



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE NUEZ (*Juglans regia L.*) CON  
AISLADO PROTEICO DE SOYA MEDIANTE SECADO POR ATOMIZACIÓN

**Director**

Dra. Paz Robert Canales  
Departamento de Ciencia y  
Tecnología de los Alimentos  
Universidad de Chile

**Patrocinante**

Dra. Paz Robert Canales  
Departamento de Ciencia y  
Tecnología de los Alimentos  
Universidad de Chile

**Co-director**

Dra. Cristina Vergara Hinostroza  
Centro de Investigación La Platina  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)

Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero en Alimentos

NICOL ANTONIETA HERRERA MARAMBIO

Santiago, Chile

2021

Proyecto de título financiado por el proyecto FONDECYT N° 1181329

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo de manera especial  
a mis padres: Ana y Alejandro,  
por su amor y apoyo incondicional  
durante mi proceso universitario.

## AGRADECIMIENTOS

A dios por guiarme y ser la luz en mi camino.

A mi familia, por ser mi contención emocional a lo largo de toda mi vida, por confiar en mis capacidades, dar ánimos en los momentos difíciles, por sus consejos, por desear lo mejor para mí y sobre todo por transmitirme sus buenas enseñanzas.

A mi directora y guía de tesis, Dra. Paz Robert, por incorporarme a su equipo de trabajo, por su dedicación, orientación y apoyo en resolver mis dudas e inquietudes, además destacar su excelente calidad, vocación y profesionalismo.

A mi Co-Directora de tesis, Dra Cristina Vergara, por apoyarme en los análisis realizados y en cualquier duda que me surgiera.

A mis compañeras de laboratorio, Denisse, Patricia y Alejandra por brindarme toda su ayuda y conocimientos en el laboratorio.

A mis amigas/os a lo largo de este proceso universitario, María José, Fernanda, Cinthya y José Tomás, por todos esos momentos de felicidad y angustia que vivimos juntos.

Al proyecto FONDECYT N° 1181329 por el financiamiento para llevar a cabo este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	2
2.1 Antecedentes generales de la nuez .....	2
2.2 Compuestos bioactivos del aceite de nuez .....	3
2.3 Microencapsulación.....	4
2.3.1 Secado por atomización .....	5
2.3.1.1 Secado por atomización con boquilla de tres fluidos .....	7
2.3.2 Materiales encapsulantes.....	8
2.3.2.1 Aislado proteico de soya .....	10
2.3.2.2 Alginato se sodio.....	10
2.4 Oxidación de aceite en micropartículas.....	11
3. HIPÓTESIS.....	14
4. OBJETIVOS .....	14
4.1 Objetivo General.....	14
4.2 Objetivos Específicos .....	14
5. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS .....	15
5.1 Materiales .....	15
5.2 Reactivos .....	15
5.3 Equipos .....	16
6. METODOLOGÍA .....	17
6.1 Obtención y caracterización del aceite de nuez purificado. ....	17
6.1.1 Purificación del aceite de nuez (AN). ....	17
6.1.2 Caracterización aceite de nuez (AN) y aceite nuez purificado (ANP). ....	17
6.1.2.1 Determinación de tocoferoles en AN y ANP .....	17
6.1.2.2 Perfil de ácidos grasos de AN y ANP .....	17
6.1.2.3 Acidez libre .....	18
6.1.2.4 Índice de Peróxidos .....	18
6.1.2.5 Período de Inducción.....	19
6.2 Optimización de la encapsulación de la emulsión de ANP con aislado proteico de soya (APS) a través del secado por atomización. ....	19

6.2.1	Diseño estadístico.....	19
6.2.2	Preparación de micropartículas de ANP-APS.....	19
6.2.3	Caracterización de las micropartículas de ANP-APS. ....	20
6.2.3.1	Eficiencia de encapsulación (EE):.....	20
6.2.3.2	Periodo de inducción (PI):.....	20
6.3	Elaboración de micropartículas de ANP-APS con recubrimiento de alginato de sodio a través de una boquilla de 3 fluidos.....	21
6.4	Revisión de la bibliografía en relación al uso de ácido ascórbico como secuestrante de oxígeno en micropartículas. ....	21
6.5	Análisis estadístico .....	21
7.	RESULTADOS.....	22
7.1	Caracterización del aceite de nuez (AN) y aceite de nuez purificado (ANP) ..	22
7.2	Optimización de la encapsulación del ANP por secado por atomización .....	23
7.2.1	Análisis estadístico.....	24
7.2.1.1	Eficiencia de encapsulación (EE).....	24
7.2.1.2	Periodo de Inducción.....	26
7.2.1.3	Deseabilidad.....	28
7.3	Caracterización de las micropartículas ANP-APS obtenidas bajo condiciones óptimas contrastado con la literatura. ....	29
7.3.1	Temperatura del aire de entrada al secador .....	29
7.3.2	Relación aceite de nuez: biopolímero .....	30
7.3.3	Eficiencia de encapsulación (EE).....	31
7.3.4	Periodo de inducción (PI).....	35
7.3.5	Contenido de ANP .....	36
7.4	Incorporación de Alginato de Sodio (AS) como capa de recubrimiento.....	37
7.5	Revisión de la bibliografía en relación al uso de ácido ascórbico como secuestrante de oxígeno en micropartículas. ....	37
8.	CONCLUSIONES .....	41
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	42
10.	ANEXOS .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Superficie de nueces por región en Chile. Fuente Redagráfica, 2018.....	3
Figura 2. Principio de funcionamiento del secado por atomización. Fuente Vibrasec, 2021.....	6
Figura 3. Diagrama de boquilla de tres fluidos (Kondo et al., 2014).....	8
Figura 4. Estructura química del alginato de sodio.....	11
Figura 5. Diagrama de Pareto para la eficiencia de encapsulación de las micropartículas de aceite de nuez purificado con APS (ANP-APS). ....	24
Figura 6. Gráfico de superficie respuesta para la variable dependiente eficiencia de encapsulación (EE).....	26
Figura 7. Diagrama de Pareto para el Periodo de inducción de las micropartículas de aceite de nuez purificado con APS (ANP-APS). ....	26
Figura 8. Gráfico de Método de Superficie de Respuesta para la variable dependiente periodo de inducción .....	27
Figura 9. Gráfico de superficie de respuesta para la función deseabilidad, para la encapsulación de aceite de nuez purificado con APS (ANP-APS).....	28
Figura 10. Influencia del agente encapsulante en la eficiencia de encapsulación (EE). ....	32
Figura 11. Influencia de la temperatura del aire de entrada al secador sobre la eficiencia de encapsulación (EE). ....	34
Figura 12. Influencia del contenido de sólidos sobre la eficiencia de encapsulación (EE). ....	35
Figura 13. Estructura química del ácido ascórbico .....	38
Figura 14. Incorporación de AA en diferentes localizaciones de la micropartícula. .	39
Figura 15. Efecto de la adición de AA en distintas concentraciones y localizaciones sobre el PI en el sistema ANP-C/AS (Cáceres et al., 2020).....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microencapsulación de aceites ricos en AGP y evaluación de la estabilidad oxidativa.....	13
Tabla 2. Variables independientes y niveles en el diseño Composito Central más punto estrella para la encapsulación del sistema ANP-APS .....	19
Tabla 3. Caracterización del aceite de nuez (AN) y aceite de nuez purificado (ANP) .....	23
Tabla 4. Condiciones experimentales para el sistema ANP-APS, eficiencia de encapsulación (EE) y periodo de inducción (PI) para la encapsulación por secado por atomización utilizando un Diseño Composito Central más punto estrella. ....	24
Tabla 5. Condiciones óptimas para la elaboración de ANP-APS .....	29
Tabla 6. Caracterización de las micropartículas de ANP: ANP-C, ANP-C/AS, ANP-C(AA)/AS, ANP-C/AS(AA) y ANP-C(AA)/AS(AA).....	51

