realizaron aplicando la metodología de superficie de respuesta y la función deseabilidad, donde se maximizó la eficiencia de encapsulación (EE) y se minimizó la liberación del flavonoide (LH) para cada sistema estudiado.

La In (6,8-17 g) y el agente canalizante APS (0-1,7 g) se disolvieron en agua destilada a 70 y 40 ^\circ C, respectivamente con agitación constante. Ambas soluciones se mezclaron, se enfriaron a temperatura ambiente y se adicionaron los flavonoides E, N y Q (0,34 g) disueltos en etanol (16-18 g) con agitación constante (250 rpm) durante 30 min y luego se sonicó durante 20 minutos (230 W, 50 H, FS-30H Fisher Scientific, USA) a temperatura ambiente. La solución resultante se alimentó a un mini-secador (Spray-Dryer B-290, Buchi, Suiza) con alimentación y flujo de aire de secado en paralelo. El flujo del aire, velocidad de alimentación y presión de atomización alcanzaron un valor de 600 L/h, 2 mL/min y 5 bar, respectivamente para todos los sistemas estudiados. Los polvos obtenidos se almacenaron en un recipiente plástico cerrado a -20 ^\circ C hasta su análisis.

2.2.5. Caracterización de micropartículas de flavonoides con inulina.

La caracterización de las micropartículas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS), se realizó mediante la cuantificación de flavonoides superficiales, totales y eficiencia de encapsulación (EE) por HPLC, en similares condiciones descritas en el punto 2.2.2.1.

2.2.5.1. Liberación de flavonoides (LH) desde las micropartículas a los 14 días (t₁₄) de almacenamiento en hexano.

La liberación de flavonoides (E, N y Q) desde las micropartículas de los sistemas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS) se evaluó en hexano. Las micropartículas (500 mg) se colocaron en bolsas de filtro de celulosa y se introdujeron en frascos schott que contenían hexano (100 mL) con 0,5 % de Span. Los frascos se taparon y almacenaron en estufa a una temperatura de 30 °C (Memmert, modelo UFE 500, Alemania) en oscuridad. Se tomaron alícuotas de 2 mL a los 14 días de almacenamiento. Las muestras se trataron con 3 mL de una solución de agua:metanol:acetonitrilo (45:40:15 v/v/v) que contenía un 1% de ácido acético glacial, se agitaron en un vortex por 1 min y se centrifugaron a 452,8 x g por 3 minutos. La fase agua:metanol se removió y se transfirió a un matraz aforado (5 mL). El procedimiento se repitió con 2 mL del sovente de extracción. Los extractos se juntaron y se inyectó en el HPLC. La determinación de flavonoides se realizó de forma similar al procedimiento cromatográfico del punto 2.2.2.1.

2.2.5.2. Preparación y caracterización de micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de encapsulación para cada flavonoide, se prepararon tres sistemas de micropartículas (E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS)) bajo condiciones óptimas de relación flavonoide/In y temperatura del aire de entrada al secador. El contenido de APS se fijó en 5% (expresado respecto a la inulina). Además, como controles se elaboraron micropartículas de In-APS sin flavonoides y micropartículas de flavonoides sin agente canalizante (E-In y Q-In), considerando la temperatura de entrada y relación flavonoide/In óptimas. Las condiciones de preparación de las soluciones, las condiciones operacionales de secado y la determinación de la eficiencia de encapsulación, humedad, actividad de agua e higroscopicidad de los sistemas de micropartículas obtenidos E-In, Q-In, In-APS, E-(In-APS) y Q-(In-APS) fueron similares a las descritas en los puntos 2.2.2.1. al 2.2.2.4.

2.2.5.3. Morfología y tamaño de partículas

Las características morfológicas de las micropartículas de flavonoides sin APS (E-In y Q-In) y con 5% de APS (In-APS, E-(In-APS) y Q-(In-APS)) fueron estudiadas usando un microscopio electrónico de barrido (SEM). Las micropartículas se cubrieron con oro/Paladio usando una bomba de vacío Varian Vacuum Evaporator PS 10E y analizada usando LEO 142 OVP (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK). Operado a 20Kv las imágenes captadas fueron colectadas digitalmente usando el software EDS 7424 (Oxford Instruments, Oxford UK).

2.2.5.4. Tamaño y distribución de partícula.

El tamaño de partícula para las micropartículas de flavonoides se determinó por difracción de luz láser (DLL), HORIBA light scattering LV 950-V2 con una lente de 300 mm. Las muestras en polvos se dispersaron en etanol previo a su análisis. Los resultados entregados por el equipo incluyen la distribución del tamaño de partícula y el valor $D_{(4,3)}$.

2.2.5.5. Estudio de la formación de canales en las micropartículas

Para estudiar y confirmar la formación de canales en los sistemas de micropartículas In-APS, E-(In-APS) y Q-(In-APS) que contienen el polímero de APS (formador de canales) se usó la técnica de Microscopia confocal (LSM 700, Carl Zeiss, Germany). Los ensayos se realizaron utilizando Rojo de Nilo al (0,1%) el cual se disolvió en el AG. Los sistemas de AG (3 g de aceite con Rojo de Nilo) se colocaron en tubos (1x10 cm) y las micropartículas de flavonoides de Q-In y Q-(In-APS) se dispersaron en una concentración equivalente a 200 mg flavonoide/kg (AG) para cada sistema. Las dispersiones se agitaron durante 14 días a 300 rpm en una placa calefactora con termocupla a 60 °C (en las mismas condiciones que los ensayos de estabilidad en placa, punto 2.2.3.2.2). Las muestras se analizaron a dos longitudes de ondas; 488 nm para rojo de Nilo y 405 nm para DAPI (4,6-diamidino 2-fenilindol) mientras que la señal fluorescente fue colectada en 580 y 456 nm para Rojo de Nilo y DAPI respectivamente. Para analizar las imágenes se usó el Software CLSM imaging was ZEN 2012 (Blue Editions, Carl Zeiss, Alemania).

2.2.6. Ensayos de estabilidad oxidativa

2.2.6.1. Tiempo de Inducción (Rancimat)

Las micropartículas sin APS (E-In y Q-In) y las micropartículas de flavonoides con APS (In-APS), E-(In-APS) y Q-(In-APS)) se adicionaron a LM (3 g) (Sistemas: LM , LM+E-In, LM+Q-In, LM+ In-APS LM+E-(In-APS), LM+N-(In-APS), LM+Q-(In-APS)) y AG (3g) (Sistemas: AG, AG+E-In. AG+Q-In. AG+In-APS, AG+E-(In-APS), AG+N-(In-APS) y AG+Q-(In-APS))) en una concentración equivalente a 200 mg flavonoide/kg (LM ó AG).

El tiempo de inducción en los sistemas señalados se determinó de acuerdo con el método oficial AOCS (1993) (Anexo 4). Se utilizó un equipo Rancimat (679 Metrohm AG) bajo condiciones aceleradas de oxidación a 60 °C y burbujeo de oxígeno (20 L/h). Los ensayos se realizaron en triplicado.

2.2.6.2. Estabilidad oxidativa de LM y AG durante almacenamiento

2.2.6.2.1 Almacenamiento con burbujeo de oxígeno: las micropartículas de flavonoides sin y con APS se adicionaron a LM y AG en una concentración equivalente a 200 mg flavonoide/kg AG. Los sistemas de LM (4 g) sin y con APS (LM, LM+E-(In-APS), LM+N-(In-APS), LM+Q-(In-APS)) y AG (4 g) sin y con APS (AG, AG+E-(In-APS) y AG+Q-(In-APS)) se colocaron en tubos y se almacenaron a 60 °C (Rancimat, Metrohm,

Herisau, Suiza) con un flujo de aire de 20 L/h. Se tomaron alícuotas a intervalos de tiempos definidos. En cada muestra se determinó la formación de compuestos de oxidación (monómeros oxidados (TGOxs), dímeros (DTG), polímeros (PTG), diglicéridos (DG) y AGL (ácidos grasos libres)) por cromatografía líquida de exclusión por tamaño (HPSEC) (Márquez-Ruiz *et al.*, 2007), como se describió en el punto 2.2.3.2.4. Los experimentos se realizaron en duplicado.

2.2.6.2.2. Almacenamiento sin burbujeo de oxígeno: las micropartículas de flavonoides sin y con APS se adicionaron a AG en una concentración equivalente a 200 mg flavonoide/kg AG. Los sistemas de AG (3g) sin (AG+E-In y AG+Q-In) y con agente canalizante (AG+E-(In-APS), AG+Q-(In-APS)), se colocaron en tubos de vidrio (1x10 cm) destapados en una placa de calentamiento (Merck, Darmstadt, Alemania), a 60 °C, regulado con una termocupla y agitación constante durante 35 días. Se tomaron muestras en intervalos de tiempos definidos y en duplicado (días 0, 3, 7, 11,14, 21, 28 y 35). En cada muestra se analizó el contenido de tocoferoles por HPLC (AOCS, 1993a, como se describió en el punto 2.2.3.1.3) compuestos polares por cromatografía en columna (AOCS, 1993, como se describió en el punto 2.2.3.2.3) y distribución de compuestos polares (Dobarganes *et al.*, (1988) y método oficial IUPAC (1992) como se describió en el punto 2.2.3.2.4). Todos los ensayos se realizaron en triplicado

2.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las determinaciones de las condiciones óptimas de encapsulación para los sistemas de micropartículas de flavonoides con agente canalizante, se obtuvieron mediante metodología de superficie de respuesta (MSR) y la función deseabilidad. Para evaluar las diferencias estadísticas entre los sistemas estudiados para el proceso de secado (contenido de flavonoides, recuperación de flavonoides y eficiencia de encapsulación), la caracterización de las micropartículas (humedad, actividad de agua, higroscopicidad, tamaño de partícula) y los ensayos de estabilidad (tiempo de inducción, factor de protección, compuestos polares , retención de α -tocoferol y distribución de compuestos de oxidación HPSEC) se aplicó análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de rango múltiple de Tukey. Todos los resultados se procesaron utilizando el software Statgraphics Plus versión 7.0, con un nivel de significancia de un 95% (Manugistics Inc.Statistical Graphics Corporation, 1993, Rockville, MA, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PARTE I: Efecto del grado de cristalinidad de micropartículas de flavonoides con inulina sobre la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas.

Se elaboraron micropartículas de flavonoides con inulina (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) y micropartículas con inulina vacías (In-15 y In-90) a dos temperaturas de alimentación (15 y 90 °C).

Es bien conocido que, durante el secado por atomización, cuando una dispersión o solución es secada con aire caliente, conduce a la formación de partículas con estructuras principalmente amorfas, debido a que los cortos tiempos de secado no permiten la cristalización (Chiou y Langrish, 2007, Das y Langrish, 2012). En esta investigación, el término “*cristalinidad*” es usado para describir el comportamiento donde polvos obtenidos por secado con atomización son transformados a parcial o completamente cristalinos.

3.1.1 Grado de cristalinidad de las micropartículas: Difracción de Rayos X (DRX)

En la Figura 9 (A-H), se muestran los espectros de DRX para quercetina, epicatequina, micropartículas de inulinas vacías (In-15 y In-90) y micropartículas con flavonoides (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90). El grado de cristalinidad se calculó como la relación del área del *peak* cristalino respecto al área total en el difractograma, utilizando el software Difrac Suite 2.

Los difractogramas de Q y E (Figuras 9A y 9B, respectivamente) muestran señales características de su estructura cristalina con un perfil de difracción bien definido y ángulos específicos de diferentes intensidades. Estas señales se observan entre $2\theta=10-28^\circ$ para Q y $2\theta=9-50^\circ$ para E, que corresponden a estructuras altamente cristalinas (Kumar *et al.*, 2015 y Pool *et al.*, 2012). Además, los difractogramas de Q mostraron *peaks* de diferentes intensidades entre ángulos de $2\theta=10,7-27,4^\circ$ y $2\theta=8-30^\circ$. Los resultados para el perfil de DRX de Q son similares a los reportados por Hazra *et al.* (2015) y Caddeo *et al.* (2014) con valores de $2\theta=10,7-27,4^\circ$ y $2\theta=8-32^\circ$, respectivamente.

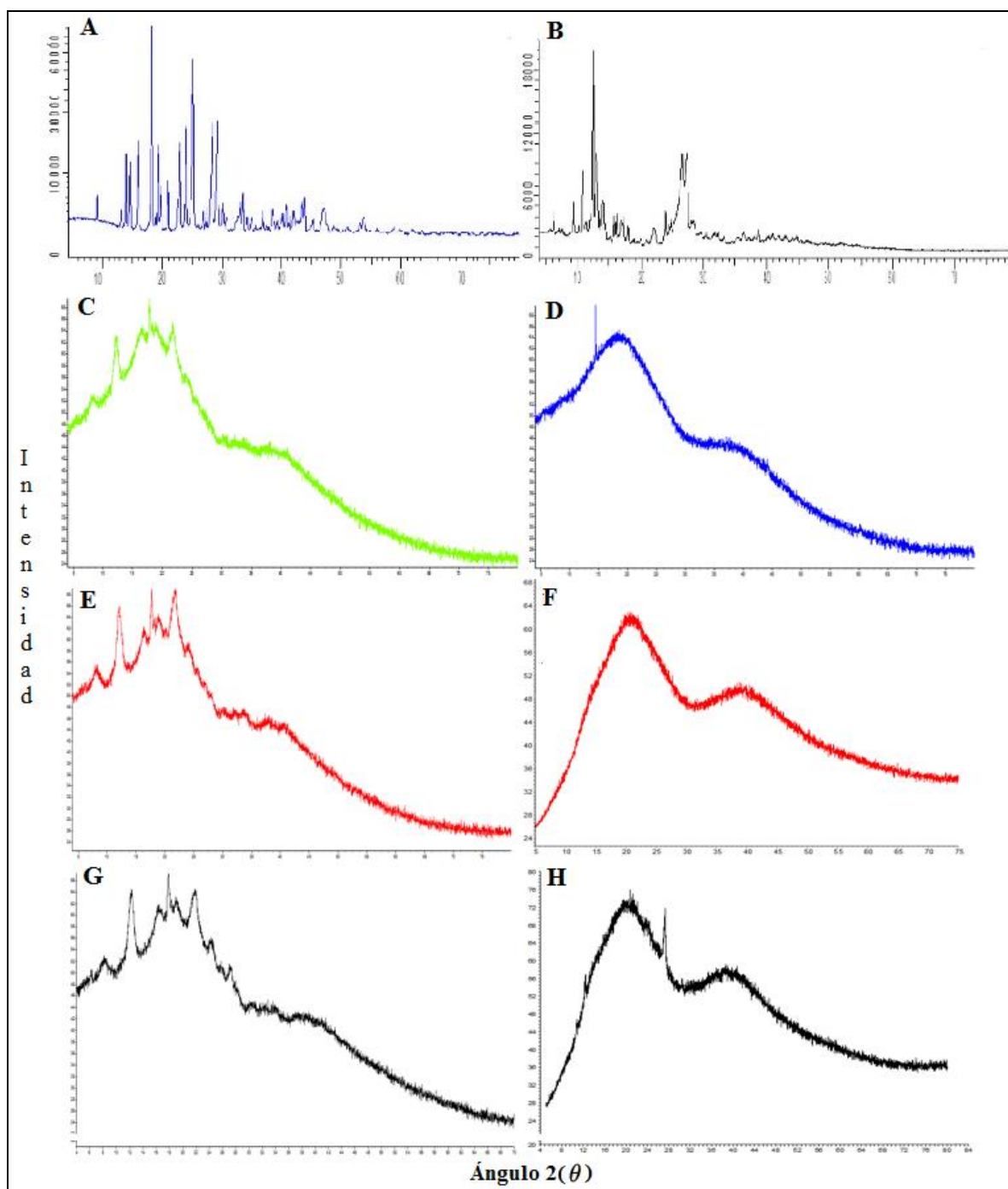


Figura 9 Espectro de Difracción de Rayos X de: (A) quercetina, (B) epicatequina, (C) In-15, (D) In-90, (E) E-In-15, (F) E-In-90, (G) Q-In-15 y (H) Q-In-90.

En relación con las micropartículas vacías de In-15 (Figura 9C), se identificaron *peaks* característicos del estado semicristalino ($2\theta=10-25^\circ$, grado de cristalinidad de 55,7%). En contraste, en In-90 (Figura 9D) se observó un incremento de las regiones amorfas, con un grado de cristalinidad de 18,6%. De acuerdo con los resultados de esta

investigación se puede señalar que el grado de cristalinidad de la inulina después del secado por atomización dependió de la temperatura de alimentación, donde una menor temperatura de alimentación favorece la formación de estructuras más cristalinas para la inulina. En la literatura existe limitada información sobre el efecto de la temperatura de alimentación como una medida para controlar el grado de cristalinidad en polvos. Ronkart *et al.* (2007), reportaron que a temperaturas de alimentación sobre 70 °C se favorece la formación de inulina en polvo con zonas amorfas y a temperaturas de alimentación de 40 °C se favorece la formación de inulina en polvo con zonas cristalinas ($\approx 55\%$). En el presente estudio se obtuvieron micropartículas con zonas cristalina a una temperatura de alimentación menor (15 °C) respecto a la utilizada por Ronkart *et al.* (2007). Este resultado indicaría que no sólo la temperatura de alimentación está relacionada con el grado de cristalinidad, sino que también la temperatura del aire de entrada al secador tiene un rol sobre la cristalinidad de los polvos. En el estudio realizado por Ronkart *et al.* (2007) encontraron que al incrementar la temperatura del aire de entrada al secador de 120 a 230 °C se favorecen polvos con zonas amorfas. Chiou y Langrish (2007), también reportaron el efecto de la variación de la temperatura del aire de entrada al secador (134 y 210 °C) sobre el grado de cristalinidad de lactosa obtenida por secado por atomización. A temperaturas del aire de entrada al secador de 210 °C las muestras fueron más cristalinas (62%) y a temperaturas inferiores a 134°C se obtuvieron polvos menos cristalinos (52%).

Las micropartículas de E-In-15 (Figura 9E) y Q-In-15 (Figura 9G), mostraron la aparición de nuevos *peaks* ($2\theta=10-40^\circ$ y $2\theta=10-50^\circ$), que sugieren la presencia de una nueva estructura flavonoide-inulina. Las micropartículas con flavonoides alcanzaron valores de cristalinidad de 61,2% para E-In-15 y de 60% para Q-In-15, mostrando que la incorporación de flavonoides a la In-15 aumentó la cristalinidad de las micropartículas respecto a las micropartículas vacías In-15 (55,7 %). Además, no se observan *peaks* característicos de los flavonoides puros (E y Q), confirmando que los flavonoides se han encapsulado y dispersado dentro de la matriz polimérica.

En los difractogramas de E-In-90 (Figura 9F) y Q-In-90 (Figura 9H), no se observan *peaks* definidos, lo que comprueba la desaparición de estructuras cristalinas, aumentando las regiones amorfas en las micropartículas (Caddeo *et al.*, 2014). Las micropartículas E-In-90 y Q-In-90 alcanzaron valores de cristalinidad de 1,73% y 2,3%, respectivamente; mostrando que la incorporación de flavonoides a la In-90 disminuyó el grado de cristalinidad con respecto a las micropartículas vacías de In-90 (18,6 %). Estos resultados indican que las moléculas de E y Q han sido encapsuladas o dispersadas dentro de la inulina formando un complejo amorfo con la matriz polimérica. Similares resultados se reportaron en nanopartículas de Q usando la técnica de nanoprecipitación con polivinil alcohol como agente encapsulante (Wu *et al.*, 2008) y en micropartículas de Q con alginato y quitosano (Hazra *et al.*, 2015).

En base al perfil de los difractogramas para los flavonoides Q y E, micropartículas vacías (In-15 y In-90) y micropartículas con flavonoides (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) y la determinación cuantitativa del porcentaje de cristalinidad, confirman que

fue posible obtener micropartículas con diferentes grados de cristalinidad. Las micropartículas elaboradas a temperaturas de alimentación de 15 °C (In-15, E-In-15 y Q-In-15) presentaron un grado de cristalinidad de 55,7%, 61,2% y 60% respectivamente. En contraste, los sistemas elaborados a temperaturas de alimentación de 90 °C (In-90, E-In-90 y Q-In-90) presentaron un bajo grado de cristalinidad de 18,6%, 1,73% y 2,3% respectivamente, con predominio de zonas amorfas. Es posible entonces afirmar que la selección de los parámetros apropiados de secado, como la temperatura de alimentación permiten minimizar o maximizar el grado de cristalinidad de los polvos. Jeong *et al.* (2003) encontraron una correlación entre el historial térmico de muestras preparadas a diferentes temperaturas (25, 40 y 50 °C) y la microestructura cristalina de las micropartículas de papaverina con poli-(ε-caprolactona).

3.1.2. Termogramas de las micropartículas por calorimetría diferencial de barrido

El análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) nos permite analizar las características estructurales y las transiciones térmicas de las micropartículas. Los termogramas de DSC para los flavonoides Q y E, micropartículas vacías (In-15 y In-90) y micropartículas con flavonoides (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) se muestran en la Figura 10 (A-H).

Los termogramas de los compuestos puros E y Q (Figura 10A y 10B, respectivamente), se caracterizaron por presentar un *peak* endotérmico centrado en 246,4 °C y 322,3 °C, respectivamente, atribuido a la temperatura de fusión (T_m) de la fase cristalina del compuesto. Estos *peaks* son similares a los publicados anteriormente por Caddeo *et al.* (2014) y Kumar *et al.* (2015) para Q con valores de 319 °C y 321,08 °C, respectivamente.

Los termogramas de las micropartículas vacías In-15 e In-90, se muestran en las Figuras 9C y 9D, respectivamente. Para In-15 se observa un amplio *peak* endotérmico alrededor de los 25 y 125 °C atribuido a la pérdida de agua, asociada a los grupos hidrofílicos del polímero. La siguiente zona, cercana a los 210 °C corresponde al proceso de fusión de la fase cristalina, y de acuerdo con el termograma, la descomposición (T_d) de estas partículas puede tener lugar a temperaturas superiores a los 300 °C. Este comportamiento concuerda con el obtenido por Ronkart *et al.* (2007), para micropartículas de inulina obtenidas utilizando temperaturas de alimentación entre 40 y 95 °C. En los termogramas de In-90, se observa un *peak* endotérmico (230 °C). Estos resultados indican que un incremento en la temperatura de alimentación aumenta la solubilidad de la inulina y disminuye la cristalinidad.

La investigación realizada por Hébette *et al.* (1998), demostró la formación de dos tipos de cristales durante la cristalización de soluciones de inulina, dependiendo de la temperatura y del grado de polimerización de la inulina. Además, confirmó que la cristalización de inulina corresponde a un modelo de dos fases de capas de lamelas, donde los cristales están separados por regiones amorfas, explicando la existencia de las endotermas. Así, en algunos polímeros cristalinos se presentan siempre como mezclas de

regiones cristalinas y amorfas. La presencia de zonas amorfas es inevitable, ya que siempre quedarán zonas con segmentos de cadenas desordenadas en mayor o menor proporción debido al propio proceso de cristalización (Ronkart *et al.*, 2007).

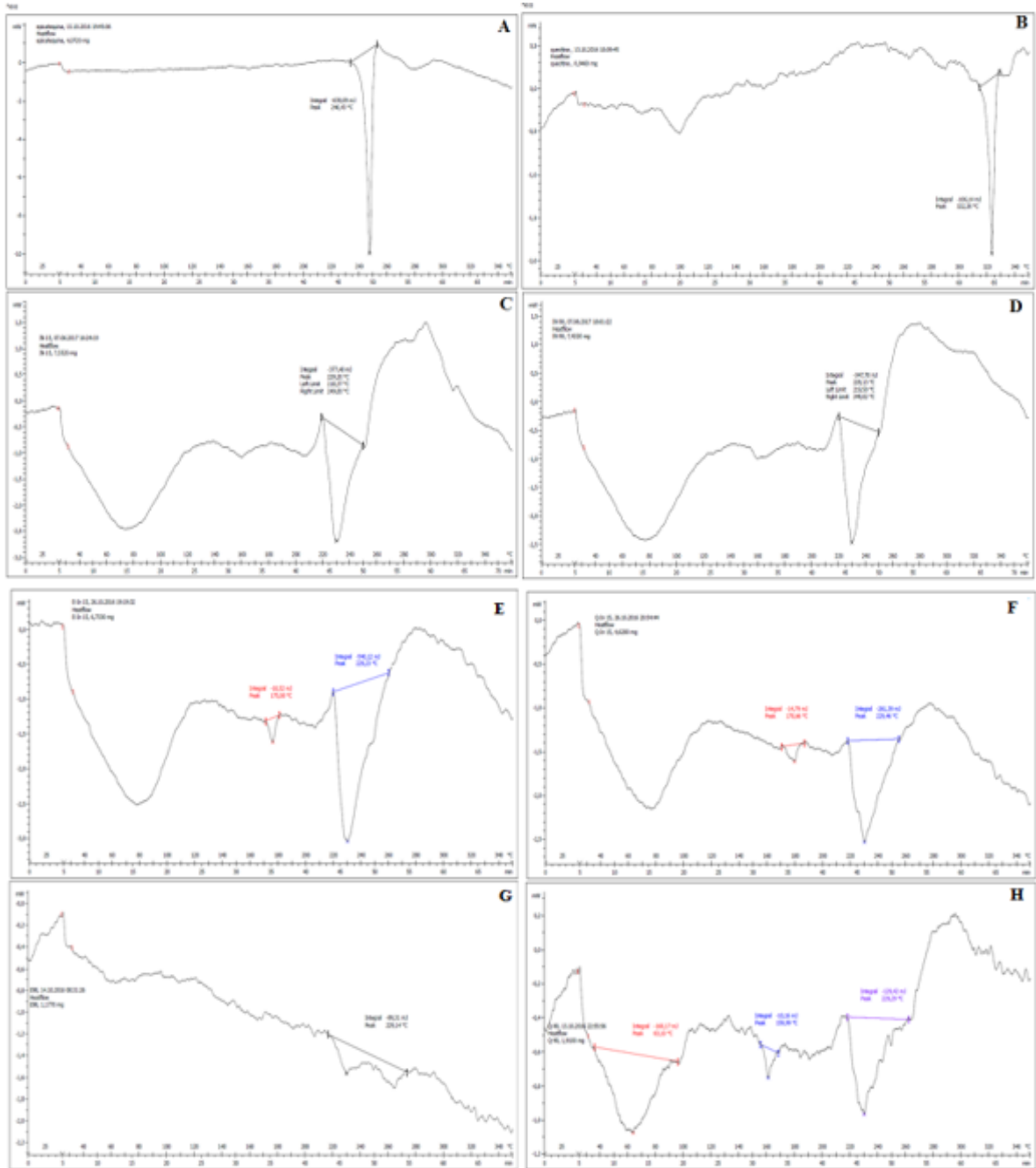


Figura 10. DSC termogramas: (A) Epicatequina, (B) Quercetina, (C) In-15, (D) In-90, (E) E-In-15, (F) Q-In-15, (G) E-In-90 y (H) Q-In 90.

Las Figuras 10E y 10G, corresponden a los termogramas de E-In-15 y E-In-90 respectivamente, en ambas curvas de DSC, no se observaron transiciones térmicas correspondientes a E. Sin embargo, en el termograma de E-In-15 (Figura 10E) se observó una transición endotérmica cercana a 76 °C, correspondiente a la pérdida de agua de las micropartículas y dos nuevas señales correspondientes a *peaks* endotérmicos alrededor de 175,1°C y 229,23°C, lo que sugiere interacciones entre la inulina y epicatequina formando una nueva estructura. Mientras que, el DSC para E-In-90 (Figura 10G), presentó una transición endotérmica a 70 °C, debido a la pérdida de agua y un *peak* endotérmico bien definido a los 230 °C, lo que sugiere que la E podría encontrarse dispersa en un estado amorfo de alta energía con la matriz polimérica de inulina. Un efecto similar reportó Pool *et al.* (2012) en nanopartículas de catequinas.

Los termogramas obtenidos para Q-In-15 y Q-In-90 se presentan en la Figura 10F y 10H, respectivamente. En el perfil de DSC de Q-In-15 (Figura 10F), no se observó el *peak* característico de la quercetina, pero se observaron dos nuevas transiciones endotérmicas en 178,7 y 229,5 °C, que sugieren interacciones entre la inulina y la Q, resultando en la formación de una nueva organización estructural en la matriz polimérica (Kumar *et al.*, 2015 y Pool *et al.*, 2012). El mismo comportamiento mostró Q-In-90 (Figura 10H), donde pueden apreciarse tres transiciones endotérmicas, la primera a 60°C, y las otras dos transiciones a 160,1°C y 229,3°C. Este comportamiento podría estar relacionado, con la hipótesis de dos poblaciones de cristales presentes que resultan en *peaks* de fusión en el análisis térmico, pero también a la liberación de agua de cristalización (Ronkart *et al.*, 2007). Estos resultados son similares a los reportados para Q encapsulada con acetato-ftalato de celulosa (Sansone *et al.*, 2011). Por otro parte, cuando los productos son cristalinos la temperatura de transición es más débil y por lo tanto la Tg no se observa (Ronkart *et al.*, 2007 y 2009).

3.1.3. Caracterización fisicoquímica de micropartículas por secado con atomización.

En la Tabla 2, se presenta la caracterización de micropartículas de flavonoides con inulina (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) y micropartículas con inulina vacías (In-15 y In-90) a dos temperaturas de alimentación (15 y 90°C).

Tabla 2. Caracterización de micropartículas de flavonoides con inulina a dos temperaturas de alimentación.

Parámetros	In-15	In-90	E-In-15	E-In-90	Q-In-15	Q-In-90
Relación F/In	-	-	1:41	1:41	1:43	1:43
T° de alimentación(°C)	15 ± 1	90 ± 2	15 ± 1	90 ± 2	15 ± 1	90 ± 2
T° del aire de entrada (°C)	160	160	160	160	160	160
Grado de cristalinidad (%)	55,7	18,6	61,2	1,73	60,0	2,3
EE Flavonoides (%)	-	-	68,8 ± 1,0 ^c	41,6 ± 0,7 ^a	67,8 ± 1,9 ^c	51,1 ± 2,8 ^b
RF Flavonoides (%)	-	-	82,0 ± 2,0 ^c	79,1 ± 0,5 ^{bc}	75,7 ± 1,9 ^a	78,1 ± 1,0 ^b
Flavonoides totales (mg/g)	-	-	19,5 ± 0,48 ^b	18,8 ± 0,1 ^b	17,2 ± 0,1 ^a	17,7 ± 0,2 ^a
Humedad (%)	5,7 ± 0,27 ^a	8,5 ± 0,1 ^c	6,2 ± 0,1 ^a	7,2 ± 0,13 ^b	6,3 ± 0,1 ^a	7,0 ± 0,3 ^b
Actividad de agua (a _w)	0,15 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,0 ^a	0,22 ± 0,1 ^b	0,27 ± 0,01 ^c	0,27 ± 0,1 ^c	0,42 ± 0,1 ^d
Higroscopicidad (g/100g)	25,0 ± 0,1 ^a	46,7 ± 1,6 ^b	25,4 ± 0,2 ^a	47,0 ± 0,2 ^b	24,9 ± 0,5 ^a	47,4 ± 0,5 ^b
Tamaño de partícula D _(4,3) (µm)	-	-	4,4 ± 0,01 ^a	5,6 ± 0,05 ^b	4,4 ± 0,03 ^a	6,1 ± 0,4 ^c

T°: temperatura; F: flavonoides; E: epicatequina; Q: quercetina; In: inulina; EE: eficiencia de encapsulación; RF: recuperación de flavonoides. Letras distintas indican diferencias significativas (p≤0,05) entre los sistemas.

La EE está relacionada con la interacción flavonoide-polímero principalmente por puentes de hidrógeno. La EE de E y Q (Tabla 2) fue significativamente mayor para aquellos sistemas elaborados con temperaturas de alimentación menores (E-In-15 y Q-In-15), mostrando que las micropartículas con mayor grado de cristalinidad favorecen la EE. Este resultado sugiere que, a temperaturas de alimentación menores, la inulina deja los grupos OH más expuestos, favoreciendo la interacción flavonoide-inulina. Por otra parte, no se observó diferencias significativas en la EE entre E (flavanol) y Q (flavonol) cuando la temperatura de alimentación fue de 15°C (Quideau *et al.*, 2011). Contrariamente, cuando la temperatura de alimentación fue de 90°C la EE fue significativamente mayor para Q aunque ambos flavonoides presentan 5 grupos OH, la Q presenta un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C, sugiriendo que cuando la inulina está en estado amorfo, los puentes de hidrógeno favorecen la interacción entre los OH y carbonilo de Q con los OH de inulina.

El parámetro de recuperación corresponde a las pérdidas de flavonoides durante el proceso de secado por atomización. En general, la recuperación de los flavonoides E y Q después del secado, alcanzó valores sobre 75% para las micropartículas de todos los sistemas estudiados. La alta recuperación de flavonoides durante el secado por

atomización podría ser atribuida a la rápida formación de la costra y/o a los bajos tiempos de residencia en la cámara de secado, ya que las partículas alcanzan altas temperaturas por períodos de tiempo muy cortos (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Con respecto al contenido de flavonoides totales no se observan diferencias significativas entre las micropartículas obtenidas a diferentes temperaturas de alimentación para los sistemas de E (E-In-15, E-In-90) y para los de Q (Q-In-15 y Q-In-90). Mientras que, al comparar entre los flavonoides (E versus Q), las micropartículas con E presentaron un contenido de flavonoides totales después del secado, significativamente mayor respecto a las de Q, en línea con una mayor recuperación para E.

Las micropartículas más amorfas (E-In-90 y Q-In-90) presentaron contenidos significativamente mayores de humedad respecto a los sistemas semicristalinos (E-In-15 y Q-In-15). Ronkart *et al.* (2009) reportaron que cuando ocurre la cristalización, los polvos pueden presentar menos humedad como parte del ordenamiento de estructuras cristalinas, y la desorción de humedad de los polvos. En relación con los valores de a_w , los valores están dentro del rango descrito en la literatura de 0,2-0,5 para polvos obtenidos por secado por atomización (Ahn *et al.*, 2008) y que además permiten asegurar una calidad microbiológica. Por otra parte, los valores de a_w de las micropartículas amorfas (E-In-90 y Q-In-90), fueron significativamente mayores que los sistemas más cristalinos (E-In-15 y Q-In-15).

Las micropartículas de los sistemas amorfos (In-90, E-In-90 y Q-In-90) mostraron valores de higroscopicidad significativamente mayores ($p < 0,05$) respecto a los sistemas cristalinos (In-15, E-In-15 y Q-In-15). Estos resultados son consistentes con lo descrito en la literatura, donde se ha señalado que los polímeros con predominio de zonas amorfas tienden a ser más higroscópicos y cohesivos respecto a aquellos cristalinos (Chan y Chew, 2003). Por lo tanto, los resultados de este estudio muestran el efecto de la temperatura de alimentación sobre las propiedades físicas y químicas de los sistemas de micropartículas de E y Q obtenidas por secado con atomización.

3.1.3.1. Microscopía electrónica de Barrido (SEM) y distribución de tamaño de partícula por difracción de luz láser (DLL) de las micropartículas.

La Figura 11 (A-D), muestra las microfotografías SEM de los sistemas de micropartículas de epicatequina y quercetina con dos grados de cristalinidad (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) y la distribución del tamaño de partícula medido por difracción de luz láser (DLL).

Las micropartículas de los sistemas E-In-15 (Figura 11A) y Q-In-15 (Figura 11C), ambas con mayor predominio de zonas cristalinas mostraron partículas no fundidas con forma esférica, superficie lisa y algunas partículas presentan irregularidades en la superficie. Sin embargo, en las fotos SEM es difícil diferenciar las zonas cristalinas. Las imágenes de SEM para las partículas con mayor índice de cristalinidad son concordantes

con las imágenes SEM obtenidas por Ronkart *et al.* (2007) para los polvos de inulina más cristalinos, donde las partículas son sustancialmente agregados esféricos de cristal. Este comportamiento sugiere que durante el proceso de atomización las partículas obtenidas adquieren una forma similar a la de la gota original formada durante el proceso de secado (Reverchon y Spada, 2004).

En contraste, las imágenes SEM de E-In-90 (Figura 11B) y Q-In-90 (Figura 11D), mostraron partículas preferentemente amorfas, con una forma irregular, un alto grado de aglomeración. En sistemas con más zonas amorfas, el origen de las aglomeraciones puede ocurrir por la colisión entre las partículas durante la atomización y/o las altas temperaturas de alimentación, que favorecen la unión y/o fusión de gotas durante el secado (Sansone *et al.*, 2011). Estas aglomeraciones se pueden considerar como un aumento del tamaño de las micropartículas, debido a que pequeñas partículas se combinan para formar agregados más grandes (Ronkart *et al.*, 2007).

La distribución de tamaño para los sistemas de micropartículas fue unimodal en un rango de 0,7- 10 μm (Figuras 11 A-D), valores que están dentro del rango reportado para micropartículas obtenidas por secado con atomización (Gharsallaoui *et al.*, 2007). En esta investigación los resultados indican que la temperatura de alimentación de las dispersiones puede determinar la morfología y el tamaño de las partículas ($D_{4,3}$). Las micropartículas elaboradas con mayor temperatura de alimentación (predominio de zonas amorfas, E-In-90 y Q-In-90) presentaron tamaños de partícula significativamente mayores (5,6 y 6,1 μm , respectivamente), respecto a aquellas elaboradas con temperaturas de alimentación menores (predominio de zonas cristalinas, E-In-15 y Q-In-15) con 4,4 μm (Tabla 2).

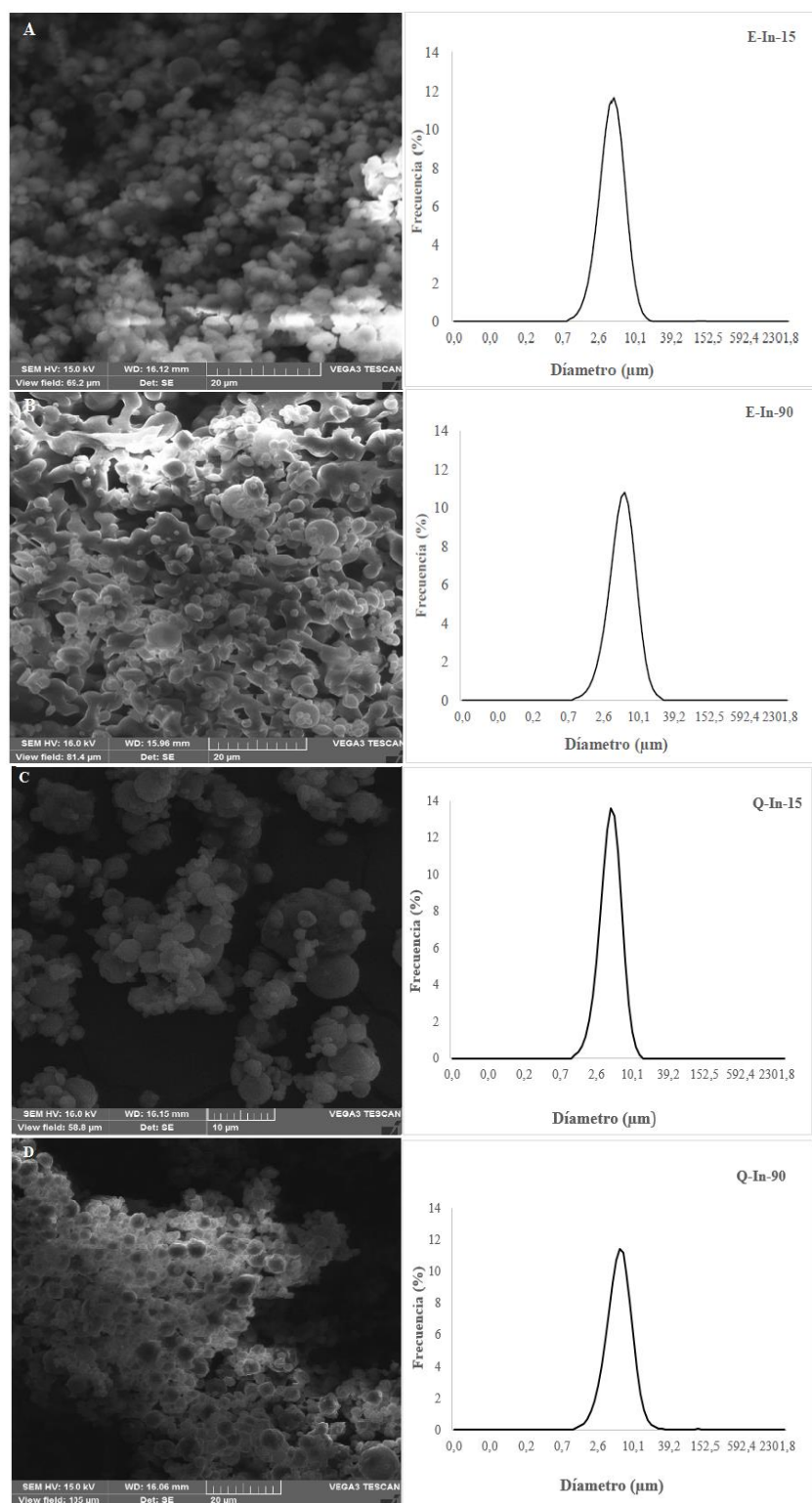


Figura 11. Microfotografías por microscopía electrónica de barrido y distribución de tamaño de partículas para (A) E-In-15, (B) E-In-90, (C) Q-In-15 y (D) Q-In-90 (magnificación 2000x).

3.1.4. Estabilidad oxidativa de LM y AG con micropartículas de flavonoides con distinto grado de cristalinidad.

3.1.4.1 Tiempo de inducción (Rancimat)

En la Tabla 3, se presenta el tiempo de inducción (TI) y el factor de protección (FP), para LM y AG sin y con la adición de micropartículas de flavonoides con inulina (alto y bajo grado de cristalinidad) en cantidades equivalentes a 200 mg flavonoide/kg (ML o AG), evaluados en un equipo Rancimat (con burbujeo de oxígeno) a 60 °C.

Tabla 3. Tiempo de inducción y factor de protección para linoleato de metilo y aceite de girasol sin y con la adición de micropartículas de flavonoides (200 mg/kg (ML o AG)) de distinto grado de cristalinidad

Sistemas	Tiempo de inducción	Factor de protección
	(TI) (h) X ± DE	
LM (control)	10,7 ± 0,2 ^a	-
LM+E-In-15	12,0 ± 1,6 ^{ab}	0,81
LM+E-In-90	12,7 ± 0,1 ^b	1,18
LM+Q-In-15	97,5 ± 2,2 ^c	9,09
LM+Q-In-90	144,1 ± 1,5 ^d	13,4
AG (control)	175,3 ± 6,6 ^a	-
AG+E-In-15	225,4 ± 4,3 ^b	1,28
AG+E-In-90	235,6 ± 4,4 ^{bc}	1,34
AG+Q-In-15	249,2 ± 7,3 ^c	1,42
AG+Q-In-90	294,0 ± 1,6 ^d	1,68

LM: linoleato de metilo; AG: aceite de girasol; Q: quercetina; E: epicatequina, In: inulina. Los resultados se expresan como X (promedio) ± DE (desviación estándar) (n=3). Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas entre sistemas para LM ó AG.

Los resultados obtenidos para los sistemas de LM muestran que la adición de micropartículas de Q (LM+Q-In-15 y LM+Q-In-90), incrementan significativamente ($p \leq 0,05$) el TI y FP respecto al control (LM). En particular, el sistema LM+Q-In-90 presentó el valor más alto de TI (144,1 h), mostrando que el predominio de zonas amorfas favorecería la dispersión de las micropartículas en el LM y la difusión de la Q para ejercer su acción antioxidante y aumentar la estabilidad oxidativa de LM. En el caso de las micropartículas con E, el sistema LM+E-In-90 aumentó levemente, pero significativamente ($p < 0,05$) el TI respecto del LM-control. Sin embargo, no se encontró un efecto del grado de cristalinidad entre LM+E-In-15 y LM+E-In-90 sobre el TI. Las diferencias entre E y Q se pueden explicar por la mayor polaridad de E (menor solubilidad en LM) y/o por la fuerte interacción entre epicatequina-inulina, que limitaría la difusión de E hacia el LM y por lo tanto su acción antioxidante, como reportó Palma *et al.* (2014).