## RESUMEN

Entre los aceites vegetales, aquellos obtenidos desde plantas ricas en ácidos grasos poliinsaturados omega-3, específicamente ácido linolénico (ALA, 18:3  $\omega$ 3) están tomando interés en los últimos años debido a los efectos beneficiosos como protección cardiovascular, y funciones antiinflamatorias entre otros. Sin embargo, el ALA presenta una baja estabilidad oxidativa frente factores ambientales. En este contexto, la tecnología de encapsulación permite una mayor estabilidad de los aceites.

El objetivo de este trabajo fue estudiar las variables de proceso (temperatura de entrada al secador) y de formulación (relación aceite:aislado proteico de soya) sobre la eficiencia de encapsulación de aceite de nuez purificado y su estabilidad oxidativa.

El aceite de nuez purificado (sin antioxidantes naturales) (ANP) se encapsuló con aislado proteico de soya (APS) por secado por atomización, aplicando un diseño experimental Composito Central más punto estrella, optimizado mediante Metodología de Superficie Respuesta (MSR). Las variables independientes fueron la temperatura del aire de entrada al secador (100-180°C) y la relación ANP:APS (1:2,2-1:3,8). Las variables dependientes fueron la eficiencia de encapsulación del ANP y el tiempo de inducción.

Las condiciones óptimas experimentales para el sistema ANP-APS fueron: temperatura del aire de entrada al secador de 92°C y una relación ANP:APS de 1:3, obteniendo una EE de ANP de 79,7% y un tiempo de inducción de 0,94 h. Las micropartículas bajo condiciones óptimas se recubrieron con alginato de sodio (ANP-APS/AS), presentado una eficiencia de encapsulación sobre el 90%.

El ANP encapsulado podría ser utilizado como un ingrediente saludable en formulaciones de alimentos funcionales, permitiendo a las poblaciones veganas, vegetarianas y aquellas libres de pescados, aumentar su consumo de lípidos insaturados ricos en omega-3.



## SUMMARY

Among vegetable oils, those obtained from plants rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids, specifically linolenic acid (ALA, 18: 3  $\omega$ 3), are gaining interest in recent years due to the beneficial effects such as cardiovascular protection and anti-inflammatory functions, among others. However, ALA has low oxidative stability against environmental factors. In this context, encapsulation technology allows the protection of the oils and increase their stability.

The objective of this work was to study the process (inlet air temperature) and formulation (oil: soy protein isolate ratio) variables on the encapsulation efficiency of purified walnut oil and its oxidative stability.

Encapsulation of purified walnut oil (without natural antioxidants) (PWO) was performed with soy protein isolate (SPI) by spray drying, applying a Central Composite design plus star point optimized by RSM. The independent variables were the inlet air temperature (100-180°C) and the PWO: SPI ratio (1:2.2 -1:3.8). The dependent variables were the encapsulation efficiency of the PWO and the induction time.

The optimal experimental conditions for the PWO-SPI system were: inlet air temperature of 92°C and a PWO: SPI ratio of 1: 3, obtaining an EE of PWO of 79.7% and an induction time 0.94 h. The microparticles under optimal conditions were coated with sodium alginate (PWO-SPI / SA), showing an encapsulation efficiency of over 90%.

Encapsulated PWO could be used as a healthy ingredient in functional food formulations, allowing vegan, vegetarian and fish-free populations to increase their consumption of unsaturated lipids rich in omega-3.

## 1. INTRODUCCIÓN

Existe una amplia literatura en torno a los beneficios que tiene el consumo de aceites vegetales ricos en ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) debido a su importante actividad biológica como anticancerígeno, neuro-protector, antiosteoporótico y antiinflamatorio (Kim et al., 2014).

En este contexto, el aceite de nuez posee un alto contenido de ALA (10- 13%) al ser comparado con diferentes aceites vegetales, además de presentar otros tipos de compuestos bioactivos como fitosteroles, polifenoles y tocoferoles (Amaral et al., 2003; Amaral et al., 2005; Carvalho et al., 2010; Shamaei et al., 2017). Sin embargo, la composición en ácidos grasos poliinsaturados (AGP) del aceite de nuez, lo hace susceptible a degradación por las condiciones ambientales, tales como: luz, temperatura y oxígeno, afectando la calidad nutricional y sensorial debido a la generación de sabores y olores desagradables que limita su uso en alimentos (Calvo et al., 2012; Savage et al., 1999).

La tecnología de encapsulación es una alternativa que recubre sustancias bioactivas (aceites, vitaminas y enzimas, entre otros) con biopolímeros para protegerlos de las condiciones del medio ambiente y que pueden liberar su contenido en un lugar y/o tiempo deseado a una velocidad específica. Entre los diferentes métodos de encapsulación, el secado por atomización es el método más utilizado por ser económico, flexible, rápido, continuo y escalable (McClements, 2014; Ray et al., 2016). Sin embargo, en algunos estudios el secado por atomización no ha sido efectivo para proteger la estabilidad oxidativa de aceites ricos en AGP (Kolanowski et al., 2006; Martínez et al., 2015), debido a la incorporación de oxígeno durante el proceso de emulsificación. En esta investigación se estudiará la aplicación de un diseño experimental para la encapsulación de aceite de nuez, estudiando variables de proceso y formulación sobre la eficiencia de encapsulación de aceite de nuez y su estabilidad oxidativa, de manera de obtener el mínimo deterioro del aceite en el proceso de secado. Además, se discutirán algunas estrategias abordadas en la literatura que involucran la incorporación de antioxidantes sintéticos o naturales para inhibir la oxidación del aceite encapsulado.