Los resultados de estabilidad oxidativa (TI y FP) para AG con micropartículas de flavonoides, mostraron que en general los sistemas de AG presentaron valores de TI

mayores en comparación con los sistemas de LM. Estas diferencias pueden atribuirse a la presencia de componentes menores en el AG, como los tocoferoles, principalmente el α -tocoferol ($547,6 \pm 9$ mg/kg), que también actúa como antioxidante.

La adición de micropartículas de E (E-In-15 y E-In-90) y Q (Q-In-15 y Q-In-90) al AG aumentó significativamente el TI y el FP respecto al AG-control. En particular, los sistemas que presentaron los mejores efectos antioxidantes fueron los elaborados con Q (Q-In-15 y Q-In-90). El sistema AG+Q-In-90 presentó el mayor TI (294 h), lo cual está en línea con los resultados encontrados para LM, donde las micropartículas amorfas presentaron un TI mayor. Contrariamente, los sistemas de AG con micropartículas de E (E-In-15 y E-In-90) no presentaron diferencias significativas en TI, mostrando que el grado de cristalinidad no tuvo un efecto sobre la estabilidad oxidativa del AG. Las diferencias en el TI entre micropartículas de E y Q muestran el efecto de la estructura química del flavonoide sobre la estabilidad oxidativa del AG. Así, el incremento en la estabilidad oxidativa del AG dependería de las características estructurales de los flavonoides, cristalinidad de las micropartículas y/o de la liberación del flavonoide en el medio y/o interacción flavonoide- α -tocoferol (Marinova *et al.*, 2008).

3.1.4.2. Almacenamiento en placa

En la Tabla 4, se muestra la evolución de los compuestos polares para los sistemas de AG sin y con la adición de micropartículas de flavonoides con inulina de distinto grado de cristalinidad, durante el almacenamiento en placa (sin burbujeo de oxígeno) por 35 días a 60 °C.

Tabla 4. Evolución de la formación de compuestos polares para AG sin y con la adición de micropartículas de flavonoides de distinto grado de cristalinidad (200 mg/kg AG), almacenados en placa a 60°C.

(Días)	Compuestos Polares (%)				
	AG	AG+E-In-15	AG+E-In-90	AG+Q-In-15	AG+Q-In-90
	X \pm DE				
0	3,8 \pm 0,8 ^a	3,7 \pm 0,14 ^a	3,7 \pm 0,14 ^a	3,7 \pm 0,1 ^a	3,7 \pm 0,14 ^a
3	4,2 \pm 0,6 ^a	4,4 \pm 0,07 ^a	4,2 \pm 0,16 ^a	5,1 \pm 0,3 ^b	5,6 \pm 0,15 ^b
7	8,3 \pm 0,4 ^a	5,6 \pm 0,8 ^a	6,6 \pm 1,6 ^a	6,6 \pm 2,2 ^a	7,1 \pm 0,48 ^a
11	9,6 \pm 0,3 ^b	8,2 \pm 0,2 ^a	8,4 \pm 0,7 ^a	8,0 \pm 0,7 ^a	8,7 \pm 0,3 ^a
14	13,4 \pm 0,4 ^b	7,9 \pm 0,48 ^a	12,6 \pm 0,4 ^b	8,6 \pm 0,4 ^a	8,8 \pm 0,78 ^a
21	15,2 \pm 1,0 ^a	13,9 \pm 2,7 ^a	14,9 \pm 1,2 ^a	14,7 \pm 1,0 ^a	11,8 \pm 2,5 ^a
28	23,4 \pm 0,5 ^c	21,1 \pm 0,8 ^{bc}	21,2 \pm 0,7 ^{bc}	20,0 \pm 1,4 ^{ab}	17,3 \pm 2,8 ^a
35	36,3 \pm 0,5 ^c	36,0 \pm 0,6 ^c	35,8 \pm 0,57 ^c	30,8 \pm 1,6 ^b	23,5 \pm 1,8 ^a

AG: aceite de girasol; E: epicatequina; Q: quercetina; In: inulina. Los resultados se expresan como X: promedio \pm DE: desviación estándar. Letras distintas (a-d) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los sistemas a cada tiempo de almacenamiento.

En la Tabla 4, se observa que los CP aumentaron en función del tiempo de almacenamiento. El contenido de CP superó el 25%, valor máximo permitido por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (RSA, 1996) para todos los sistemas de AG con micropartículas de flavonoides, excepto para el sistema de AG+Q-In-90

(23,5%). Los sistemas de AG con micropartículas de Q (Q-In-15 y Q-In-90) presentaron valores de CP significativamente menores con respecto al AG (control) en el día 35 de almacenamiento, donde el sistema AG+Q-In-90 presentó un valor de CP significativamente ($p < 0,05$) menor en comparación con el sistema AG+Q-In-15. Este comportamiento se puede explicar en base a la microestructura de las micropartículas de Q, ya que las micropartículas con predominio de zonas amorfas (Q-In-90) tienen mayor superficie de contacto con el AG (André *et al.*, 1996), lo cual favorecería la difusión de Q hacia el AG y por lo tanto disminuye la formación de CP (Jeong *et al.*, 2003 y Sansone *et al.*, 2011). Contrariamente, no se encontraron diferencias significativas en el valor de CP entre los sistemas de AG+E-In-15 y AG+E-In-90 al final del estudio de estabilidad (35 días), mostrando que el grado de cristalinidad de las micropartículas no tuvo un efecto sobre la formación de CP.

Los valores de TI y CP mostraron una mayor actividad antioxidante para los sistemas de AG con micropartículas de Q respecto a aquellos con micropartículas de E; tanto para micropartículas con predominio de zonas amorfas como para aquellas con predominio de zonas cristalinas, sugiriendo que el efecto antioxidante es dependiente del tipo de flavonoide. Es conocido que la actividad antioxidante de los flavonoides está relacionada con sus características estructurales (Quideau *et al.*, 2011, Shahidi y Zhong, 2010). En este caso, Q y E tienen el mismo número de grupos hidroxilos, pero la Q tiene un doble enlace conjugado en posición 2,3 del anillo C y un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C, ambos grupos favorecen la estabilidad del radical fenoxil por resonancia, así como también la actividad antioxidante de Q (Elhamirad y Zamanipoor, 2012; Letan, 1996).

En la Tabla 5 y la Figura 12, se presenta la distribución de compuestos polares para el AG sin y con micropartículas de flavonoides (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) (200 mg/kg AG) a los 3 y 35 días de almacenamiento en placa a 60°C.

Tabla 5. Distribución de compuestos polares para AG sin y con la adición de micropartículas de flavonoides de distinto grado de cristalinidad (200 mg/kg AG), almacenados en placa a 60°C.

Sistemas	Días	TGOx (%)	DTG (%)	PTG (%)	DG (%)	AGL (%)
AG (control)	3	3,0 ± 1,0 ^{ab}	0,2 ± 0,06 ^a	0,0 ± 0,01 ^a	0,9 ± 0,42 ^a	0,2 ± 0,12 ^a
AG+E-In-15	3	3,0 ± 0,03 ^{ab}	0,2 ± 0,01 ^{ab}	0,04 ± 0,01 ^{ab}	0,9 ± 0,05 ^a	0,2 ± 0,01 ^a
AG+E-In-90	3	2,5 ± 0,01 ^a	0,2 ± 0,05 ^{ab}	0,1 ± 0,01 ^a	1,1 ± 0,07 ^a	0,2 ± 0,02 ^a
AG+Q-In-15	3	3,2 ± 0,1 ^{ab}	0,3 ± 0,01 ^b	0,1 ± 0,01 ^b	1,1 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,01 ^a
AG+Q-In-90	3	3,8 ± 0,6 ^{ab}	0,3 ± 0,06 ^b	0,1 ± 0,02 ^{ab}	1,2 ± 0,28 ^a	0,3 ± 0,1 ^a
AG (control)	35	16,3 ± 0,6 ^a	10,1 ± 0,4 ^b	8,2 ± 0,3 ^b	1,22 ± 0,4 ^a	0,33 ± 0,0 ^a
AG+E-In-15	35	14,4 ± 0,5 ^a	9,9 ± 0,07 ^b	10,8 ± 0,1 ^d	1,0 ± 0,02 ^a	0,2 ± 0,01 ^a
AG+E-In-90	35	16,7 ± 0,8 ^a	9,8 ± 0,2 ^b	8,0 ± 1,2 ^c	1,1 ± 0,06 ^a	0,3 ± 0,05 ^a
AG+Q-In-15	35	16,5 ± 1,5 ^a	7,7 ± 1,6 ^b	5,3 ± 1,6 ^b	1,0 ± 0,05 ^a	0,3 ± 0,12 ^a
AG+Q-In-90	35	15,8 ± 2,0 ^a	4,4 ± 2,1 ^a	1,9 ± 1,0 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,10 ^a

AG aceite girasol; PTG: polímeros de triglicéridos; DTG: dímeros de triglicéridos; TGOx: triglicéridos oxidados; DG: diglicéridos; AGL: ácidos grasos libres. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los sistemas a cada tiempo de almacenamiento.

En general, la Tabla 5 muestra que para todos los sistemas de AG sin y con micropartículas de flavonoides hubo un aumento en la formación de TGOx, DTG y PTG a los 35 días de almacenamiento, mientras que, los DG y AGL se mantuvieron en niveles similares a los encontrados en el aceite inicial, debido a que en las condiciones de estabilidad estudiada el deterioro térmico y oxidativo prevalece frente al hidrolítico (Velasco *et al.*, 2010).

Los TGOx (Tabla 5, Figura 12) son los compuestos mayoritarios formados durante el almacenamiento de los sistemas de AG. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en el nivel de TGOx al final del estudio (35 días) entre los sistemas estudiados, indicando que el nivel de compuestos de oxidación primaria fue similar en todos los sistemas, independientemente de su grado de cristalinidad y tipo de flavonoide. Respecto a los compuestos de oxidación secundarios (DTG y PTG), los DTG fueron significativamente menor ($p \leq 0,05$) para el sistema de AG con micropartículas de Q amorfas (AG+Q-In-90) ($4,4 \pm 2,1\%$) a los 35 días de almacenamiento.

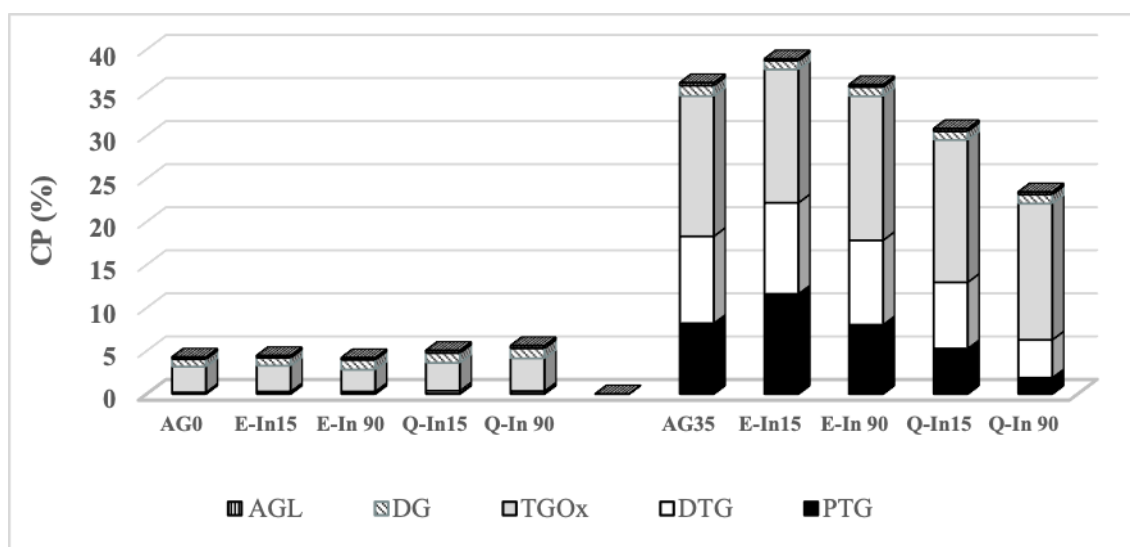


Figura 12. Distribución de compuestos polares para aceite de girasol (AG) sin y con la adición de micropartículas de flavonoides (200 mg/kg AG) de distinto grado de cristalinidad (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90) a los 3 y 35 días de almacenamiento a 60 °C. PTG: polímeros de triglicéridos; DTG: dímeros de triglicéridos; TGOx: triglicéridos oxidados; DG: diglicéridos; AGL: ácidos grasos libres.

La evolución de los PTG mostró que coincide con lo que se esperaría conforme la degradación progresa en cualquier proceso de polimerización de los aceites, aumentando la formación de compuestos de peso molecular más elevado en función del tiempo (Marmesat *et al.*, 2010). Los PTG fueron significativamente menor ($p \leq 0,05$) para el sistema de AG con micropartículas amorfas Q-In-90 ($1,9 \pm 1,0 \%$), respecto al sistema

de AG con micropartículas cristalinas Q-In-15 ($5,3 \pm 1,6$ %). Este mismo comportamiento se encontró para el sistema de AG con micropartículas de E. Los resultados sugieren que además del grado de cristalinidad hay otros factores que afectan la formación y distribución de CP como: la estructura del flavonoide, la polaridad del flavonoide, solubilidad del flavonoide en el medio lipídico, la interacción inulina-flavonoide que afecta la liberación al medio e interacción del flavonoide con otros componentes de la matriz lipídica, son factores determinantes en la difusión del flavonoide al aceite (AG) y por lo tanto en su actividad antioxidante (Palma *et al.*, 2014 y 2017).

3.1.4.3. Evolución de tocoferoles en sistemas con AG

En la Figura 13 (A y B) se observan las gráficas de la retención del contenido de α -tocoferol y la formación de CP para los sistemas de AG con micropartículas de distinto grado de cristalinidad para E (E-In-15, E-In-90) y para Q (Q-In-15 y Q-In-90), respectivamente.

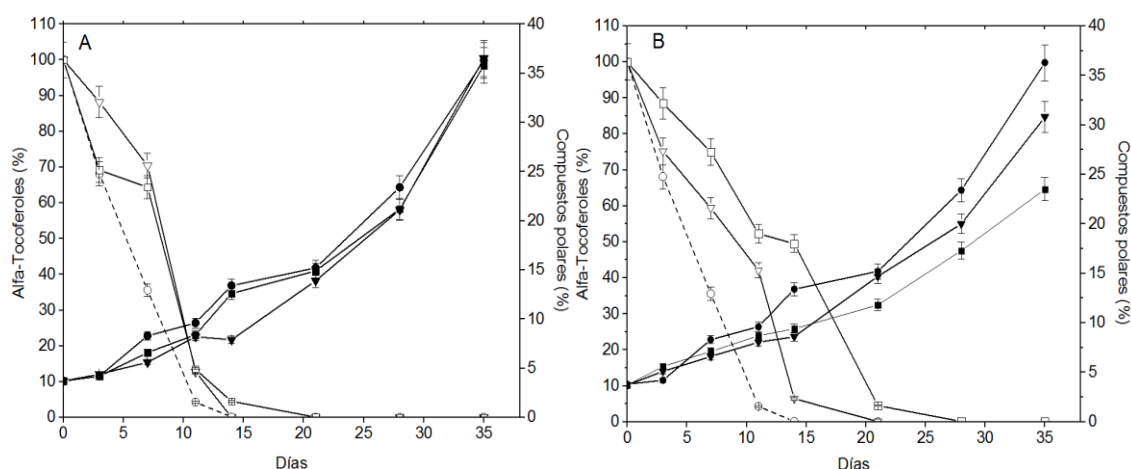


Figura 13. Formación de CP (símbolos sólidos) y la retención del α -tocoferol (símbolos sin relleno) para aceite AG control (\bullet \circ), A) AG+E-In-90 (\blacksquare \square), AG+E-In-15 (\blacktriangledown , \triangledown) y B) AG+Q-In-90 (\blacksquare \square) AG+Q-In-15 (\blacktriangledown , \triangledown)

En general, se puede observar en la Figura 13 que la retención del α -tocoferol muestra una disminución durante el tiempo de almacenamiento en todos los sistemas estudiados y que el final del tiempo de inducción estuvo marcado por el agotamiento del α -tocoferol como ha sido reportado previamente por Martin-Polvillo *et al.* (2004).

En la Tabla 6, se presentan las constantes de velocidad de degradación de primer orden de los tocoferoles en AG sin y con la adición de micropartículas de flavonoide con distinto grado de cristalinidad (E-In-15, E-In-90, Q-In-15 y Q-In-90), calculadas como la pendiente de un gráfico del logaritmo natural del porcentaje de retención de α -tocoferol versus el tiempo de almacenamiento (Anexo 8).

Tabla 6. Constantes de velocidad de degradación de primer orden para α -tocoferol en sistemas de aceite de girasol sin y con la adición de micropartículas de flavonoides de distinto grado de cristalinidad

Sistemas	k_{obs} (días ⁻¹) α -tocoferol $10^2 X \pm 10^2 \text{DE}$
AG	17,3 \pm 0,40 ^a
AG+E-In-15	16,9 \pm 0,01 ^b
AG+E-In-90	16,6 \pm 0,06 ^c
AG+Q-In-15	15,6 \pm 0,01 ^d
AG+Q-In-90	14,3 \pm 0,17 ^e

AG: aceite de girasol; Q: quercetina; E: epicatequina, In: inulina. k_{obs} : constante de velocidad de degradación del α -tocoferol. Los resultados se expresan como X (promedio) \pm DE (desviación estándar) (n=3). Letras diferentes (a-e) indican diferencias significativas entre sistemas.

Los sistemas de AG con micropartículas de E y Q (Tabla 6) presentaron constantes de velocidad de degradación de α -tocoferol significativamente menores y una mayor retención de α -tocoferol (Figura 13) con respecto al AG (control), sugiriendo la existencia de una interacción flavonoide- α -tocoferol. Este comportamiento se puede explicar por un mecanismo de regeneración entre flavonoide y tocoferoles, donde los flavonoides pueden regenerar a los tocoferoles o viceversa (Pekkarinen *et al.*, 1999; Pedrielli y Skibsted, 2002; Marinova *et al.*, 2008).

La Tabla 6 y Figura 13 muestran que los sistemas (AG+Q-In-90) con mayor predominio de zonas amorfas presentó una constante de velocidad de degradación de α -tocoferol significativamente menor respecto al sistema con predominio de zonas cristalinas (AG+Q-In-15), lo cual se puede explicar por la mayor liberación de Q desde micropartículas amorfas hacia el AG que permite la interacción de quercetina con α -tocoferol y regeneración de éste último. Resultados similares al presente estudio donde flavonoides (quercetina, mirecitina y rutina) regeneran al α -tocoferol se reportaron en linoleato de metilo a temperaturas de 40°C (Pekkarinen *et al.*, 1999). Así también, se sugirió la regeneración del α -tocoferol a partir de quercetina y catequina en linoleato de metilo a 50°C (Pedrielli y Skibsted, 2002). La regeneración del α -tocoferol a partir de flavonoides, se debe a que los flavonoides presentan un menor valor redox, lo que favorece la transferencia de un protón al radical tocoferoxil reduciendolo (Zhou *et al.*, 2000; Pazos *et al.*, 2007).

En los sistemas con E no se encontró un efecto de la microestructura de las micropartículas sobre la constante de degradación de α -tocoferol. Las diferencias entre las micropartículas de Q y E se pueden explicar por las diferencias en el potencial redox de los flavonoides (Zhou *et al.*, 2000; Pazos *et al.*, 2007) y/o estructura química del flavonoide (Zhou *et al.*, 2000) y/o polaridad de los flavonoides y/o liberación de flavonoides hacia el AG.

3.2. PARTE II: Efecto del agente canalizante en micropartículas de flavonoides sobre la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas

3.2.1. Micropartículas de flavonoides con inulina y aislado proteico de soya.

Epicatequina (E), Naringenina (N) y Quercetina (Q) se encapsularon con inulina (In) (agente encapsulante) y aislado proteico de soya (APS) (agente canalizante), empleando el método de secado por atomización (E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS)). En base a estos antecedentes, en esta investigación se aplicó un diseño Box-Behnken, con 15 experimentos para cada sistema estudiado (E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS)), las variables independientes estudiadas fueron: la relación flavonoide/In, el contenido de APS (agente canalizante) y la temperatura de entrada del aire al secador. Las variables de respuestas fueron: la eficiencia de encapsulación (EE) y la liberación de flavonoides (LH) al día 14 de almacenamiento en hexano (t_{14}). Para determinar las condiciones óptimas se utilizó la metodología de superficie respuesta (MSR), para cada sistema estudiado. Aplicando la función deseabilidad que permite asignar un puntaje entre 0 y 1 donde 1 representa la maximización de EE y 0 la minimización de la liberación del flavonoide (LH).

En las Tablas 7-9, se presentan las condiciones experimentales, la EE de los flavonoides, y la liberación en hexano al día 14 de almacenamiento (t_{14}) para los sistemas de micropartículas (E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS)), respectivamente.

Tabla 7. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación, recuperación de epicatequina y liberación en hexano para el diseño Box Behnken de E-(In-APS)

Relación E/In	APS* (g)	Temperatura del aire de entrada (°C)	EE (%) (X ± DS)	LH (%) (X ± DS)
1:20	0,85	120	42,2 ± 3,7	82,5 ± 1,6
1:20	0,0	140	27,1 ± 2,3	82,8 ± 1,5
1:20	1,7	140	23,0 ± 4,1	76,2 ± 3,1
1:20	0,85	160	27,5 ± 1,4	84,0 ± 0,9
1:35	0,0	120	52,6 ± 1,4	84,6 ± 2,8
1:35	1,7	120	54,3 ± 0,9	79,1 ± 1,4
1:35	0,85	140	46,5 ± 0,2	79,0 ± 1,1
1:35	0,85	140	39,8 ± 0,3	84,1 ± 1,3
1:35	0,85	140	63,3 ± 1,9	80,2 ± 0,0
1:35	0,0	160	46,2 ± 1,7	77,7 ± 1,2
1:35	1,7	160	47,9 ± 1,4	81,2 ± 0,7
1:50	0,85	120	52,5 ± 0,1	59,1 ± 0,2
1:50	0,0	140	29,1 ± 1,6	79,7 ± 2,2
1:50	1,7	140	29,6 ± 2,2	83,3 ± 1,9
1:50	0,85	160	38,6 ± 0,6	80,3 ± 0,3

E: epicatequina; In: inulina; *APS: aislado proteico de soya calculado en base al peso de inulina; EE: eficiencia de encapsulación; LH: liberación de flavonoides en hexano a los 14 días de almacenamiento; X: promedio; DS: desviación estándar.