## 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 2.1 Antecedentes generales de la nuez

La nuez (*Juglans regia L*), es el fruto proveniente del nogal perteneciente a la familia botánica Juglandaceae y al género Juglans, una de las especies más conocidas y difundidas de la familia, de interés tanto agrícola como forestal. Es un árbol vigoroso, que alcanza alturas entre 24 a 31 metros y un diámetro de 60 a 90 cm (Loewe et al., 2001).

Existen varias hipótesis sobre el origen del nogal, una de ellas es que sea nativo de Asia donde se habría extendido a países europeos, otro supuesto es que sea originario del sudeste de Europa extendiéndose hasta Turquía, Irán, Irak, Afganistán y parte de Rusia (Loewe et al., 2001; Vargas, 2020).

Por otro lado, la producción mundial de nueces con cáscara, durante la temporada 2020/21 alcanzó casi 2,3 millones de toneladas, representando una tasa media de crecimiento anual del 7% y aproximadamente un 5% de crecimiento en comparación con la producción récord de la temporada 2016/17 (Magaña et al., 2021; ODEPA, 2017).

Los tres países que lideran la producción mundial de nueces 2020/21 son China, Estados Unidos y Chile, con una distribución del 45%, 31%, y 7%, respectivamente. Otros productores de nueces son la UE, Ucrania, Turquía, India y Australia (Magaña et al., 2021).

Los árboles frutales de nogal en Chile se distribuyen entre la III y IX región (figura 1), donde la región del país con mayor protagonismo en el cultivo es la Metropolitana, seguida de las regiones de Valparaíso, O'Higgins, Coquimbo y Maule (Redagrícola, 2018), estas regiones aportan el 89% de la producción total de huertos industriales, lo que se debe principalmente a las condiciones favorables de clima (precipitación anual, humedad relativa, temperaturas, meses secos) y suelo (drenaje, textura y profundidad) (Loewe et al., 2001). Del Bío Bío al sur y en zonas costeras se encuentran individuos aislados como se observa en figura 1 (Redagrícola, 2018).

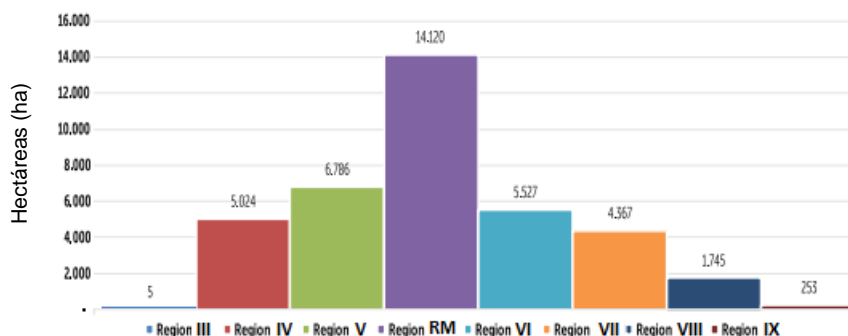


Figura 1. Superficie de nueces por región en Chile. Fuente Redagráfica, 2018.

Las variedades Chandler y Serr son las que más se plantan en Chile, de acuerdo a las estimaciones que se realizaron a partir del catastro frutícola, donde en el año 2016, el 70,4% de la superficie corresponde a la variedad Chandler y el 24% a la variedad Serr (ODEPA, 2017).

Una alternativa para las nueces que no califican para exportación (10 y 20% de la producción) se utiliza para la extracción del aceite, de forma de otorgar un mayor valor agregado a una materia prima con potencial uso en la industria de alimentos, que podría ser utilizado como un ingrediente funcional (ODEPA, 2017).

## 2.2 Compuestos bioactivos del aceite de nuez

La nuez destaca sobre otros frutos de su tipo debido a que es rico en nutrientes en virtud de su perfil proteico y lipídico, contiene altas cantidades de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) y ácidos grasos poliinsaturados (AGP, ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico) (Zhou et al., 2017), siendo el ácido linoleico el principal ácido graso seguido del oleico, linolénico y palmítico (Gursul et al., 2019). Además, las nueces poseen otros compuestos funcionales con capacidad antioxidante como tocoferoles (vitamina E) y compuestos fenólicos (Luna et al., 2017).

Las nueces contienen entre un 52 y 74% de aceite (Gursul et al., 2019; Martínez et al., 2015; Zhou et al., 2017), el cual se compone principalmente de ácidos grasos esenciales del tipo omega-6 (ácido linoleico 59 – 62 % (ALA 18:2 ( $\omega$ 6)) y omega-3 (ácido  $\alpha$ -linolénico 10-13% (ALA 18:3 ( $\omega$ 3))) (Amaral et al., 2003; Calvo et al., 2012). Los aceites que contienen ALA son apreciados desde el punto de vista nutricional

porque es el precursor de EPA y DHA, aunque la conversión es muy baja (Gursul et al., 2019). En esta línea algunos ensayos epidemiológicos y clínicos sugieren que los AGP  $\omega$ 3 de origen vegetal podrían desempeñar un papel activo en la prevención de enfermedades coronarias, arritmias y enfermedades trombóticas. La importancia del consumo de éstos es que, al no ser sintetizados por el cuerpo humano, deben ser suministrados regularmente a través de la dieta (Kumar et al., 2016; Shamaei et al., 2017; Zhou et al., 2017).

Si bien el aceite de nuez puede ser consumido directamente, una aplicación interesante sería incorporarlo en productos alimenticios de consumo masivo, pero esto se vería limitado debido a su baja solubilidad y además que los ácidos grasos insaturados son químicamente inestables y muy sensibles al deterioro oxidativo frente a condiciones del medio ambiente lo que limita su vida útil (Calvo et al., 2012; Gursul et al., 2019; Martínez et al., 2015; Savage et al., 1999; Shamaei et al., 2017) generando olores rancios, sabores indeseables, hidroperóxidos y otras formas de deterioro (Zhou et al., 2017).

Con el objeto de mejorar la estabilidad oxidativa del aceite de nuez durante el proceso de producción, almacenamiento y consumo es que la microencapsulación está demostrando ser una alternativa para proteger el aceite otorgando una barrera eficaz contra factores de deterioro ambiental (Ray et al., 2016; Zhou et al., 2017).

### 2.3 Microencapsulación

Esta técnica se define como una tecnología de recubrimiento de una sustancia (compuesto activo) con un polímero (material muralla o agente encapsulante) que pueden liberar su contenido en un lugar y/o tiempo deseado a una velocidad específica (Luna et al., 2017; Martínez et al., 2015).

La microencapsulación es una técnica utilizada para mantener y/o proteger materiales o compuestos sensibles como aromatizantes, compuestos bioactivos, pigmentos, microorganismos, aceites esenciales, aceites de semillas, antioxidantes, entre otros. Por otro lado, la encapsulación tiene bastantes ventajas tales como: controlar la liberación, evitar la pérdida de volátiles, proteger sustancias activas, mejorar la

estabilidad y prolongar el período de almacenamiento (Geranpour et al., 2020; Luna et al., 2017; Yáñez et al., 2002; Zhou et al., 2017).