Tabla 8. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación, y liberación de naringenina, en hexano para el diseño Box Behnken de N-(In-APS)

Relación N/In	APS* (g)	Temperatura del aire de entrada (°C)	EE (%) (X ± DS)	LH (%) (X ± DS)
1:20	0,85	120	22,9 ± 1,2	0,0
1:20	0,0	140	32,1 ± 0,1	18,2±2,4
1:20	1,7	140	34,2 ± 0,8	17,3±3,1
1:20	0,85	160	40,5 ± 0,2	18,6±4,4
1:35	0,0	120	29,7 ± 0,9	0,0
1:35	1,7	120	24,2 ± 0,9	0,0
1:35	0,85	140	36,2 ± 1,6	10,1±0,6
1:35	0,85	140	33,6 ± 1,8	8,6±0,9
1:35	0,85	140	33,1 ± 1,1	9,0±0,7
1:35	0,0	160	44,1 ± 4,4	15,0 ±14,2
1:35	1,7	160	45,4 ± 1,4	14,4±1,5
1:50	0,85	120	24,9 ± 0,4	0,0
1:50	0,0	140	32,9 ± 2,9	11,4±1,3
1:50	1,7	140	37,2 ± 0,2	12,1±4,4
1:50	0,85	160	31,9 ± 1,1	19,7±1,3

N: naringenina; In: inulina; *APS: aislado proteico de soya calculado en base al peso de inulina; EE: eficiencia de encapsulación; LH: liberación de flavonoides en hexano a los 14 días de almacenamiento; X: promedio; DS: desviación estándar

Tabla 9. Condiciones experimentales, eficiencia de encapsulación y liberación de quercetina en hexano para el diseño Box Behnken de Q-(In-APS)

Relación Q/In	*APS (g)	Temperatura del aire de entrada (°C)	EE (%) (X ± DS)	LH (%) (X ± DS)
1:20	0,85	120	37,1 ± 0,2	23,5 ± 0,9
1:20	0,0	140	28,0 ± 1,2	53,6 ± 2,7
1:20	1,7	140	38,3 ± 0,07	48,2 ± 2,1
1:20	0,85	160	54,1 ± 0,61	41,4 ± 8,3
1:35	0,0	120	36,7 ± 0,17	21,9 ± 5,0
1:35	1,7	120	26,7 ± 1,8	13,4 ± 1,1
1:35	0,85	140	39,3 ± 0,51	35,9 ± 4,2
1:35	0,85	140	40,5 ± 0,6	27,3 ± 7,7
1:35	0,85	140	42,5 ± 1,2	31,1 ± 13,1
1:35	0,0	160	37,6 ± 0,2	48,3 ± 4,8
1:35	1,7	160	49,8 ± 0,81	47,0 ± 6,6
1:50	0,85	120	48,0 ± 1,3	23,8 ± 1,4
1:50	0,0	140	47,3 ± 0,4	50,1 ± 5,7
1:50	1,7	140	31,1 ± 0,7	57,4 ± 2,8
1:50	0,85	160	51,4 ± 1,7	35,6 ± 4,2

Q: quercetina; In: inulina; *APS: aislado proteico de soya calculado en base al peso de inulina; EE: eficiencia de encapsulación; LH: liberación de flavonoides en hexano a los 14 días de almacenamiento; X: promedio; DS: desviación estándar.

Los sistemas de micropartículas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS) presentaron rangos de EE de 23,0-63,3%, 22,9-45,4% y 26,7-54,1%, respectivamente. En general, el sistema con epicatequina (E-(In-APS)) mostró la mayor EE respecto a Q y N, indicando una mayor interacción y/o afinidad de la epicatequina con la inulina.

En la Figura 14 (A-C) se muestran los gráficos de Pareto para la EE, de los sistemas de micropartículas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS), respectivamente. Los criterios para considerar una variable dependiente en la optimización múltiple (deseabilidad) fueron el coeficiente de determinación (R^2 -ajustado corregido por grados de libertad) y los residuales (Romero y Zúñiga, 2005). Cuando el R^2 -ajustado corregido por grados de libertad fue alto y el valor de los residuales fue menor a 6, la variable fue considerada. Por otra parte, para todos los casos el “*lack of fit*” no fue significativo.

Para el sistema E-(In-APS) (Figura 14A) las variables que presentaron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) en la EE fueron: la relación E/In y el contenido de APS en su forma lineal, la interacción entre ambas variables y el contenido de APS en su forma cuadrática. En el caso del sistema N-(In-APS) (Figura 14B) el análisis de varianza indicó que únicamente el contenido de APS en su forma lineal, presentó un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre la EE. Los resultados del análisis de varianza del sistema Q-(In-APS) (Figura 14C) indicaron que la relación Q/In y el contenido de APS en su forma lineal, cuadrática y la interacción entre ambas variables presentaron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) (Anexo 7). Aunque la variable temperatura del aire de entrada al secador, no presentó un efecto significativo en su forma lineal, si se presentó un efecto significativo en su interacción con las variables relación Q/In y contenido de APS. Por lo tanto, los efectos lineales se consideraron para todos los sistemas, aun cuando no fueron significativos, porque el efecto lineal es la base del experimento (Romero y Zúñiga, 2005). El R^2 -ajustado para la EE alcanzó valores de 88,6 %, 78,1 % y 95,4 % para los sistemas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS), respectivamente.

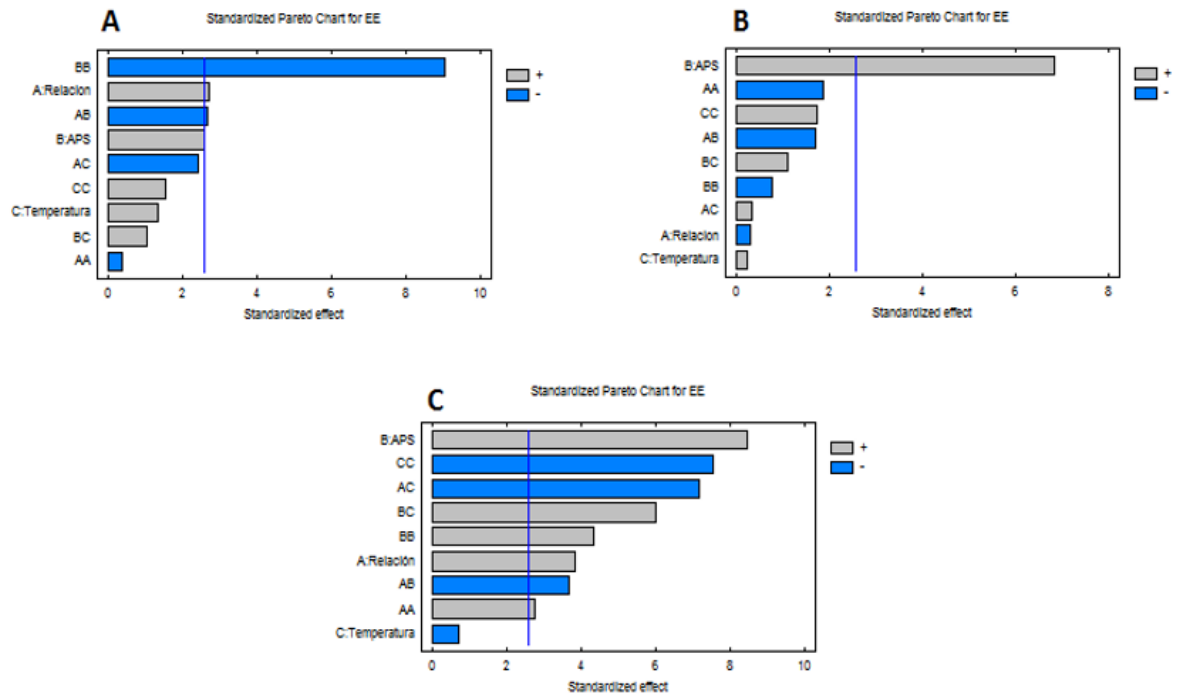


Figura 14. Diagramas de Pareto para la eficiencia de encapsulación en los sistemas A) E-(In-APS), B) N-(In-APS) y C) Q-(In-APS).

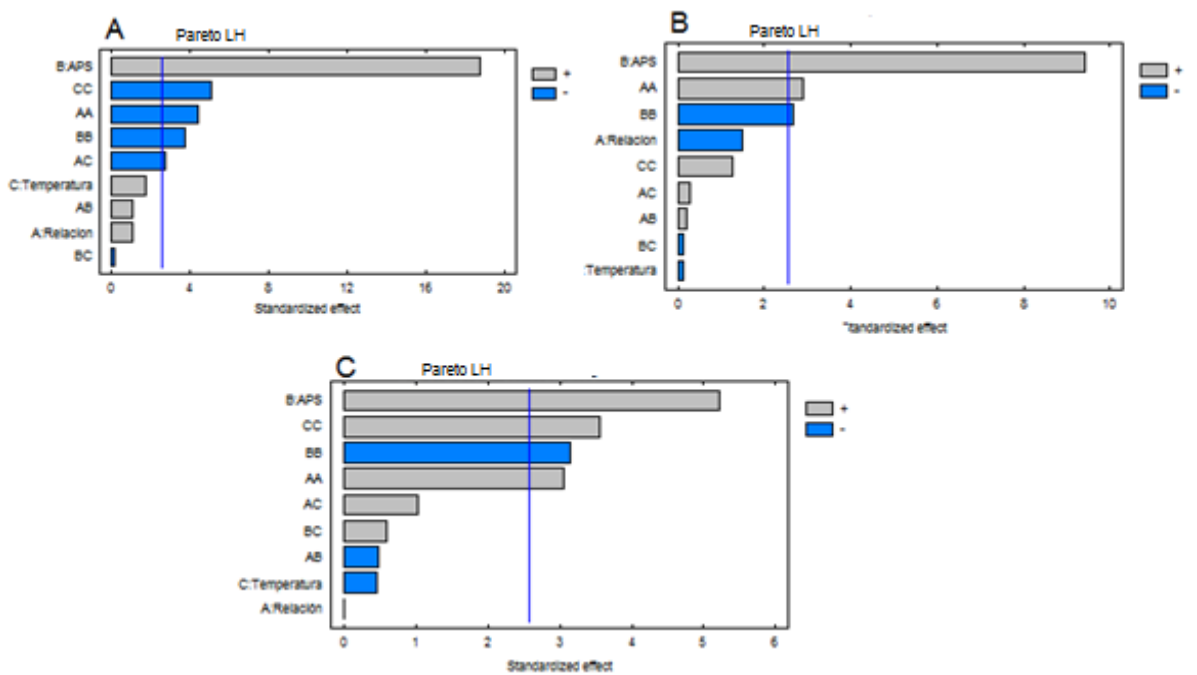


Figura 15. Diagramas de Pareto para la liberación de flavonoides en hexano de los sistemas A) E-(In-APS), B) N-(In-APS) y C) Q-(In-APS).

Con respecto a la liberación de los flavonoides en hexano para los sistemas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS), se observó que alcanzaron valores entre 59,1-84,6 %, 0,0-19,7 % y 13,4-57,4 %, respectivamente. En la Figura 15 (A-C) se muestran los gráficos de Pareto para la liberación de flavonoides en hexano (t_{14}) para los sistemas de micropartículas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS), respectivamente. Para el sistema E-(In-APS) (Figura 15A) las variables que presentaron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre la variable dependiente liberación de E, fueron el contenido de APS en su forma lineal y cuadrática, la relación E/In y la temperatura del aire de entrada al secador, ambas en su forma cuadrática, así como la interacción entre la relación E/In con la temperatura de aire de entrada. Para el sistema N-(In-APS) (Figura 15B), el análisis de varianza indicó que el contenido de APS en su forma lineal y cuadrática, y la relación N/In en su forma cuadrática presentaron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la liberación de N en hexano. Con respecto, a la Q-(In-APS) (Figura 15C) se encontró que el contenido de APS en su forma lineal y cuadrática y las formas cuadráticas de la relación Q/In y temperatura del aire de entrada fueron significativas ($p < 0,05$) sobre la liberación de Q en hexano (Anexo 7).

En general, todos los sistemas de micropartículas de flavonoides de este estudio mostraron que un aumento en el contenido de agente canalizante (APS), aumentó la liberación de los flavonoides en hexano (t_{14}). El valor de R^2 -ajustado explicó el 96,7%, 87,8% y 79,4% de la variabilidad en la liberación de los flavonoides en hexano (t_{14}), para E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS), respectivamente.

Con el propósito de determinar las condiciones óptimas para la elaboración de las micropartículas de los tres sistemas estudiados E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS), se aplicó la función deseabilidad, donde se maximizó la eficiencia de encapsulación y se minimizó la liberación del flavonoide. En la Figura 16 (A-C), se muestran los gráficos de Superficie Respuesta para los sistemas de micropartículas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS), respectivamente. La optimización múltiple para las variables de respuesta EE (maximización) y LH (minimización), se alcanzó a valores mayores de contenido de In y de temperaturas del aire de entrada al secador más altas para E-(In-APS) (Figura 16A); a valores intermedios de In para N-(In-APS) (Figura 16B), y a valores mayores de contenido de In y de temperatura del aire de entrada al secador para Q-(In-APS).

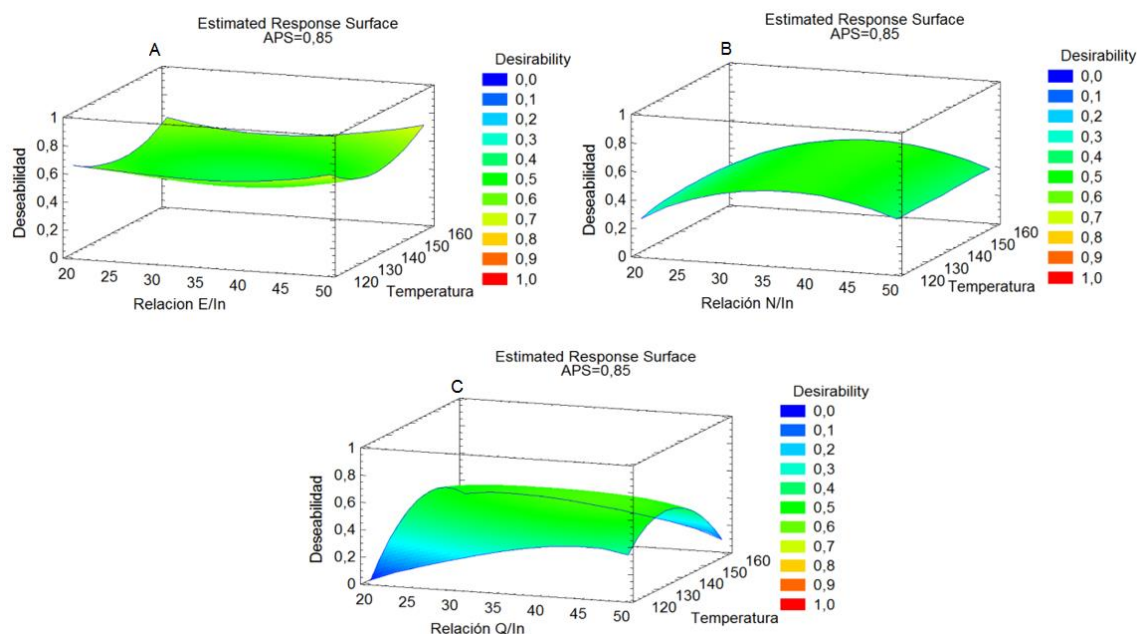


Figura 16. Gráficos de superficie de respuesta para el diseño Box-Behnken de los sistemas A) E-(In-APS), B) N-(In-APS) y C) Q-(In-APS).

La Tabla 10, muestra las condiciones óptimas para la elaboración de las micropartículas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS), eficiencia de encapsulación y liberación en hexano (t_{14}) de los flavonoides.

Tabla 10. Condiciones óptimas, EE y LH (t_{14}) para los sistemas E-(In-APS), N-(In-APS) y Q-(In-APS)

Sistemas	E-(In-APS)	N-(In-APS)	Q-(In-APS)
Relación F/In	1:50	1:39	1:20
APS (%)	0,40	0,12	0,0
T° del aire de entrada (°C)	160	120	132
EE (%)	65,4	31,1	51,3
LH (%)	5,3	0,84	22,3

F: flavonoide; Q: quercetina; N: naringenina; E: epicatequina; In: inulina; APS: aislado proteico de soya (% respecto a la inulina); EE: eficiencia de encapsulación; LH: liberación de flavonoides en hexano a los 14 días de almacenamiento (t_{14}).

En los tres sistemas de micropartículas estudiados se obtuvieron distintas relaciones F/In, temperatura del aire de entrada al secador y contenido de APS. Estos resultados demuestran que las condiciones óptimas de encapsulación por secado por atomización son específicas para cada flavonoide. Para los ensayos posteriores, se utilizaron solamente las micropartículas formuladas con E-(In-APS) y Q-(In-APS) debido a que en las micropartículas de N-(In-APS) no se observó un efecto antioxidante en los ensayos previos realizados.

3.2.2. Caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas.

Se prepararon micropartículas de E-(In-APS) y Q-(In-APS) bajo condiciones óptimas de relación F/In y temperatura del aire de entrada al secador. El contenido de APS se fijó en un 5% (expresado respecto a la inulina). Además, se elaboraron micropartículas sin flavonoides (In-APS) y micropartículas de flavonoides sin APS (E-In y Q-In) bajo condiciones óptimas descritas por Palma *et al.* (2014), como controles.

La Tabla 11 muestra la caracterización de los sistemas de micropartículas de flavonoides: con APS (E-(In-APS) y Q-(In-APS)) y sin APS (E-In y Q-In).

Tabla 11. Características físicas y químicas de los sistemas de micropartículas sin APS (E-In y Q-In) y con APS (E-(In-APS) y Q-(In-APS)) obtenidos bajo condiciones óptimas.

Sistemas	E-In-APS	Q-In-APS	E-In	Q-In
F/In ratio	1:50	1:20	1:41	1:43
APS (%)	5	5	0	0
Temperatura del aire de entrada (°C)	160	132	145	160
F totales* (mg/g polvo)	14,9 ± 0,4 ^a	18,7 ± 0,3 ^c	18,6 ± 0,1 ^c	15,9 ± 0,11 ^b
EE de flavonoides (%)	71,4 ± 3,2 ^d	50,6 ± 0,68 ^a	68,7 ± 0,6 ^c	59,6 ± 0,57 ^b
RF de flavonoides (%)	79,4 ± 2,4 ^a	98,4 ± 1,84 ^b	82,0 ± 0,6 ^a	70,1 ± 0,52 ^a
Humedad (%)	3,6 ± 0,4 ^b	5,7 ± 0,01 ^c	3,7 ± 0,07 ^b	2,6 ± 0,22 ^a
Actividad de agua (a_w)	0,13 ± 0,06 ^a	0,24 ± 0,01 ^c	0,21 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,01 ^a
Higroscopicidad (g/100g)	46,9 ± 0,46 ^{ab}	48,4 ± 0,50 ^c	46,6 ± 0,0 ^a	47,8 ± 0,70 ^{bc}
Tamaño de partícula D(4,3)(µm)	7,5 ± 0,31 ^c	10,3 ± 0,45 ^d	5,1 ± 0,05 ^a	5,7 ± 0,17 ^b

F: flavonoides; E: epicatequina; Q: quercetina In: inulina; APS: aislado proteico de soya; F totales*: después de secado; X: promedio; SD: desviación estándar (n=3). Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas entre sistemas de micropartículas (p ≤ 0,05).

La eficiencia de encapsulación para las micropartículas de E (E-In-APS y E-In) fueron significativamente mayor respecto a los sistemas de Q (Q-In-APS y Q-In). Aunque ambos flavonoides E y Q poseen 5 grupos hidroxilos, las diferencias en la EE (interacción polímero-flavonoide) encontradas en este estudio sugieren que la conformación molecular de los flavonoides, puede favorecer la disponibilidad de los grupos hidroxilo del flavonoide y favorecería la interacción entre los grupos hidroxilos (OH) de la inulina y los de la E mediante puentes de hidrógeno. Por otra parte, la mayor EE en el sistema E-In-APS se podría atribuir al mayor contenido de inulina y/o sólidos que aumenta la velocidad de formación de la costra sobre la superficie de la gota durante el secado (Gharsallaoui *et al.*, 2007). La adición de APS en las micropartículas con inulina, tuvo un comportamiento diferente para E y Q. En las micropartículas de Q la incorporación de APS disminuyó la EE de Q-In-APS (50,6 %) respecto a Q-In (59,6%). Sin embargo, para las micropartículas de E se observó que E-In-APS fue significativamente mayor que para (E-In) atribuible a las condiciones operacionales de secado.

Eficiencias de encapsulación similares a la de este estudio se han reportado para micropartículas de E (69,9 %) y Q (61,8%) con inulina como agente encapsulante y

capsul como agente canalizante por secado por atomización (Palma *et al.*, 2014); para micropartículas de Q (63%) con quitosano/goma xantana obtenidas por secado con atomización y posteriormente comprimidas en tabletas (Caddeo *et al.*, 2014). Mientras que, en la encapsulación por secado con atomización de Q empleando acetato ftalato de celulosa en combinación con carboximetilcelulosa y con dodecilbensulfonato de sodio se alcanzaron EE entre 62 y 81% (Sansone *et al.*, 2011). Micropartículas de Q obtenidas por secado por atomización usando trimetilato de acetato de celulosa en distintas proporciones presentaron EE entre 64 y 96 % y se reportaron EE levemente inferiores usando acetato ftalato de celulosa entre 64 y 88% (Lauro *et al.*, 2005).