Existen diferentes métodos desarrollados para encapsular compuestos activos, donde la selección depende de la aplicación que se requiere para la micropartícula, el tamaño deseado, costos asociados y las propiedades fisicoquímicas tanto del agente encapsulante como del activo (Gharsallaoui et al., 2007). Tales técnicas para microencapsular se pueden separar en métodos físicos y químicos. Dentro de los métodos físicos se encuentra la extrusión, liofilización, secado por atomización, entre otros. Mientras que en los métodos químicos existe la separación y polimerización interfacial, suspensión rotacional, coacervación, gelificación iónica, extrusión centrífuga, atrapamiento por liposomas, entre otras (Bakry et al., 2016).

En general, la técnica más utilizada en este campo es el secado por atomización porque es una operación unitaria bastante económica, continua, simple y escalable para proteger sustancias activas y sensibles a la temperatura (Bakry et al., 2016; Martínez et al., 2015; Zhou et al., 2017). En este contexto, el secado por atomización se seleccionó en este estudio como método de encapsulación.

### 2.3.1 Secado por atomización

Desde principios del siglo XX es que se han utilizado equipos de secado por atomización, siendo Alemania quién desarrolló en 1912 el primer equipo. Sin embargo, el secado por atomización se conoció comercialmente gracias al Danés Nyro en 1933 (Johansen, 1989). Actualmente, el secado por atomización se utiliza ampliamente para aplicaciones en la industria farmacéutica, nutracéutica y alimentaria.

El secado por atomización es uno de los métodos más utilizados para la encapsulación de aceites, sin embargo, este método también se utiliza para encapsular otro tipo de compuestos lábiles o para eliminar el agua de un producto y transformarlo en un polvo con menor actividad de agua (Luna et al., 2017).

En el secado por atomización (figura 2) una solución, dispersión o emulsión es atomizada (con boquilla o disco giratorio) en pequeñas gotas que entran en contacto con un flujo de aire caliente a la salida del atomizador, produciéndose una transferencia de calor y masa (agua), lo que da como resultado una rápida formación de la costra y

un atrapamiento casi instantáneo del material activo, obteniendo partículas en polvo (Dziezak, 1998). Cuando el compuesto activo es de naturaleza hidrofóbica, como en el caso de los aceites, es necesario elaborar una emulsión aceite en agua (o/w) con o sin la adición de un emulsionante, dependiendo de las propiedades del biopolímero, ya que algunos de ellos tienen actividades interfaciales por sí mismos (Bakry et al., 2016; Gharssallaoui et al., 2007).

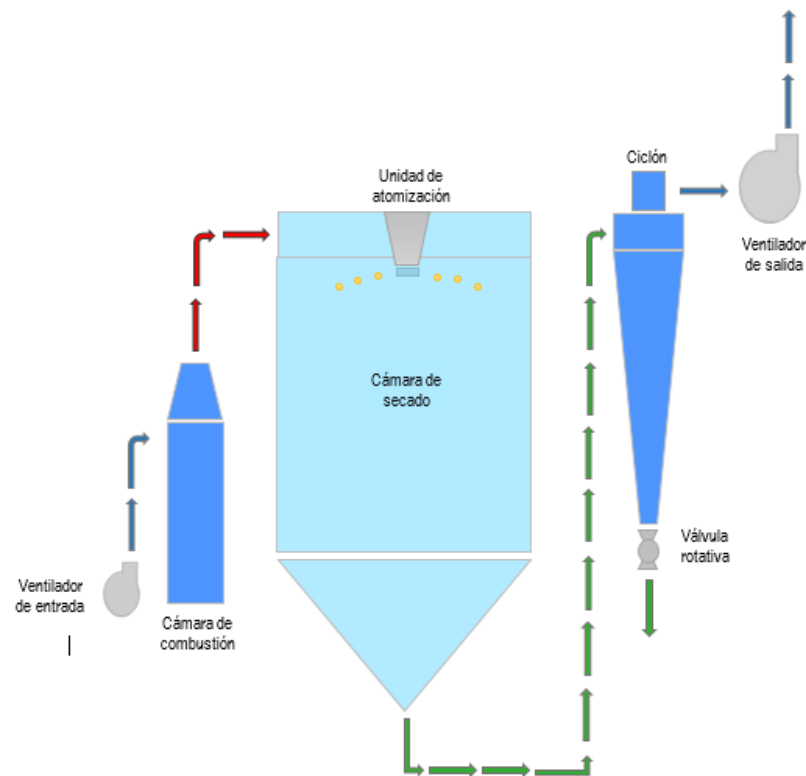


Figura 2. Principio de funcionamiento del secado por atomización. Fuente Vibrasec, 2021.

La microencapsulación de aceites mediante secado por atomización comprende 4 etapas: (i) preparación de la emulsión que contenga en el caso de moléculas hidrofóbicas, (ii) homogenización, (iii) atomización, (iv) deshidratación de la emulsión (Brakry et al., 2016; Shamaei et al., 2017).

A pesar de las altas temperaturas del aire de entrada en el proceso de secado por atomización (típicamente 180-220°C), la temperatura en el interior de las micropartículas está muy por debajo de este rango debido al rápido secado que alcanza

solamente unos segundos (5 a 30 segundos), lo que es apropiado para proteger los ingredientes sensibles a altas temperaturas como los ácidos grasos insaturados (Geranpour et al., 2020; Martínez et al., 2015). Otra ventaja de esta tecnología es el tamaño de partículas producidas, menor a 40  $\mu\text{m}$  con efectos positivos sobre la textura, que se pueden utilizar y manipular fácilmente para la formación de nutracéuticos y/o enriquecimiento de alimentos (Heck et al., 2020).

Las variables más importantes del proceso son la temperatura del aire de entrada al secador, la temperatura de salida del producto y el flujo de alimentación (Liu et al., 2004). La temperatura del aire de entrada al secador es proporcional a la velocidad de evaporación (velocidad de secado) y al contenido final de agua de las micropartículas. Temperaturas del aire de entrada al secador bajas producen micropartículas más húmedas y con facilidad para aglomerarse, mientras que temperaturas muy altas causan excesiva evaporación, lo cual lleva a fracturas de las micropartículas exponiendo al activo encapsulado a una degradación o liberación anticipada (Zakarian y King, 1982).

El objetivo principal es construir una barrera entre el material activo y el medio ambiente a través de la formación de un sistema matricial alrededor de las gotas que se encapsulan (Shamaei et al., 2017; Zhou et al., 2017). Esta barrera puede proteger contra el oxígeno, el agua, la luz y también evitar el contacto con otros ingredientes.

#### 2.3.1.1 Secado por atomización con boquilla de tres fluidos

Comúnmente para el secado por atomización convencional, la solución de alimentación es atomizada utilizando una boquilla de presión de 2 fluidos (2-N), la cual consiste en dos canales concéntricos donde la solución de alimentación es bombeada a través del canal interior, mientras que el aire caliente fluye a través del canal exterior (Sunderland et al., 2013). Este tipo de sistema está limitado principalmente por la solubilidad y viscosidad del agente encapsulante y las condiciones de secado (Kondo et al., 2014; Sunderland et al., 2013).

La boquilla de tres fluidos (3-N, figura 3), permite que dos soluciones de alimentación separadas sean alimentadas de manera individual mediante dos canales interiores concéntricos y el aire de atomización fluya a través de un tercer canal externo. Además,



las soluciones de alimentación interior (solución y/o emulsión con el compuesto activo y el agente encapsulante) y exterior (agente de recubrimiento), permiten que las gotas atomizadas sean recubiertas con la alimentación externa durante el proceso de atomización, generando así una microcápsula, como se observa en la figura 3 (Kondo et al., 2014). Así, con el uso de una boquilla 3-N se logra obtener microcápsulas con una morfología definida (Sunderland et al., 2013).

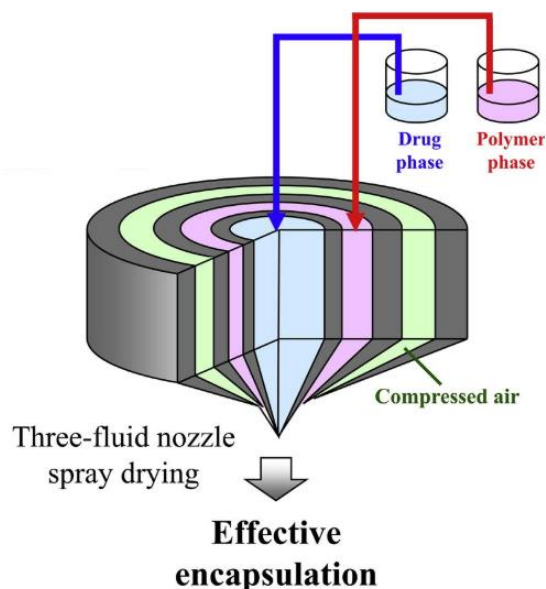


Figura 3. Diagrama de boquilla de tres fluidos (Kondo et al., 2014).

### 2.3.2 Materiales encapsulantes

La selección del agente encapsulante es una etapa clave para la encapsulación de agentes activos principalmente porque determina las propiedades de las micropartículas, influyendo directamente en la estabilidad durante el almacenamiento, y en la liberación controlada del agente activo (Martínez et al., 2020; Geranpour et al., 2020; Zhou et al., 2017).

Algunas propiedades cualitativas para escoger el agente encapsulante es que debe ser de grado alimenticio, biodegradable, económico, insípido, no reactivo con el agente

activo, de baja viscosidad e higroscopicidad, y buenas características emulsionantes en el caso de encapsulación de compuestos hidrofóbicos (Gallardo et al., 2013; Geranpour et al., 2020).

Comúnmente, los agentes encapsulantes se dividen en tres grupos principales, carbohidratos, proteínas y lípidos/ceras. Sin embargo, los dos primeros grupos se utilizan con mayor frecuencia en el secado por atomización mientras que el tercer grupo se utiliza para otros métodos de encapsulación como los sistemas de atrapamiento por liposomas (Desai y Park, 2005). Los carbohidratos y proteínas generalmente se mezclan para eliminar las deficiencias de su uso individual, esta estrategia mejora las propiedades emulsionantes y la capacidad de formación de film durante el secado por atomización (Geranpour et al., 2020; Luna et al., 2017).

Algunos ejemplos de agentes encapsulantes más utilizados en los últimos años para la encapsulación de ácidos grasos esenciales mediante secado por atomización son aquellos procedentes de carbohidratos de origen vegetal como la goma arábica y maltodextrina. En el caso de las proteínas de origen animal se han reportado el caseinato y el aislado proteico de suero de leche (Geranpour et al., 2020; Gharsallaoui et al., 2007; Martínez et al., 2015).

Para cierto tipo de agentes activos, se pueden utilizar proteínas o carbohidratos como agentes encapsulantes. Por ejemplo, las maltodextrinas proporcionan una buena estabilidad oxidativa al aceite encapsulado, pero exhiben propiedades interfaciales pobres y baja capacidad de retención de aceite lo cual es importante para obtener una alta eficiencia de encapsulación. En este contexto, los carbohidratos suelen asociarse con otros materiales encapsulantes como proteínas o gomas. Las proteínas como material encapsulante proporcionan una buena barrera contra el oxígeno y son útiles para encapsular una gran variedad de ingredientes. Sin embargo, presentan algunas desventajas, entre ellas, un mayor costo, son alérgenos para un sector de la población, presentan inestabilidad a ciertos pH y son altamente reactivas con compuestos que poseen grupos carbonilos (por ejemplo, azúcares reductores y algunos edulcorantes) (Gharsallaoui et al., 2007; Reineccius y Yan, 2016).

En este estudio, el agente encapsulante utilizado fue el aislado proteico de soya (APS) y como agente de recubrimiento el alginato de sodio (AS).

#### 2.3.2.1 Aislado proteico de soya

El APS se produce a partir de la harina de soya desgrasada, que elimina la mayor parte de sus componentes no-proteicos, grasas y carbohidratos. El APS es una materia prima abundante, con alto valor nutricional, buenas propiedades funcionales y económica (Arpi, 2015; Zhou et al., 2017). Alrededor de un 75% de las proteínas de soya son globulinas principalmente subunidades de glicina y  $\beta$ -conglucina (Zhou et al., 2017). El aislado proteico de soya es una proteína alimenticia importante con un gran potencial para actuar como portador de bioactivos poco solubles, gracias a su naturaleza hidrofóbica superficial, posee buenas propiedades emulsionantes, capacidad de retención de agua, espumante, gelificante, adhesividad, cohesividad, elasticidad, aumento de viscosidad, asimismo es un buen agente encapsulante para la microencapsulación mediante secado por atomización (Arpi, 2015; Zhou et al., 2017).