Para la recuperación de flavonoides (RF) se alcanzaron valores sobre el 70%, lo cual puede ser atribuido a los cortos tiempos de secado (Ersus y Yurdagel, 2007) y/o a la rápida formación de la costra, que permite una rápida difusión de agua y retención del activo (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Los sistemas E-(In-APS) y Q-In presentaron los menores valores de recuperación, atribuido a las mayores temperaturas del aire de entrada al secador (160°C) que induce una mayor pérdida de flavonoides debido a reacciones de oxidación y/o degradación (Bravo, 1998; Elhamirad y Zamanipoor, 2012).

En la Tabla 11, se puede observar que para todos los sistemas estudiados el contenido de humedad varió entre 2,6 y 5,7 %; dentro del rango comúnmente reportado para secado por atomización (Sun-waterhouse *et al.*, 2012). Estos resultados están principalmente relacionados con la temperatura del aire de entrada al secador utilizada en la elaboración de las micropartículas, donde a menor temperatura del aire de entrada al secador, mayor es el contenido de humedad. Los valores de a_w para los sistemas estudiados se encontraron entre 0,13 y 0,24 (Tabla 11). Una baja a_w (menos 0,5) conduce a una disminución en el riesgo microbiano y a un aumento en la vida media, ya que las reacciones químicas y de degradación disminuyen cuando decrece la actividad de agua. En general, las micropartículas de flavonoides en polvo elaboradas utilizando inulina tuvieron baja a_w , sin embargo, varias reacciones de oxidación pueden ocurrir a a_w mínima, por ello es importante asegurar la estabilidad y la calidad final de los polvos (Sun-waterhouse *et al.*, 2012).

El tamaño de partícula para las micropartículas sin y con APS (Tabla 11) elaboradas bajo condiciones óptimas presentaron una distribución unimodal, dentro del rango reportado para partículas obtenidas por secado con atomización (Zuidam y Shimoni *et al.*, 2010; Gharsallaoui *et al.*, 2007). Las micropartículas sin agente canalizante (E-In y Q-In) presentaron un tamaño de partícula significativamente menor ($p \leq 0,05$), respecto a aquellas micropartículas con APS (E-(In-APS) y Q-(In-APS)). Este resultado, muestra que la incorporación de APS en la formulación aumenta el tamaño de las micropartículas.

3.2.2.1. Estudio de la morfología de las micropartículas

La morfología de las micropartículas sin flavonoides (In-APS), sin APS (E-In y Q-In) y con APS (E-In-APS y Q-In-APS) obtenidas bajo condiciones óptimas se presentan en la

Figura 17(A-E). Las micropartículas sin flavonoides (In-APS, Figura 17A) presentan partículas individuales con superficies rugosas y desiguales. En contraste, las micropartículas de E-In y Q-In (Figura 17B y C, respectivamente) muestran formas y tamaños irregulares, formando aglomerados. Este comportamiento se asocia con la contracción de las partículas, que se produce después del endurecimiento de la superficie externa seguido por la expansión de las burbujas de aire o vapor atrapadas dentro de la gota durante las últimas etapas del proceso de secado (Fernández *et al.*, 2014).

En la Figura 17 (D-E), se muestran las microfotografías de las micropartículas con APS obtenidas bajo condiciones óptimas. Las micropartículas de E-(In-APS, Figura 17D) son más esféricas, con superficie lisa, no presentan grietas, ni hendiduras y se observan libres de poros, se aprecia un mayor número de partículas con forma más redondas. Mientras que, las micropartículas de Q-(In-APS, Figura 17E), muestran formas irregulares, con tamaños heterogéneos. Se ha demostrado que entre más fuertes son las interacciones químicas entre los diferentes componentes, las partículas son más compactas y con superficies más lisas (Liang *et al.*, 2017).

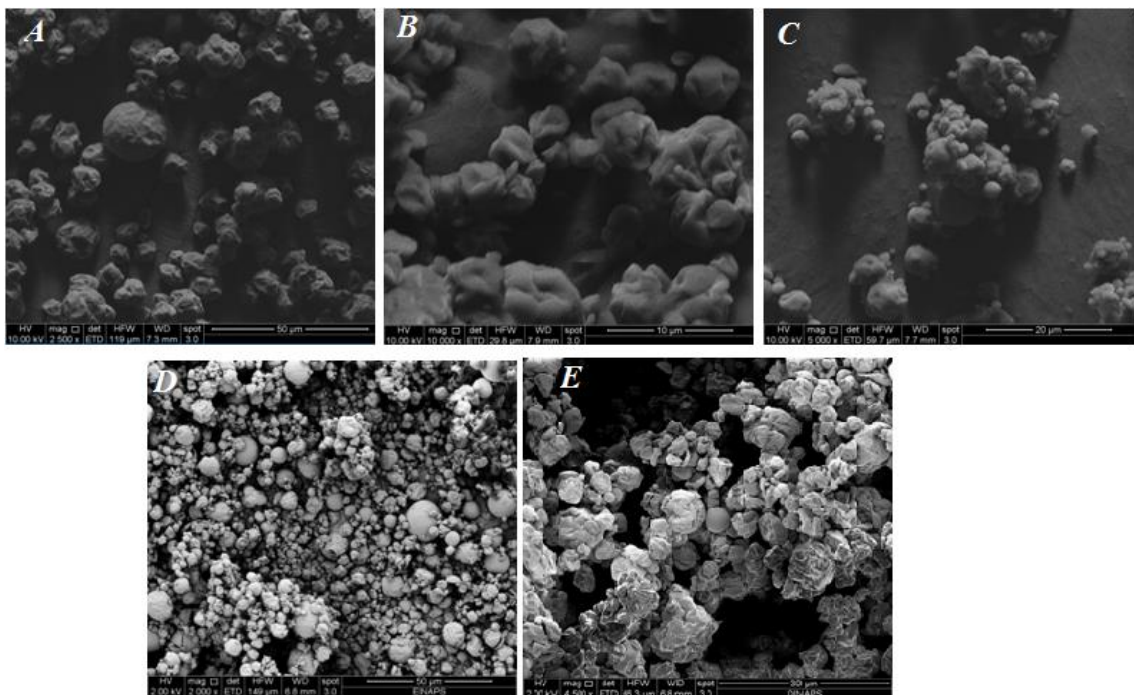


Figura 17. Microfotografías por microscopía electrónica de barrido (SEM) para micropartículas sin flavonoide A) In-APS, micropartículas sin APS B) E-In y C) Q-In, y micropartículas con APS D) E-(In-APS), E) Q-(In-APS), x 2000.

3.2.2.2. Estudio de la formación de los canales en las micropartículas con APS

Para estudiar la formación de canales en las micropartículas de flavonoides-(In-APS) se empleó la Microscopia Confocal, que es una herramienta que permite la visualización de la superficie externa y especialmente la estructura interna de diversos tipos de

micropartículas. La Figura 18 (A y B) muestra las fotografías obtenidas por microscopía confocal a los 14 días de almacenamiento, para Q-(In-APS) y Q-In, respectivamente. Se utilizaron dos canales fluorescentes: láser rojo (Figura 18 IA y IB) y láser azul (Figura 18 IIA y IIB) para excitar el AG y APS, respectivamente. Las Figuras 18 IIIA y 18 IIIB corresponden a la superposición de la imagen del láser azul y el rojo, lo cual permite distinguir entre el aceite en el interior de la micropartícula y la estructura base de las micropartículas.

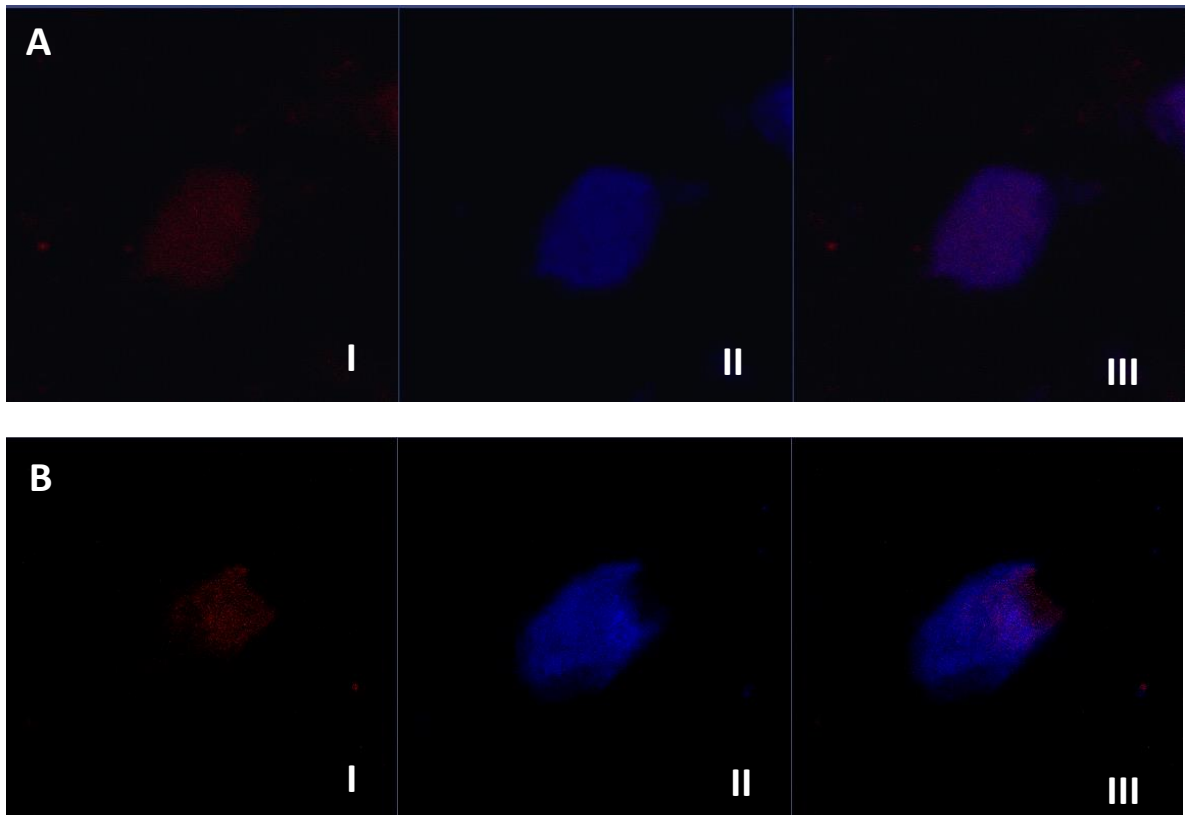


Figure 18. Imágenes de microscopía confocal láser de A) Q-(In-APS) y B) Q-In. (I) Láser rojo (A y B), (II) láser azul (A y B) y III superposición de imágenes de láser rojo y azul (A y B).

Las imágenes de Q-(In-APS) muestran que el AG está localizado dentro de la micropartícula (Figura 18A). Este resultado podría ser explicado por la disolución del APS por el aceite, formando canales dentro de la micropartícula, favoreciendo la interacción entre el flavonoide encapsulado y el AG, y así su difusión hacia el aceite donde ejerce su acción antioxidante. Además, también podría tener lugar el hinchamiento de inulina en el medio lipídico lo que también permite la difusión de los flavonoides hacia el aceite. En contraste, para los sistemas con micropartículas Q-In, el aceite se localiza principalmente en la superficie (Figura 18B). Estos resultados muestran que el APS es capaz de formar canales dentro de las micropartículas, permitiendo que el flavonoide se libere al medio lipídico.

3.2.3. Ensayos de estabilidad oxidativa

Los ensayos de estabilidad oxidativa de micropartículas de flavonoides sin agente canalizante (E-In y Q-In) y con agente canalizante (E-(In-APS) y Q-(In-APS)) se realizaron empleando dos matrices lipídicas: linoleato de metilo (LM) y aceite de girasol (AG).

El perfil de ácidos grasos del AG fue determinado por cromatografía de gases (CG), la composición inicial fue la siguiente: $51,3 \pm 0,1$ % de C18:2 ω 6; $37,3 \pm 0,1$ % de C18:1 ω 9 cis; $5,73 \pm 0,01$ % de C16:0; $3,27 \pm 0,04$ % de C18:0; $0,85 \pm 0,1$ % de C20:1 ω 9. El valor inicial de compuestos polares (CP), índice de peróxido y contenido inicial de tocoferoles fue de $4,20 \pm 0,04$ %, $0,37 \pm 0,1$ mEq O₂/kg y 548 mg/kg de aceite, respectivamente.

3.2.3.1. Estabilidad oxidativa en condiciones aceleradas

Se estudió la estabilidad oxidativa de los sistemas de LM y AG sin y con micropartículas de flavonoides-In-APS, evaluando el tiempo de inducción y la formación de compuestos de oxidación, en condiciones aceleradas de oxidación: burbujeo de oxígeno y temperatura de 60°C.

3.2.3.1.1. Tiempo de Inducción

La Tabla 12, muestra los resultados obtenidos para el tiempo de inducción (TI) y el factor de protección (FP) para LM y AG con y sin la adición de micropartículas de flavonoides (200 mg flavonoide/kg (LM o AG)) en Rancimat a 60°C con burbujeo de oxígeno.

Tabla 12. Tiempo de inducción y factor de protección de linoleato de metilo y aceite de girasol sin y con la adición de micropartículas de flavonoides (200 mg/kg (LM ó AG)) en Rancimat a 60°C.

Sistema	Tiempo de inducción (TI) X \pm DS (h)	Factor de protección (FP)
LM (control)	10,9 \pm 0,7 ^a	-
LM + E-In	13,7 \pm 1,1 ^b	1,25
LM + Q-In	90,7 \pm 2,9 ^c	8,32
LM + E-(In-APS)	15,7 \pm 0,8 ^b	1,44
LM + Q-(In-APS)	99,3 \pm 0,9 ^d	9,10
AG (control)	180 \pm 5,1 ^a	-
AG + E-In	182 \pm 6,2 ^a	1,01
AG + Q-In	205 \pm 4,4 ^b	1,14
AG + E-(In-APS)	223 \pm 9,2 ^c	1,23
AG + Q-(In-APS)	279 \pm 8,7 ^d	1,55

LM: linoleato de metilo; AG: aceite de girasol; Q: quercetina; E: epicatequina; In: inulina; APS: aislado proteico de soya; X: promedio; DS: desviación estándar (n=3); Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas entre sistemas.

En la Tabla 12, se observa que los valores de TI fueron significativamente mayores para AG, en comparación a los de LM. Sin embargo, los factores de protección fueron mayores en los sistemas con LM con adición de micropartículas, principalmente para Q (Q-In y Q-In-APS), respecto al AG, lo que se puede atribuir a la presencia de otros componentes menores en el AG, como α -tocoferol (antioxidante natural) presente en forma endógena en AG que también actúa como antioxidante. Investigaciones previas indican un efecto sinérgico entre tocoferoles y flavonoides (Chen *et al.*, 2012; Marinova *et al.*, 2008).

Las micropartículas sin flavonoides In-APS utilizadas como un control, no presentaron ningún efecto sobre el incremento en la estabilidad oxidativa de LM y AG, descartando cualquier efecto dependiente de la composición del polímero sobre la actividad antioxidante.

Sistemas con linoletao de metilo (LM). En los sistemas de LM se observa que la adición de micropartículas de flavonoides sin APS (E-In y Q-In) y con APS (E-(In-APS) y Q-(In-APS)) aumentaron significativamente ($p \leq 0,05$) el TI, respecto al control (Tabla 12). Los sistemas con micropartículas de Q presentaron los TI más altos, siendo el TI del sistema con Q-In-APS (99,3 h) mayor que el sistema con Q-In (90,7 h). Estos resultados sugieren que el LM podría disolver el APS formando canales dentro de las micropartículas que favorecen la difusión de Q al medio lipídico. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el TI entre los sistemas con E-In y E-In-APS, lo cual puede ser atribuido a una alta interacción entre E-In y/o a la mayor polaridad de E (factor de apolaridad 5 y 19 para E y Q, respectivamente) que puede afectar su difusión al medio lipídico. Los mayores valores de TI para los sistemas que contienen Q son concordantes con los más altos factores de protección (FP) encontrados en este estudio.

Sistemas con aceite de girasol (AG). La adición de micropartículas de Q con y sin APS al AG, aumentó significativamente el TI y FP, siendo el sistema con Q-(In-APS) el que presentó el mayor efecto. Con respecto a las micropartículas de E, la adición de micropartículas E-In a AG no presentó un efecto significativo sobre el TI del AG, mientras que el TI de AG aumentó significativamente cuando se adicionó APS a las micropartículas E-In. Por lo tanto, estos resultados muestran que el APS puede favorecer la difusión de flavonoides al medio lipídico debido a la formación de canales dentro de las micropartículas. Esta diferencia no se encontró en LM, lo cual se puede explicar por la mayor polaridad de AG respecto al LM que facilitaría la difusión de E.

Por otro parte, los resultados muestran la influencia de la estructura química del flavonoide sobre las propiedades antioxidantes en medios lipídicos. Así, los mayores TI en LM y AG con Q-micropartículas respecto a E-micropartículas (Q-In vs. E-In y Q-(In-APS) vs. E-(In-APS)), podría ser atribuido a la estructura química de estos flavonoides. La Q tiene cinco grupos OH, que se distribuyen en el anillo A (dos grupos OH), anillo B (dos grupos OH en posición *orto*) y C (1 grupo OH), un doble enlace en posición 2,3 y un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C. Mientras que, E carece del doble enlace en posición 2,3 y del grupo 4-carbonilo en el anillo C. Por lo tanto, la capacidad de Q de

donar un hidrógeno para estabilizar el radical peroxilo es mayor que la de E, porque el fenoxil radical de Q se estabiliza por resonancia (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2006).

Otros factores, además de las características estructurales de los flavonoides como la solubilidad y la polaridad pueden afectar la capacidad antioxidante de los flavonoides en aceites. Se ha descrito que los antioxidantes hidrofílicos son más efectivos en sistemas lipídicos “*in bulk*” que los antioxidantes lipofílicos (Shahidi y Zhong, 2010). La teoría de la paradoja polar (Porter, 1993) indica que la actividad de los antioxidantes en sistemas “*in bulk*” depende de su constante de partición entre la interfase aire-aceite, los antioxidantes hidrofílicos tienen la habilidad para concentrarse en esta interfase donde la oxidación es prevalente, mientras que los antioxidantes lipofílicos se disuelven en la fase lipídica, en consecuencia, serían menos efectivos. Cuvelier *et al.* (2000) determinó la polaridad de distintos compuestos por cromatografía en capa fina, encontraron un factor de apolaridad de 5 y 19 para E y Q, respectivamente. Q tienen mayor polaridad que E y tendrían una mayor capacidad antioxidante al distribuirse con mayor facilidad en la interfase aceite-aire. Por lo tanto, la efectividad de los antioxidantes utilizados en este estudio dependería de su polaridad y de las características estructurales (Laguerre *et al.*, 2015, Shahidi y Zong, 2010).

En general, el efecto antioxidante observado para Q es concordante con los resultados reportados por Palma *et al.* (2017) para micropartículas de flavonoides elaboradas con inulina como agente encapsulante y capsul como agente canalizante, donde las micropartículas de Q-In-capsul adicionadas a LM (60°C) mostraron alta estabilidad oxidativa incrementando el TI de LM.

3.2.4.1.2. Formación y distribución de compuestos de oxidación

En los ensayos de TI, se demostró que la adición de micropartículas de flavonoides-In-APS mejoraron la estabilidad oxidativa de LM y AG. En este contexto, la evolución de los compuestos de oxidación y su distribución se estudiaron en LM y AG sin y con micropartículas de flavonoides (E-(In-APS) y (Q-(In-APS)) en condiciones aceleradas de oxidación (burbujeo de oxígeno y 60°C), como se muestra en la Figura 19 (A-F).

En los sistemas con LM (Figuras 19 A-C) sin y con la adición de micropartículas de flavonoides (E-In-APS y Q-In-APS), se observa que los monómeros oxidados son los primeros compuestos en formarse, porque son característicos de los estados iniciales o tempranos de oxidación. Cuando la oxidación avanza, aumenta la formación de compuestos de polimerización, indicando el inicio de la propagación (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 2007) y que corresponde al TI (Tabla 12).