#### 2.3.2.2 Alginato de sodio

Los alginatos son polisacáridos de carácter aniónico no ramificados obtenidos de algas pardas (clase *Phaeophyceae*) (Zimmerman et al., 2007). El alginato de sodio (AS) es un polisacárido natural del ácido  $\beta$ -D-manurónico y el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico, unidos por enlaces glucosídicos (1-4) (figura 4), el cual es extraído de algas pardas (ej. *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum*, y *Macrocystis pyrifera*). El AS es un polímero de liberación sitio-específica (intestino delgado), ya que es estable a pH ácido (condiciones estomacales) pero se disuelve en condiciones alcalinas suaves, como las encontradas en zonas del intestino delgado, donde se desintegra, liberando los agentes activos (George y Abraham, 2007). Además, los alginatos de bajo peso molecular poseen efectos benéficos tras su consumo, ya que son un aporte de fibra, con efecto prebiótico, reduciendo así los niveles de azúcar y colesterol en sangre. No obstante, a pesar de estas ventajas en la técnica de secado por atomización no se recomienda el uso de AS como agente encapsulante, debido a su alta viscosidad a bajo contenido de sólidos (2%) (Gharsallaoui et al., 2007). Sin embargo, es posible utilizarlo al usar una boquilla de tres fluidos, permitiendo formar una capa externa de AS.

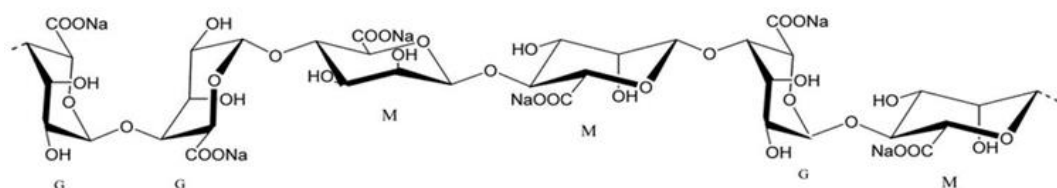


Figura 4. Estructura química del alginato de sodio.

#### 2.4 Oxidación de aceite en micropartículas

Algunos trabajos muestran que la encapsulación de aceite por secado por atomización puede mejorar la estabilidad oxidativa del aceite durante el almacenamiento (Bakry et al., 2016; Wang et al., 2016; Encina et al., 2016; Kagami et al., 2003). Sin embargo, existen resultados controversiales respecto a la estabilidad oxidativa como se observa en la tabla 1. Estos resultados se pueden explicar por la incorporación de oxígeno durante el proceso de homogeneización de la alimentación interna, así como otros factores propios de la técnica de atomización, las diferentes condiciones y materiales utilizados y las diferentes metodologías de evaluación de la estabilidad oxidativa (Bakry et al., 2016).

Los principales factores del secado por atomización convencional que afectarían la estabilidad oxidativa de los aceites son: la presencia de oxígeno y la temperatura del aire de entrada al secador. En el caso de encapsulación de aceites se debe elaborar una emulsión o/w, donde se produce la incorporación de oxígeno en la etapa de homogeneización, el cual puede llegar a ser un factor crítico, ya que reacciona con los radicales lipídicos lo que genera el deterioro oxidativo (Uluata et al. 2015). El segundo factor es la alta temperatura del aire de entrada al secador que también aumenta la oxidación del aceite (Bakry et al., 2016).

Estos factores pueden disminuir o anular la efectividad en la protección del aceite encapsulado, favoreciendo en algunos casos las reacciones de oxidación y polimerización. Una alternativa para solucionar el problema de la estabilidad oxidativa de los lípidos encapsulados ha sido la incorporación de antioxidantes sintéticos o

naturales previo al proceso de emulsificación del aceite, sin embargo, los resultados han sido controversiales (Mahieu et al., 2017).

Para esto la industria de alimentos, con el fin de evitar la presencia de oxígeno y con esto el deterioro de los alimentos ha desarrollado el uso de sistemas secuestrantes de oxígeno los cuales se utilizan comercialmente en una amplia gama de alimentos. Ejemplo de estos sistemas son: polvo de hierro, ácido ascórbico, enzimas, polímeros fotosensibles, sulfitos, azúcares, entre otros (Cichello, 2015; Janjarasskul et al., 2011; Berenzon y Saguy, 1998). Sin embargo, no todos los secuestrantes de oxígeno son aptos para ser incorporados directamente sobre los alimentos. En esta tesis se analizará la información respecto al uso de ácido ascórbico como secuestrante de oxígeno en la encapsulación de aceites.

Tabla 1. Microencapsulación de aceites ricos en AGP y evaluación de la estabilidad oxidativa

Tipo de aceite	Agente encapsulante	EE%	Estabilidad oxidativa aceite ME y SME	Referencia
Aceite de pescado	EPC	92.9-100	Aceite ME mejor EO que SME(PV inicial menor en SME luego aumenta por sobre el aceite ME)	Wang et al., 2011
Aceite de pescado y oliva	PR (2%) y JG (13-20,5%)	>90	Aceite SME mejor EO (mayor IP) que aceite ME	Polavarapu et al.,2011
Aceite de pescado	MC y MD	84,8-86,5	Aceite SME mejor EO (mayor PV) que aceite ME	Kolanowski et al., 2006
Aceite de linaza	MD/CAS, AM/GA, AM/CAS,MD/WPC, AM/WPC Y AM/GA	79 a 90	WD/WPC (4:1) única combinación exitosa para prevenir oxidación	Tontul and Topuz, 2013
Aceite de linaza	GA, GA/MD,GA/MD/WPI Y MD/MC	>90	Aceite ME con GA y GA/MD/WPI mejor EO (IP) aceite SME	Gallardo et al., 2013
Aceite de girasol	WPI o CAS (4%) Trealosa y fosfato	90-99	Aceite ME similar que SME (recipiente cerrado). El aceite ME y aglomerado por lecho fluidizado tuvo la mejor EO	Domian et al., 2014
Aceite de semillas de "sea buckthorn"	MD/GA (1:7) Y AM	75-100	A HR=11% aceite ME mas estable; a HR=54% solo MD/GA mas estable que aceite SME	Partanen et al.,2005
Aceite de semillas de "sea buckthorn"	MD/GA Y AM	~83-92	Aceite ME mejor EO que aceite SME	Partanen et al.,2002
Aceite de pescado	WPI	13-93	Aceite ME mejor EO que SME(PV inicial menor en SME luego aumenta por sobre el aceite SME luego aumenta por sobre el aceite ME )	Wang et al.,2016
Aceite de pescado	HBCD/CAS,HBCD/WPI Y CAS	~98-99	Aceite ME mejora significativamente EO respecto al aceite SME	Kagami et al.,2003
Aceite de pescado	CAS/GA	69-73	Aceite ME mejor EO ( menor PV y valor de TBARs) que aceite SME	Binsi et al.,2017
Aceite de nuez y de Chia	MD/HPMC	73	Aceite de nuez ME logra mayor EO respecto a SME, pero aceite de chía ME obtuvo peor EO respecto a SME	Martínez et al., 2015

EPC: extracto proteico de cebada; PR: pectina de remolacha; jarabe de glucosa; MC: maltodextrina; CAS: caseinato de sodio; AM: almidón modificado; WPC: concentrado proteico de suero; GA: goma arábica; WPI: aislado proteico de suero; HBCD: dextrina ciclica; HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa; UT: ultraturax; HP: homogeneizador de alta presión; US: ultrasonificador; A: aceite; AE: agente encapsulante; EE: eficiencia de encapsulación; EO: estabilidad oxidativa; PV: valor de peróxido; IP: periodo de inducción; HR: humedad relativa; ME: microencapsulado; SME: sin microencapsular.