La formación y distribución de compuestos de oxidación en las muestras de AG (Figura 19 D-E) con y sin micropartículas de flavonoides se determinó por inyección directa al HPSEC (Dobarganes *et al.*, 1988). Se cuantificaron los polímeros y dímeros, pero no los monómeros oxidados, debido a que los monómeros oxidados y los triglicéridos no oxidados eluyen al mismo tiempo de retención, porque presentan pesos moleculares

similares (Márquez-Ruiz *et al.*, 2003). En los sistemas con AG se observa que el inicio de la formación de polímeros coincide con el TI (Tabla 12)

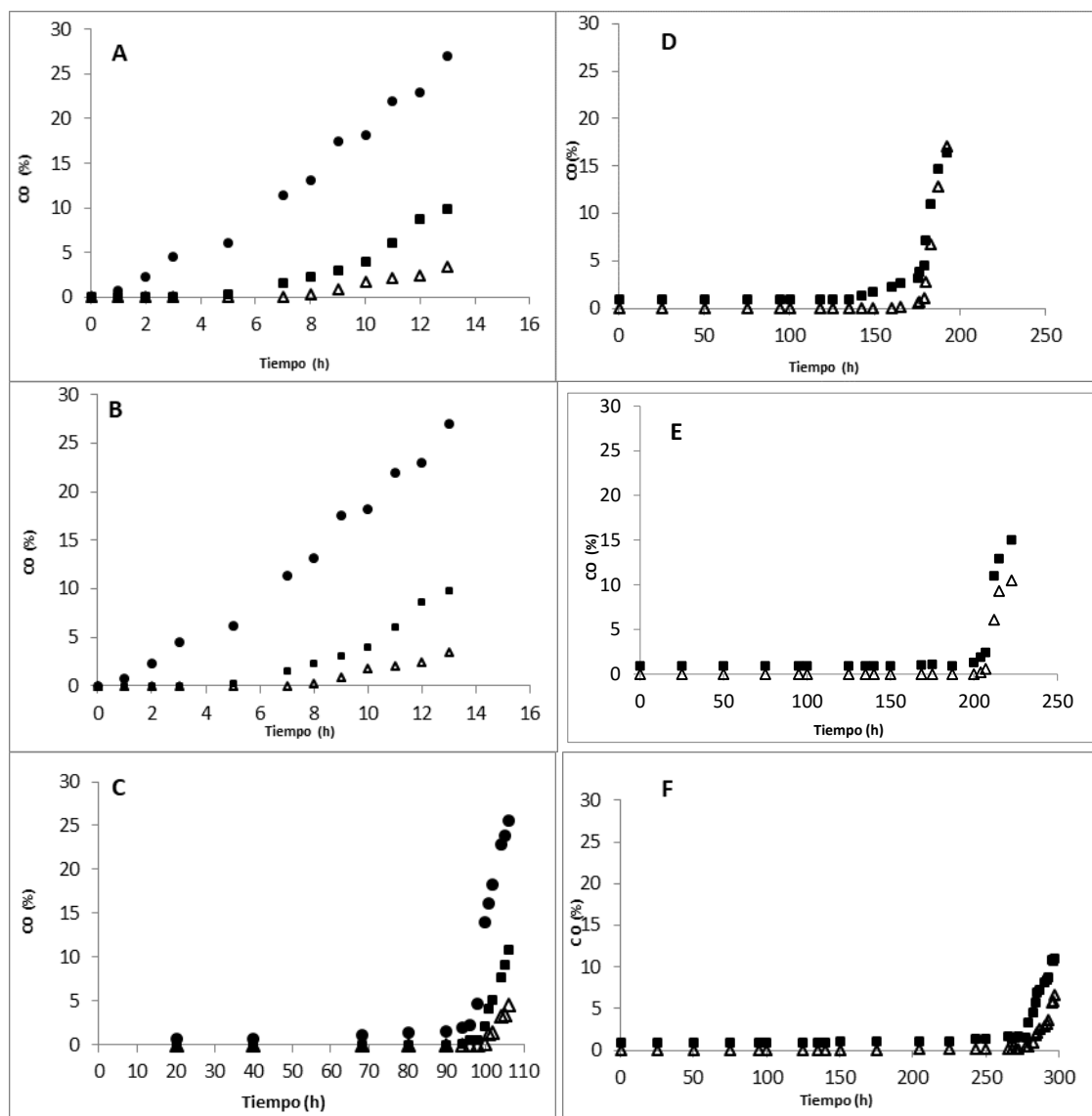


Figura 19. Formación y distribución de compuestos de oxidación en LM y AG sin y con micropartículas flavonoides-In-APS, sometidos a condiciones aceleradas de oxidación (burbujeo de oxígeno y 60°C). A) LM, B) LM+E-(In-APS), C) LM+Q-(In-APS), D) AG, E) AG+E-(In-APS), F) AG+Q-(In-APS). (●) monómeros oxidados, (■) dímeros y (Δ) polímero.

En los sistemas de LM y AG se encontró que las micropartículas de flavonoide (Q y E)-In-APS retardaron la formación de compuestos de oxidación y previnieron las reacciones de polimerización, siendo aquellos sistemas con Q los que presentaron mayor estabilidad.

3.2.3.2. Estabilidad oxidativa durante almacenamiento en placa

3.2.3.2.1. Formación de compuestos polares durante el almacenamiento en placa

En la Tabla 13, se muestra la evolución en el contenido de compuestos polares para los sistemas de AG sin y con la adición de micropartículas de flavonoides, sin APS ((AG+E-In y AG+Q-In)) y con APS ((AG+E-(In-APS) y AG+Q-(In-APS))), durante el almacenamiento a 60°C en placa (sin burbujeo de oxígeno) durante 35 días de almacenamiento. Se puede apreciar que el contenido inicial de CP del AG es inferior al 5%, lo cual indica un aceite de buena calidad (Masson *et al.*, 1997; Velasco *et al.*, 2010).

Tabla 13. Evolución del contenido de compuestos polares en AG sin y con la adición de micropartículas de flavonoides con APS y sin APS (200 mg/kg AG), almacenados en placa a 60°C.

Tiempo (Días)	Compuestos polares (%)				
	AG	AG+E-(In-APS)	AG+Q-(In-APS)	AG+(E-In)	AG+(Q-In)
0	3,8 ± 0,8 ^a	3,8 ± 0,8 ^a	3,8 ± 0,8 ^a	3,8 ± 0,8 ^a	3,8 ± 0,8 ^a
3	4,2 ± 0,6 ^a	3,6 ± 0,01 ^a	6,5 ± 0,1 ^b	4,0 ± 0,36 ^a	7,6 ± 0,1 ^c
7	8,3 ± 0,4 ^a	8,6 ± 0,2 ^a	8,7 ± 0,7 ^a	8,7 ± 0,06 ^a	8,7 ± 0,1 ^a
11	9,6 ± 0,3 ^a	9,8 ± 0,3 ^a	9,6 ± 0,5 ^b	9,9 ± 0,07 ^a	11,1 ± 0,5 ^a
14	13,4 ± 0,4 ^a	10,6 ± 0,5 ^a	10,4 ± 0,5 ^a	11,4 ± 0,4 ^b	11,8 ± 0,7 ^b
21	15,2 ± 1,0 ^c	12,8 ± 1,0 ^{ab}	11,9 ± 0,1 ^a	13,9 ± 2,3 ^{ab}	14,5 ± 0,6 ^{ab}
28	23,4 ± 0,5 ^b	16,4 ± 0,5 ^a	22,7 ± 2,7 ^b	25,4 ± 5,1 ^b	23,7 ± 1,8 ^b
35	36,3 ± 0,5 ^b	29,9 ± 0,04 ^a	28,0 ± 1,2 ^a	33,4 ± 4,0 ^{ab}	31,5 ± 3,3 ^{ab}

AG: aceite de girasol; E: epicatequina; Q: quercetina; APS: aislado proteico de soya; In: inulina; X: promedio; DE: desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los sistemas.

Los resultados mostraron un aumento gradual en el contenido de los compuestos polares (CP) con el tiempo de almacenamiento en todos los sistemas estudiados. No obstante, a los 35 días de almacenamiento los sistemas de AG con micropartículas con APS (Q-(In-APS) y E-(In-APS)) disminuyeron significativamente ($p \leq 0,05$) el contenido de CP, respecto al AG. Contrariamente, los sistemas de AG con micropartículas sin APS (E-In y Q-In) no mostraron diferencias significativas en el contenido de CP, respecto al AG. Por otro lado, los valores de CP a los 35 días de almacenamiento fueron mayores para los sistemas de AG con micropartículas sin APS respecto a aquellos con APS, aunque estas diferencias no fueron significativas, sugieren la influencia del APS como agente canalizante sobre la estabilidad del aceite.

En aceites con flavonoides libres, se ha reportado la relación entre las características estructurales de los flavonoides y la actividad antioxidante, donde se encontró que el número y posición de los grupos hidroxilo en el anillo B (principalmente *orto* y *para*), la presencia de un doble enlace 2,3 en el anillo C y la glicosilación del hidroxilo (3-OH) del anillo C, influyen en la actividad antioxidante en matrices lipídicas (Palma *et al.*, 2014, Pekkarinen *et al.*, 1999). Sin embargo, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas para CP a los 35 días de almacenamiento entre AG+Q-(In-

APS) y AG+E-(In-APS) y entre AG+(Q-In) y AG+(E-In), mostrando que el tipo de flavonoide no presentó un efecto sobre la estabilidad oxidativa de AG.

El hecho de que las diferencias entre las micropartículas sin y con incorporación de APS no fueron significativas al final del estudio (día 35), en contraste con las diferencias encontradas en los ensayos de Rancimat, puede atribuirse a las diferentes condiciones aplicadas. En los ensayos con método de Rancimat (TI), la oxidación se acelera como resultado del burbujeo del aire y se observan diferencias en ausencia y presencia de agente canalizante y tipo de flavonoides sobre el TI. Mientras que en los ensayos en placa (sin burbujeo de oxígeno) con almacenamiento a largo plazo, la influencia de la estructura de los flavonoides entre E y Q, no se observó; así como tampoco el efecto de un agente canalizante. Como ha sido reportado previamente por Velasco *et al.* (2009), el efecto combinado de las variables involucradas en la oxidación, entre las cuales el oxígeno puede ser o no un factor limitante, puede tener una importante influencia en las diferencias comparativas entre las muestras cuando se ensayan durante un almacenamiento a largo plazo.

3.2.3.2.2. Distribución de compuestos polares durante el almacenamiento en placa

En la Tabla 14, se presenta el contenido de la fracción polar para los sistemas de AG control y con la adición de micropartículas de flavonoides sin (E-In y Q-In) y con agente canalizante (E-(In-APS) y Q-(In-APS)) durante el almacenamiento en placa a 60°C.

La distribución de compuestos de oxidación de la fracción polar de los sistemas de AG sin y con adición de micropartículas de flavonoide durante 35 días de almacenamiento a 60°C, los compuestos identificados se agruparon por el tipo de deterioro (polímeros de triglicéridos PTG, dímeros de triglicéridos DTG y triglicéridos oxidados TGOx, diglicéridos DG y ácidos grasos libres AGL).

Tabla 14. Distribución de los compuestos de oxidación en aceite de girasol sin y con micropartículas de flavonoides, sin y con agente canalizante (APS), almacenados en placa a 60°C.

Sistemas	Distribución de Compuestos de oxidación (%)					
	(Días)	TGOx	DTG	PTG	DG	AGL
AG (control)	3	3,0± 0,71	0,2 ± 0,04	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,42	0,2 ± 0,1
AG (control)	35	16,28± 0,6 ^{bc}	10,1 ± 0,4 ^c	8,2 ± 0,3 ^b	1,2 ± 0,4 ^a	0,3 ± 0,0 ^{ab}
AG+E-(In-APS)	3	2,60 ± 0,03	0,3± 0,06	Nd	0,5 ± 0,03	0,2 ± 0,06
	7	5,9 ± 0,30	0,7± 0,04	0,1 ± 0,001	1,4 ± 0,14	0,4 ± 0,11
	11	5,9 ± 0,91	1,5± 0,32	1,2 ± 0,62	1,1 ± 0,17	0,3 ± 0,04
	14	5,2± 1,23	1,6± 0,14	1,3 ± 0,36	5,1 ± 3,00	0,3 ± 0,02
	21	8,5± 0,16	2,2± 0,37	0,8 ± 0,08	1,1 ± 0,02	0,2 ± 0,01
	28	11,1± 0,44	2,2± 0,10	1,1 ± 0,03	1,5 ± 0,06	0,3 ± 0,01
	35	13,6± 0,56 ^{ab}	6,9± 0,17 ^a	7,3 ± 0,18 ^b	1,7± 0,57 ^b	0,4 ± 0,04 ^c
	35	17,6± 1,5 ^c	8,9± 0,7 ^{bc}	4,7 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,27 ^a	0,3 ± 0,06 ^{ab}
AG+Q-(In-APS)	3	4,6± 0,09	0,4± 0,01	0,1 ± 0,01	1,0 ± 0,02	0,3 ± 0,01
	7	2,2± 0,54	0,9± 0,09	0,5 ± 0,02	1,0 ± 0,21	0,02 ± 0,01
	11	6,8 ± 0,56	0,5± 0,09	0,1 ± 0,02	1,3 ± 0,13	0,8 ± 0,02
	14	7,5± 0,54	0,5± 0,09	0,1 ± 0,02	0,8 ± 0,13	0,2 ± 0,02
	21	8,1± 0,03	2,1± 0,01	0,4 ± 0,02	1,13 ± 0,0	0,3 ± 0,0
	28	12,6± 2,11	3,3± 0,25	0,9 ± 0,36	1,8 ± 0,14	0,5 ± 0,08
	35	12,2± 0,24 ^a	9,1 ± 0,47 ^{bc}	5,3 ± 0,14 ^a	1,1 ± 0,07 ^a	0,4 ± 0,02 ^{bc}
	35	16,9 ± 2,9 ^c	7,6± 1,62 ^{ab}	5,2 ± 3,8 ^a	1,2 ± 0,48 ^a	0,2 ± 0,07 ^a

AG: aceite de girasol; TGOx: monómeros oxidados; DTG: dímeros; PTG: polímeros; DG: diglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; Letras distintas (a-d) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre sistemas a los 35 días de estudio; *día 35 de almacenamiento.

En general, los resultados muestran que en todos los sistemas estudiados, los TGOx son los compuestos detectados mayoritariamente y corresponden a los primeros estados de oxidación. En particular, el sistema de AG+ Q-(In-APS) disminuyó significativamente la formación de TGOx con respecto al AG (control) y con respecto a los sistemas de AG con micropartículas sin APS (AG+E-In y AG+Q-In). El efecto del agente canalizante se observó al comparar los sistemas AG+Q-(In-APS) vs AG+(Q-In) y AG+E-(In-APS) vs AG+(E-In) en el día 35 de almacenamiento, donde los sistemas con APS presentaron un contenido significativamente menor de TGOx respecto a los sistemas sin APS. Sin embargo, el tipo de flavonoide no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de TGOx en el día 35 de almacenamiento.

Similar a los TGOx, la evolución de DTG y PTG se incrementa conforme progresa la oxidación y la aparición de polímeros corresponde al inicio de la propagación en AG. En el presente estudio, la adición de Q-(In-APS), Q-In y E-In a AG, mostró el efecto protector de las micropartículas (Q y E) en retardar las reacciones de polimerización en el AG, a los 35 días de almacenamiento. Sin embargo, no se encontró un efecto claro del agente canalizante y tipo de flavonoide sobre el contenido de DTG y PTG.

El predominio de los compuestos (PTG, DTG y TGOx) de degradación termooxidativa encontrada en este estudio, corresponden a la formación que se esperaría conforme la oxidación progresa en aceites (Velasco *et al.*, 2010).

3.2.3.2.3. Evolución de tocoferoles en sistemas con AG durante el almacenamiento en placa

En las Figuras 20 (A y B), se muestra la formación de CP y retención de α -tocoferol para los sistemas de AG (control), AG con micropartículas de flavonoides sin y con agente canalizante (APS), durante el almacenamiento en placa, para epicatequina y quercetina, respectivamente.

El principal tocoferol presente en el AG, es el α -tocoferol, con un contenido de 548 mg/kg AG. El estudio de su evolución se fundamenta en investigaciones previas donde se describe una interacción entre flavonoide y α -tocoferol (Pekkarinen *et al.*, 1999; Pazos *et al.*, 2007).

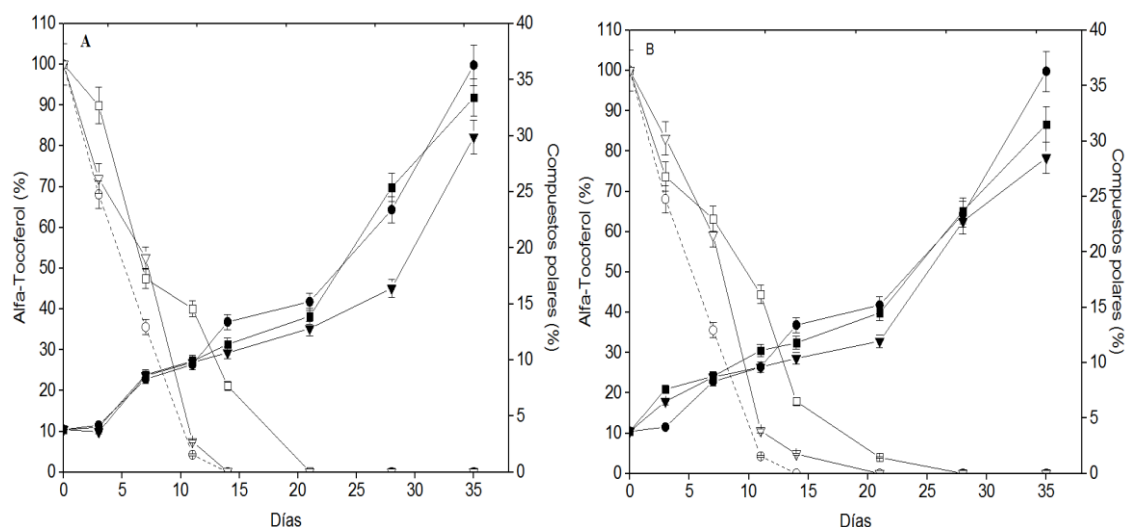


Figura 20. Formación de CP (símbolos sólidos) y retención de α -tocoferol (símbolos abiertos) en aceite girasol control AG (● ○), A) AG+E-In (■ □) y AG+E-In-APS (▼, ▽) B) AG+Q-In (■ □) y AG+Q-In-APS (▼, ▽) durante los ensayos de almacenamiento en placa a 60°C.

De acuerdo con las Figuras 20 A y B, la retención del α -tocoferol durante los estudios de almacenamiento en placa (sin burbujeo de oxígeno), se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, se produce un incremento gradual en la formación de compuestos polares. En general, entre los días 14 a 21, la oxidación se acelera en todos los sistemas debido a la disminución en la retención del contenido de α -tocoferol, siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) para AG control. Por otra parte, como lo indican las Figuras 20 B (AG+E-In y AG+E-(In-APS)) y 20 A (AG+Q-In y AG+Q-In-APS), después de 11 días de almacenamiento, todos los sistemas de AG con la adición de micropartículas sin APS (Q-In y E-In) presentaban una mayor retención de α -

tocoferol y los sistemas con APS (Q-(In-APS) y E-(In-APS)) una menor retención de α -tocoferol, similar al AG. Los flavonoides y tocoferoles compiten por los radicales peroxilo pero al mismo tiempo puede ocurrir una regeneración entre flavonoide y tocoferoles, donde flavonoides regeneran tocoferoles o viceversa (Pekkarine *et al.*, 1999; Pedrieell y Skibsted, 2002; Becker *et al.*, 2007). El mecanismo que describe la interacción entre flavonoides y tocoferoles no está aún bien definido (Marinova *et al.*, 2008). Pero la interacción entre estos compuestos ha quedado demostrada en distintas investigaciones, como lo reportó Chen *et al.*, (2012), quienes encontraron un efecto sinérgico-antioxidante entre quercetina y α -tocoferol, debido a la regeneración de tocoferol oxidado por quercetina en sistemas de películas comestibles.

En la Tabla 15, se presentan las constantes de velocidad de degradación de primer orden de los tocoferoles AG y AG con la adición de micropartículas de flavonoide sin APS (E-In y Q-In) y con APS (E-(In-APS) y Q-(In-APS)) calculadas como la pendiente de un gráfico del logaritmo natural del porcentaje de retención versus el tiempo (Anexo 9).

Tabla 15. Constante de velocidad de degradación de primer orden para α -tocoferol en sistemas de aceite de girasol sin y con la adición de micropartículas de flavonoides sin APS y con APS.

Sistemas	k_{obs} (días ⁻¹) α -tocoferol $10^2X \pm 10^2DE$
AG	17,3 \pm 0,1 ^a
AG + E-In	15,0 \pm 0,1 ^c
AG + Q-In	14,7 \pm 0,04 ^c
AG + E-In-APS	17,2 \pm 0,001 ^a
AG + Q-In-APS	16,1 \pm 0,03 ^b

AG: aceite de girasol; Q: quercetina; E: epicatequina, In: inulina, APS: aislado proteico de soya.; K_{obs} : constante de velocidad de degradación del α -tocoferol. Los resultados se expresan como X (promedio) \pm DE (desviación estándar) (n=3). Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas entre sistemas.

Los sistemas de AG con adición de micropartículas de flavonoides de E y Q sin APS presentaron constantes de velocidad de degradación de α -tocoferol significativamente menores con respecto al AG (control) y a los sistemas con APS (E-(In-APS) y Q-(In-APS)). Por otra parte, la formación de CP a los 35 días de almacenamiento fue menor en los sistemas de AG con micropartículas con APS (aunque no significativa) como se mostró en la Tabla 13. Estos resultados sugieren que una mayor velocidad de degradación de α -tocoferol y un menor contenido de CP (día 35) en los sistemas de AG+micropartículas de flavonoides con APS, se podría explicar por una mayor degradación de tocoferol por su acción antioxidante y/o una mayor velocidad de degradación de tocoferol para regenerar los flavonoides, los cuales protegerían a los sistemas de la oxidación.

Estos resultados están en línea con los encontrados para CP durante el almacenamiento en placa donde no se encontraron diferencias significativas al final del estudio de

estabilidad (día 35), lo que sugiere que cuando se alcanza un nivel de oxidación avanzado, no existe influencia de la estructura química del flavonoide (E y Q) y de la presencia de APS en las micropartículas en los estudios de almacenamiento en placa (sin burbujeo de oxígeno)

CONCLUSIONES

- El grado de cristalinidad de micropartículas de flavonoides E y Q elaboradas con inulina por secado por atomización dependió de la temperatura de la solución de alimentación. Las micropartículas elaboradas con menor temperatura de alimentación presentaron mayor predominio de zonas cristalinas y mayor eficiencia de encapsulación. Así, la temperatura de alimentación en el secado por atomización sería una estrategia para controlar otras propiedades de las micropartículas como el tamaño de partícula, la humedad y morfología entre otras, lo que condiciona la aplicabilidad de las micropartículas en sistemas alimentarios.
- El grado de cristalinidad de micropartículas de flavonoides (Q y E) con inulina (200 mg/kg) influyó sobre la estabilidad oxidativa de linoleato de metilo y aceite de girasol a 60°C, dependiendo del tipo de flavonoide. En micropartículas de E no se encontró un efecto del grado de cristalinidad sobre el TI (con burbujeo de oxígeno) y compuestos polares (almacenamiento en placa), mientras que las micropartículas de Q con predominio de zonas amorfas aumentaron el TI y disminuyó la formación de compuestos polares.
- En micropartículas de flavonoides con inulina como agente encapsulante y APS como agente canalizante, se confirmó la formación de canales, en una matriz lipídica por microscopia confocal de barrido láser. El mecanismo involucraría la disolución de moléculas de APS por el medio lipídico, formando canales dentro de la red polimérica que favorecería la interacción flavonoide encapsulado con el medio lipídico y por lo tanto la difusión del flavonoide hacia el medio lipídico
- La incorporación de un agente canalizante (APS) en micropartículas de flavonoides (Q y E) con inulina (200 mg/kg) a matrices lipídicas (linoleato de metilo y aceite de girasol) aumentan en el TI de los sistemas lipídicos, retardan la formación de compuestos de oxidación y previenen reacciones de polimerización, siendo más evidente en las micropartículas con Q. La magnitud del efecto dependió del tipo de flavonoide (polaridad, solubilidad, interacción flavonoide-inulina) y del tipo de matriz lipídica.

BIBLIOGRAFIA

- Ahn, J., Kim, Y., Seo, E., Choi, Y., Kim, H. 2008. Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal of Food Engineering*. **84**: 327-334.
- André, I., Mazeau, K., Tvaroska, I., Putaux, J., Winter, W., Taravel, F., Chanzy, H. 1996. Molecular and crystal structures of inulin from electron diffraction data. *Macromolecules*. **29**: 4626-4635
- Antoshina, S., Selishcheva, A., Sorokoumova, G. Utkina, E., Degtyarev, N., Shvets, V. 2005. Effects of flavonoids of various structures on peroxidation of neutral lipids of animal origin. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **41**: 18-23.
- AOAC. 1996. Official methods of analysis of AOAC International. 16th Edn., Gaythersburg, MD, USA.
- AOCS. 1993. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4th Edn., AOCS Press, Champaign IL. (USA).
- Barclay, L., Vinqvist, M. R. 2003. Phenols as antioxidants. The chemistry of phenols. *American Journal of Clinical Nutrition*. **79**: 727-747.
- Becker, E., Ntouma, G., Skibsted, L. 2007. Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid system of increasing structural organization. *Food Chemistry*. **103**: 1288-1296.
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bourbonb, A., Pinheirob, A., Serrad, A., Martins, M., Nunes, M., Vicente, A., Delgadillo, I., Duarted, C., Beirão da Costa, M. 2012. Effect of the matrix system in delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of food Engineering Food*. **110**: 190-199.
- Belitz, H. D. 1997. Lípidos. In H.D. Belitz, W. Química de Alimentos. Grosh (Eds.), Acribia, Zaragoza, España. pp: 175-267.
- Bors, W., Muchel, C., Sttetaier, K. 1997. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*. **6**: 399-402.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition. Reviews*. **56**: 317-333.
- Caddeo, C., Nácher, A., Díes-Sales., Merino, M., Fadda, A., Manconi, M. 2014. Chitosan-xanthan gum microparticle-based oral tablet for colon targeted and sustained delivery of quercetin. *Journal of Microencapsulation*. **31**: 1-6.

- Cai, Y. Z., Corke, H. 2000. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*. **65**: 1245-1252.
- Chambi, F., Chirinos, R., Pedreschi, R., Betalleluz, I., Debaste, F., Campos, D. 2013. Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from *C. spinosa* (*Caesalpinia spinosa*) pods. *Industrial Crops and Products*. **47**: 168-175.
- Chan, H., Chew, N. Y. 2003. Novel alternative methods for the delivery of drugs for the treatment of asthma. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **55**: 793-805.
- Chebil, L., Humeau, C., Anthoni, J., Dehez, F., Engasser, J. M., Ghoul, M., 2007. Solubility of flavonoids in organic solvents. *Journal of Chemical and Engineering*. **52**: 1552-1556.
- Chen, X., Lee, D., Zhu, X., Yam, K. 2012. Release kinetics of tocopherol and quercetin from binary antioxidant controlled-release packaging films. *Journal Agricultural Food Chemistry*. **60**: 3492-3497.
- Chiou, D. y Langrish, T.A.G. 2007. Crystallization of amorphous components in spray-dried powders. *Drying Technology*. **25**: 1427-1435.
- Choa, S., Park, J., Batt, H., Thomas, R. 2007. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. *LWT-Food Science and Technology*. **40**: 418-423.
- Choe, E. y Min, D. B. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **5**: 169-186.
- Chun, W., Chen, L., Li, W. 2005. Preparation of microencapsulation quercetin and its antioxidative properties in oils. *Agro Food Industry Hi-tec*. **26**: 27-29.
- Chun, W., Linlin, C., Jian, L. 2006. Microencapsulation of semen cuscuteae flavonoids and releasing property. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*. **9**: 56-60.
- Cuvelier, M., Bondet, V., Berset, C. 2000. Behavior of Phenolic Antioxidants in a Partitioned Medium: Structure-Activity Relationship. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, **77** (8): 819-824.
- Das, D. y Langrish, T. 2012. Combined Crystallization and Drying in a Pilot-Scale Spray Dryer. *Drying Technology*. **30**: 998-1007.
- De Souza J.R., Feitosa, J., Ricardo, N., Trevisan, M., De Paula, H., Ulrich, M., Owen, R. 2013. Spray-drying encapsulation of mangiferin using natural polymers. *Food Hydrocolloids*. **33**: 10-18.

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

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

Deng, Z. y Yu, Y. 2004. Process for producing oil-soluble microencapsulated tea polyphenols. *Fine and Speciality Chemicals*. **16**: 3-10.

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

Dobarganes, M. C., Pérez-Camino, M.C., Marquez-Ruiz, G. 1988. High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats. *Fat Science Technology*. **90**. 308-311.

Dobarganes, M. y Márquez-Ruiz, G. 2007. Formation and analysis of oxidized monomeric, dimeric and higher oligomeric triglycerides. In Erickson MD (Ed.), *Deep Frying: Chemistry Nutrition and Practical Applications*. 2nd edition, Champaign, Illinois, AOCS, pp. 87-110.

Elhamirad, A. y Zamanipoor, M. 2012. Thermal stability of some flavonoids and phenolic acids in sheep tallow olein. *European journal of lipid*. **144**: 602-606.

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

Fang, Z. y Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends in Food Science and Technology*. **21**: 510-523.

Fernández, R., Borgesa, S., Botrela, D., Botrela D. 2014. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*. **101**: 524-532.

Frankel, E. 1998. Free radical oxidation, In "Lipid oxidation". E.N. Frankel (ed), The Oily Press. pp 13-22. Dundee, UK.

Frankel, E. 2005. "Lipid Oxidation", The Oily Press. Bridgwater, England.

García, P., Vega, J., Jiménez, P., Santos, J., Robert, P. 2013. Alpha-tocopherol microspheres with cross-linked and acetylated inulin and their release profile in a hydrophilic model. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **115**: 811-819.

García-Ceja, A. y López-Malo, A. 2012. Biopolímeros utilizados en la encapsulación. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. **6**: 84-97.

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

Gordon, M. H. 1991. Oils and fats: taint or flavour. *Chemistry in Britain*. **9**: 1020–1022.

Guardiola, F., Dutta, P. C., Codony, R., Savage, G. 2002. Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence, and biological effects. Champaign, IL AOCS press.

Guevara-Bretón, N.A. y Jiménez-Munguía, T. 2008. Encapsulación: Técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. **2**: 36-49

Halliwel, B. 1995. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. **49**: 1341-1348.

Harborne, J.B. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. In J.B. Harborne (edit). *Methods in plant biochemistry*, vol I, Academic Press, London.

Harborne, J. y Williams, C. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. **55**: 481-504.

Hazra, M., Mandal, D., Mandal, T., Bhuniya, S., Ghosha, M. 2015. Designing polymeric microparticulate drug delivery system for hydrophobic drug quercetin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **23**: 429-436.

Hébette, C., Delcour, J., Koch, M., Booten, K., Kleppinger, R., Mischenko, N., Reynaers, H. 1998. Complex melting of semi-crystalline chicory (*Cichorium intybus* L.) root inulin. *Carbohydrate Research*. **310**: 65-75.

Holgado, F. 2011. Comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados: Influencia de las condiciones de preparación en sistemas modelos y estudios específicos en alimentos. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

Hu, B., Pan, C., Hou, Z., Ye, H., Hu, B., Zeng, X. 2008. Optimization of fabrication parameters to produce chitosantripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 7451-7458.

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

Islam, M., Langrish, T. A. G., Chiou, T. 2010 (a). Particle crystallization during spray drying in humid air. *Journal of Food Engineering*. **99**: 55-62.

Islam, I., Sherrell, R., Langrish T. 2010 (b). An Investigation of the relationship between glass transition temperatures and the crystallinity of spray-dried powders. *Drying Technology*. **28**: 361-368.

Ito, N., Fukushima, S., Tsuda, H. 1985. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *CRC Critical Review in Toxicology*. **15**: 109-150.

IUPAC. 1992. Standard Method 2.507. 1992. Determination of peroxide value, in Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, International Union of Pure and Applied Chemistry, 7th ed., Pergamon Press, Oxford (UK).

Jeong, J. C., Lee, J., Cho, K. 2003. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of controlled release*. **92**: 249-258.

Kerdudo, A., Dingas, A., Fernandez, X., Faure, C. 2014. Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food Chemistry*. **159**: 12-19.

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

Krishnaiah, D., Nithyanandam, R., Sarbatly, R. 2014. A critical review on the spray drying of fruit extract: effect of additives on physicochemical properties. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*. **54**: 449-473.

Kumar, V., Verma, P., Singh, S., 2015. Development and evaluation of biodegradable polymeric nanoparticles for the effective delivery of quercetin using a quality by design approach. *Food Science and Technology*. **61**: 330-338.

Laguerre, M., Bayrasy, C., Panya, A., Weiss, J. 2015. What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*. **55**: 183-201.

Lamprecht, A., Schafer, U. F., Lehr, C. M. 2000. Visualization and quantification of polymer distribution in microcapsules by confocal laser scanning microscopy (CLSM). *International Journal of Pharmaceutics*. **196**: 223-226.

Langrish, T. 2008. Assessing the rate of solid-phase crystallization for lactose: the effect of the difference between material and glass-transition temperatures. *Food Research International*. **6**: 630-636.

Lauro, M., Maggi, L., Conte, U., De Simone, F., Aquino, P. 2005. Rutin and quercetin gastro-resistant microparticles obtained by spray-drying technique. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **5**: 363-369.

Lauro, M., De Simone, F., Sansone, Iannelli, P. 2007. Preparations and release characteristics of naringin and naringenin gastro-resistant microparticles by spray-drying. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **17**: 119-124.

Letan, A. 1996. The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives I. Primary Activity. *Journal of Food Science*. **31**: 518-523.

Liang, L., Yan, H., Zhang, J., Dai, W., Gao, X., Zhou, Y., Puligundla, P. 2017. Preparation and characterization of antioxidant edible chitosan films incorporated with epigallocatechin gallate nanocapsules. *Carbohydrate Polymers*. **171**: 300-336.

Madsen, H. L., Andersen, C. M., Jorgensen, L. V., Skibstead, L. H. 2000. Radical scavenging by dietary flavonoids. A kinetic study of antioxidant efficiencies. *European of Food Research and Technology*. **211**: 240-246.

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

Marinova, E., Toneva, A., Yanishlieva, N. 2008. Synergistic antioxidant effect of α -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food Chemistry*. **106**: 628-633.

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

Márquez-Ruiz, G., Martín-Polvillo, M., Dobarganes, M. 2003. Effect of temperatura and addition of α -tocopherol on the oxidation of trilinolein model system. *Lipids*. **38**: 233-240.

Márquez-Ruiz, G., Holgado, F., García-Martínez, M.C., Dobarganes, M.C. 2007. A direct and fast method to monitor lipid oxidation progress in model fatty acid methyl esters by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1165:122-127.

Márquez-Ruiz, G., García-Martínez, M. C., Holgado F. 2008. Changes and effects of dietary oxidized lipids in the gastrointestinal tract. *Lipids Insights*. **2**: 11-13.

Martínez-Flórez, J., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M. 2002. Revisión. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. **6**: 271-278.

Martin-Polvillo, M., Márquez-Ruiz, G., Dobarganes, M. C. 2004. Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long-term storage at room temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **81**: 577-583.

Masson, L., Robert, P., Romero, N., Izaurieta, M., Valenzuela, S., Ortíz, J., Dobarganes, M.C. 1997. Comportamiento de aceites poliinsaturados en la preparación de patatas fritas para consumo inmediato: Formación de nuevos compuestos y comparación de métodos analíticos. *Grasas y aceites*. **48**: 273-28

Murugesan, R. Orsat, V. 2011. Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients - A Review. *Food Bioprocess Technology*. **8**: 1-12.

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

Nazzaro, F., Pierangelo, O., Fratianni, F., Raffaele, C. 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. **23**:182-186.

Nieto, S., Garrido, A., Sanhueza, J., Loyola, L., Morales, G., Leighton, F., Valenzuela A. 1993. Flavonoids as stabilizer in fish oil: an alternative to synthetic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **70**:773-778.

Palma, A., García, P., Márquez-Ruiz, G., Vergara, C., Holgado F., Giménez B., Robert, P., 2017. Effect of spray-dried flavonoid microparticles on oxidative stability of methyl linoleate as lipid model system. *Journal American Oil Chemistry Society*. **94**: 99-105.

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

Pazos, M., Andersen, M., Medina, I., Skibsted, L. 2007. Efficiency of natural phenolic compounds regenerating α -tocopherol from α -tocopheroxyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**: 3661-3666.

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

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

Pool, H., Quintanar, D., Figueroa, J., Marinho, C., Bechara, J., Godínez L., Mendoza S. 2012. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. 1-12.

Porter, W.L. 1993. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicology and Industrial Health*. **9**: 93-122.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewante Chemie International Edition in English*. **50**: 586-621.

Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA). 1996. Decreto Supremo N° 977/996, Ministerio de Salud.

Reverchon, E., Spada, A. 2004. Crystalline microparticles of controlled size produced by supercritical-assisted atomization. *Industrial Engineering Chemistry Research*. **43**: 1460-1465.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. **20**: 933-956.

Robert, P., García, P., Fredes, C. 2016. Drying and preservation of polyphenols. Chapter 9.

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

Romero, R., Zuñiga, L. 2005. Métodos Estadísticos en Ingeniería. 2ª edición. Universidad Politécnica de Valencia. España.

Ronkart, S., Deroanne, C., Paquot, M., Fougnyes, C., Lambrechts, J., Blecker, C. 2007. Characterization of the physical state of spray-dried Inulin. *Food Biophysics*. **2**: 83-92.

Ronkart, S., Paquot, M., Deroanne, C., Fougnyes, C., Blecker, C.S. 2009. Effect of water uptake on amorphous inulin properties. *Food Hydrocolloids*. **23**: 922-927.

Russin, T.A., Boye, J.I., Pham, H.M., Arcand, Y. 2006. Antioxidant properties of genistein in a model edible oil system. *Journal of Food Science*. **71**: 395-399.

Sansone, F., Picerno, P., Mencherini, T., Villecco, F., D'Ursi, A. M., Aquino, R., Lauro, M. 2011. Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability. *Journal of Food Engineering*. **103**: 188-196.

Schinella, G., Troiani, G., Davila, V., de Buschiazzo, P., Tournier, H. 2000. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **269**: 357-360.

Shahidi, F. y Zhong, Y. 2010. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*. **39**: 4067-4079.

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

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

Stöckmann, H. y Schwarz, K. 2005. The more–The better? Estimating the inhibitory activity of alpha-tocopherol towards lipid oxidation. *Journal of plant physiology*. **162**:785-789.

Su, Y., Xu, J., Ng, Ch., Leung, L., Huang, Y., Chen, Z. 2004. Antioxidant activity of tea theaflavins and methylated catechins in canola oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **81**: 269-274.

Sultana, B., Anwar, F., Przybylski, R. 2007. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. *Food Chemistry*. **104**: 1106-1114.

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

Terao J., M Piskula M., Yao Q. 1994. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **308**: 278-284.

Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V. 2006. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **7**: 140-146.

- Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V. 2007. Defining the role of flavonoid structure on cottonseed oil stabilization: study of A- and C-ring substitution. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **84**: 129-136.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., Nieto, S. 2003. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Grasas y Aceites*. **54**:295-303.
- Velasco, J., Holgado, F., Dobarganes, M. C., Márquez-Ruiz, G. 2009. Effect of relative humidity on the free and encapsulated oil fractions in freeze-dried microencapsulated oils. *Food Research International*. **42**: 1492-1500.
- Velasco, J., Holgado, F., Dobarganes, M. C., Márquez-Ruiz, G. 2010. Oxidative rancidity in foods and food quality. *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages*. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp 3-32.
- Wanasundara, U. y Shahidi, F. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*. **63**: 335-42.
- Woo, M., Wan, R., Marsrinda, S., Meor, M. 2008. Amorphous particle deposition and product quality under different conditions in a spray dryer. *Particuology*, **6**: 265-270.
- Wu, T., Yen, F., Lin, L., Tsai, T., Lin, C., Cham, T. 2008. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. **346**: 160-168.
- Yanishlieva, N. 2004. Inhibición de la oxidación. In N. Yanishlieva, J. Pokorny y M. Gordon (eds), *Antioxidantes de los Alimentos, Aplicaciones prácticas*. pp 33-38. Acribia, Zaragoza, España.
- Yanishlieva, N., Marinova, E. 2001. Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **103**: 752-767
- Yu, J., Wang, L., Walzem, R., Miller, E., Pike, L., Patil, B. 2005. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 2009-2014.
- Zhou, B., Jia, Z., Chen, Z., Yang, L., Wu, L., Liu, Z. 2000. Synergistic antioxidant effect of green tea polyphenols with α -tocopherol on free radical initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Journal Chemical Society, Perkin Transaction*, **2**: 785-791.
- Zuidam, N.J. y Shimoni, E. 2010. Overview of microencapsulates for use in food Products or processes and methods to make them. Chapter 2 Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. 3-29.

ANEXOS

Actividades realizadas durante el desarrollo de la tesis doctoral.

- **Publicación**

Guibeth Morelo, Gloria Márquez-Ruiz, Francisca Holgado, Begoña Gimenez and Paz Robert. **2017**. Design of flavonoids microparticles with channel forming properties to improve oxidative stability of sunflower oils. *European Journal Lipid Science Technology*, 119: 1-9.

- **Pasantía Doctoral:** Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid, España Investigador Responsable estadia: Dra Gloria Marquez-Ruiz, (Enero - Marzo 2015).

- **Participación en Congresos**

- Morelo G; Robert P., y Jiménez P.,. Efecto de la Microestructura cristalina de micropartículas de flavonoides sobre la liberación e incremento de la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas. XI congreso Iberoamericano de Alimentos (CIBIA 2017), Valparaíso, Chile, 22 al 25 de Octubre de **2017**. **Presentación oral**.
- Morelo G; Robert P., y Jiménez P. Encapsulación de quercetina por secado con atomización; influencia del grado de cristalinidad sobre la estabilidad oxidativa de aceite de girasol. XIX Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos. XI Jornadas Uruguayas de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 7 al 10 de agosto de **2016**. Montevideo, Uruguay. **Premio ALACCTA 2016 al mejor trabajo libre, modalidad poster**.
- Morelo G., Jiménez P., Robert P. Microencapsulación de flavonoides con inulina y aislado proteico de soya: Efecto antioxidante e incremento de la estabilidad oxidativa de sistemas lipídicos. XXI Congreso de Nutrición. 2 al 5 de Diciembre de **2015**. Concepción, Chile. **Presentación oral**

- Morelo, G, Jiménez P., Robert P., Márquez-Ruiz G; Meza C. Antioxidant effect of flavonoid microparticles with hydroxypropylcellulose and inulin on the oxidative stability of methyl linoleate and sunflower oil. World Congress on Oils & Fats and 31st ISF Lectureship Series. XVI Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites. 31 de octubre al 4 de Noviembre de **2015**. Rosario, Argentina. **Presentación oral**

- Morelo, G., Robert P., Palma L. y Garcia P. Oxidation stability of sunflower oil with flavonoids microparticles. 2nd Latin-America Symposium on Encapsulation. Noviembre 24 al 28, **2014**. Joao Pessoa, Brazil.

- Romero N, Morelo G, Ortuzar P, Saavedra J, Tapia F, Escobar F, Barriga A y Sepulveda B. Evolución de los compuestos fenólicos de tres variedades de aceites de oliva virgen cultivadas en Chile en dos latitudes. XV Congreso Latinoamericano y exhibición de grasas y aceites. AOCS. 20-23 de Agosto de **2013**. Santiago de Chile

ANEXO 1

Determinación de la composición de ácidos grasos.

El análisis de los ácidos grasos del aceite de girasol (AG) se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Reactivos

KOH en metanol.

Hexano p.a.

Estándares (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania)

Procedimiento

Derivatización de ácidos grasos: metilación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico: se pesó el aceite (100 mg) en un matraz aforado, se agregó 500 μL de KOH en metanol y 3 mL de hexano. Posteriormente se agitó por 30 s y se dejó reposar por 30 min.

Determinación por cromatografía de gases (CG): se inyectó 0,5 μL de la fase superior (hexano) al cromatógrafo de gases HP 5890 serie II equipado con detector de ionización de llama, sistema Split y columna capilar BPX 70 de 50 m de largo, 0,25 μm de espesor de film y 0,25 mm de diámetro interno.

La temperatura inicial del horno fue de 160 °C, durante 3 min y luego se programó con un incremento de 1 °C/min, hasta alcanzar 230 °C. La temperatura del inyector y la del detector correspondió a 240 °C. El gas portador correspondió a hidrógeno.

Para identificar a los ácidos grasos, se compararon los tiempos de retención relativos de la muestra de aceite con los tiempos de retención de un estándar inyectado previamente.

ANEXO 2

Índice de peróxidos

El índice de peróxido (PV) se determinó según el método de IUPAC (2.411) Este método permite determinar todas aquellas sustancias (miliequivalentes de peróxido por Kg de grasa) que oxidan el ioduro de potasio KI, los cuales pueden ser principalmente peróxidos originados por la oxidación del aceite. La técnica se fundamenta en una titulación iodométrica y se basa en la capacidad oxidante de los peróxidos para liberar yodo a partir de ioduro de potasio.