### 3. HIPÓTESIS

La encapsulación de aceite de nuez purificado con aislado proteico de soya (APS) presentará una alta eficiencia de encapsulación de aceite y alta estabilidad oxidativa del aceite a bajas temperaturas del aire de entrada al secador y a relaciones aceite:APS con mayor contenido de APS.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo General

Estudiar las variables de proceso (temperatura de entrada al secador) y de formulación (relación aceite:aislado proteico de soya) sobre la eficiencia de encapsulación y estabilidad oxidativa del aceite de nuez

#### 4.2 Objetivos Específicos

- i. Obtener y caracterizar el aceite de nuez purificado.
- ii. Encapsular aceite de nuez purificado (ANP) con aislado proteico de soya (ANP-APS) aplicando un diseño experimental.
- iii. Realizar el recubrimiento de las micropartículas de ANP-APS con alginato de sodio para obtener el sistema ANP-APS/AS
- iv. Analizar la información respecto al uso de ácido ascórbico como secuestrante de oxígeno y su localización en micropartículas de aceites poliinsaturados.

## 5. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

### 5.1 Materiales

Los materiales utilizados en el laboratorio para la elaboración de muestras y evaluaciones realizadas se detallan a continuación.

- Matraz Kitasato
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz esmerilado
- Vasos precipitados
- Probetas
- Embudo de filtración
- Micropipeta
- Columna de vidrio
- Magnetos
- Espátulas
- Gotario
- Parafilm
- Papel filtro
- Soporte universal
- Papel de aluminio
- Papel absorbente
- Plumón

### 5.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en el laboratorio para la elaboración de muestras y evaluaciones realizadas se detallan a continuación.

- Aceite de nuez: adquirido en Nutra Andes Ltda. (Valparaíso, Chile).
- Lecitina de soja (Epikuron 145V): adquirido en Blumos Ltda. (Santiago, Chile).
- Aislado proteico de soja: adquirido en Mathiesen S.A. (Santiago, Chile).



- Alginato sódico (AS): adquirido en Alginatos Chile S.A (Paine, Chile)
- Ácido ascórbico (AA, 99%): adquirido en Mathisen S.A (Santiago, Chile).
- Oxido de Aluminio 90: adquirido en Sigma-Aldrich (Santiago, Chile).
- Ácido sulfúrico 95-98%: adquirido en BioslabChile (Macul, Chile).
- Otros solventes de grado analítico (etanol, hexano, acetona, metanol): adquiridos en Merck (Santiago, Chile).

### 5.3 Equipos

Los equipos utilizados en el laboratorio para la elaboración de muestras y evaluaciones realizadas se detallan a continuación.

- Mini secador por pulverización B-290 (Büchi, Suiza).
- Estufa de aire forzado Memmert UFE 800 (Schwabach, Alemania).
- Evaporador rotatorio (Rotavapor R100, Büchi, Suiza).
- Polytron® (PT-2100, Kinemática, AG Inc., Lucerna, Suiza).
- Sistema HPLC con bomba L-6200 (Merck-Hitachi) y un detector de fluorescencia F-1050 (Merck-Hitachi) acoplado a una computadora con Clarity Software.
- Cromatógrafo de gases Agilent 7890 B con detector FID y automuesteador.
- Professional Rancimat 892 (Metrohm Ltd., Herisan, Suiza).
- Placa calefactora con agitador magnético, Magnetrührer MR Hei-Standard 505-20000-003 (Heidolph).
- Balanza analítica Entris2241-1S, Sartorius (Goettingen, Alemania)
- Balanza granataria WTB 2000, Radwag (EE.UU)
- Bomba de vacío Vacuum Pump V-100, (Büchi, Suiza)
- Rotavapor (R205, Büchi, Suiza).
- Balanza de infrarojo Radwag PMR 50/ NH 50 g x 1 mg (Radom, Poland).

## 6. METODOLOGÍA

Las metodologías utilizadas en el laboratorio para la elaboración de muestras y su caracterización se detallan a continuación.

### 6.1 Obtención y caracterización del aceite de nuez purificado.

#### 6.1.1 Purificación del aceite de nuez (AN).

El AN se purificó mediante cromatografía de adsorción en columna abierta con alúmina activada según Yoshida et al. (1992). En resumen, 100 g de AN se alimentó a una columna con óxido de aluminio (25 x 2,5 cm), previamente la alúmina se activó en un horno a 200°C durante tres horas. La columna de alúmina y los recipientes de recolección se cubrieron con papel de aluminio y el aceite se extrajo a través de la columna sin el uso de un disolvente.

#### 6.1.2 Caracterización aceite de nuez (AN) y aceite nuez purificado (ANP).

##### 6.1.2.1 Determinación de tocoferoles en AN y ANP

La determinación de tocoferoles se realizó mediante HPLC, de acuerdo con el método estándar Ce 8-89 (AOCS, 1993; Morelo et al., 2019) utilizando una bomba Merck-Hitachi L-6200, con detector de fluorescencia Hitachi F-1050 y una columna LiChroCART Superspher Si-60 (5µm x 4 mm d.i x 250 mm; Merck). La fase móvil utilizada fue 2-propanol: n-hexano (1:99 v/v) y un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a 290 y 330 nm de excitación y emisión, respectivamente. Los contenidos de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tocoferol fueron cuantificados usando un estándar externo.

##### 6.1.2.2 Perfil de ácidos grasos de AN y ANP

El perfil de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases (GC) (AENOR, 1991), mediante la conversión de ácidos grasos a ésteres metílicos, según el método ISO 5509 (2000).

Se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de ionización por llama (Agilent Technologies 7890B, USA) con columna capilar de sílica fundida H-88 (0,25 mm d.i x 100 m largo x 0,20 µm de espesor de película, Agilent USA). Tanto la temperatura del inyector como del detector fue de 250°C, mientras que la temperatura del horno fue de 180°C durante los primeros 20 minutos y luego aumentó a una tasa de 2°C/min

hasta los 215°C a los 37 minutos. Los ácidos grasos se identificaron por comparación de los tiempos de retención de los picos de la muestra y los picos de un patrón de referencia de ácidos grasos conocidos (GCL 674, Nu-check prep). Finalmente, el perfil del aceite de nuez se expresó como porcentaje de ésteres metílicos.