Procedimiento

Se pesó el aceite (5 g) en un balón de fondo plano de 250 mL, en una balanza analítica. Se adicionaron 30 mL de solución de ácido acético:cloroformo (3:2 v/v) agitando suavemente hasta lograr su disolución. Se añadió 3 g de KI y 0,5 mL de H₂O destilada, se agitó y se dejó en reposo en oscuridad durante 1 min. Posteriormente se agregaron 30 mL de H₂O destilada, 0,5 mL de una solución de almidón (1% p/v) como indicador y se tituló con una solución de tiosulfato de sodio 0,01N hasta la desaparición del color azul, empleando una microbureta. El índice de peróxido se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 100}{P}$$

Donde:

V₀= mL de Tiosulfato de sodio usado para el blanco.

V₁= mL de Tiosulfato de sodio usado en la muestra.

N= Normalidad del tiosulfato de sodio

P= Peso de la muestra (g)

ANEXO 3

Determinación de tocoferoles en aceite de girasol (AG) inicial y sometido a calentamiento en placa con adición de micropartículas de flavonoides.

Reactivos

Hexano HPLC

Estándares de tocoferoles alfa, beta, gama y delta (Merck, Darmstadt, Alemania).

Matraz aforado de 10 ml color ambar.

Procedimiento

Las muestras de aceite se filtraron y se pesó 100 mg en un matraz ámbar (10 mL). Luego, se aforó con hexano HPLC, se agitó suavemente (30 s) en vortex y posteriormente se inyectó (20 µL) al HPLC.

La identificación y cuantificación de tocoferoles se realizó por comparación con los estándares de tocoferoles de concentración conocida, mediante la siguiente fórmula:

$$ppm \text{ Tocoferoles} = \frac{(a * C * V * D)}{(A * P)}$$

Donde:

a = Área del peak del tocoferol en la muestra

C= Concentración de tocoferol en el estándar (µg/mL)

V= Volumen del matraz aforado (mL)

D= Factor de dilución

A= Área del peak del tocoferol en el estándar

P= Peso de la muestra (g)

ANEXOS 4

Cromatografía en columna para determinación de compuestos polares en el aceite de girasol (AG) sin y con la adición de microparticulas, sometidos a calentamiento en placa.

Determinación del porcentaje de compuestos polares por cromatografía en columna abierta (AOCS Cd 20-91,1993).

Reactivos

Éter de petróleo: éter etílico (87:13 v/v)

Éter etílico p.a.

Silica gel 60 (tamaño de partícula: 0,063-0,2 mm, Merck) ajustada a un contenido de humedad de un 5%.

Arena de mar p.a.

Columna de vidrio (10 mm diámetro interno, 150 mm longitud, con llave de paso). En la parte superior contiene balón de 100 mL conectado a la columna

Procedimiento

Se pesó 1 g de las muestras de aceite en una balanza analítica, registrando el peso exacto. La sílica gel se activó a 160 °C por 4 h, luego se ajustó la humedad a un 5% (p/p), con agua destilada. Se colocaron matraces de 100 mL en una estufa a 100°C durante 30 min y se dejaron enfriar en el desecador, luego se registró el peso de los matraces.

Preparación de la columna

Se colocó algodón en la base de la columna. Para rellenar la columna se preparó la sílica (5g) con 10 mL de éter de petróleo:éter etílico (87:13 v/v) y se se adicionó a la columna, asegurándose de traspasar toda la sílica, evitando la formación de burbujas por medio de suaves golpes en las paredes de la columna con una espátula plástica. Posteriormente, se adicionó arena de mar (500 mg). El aceite se sembró con pipeta aseptur, enjuagando el dedal varias veces con la fase móvil (éter de petróleo: éter etílico (87:13 v/v)), luego la columna se eluyó con 60 mL de la fase móvil, con un flujo de 1 mL/min. En un matraz esmerilado de 100 mL se recolectó toda la fracción I (compuestos no polares). La fase II (compuestos polares) se eluyó con éter etílico (60 mL) a un flujo de 1 mL/min. Finalmente, ambos matraces se llevaron a evaporador rotatorio hasta remover todo el solvente, se colocaron en estufa por 10 min y luego en un desecador. Para eliminar el oxígeno, se agregó nitrógeno y se pesaron hasta alcanzar peso constante.

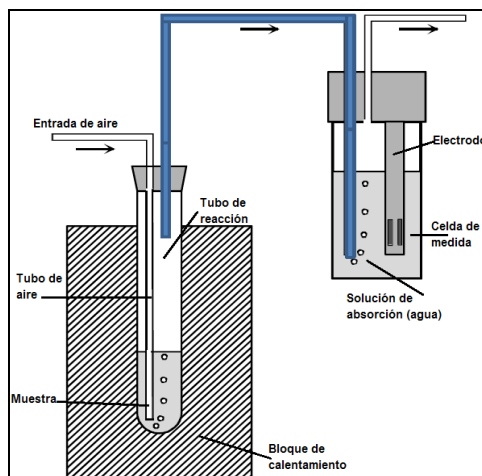
La fracción I corresponde a los triglicéridos no alterados y la fracción II a los triglicéridos alterados o compuestos polares totales. El porcentaje de compuestos polares se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$\%CP = \frac{\text{Peso obtenido de la fracción}}{(\text{g}) \text{ de la muestra}} * 100$$

ANEXOS 5

Tiempo de Inducción (Rancimat) para linoleato de metilo y aceite de girasol sin y con adición de micropartículas

Este método se basa en la medición del tiempo de resistencia a la termooxidación de un aceite o materia grasa sometida a calentamiento en presencia de un flujo de constante de aire. Este proceso produce la oxidación de las moléculas de ácidos grasos en la muestra. En primer lugar, se forman peróxidos como productos de oxidación primarios, estos se descomponen y se forman productos de oxidación secundarios, entre ellos, ácidos orgánicos volátiles de bajo peso molecular, por ejemplo, ácido acético y ácido fórmico. Los productos de oxidación de naturaleza volátil son transportados por la corriente de aire a la celda de medición donde se dispersaron en una solución de muy baja conductividad (agua bidestilada). Allí tiene lugar la medición continua de la conductividad. El aumento de la conductividad indica la presencia de ácidos volátiles. El tiempo transcurrido hasta la formación de estos productos de reacción secundarios es lo que se denomina tiempo de inducción, periodo de inducción o índice de estabilidad oxidativa.



Esquema del funcionamiento del equipo Rancimat

Procedimiento

Las muestras de aceite se pesaron en una balanza analítica (3 g). El estudio se realizó a una temperatura de 60 °C. Se agregó 90 mL de agua destilada a cada una de las celdas de medición. Se colocaron los electrodos en estas celdas y los tubos que contenían las muestras en la placa calefactora del equipo. Se conectó el flujo de aire, verificándose que la conductividad inicial de los electrodos no sobrepasara los 2 uS/cm. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado, determinando como parámetro el tiempo de inducción (TI) y los uS/cm en un equipo Rancimat 892 Professional (Metrohm).

ANEXO 6

Cromatografía de exclusión por tamaño (HPSEC).

A partir de la fracción de compuestos polares de las muestras de aceite AG, se pueden separar mediante cromatografía líquida de exclusión, 5 grupos de compuestos de peso molecular diferenciado, que en general, se distribuyen en 3 grupos diferentes. El grupo de deterioro térmico que corresponde a los polímeros de triglicéridos (PTG) y dímeros de triglicéridos (DTG) característicos de la alteración térmica. El grupo de los triglicéridos oxidados (TGOx) originados exclusivamente por el oxígeno del aire y que constituyen el deterioro oxidativo y los compuestos de hidrólisis atribuidos a la acción de la humedad que corresponden a diglicéridos (DG) y ácidos grasos libres (AGL).

Equipo: Merck Hitachi L-6200, detector de índice de refracción Merck RI-71, integrador Merck Hitachi 2500. *Columnas:* dos columnas PL-gel, Hewlett Packard (250 cm de largo x 4,6 mm d.i. x 100 y 500 Å de tamaño de poro), conectadas en serie, empacadas con un copolímero de estirenodivinilbenceno altamente entrecruzado (5 µm tamaño de partícula).

Condiciones de análisis HPLC.

Fase móvil: tetrahidrofurano (THF) grado HPLC

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Tiempo de corrida: 20 min por muestra.

Procedimiento.

Las muestras de los sistemas de LM, AG (control) y de AG con adición de micropartículas de E, N y Q, se disolvieron en THF, obteniendo una concentración entre 7 a 12 mg/mL. La identificación de las especies de deterioro térmico, oxidativo e hidrolítico se realizó por comparación de los tiempos de retención de los peaks obtenidos en las muestras con patrones de especies de deterioro térmico, oxidativo e hidrolítico. El contenido de las diferentes especies de deterioro se calculó:

$$PTG(\%) = \frac{(A * PTG / \Sigma A)}{CP}$$

$$DTG(\%) = \frac{(A * DTG / \Sigma A)}{CP}$$

$$TGO(\%) = \frac{(A * TGO / \Sigma A)}{CP}$$

$$DG(\%) = \frac{(A * DG / \Sigma A)}{CP}$$

$$AGL(\%) = \frac{(A * AGL / \Sigma A)}{CP}$$

Donde:

A: área del peak correspondiente.

ΣA = suma de todas las áreas de los peaks.

CP= porcentaje de compuestos polares en el aceite.

% PTG: porcentaje de polímeros de triglicéridos en el aceite

% DTG: porcentaje de dímeros de triglicéridos en el aceite

% TGOx: porcentaje de polímeros de triglicéridos oxidados en el aceite

% DG: porcentaje de polímeros de diglicéridos en el aceite

% AGL: porcentaje de polímeros de ácidos grasos libres.

ANEXO 7

Análisis de varianza para la eficiencia de encapsulación y la liberación de flavonoides (LH) en hexano (t14), para el diseño Box-Behnken de los sistemas de micropartículas de flavonoides (E, N y Q) con inulina y aislado proteico de soya

Ánalysis de varianza - Optimizacion sistema de micropartículas E-(In-APS)

7.1. Análisis de Varianza de eficiencia de encapsulación para el diseño Box-Behnken de E-(In-APS) con inulina como agente encapsulante y APS como agente canalizante

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

R-cuadrada = 95,9259 percent

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 88,5926 percent

Error estándar del est. = 4,06446

Error absoluto medio = 1,80222

Estadístico Durbin-Watson = 1,69496 (P=0,1336)

Autocorrelación residual de Lag 1= -0,107982

7.2. Análisis de Varianza para la liberación en hexano (t14) para el diseño Box-Behnken de E-(In-APS) con inulina como agente encapsulante y APS como agente canalizante

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F-ratio</i>	<i>p-Valor</i>
A:Relación	16,82	1	16,82	1,14	0,3349
B:APS	5196,9	1	5196,9	351,49	0,0000
C:Temperatura	45,6013	1	45,6013	3,08	0,1394
AA	295,763	1	295,763	20,00	0,0066
AB	18,0625	1	18,0625	1,22	0,3194
AC	115,563	1	115,563	7,82	0,0382
BB	206,31	1	206,31	13,95	0,0135
BC	0,64	1	0,64	0,04	0,8434
CC	393,621	1	393,621	26,62	0,0036
Total error	73,9275	5	14,7855		
Total (corr.)	6247,03	14			

R-cuadrada = 98,8166 percent

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 96,6865 percent

Error estándar del est. = 3,84519

Error absoluto medio = 1,88333

Estadístico Durbin-Watson = 1,69653 (P=0,1342)

Autocorrelación residual de Lag 1= 0,138571

7.3. Optimización conjunta.

Optimizar Deseabilidad
Valor óptimo = 0,806163

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Relación	20,0	50,0	50,0
APS	0,0	1,7	0,400802
Temperatura	120,0	160,0	159,999

Ánalysis de varianza - Optimizacion sistema de microparticulas N-(In-APS)

7.4. Análisis de Varianza de **eficiencia de encapsulación** para el diseño Box-Behnken de N-(In-APS) con inulina como agente encapsulante y APS como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-ratio	p-Valor
A:Relación	0,98	1	0,98	0,10	0,7628
B:APS	453,005	1	453,005	46,96	0,0010
C:Temperatura	0,605	1	0,605	0,06	0,8122
AA	33,2308	1	33,2308	3,45	0,1226
AB	28,09	1	28,09	2,91	0,1486
AC	1,21	1	1,21	0,13	0,7377
BB	5,76923	1	5,76923	0,60	0,4743
BC	11,56	1	11,56	1,20	0,3235
CC	28,9477	1	28,9477	3,00	0,1438
Total error	48,23	5	9,646		
Total (corr.)	616,729	14			

R-cuadrada = **92,1797** percent

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **78,1032** percent

Error estándar del est = **3,1058**

Error absoluto medio = **1,34**

Estadístico Durbin-Watson = 1,84409 (P=0,2025)

Autocorrelación residual de Lag 1= -0,0111575

7.5. Análisis de Varianza para la **liberación en hexano (t14)** para el diseño Box-Behnken de N-(In-APS) con inulina como agente encapsulante y APS como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-ratio	p-Valor
A:Relación	14,8513	1	14,8513	2,29	0,1903
B:APS	574,605	1	574,605	88,76	0,0002
C:Temperatura	0,10125	1	0,10125	0,02	0,9053
AA	54,9664	1	54,9664	8,49	0,0333
AB	0,3025	1	0,3025	0,05	0,8374
AC	0,64	1	0,64	0,10	0,7659
BB	45,6626	1	45,6626	7,05	0,0451
BC	0,1225	1	0,1225	0,02	0,8960
CC	10,1541	1	10,1541	1,57	0,2658
Total error	32,3692	5	6,47383		
Total (corr.)	741,94	14			

R-cuadrada = **95,6372** percent

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **87,7842** percent

Error estándar del est = **2,54437**

Error absoluto medio = **1,28222**

Estadístico Durbin-Watson = 2,62523 (P=0,7337)

Autocorrelación residual de Lag 1= -0,429214

7.6. Optimización conjunta.

Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo = 0,615469

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Relacion	20,0	50,0	38,6063
APS	0,0	1,7	0,126739
Temperatura	120,0	160,0	120,0

Ánalysis de varianza - Optimizacion sistema de microparticulas Q-(In-APS)

7.7. Análisis de Varianza de eficiencia de encapsulación para el diseño Box-Behnken de Q-(In-APS) con inulina como agente encapsulante y APS como agente canalizante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-ratio	p-Valor
A:Relación	50,5012	1	50,5012	14,72	0,0122
B:APS	246,42	1	246,42	71,85	0,0004
C:Temperatura	1,71125	1	1,71125	0,50	0,5115
AA	26,0108	1	26,0108	7,58	0,0401
AB	46,24	1	46,24	13,48	0,0144
AC	175,562	1	175,562	51,19	0,0008
BB	64,4878	1	64,4878	18,80	0,0075
BC	123,21	1	123,21	35,92	0,0019
CC	193,854	1	193,854	56,52	0,0007
Total error	17,1492	5	3,42983		
Total (corr.)	968,797	14			

R-cuadrada = 98,2298 percent

R-cuadrada (ajustada por g.l.)= 95,0436 percent

Error estándar del est. = 1,85198

Error absoluto medio = 0,907778

Estadístico Durbin-Watson = 1,95296 (P=0,2635)

Autocorrelación residual de Lag 1= -0,091086

7.8. Análisis de Varianza para la liberación en hexano (t14) para el diseño Box-Behnken de Q-(In-APS) con inulina como agente encapsulante y APS como agente canalizante

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Relación	0,005	1	0,005	0,00	0,9912
B:APS	1005,76	1	1005,76	27,23	0,0034
C:Temperatura	7,80125	1	7,80125	0,21	0,6651
AA	344,431	1	344,431	9,32	0,0283
AB	9,3025	1	9,3025	0,25	0,6371
AC	40,3225	1	40,3225	1,09	0,3440
BB	370,463	1	370,463	10,03	0,0249
BC	12,96	1	12,96	0,35	0,5794
CC	465,924	1	465,924	12,61	0,0164
Total error	184,699	5	36,9398		
Total (corr.)	2508,53	14			

R-cuadrada = 92,6372 percent

R-cuadrada (ajustada por g.l.)= 79,3841 percent

Error estándar del est. = 6,07781

Error absoluto medio = 3,00556

Estadístico Durbin-Watson = 2,18999 (P=0,4215)

Autocorrelación residual de Lag 1= -0,168146

7.9. Optimización conjunta.

Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo= 0,844454

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Relación	20,0	50,0	49,3674
APS	0,0	1,7	7,74558E-9
Temperatura	120,0	160,0	131,875

ANEXO 8

Gráfico de Ln (% retención de alfa-tocoferol) vs. tiempo de almacenamiento para los sistemas de AG sin y con la adición de micropartículas con distinto grado de cristalinidad.

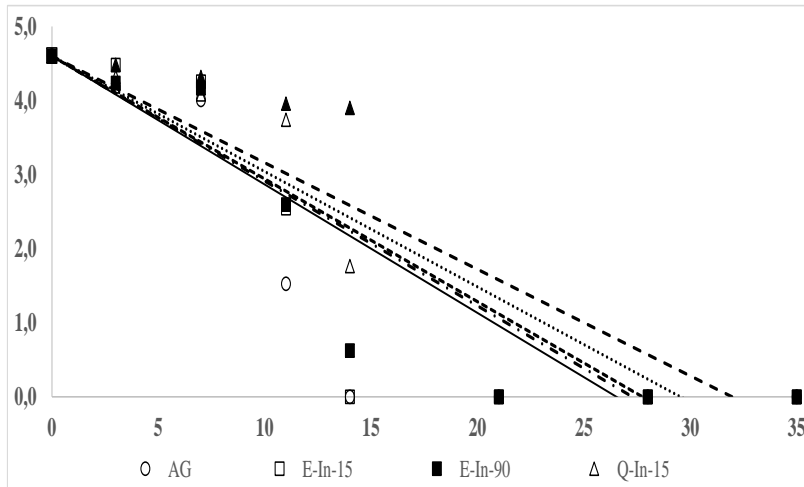


Tabla 8.1. Ecuaciones de la recta para el logaritmo natural de la retención del α -tocoferol en sistemas de aceite de girasol sin y con la adición de micropartículas de flavonoides de distinto grado de cristalinidad

Sistemas	Ecuaciones de la recta	R ²
AG	$y = -0,1735x + 4,6$	0,6942
AG+E-In-15	$y = -0,1686x + 4,6$	0,7456
AG+E-In-90	$y = -0,1657x + 4,6$	0,8043
AG+Q-In-15	$y = -0,1557x + 4,6$	0,8679
AG+Q-In-90	$y = -0,1439x + 4,6$	0,8146

AG: aceite de girasol; Q: quercetina; E: epicatequina, In: inulina.

ANEXO 9

Gráfico de Ln (% retención de alfa-tocoferol) vs. tiempo de almacenamiento para los sistemas de AG sin y con la adición de micropartículas sin y con agente canalizante.

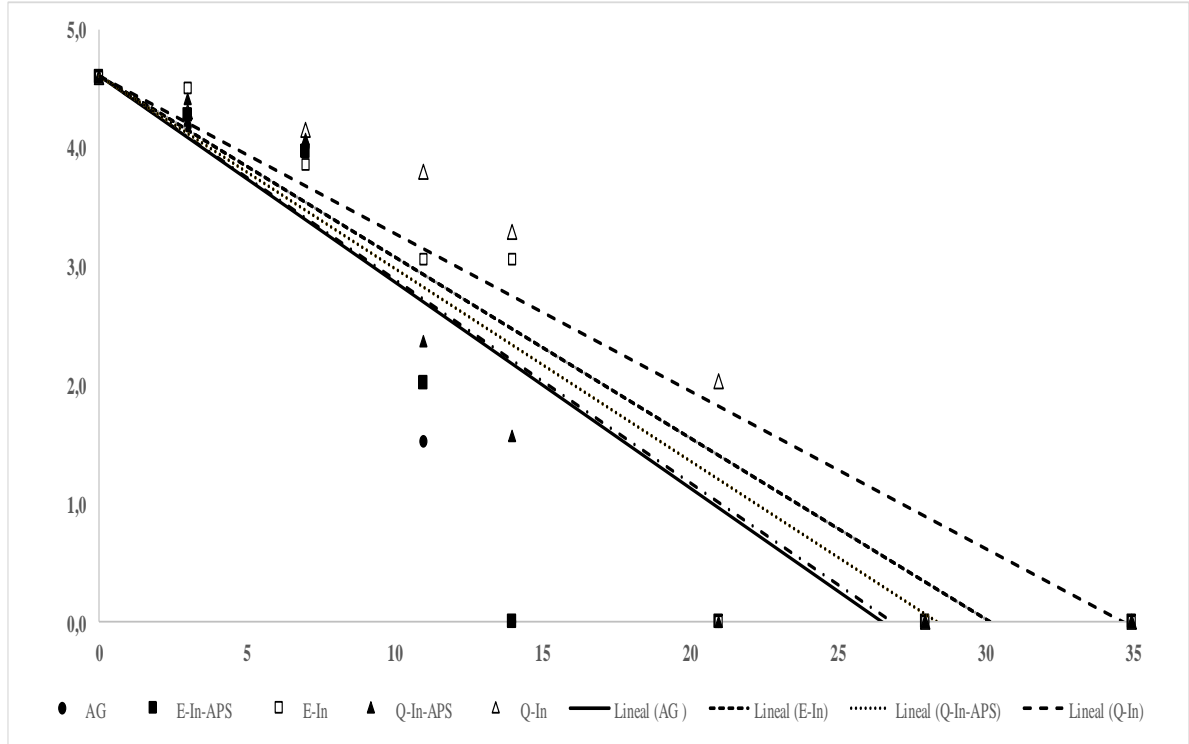


Tabla 9.1. Ecuaciones de la recta para el logaritmo natural de la retención del α -tocoferol en sistemas de aceite de girasol con micropartículas de flavonoides sin y con agente canalizante.

Sistemas	Ecuaciones de la recta	R ²
AG	$y = -0,1735x + 4,6$	0,6942
AG+E-In	$y = -0,1524x + 4,6$	0,8914
AG+Q-In	$y = -0,1327x + 4,6$	0,9273
AG+E-(In-APS)	$y = -0,1716x + 4,6$	0,7258
AG+Q-(In-APS)	$y = -0,162x + 4,6$	0,8682

AG: aceite de girasol; Q: quercetina; E: epicatequina, In: inulina.