#### 6.1.2.3 Acidez libre

Se evaluó la acidez libre del AN y ANP de acuerdo al método Cd 3d-63 (AOCS, 1993). Se pesaron 10 g de aceite en un matraz erlenmeyer de 250 mL. Luego se agregaron 50 mL de etanol al 95% a 70°C (neutralizando previamente con NaOH 0,1 N). Posteriormente se agregaron gotas de fenolftaleína como indicador y se tituló con NaOH (0,1 N), hasta la aparición de color rosa pálido permanente durante 30 segundos. El resultado se expresó como porcentaje de ácido oleico, según la ecuación 1:

$$Acidez [\% \text{ ácido oleico}] = \frac{V \text{ NaOH} \times N \text{ NaOH} \times 28,2}{P} \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde V corresponde al volumen gastado de NaOH (mL), N la normalidad del NaOH y P el peso de la muestra (g).

#### 6.1.2.4 Índice de Peróxidos

Se evaluó el índice de peróxido (IP) de acuerdo al método Cd 8-53 (AOCS, 1993). Se pesaron 5 g de AN y ANP en un balón de 250 mL con tapa esmerilada. Luego, se agregó ácido acético:cloroformo 3:2 (30mL), agitando suavemente. Posteriormente, se añadió KI (3 g) y agua destilada (0,5 mL), el balón se tapó y agitó en oscuridad durante 1 minuto e inmediatamente se trató con 30 mL de agua destilada. Luego se añadió 0,5 mL de almidón, como indicador, y se tituló con tiosulfato de sodio 0,01 N, empleando una micro bureta, hasta la desaparición del color azul, el resultado se expresó según la ecuación 2:

$$IP \left[ \frac{mEq \text{ O}_2 \text{ peróxido}}{Kg \text{ materia grasa}} \right] = \frac{V_1 - V_0 \times N \times 1000}{P} \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde,  $V_0$  corresponde al volumen de tiosulfato de sodio usado para el blanco (mL),  $V_1$  corresponde al volumen de tiosulfato de sodio usado en la muestra (mL),  $N$  corresponde a la normalidad del tiosulfato de sodio y  $P$  al peso de la muestra (g).

### 6.1.2.5 Período de Inducción

El período de inducción (PI) se determinó utilizando un equipo Rancimat 892 (Metrohm Ltd, Herisan, Suiza) a 100°C y un flujo de aire de 20 Lh<sup>-1</sup>, según la metodología estándar AOCS (1993).

## 6.2 Optimización de la encapsulación de la emulsión de ANP con aislado proteico de soya (APS) a través del secado por atomización.

### 6.2.1 Diseño estadístico

Se realizó la encapsulación de la emulsión de ANP con APS (ANP-APS) por secado por atomización de acuerdo con un diseño composito central más punto estrella, con un total de 12 experimentos (8 puntos experimentales y 4 puntos centrales). Las variables independientes fueron la temperatura del aire de entrada al secador (100 – 180°C) y la relación ANP-APS (1:2,2 – 1:3,8) como se muestra en tabla 2. Las variables dependientes fueron eficiencia de encapsulación (EE) de ANP y estabilidad oxidativa, evaluada a través del periodo de inducción (PI) (Velasco et al., 2009).

Para la optimización de las variables dependientes se aplicó MSR para cada variable independiente utilizando la función deseabilidad, donde se maximizaron las variables de respuesta (EE y PI).

Tabla 2. Variables independientes y niveles en el diseño Composito Central más punto estrella para la encapsulación del sistema ANP-APS

Variables independientes	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	1	$\alpha$
Relación ANP: APS	1:2	1:2,2	1:3	1:3,8	1:4
Temperatura del aire de entrada al secador	92	100	140	180	188

ANP: aceite de nuez purificado; APS: aislado proteico de soya

### 6.2.2 Preparación de micropartículas de ANP-APS.

La emulsión de ANP en agua se elaboró de acuerdo a las condiciones óptimas reportadas por Cáceres et al. (2020). Brevemente, la emulsión ANP-en-agua (11,745 g) se preparó, dispersando el agente emulsionante lecitina de soya (0,085 g) en agua destilada (9,66 g) a 40°C agitando a 500 rpm durante 20 minutos. La dispersión se añadió al ANP (2 g) y la mezcla se homogeneizó con un Polytron PT-2100 (Kinematica AG, Suiza) a 20.000 rpm y 2 min. El tamaño de gota de las emulsiones de ANP se determinó mediante difracción laser, utilizando un analizador de tamaño

de partículas (Mastersizer X, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) con un lente de 300 mm y se expresó como  $D_{[4,3]}$ . La oxidación de lípidos fue evaluada por TBAR, según el protocolo de Pu et al. (2011).

La solución de alimentación (100 g) se preparó incorporando la emulsión de ANP obtenida en condiciones óptimas (descrita anteriormente) (11,745 g) a una solución de APS (4 - 8 g) en agua destilada (80,3 - 84,3 g). Luego esta dispersión resultante (ANP-APS) se alimentó a un mini-spray drying B-290 (Büchi, Suiza) utilizando una boquilla de dos fluidos (2N), donde las condiciones de secado fueron: flujo de aire de 600 L/h, velocidad de alimentación de 2 mL/min, presión de atomización de 20 psi y temperatura del aire de entrada al secador en el rango de 92 a 188°C. Las micropartículas obtenidas de ANP-APS se almacenaron inmediatamente a -20°C hasta su análisis.

### 6.2.3 Caracterización de las micropartículas de ANP-APS.

6.2.3.1 Eficiencia de encapsulación (EE): se determinó gravimétricamente, mediante la extracción del aceite superficial de acuerdo a Shamaei et al. (2017), donde en un tubo falcon se pesó 1 g de micropartículas y se le adicionó 10 mL de hexano, el cual se filtró mediante un papel de filtro (Whatman n°1). El filtro se lavó 3 veces con 10 mL de hexano. La solución filtrada se transfirió a un matraz limpio, previamente pesado, y el solvente se evaporó con un rotavapor (R205, Büchi, Suiza). El aceite superficial se calculó en función de la diferencia entre los pesos del matraz inicial y el matraz del aceite extraído. La eficiencia del ANP-APS se calculó con la ecuación 3:

$$EE (\%) = \frac{\text{Aceite total} - \text{aceite superficial}}{\text{Aceite total}} \times 100 \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde el aceite total corresponde al aceite total teórico en las micropartículas.

6.2.3.2 Periodo de inducción (PI): se determinó utilizando el equipo Rancimat 892 Metrohm (Suiza), como se describió en la sección 6.1.2.5.

6.3 Elaboración de micropartículas de ANP-APS con recubrimiento de alginato de sodio a través de una boquilla de 3 fluidos.

La emulsión de alimentación interna (ANP-APS, 35 g) fue preparada con las siguientes cantidades: ANP (0,7 g), lecitina de soya (0,03 g), APS (2,1 g) y agua (32,17 g). Por otra parte, la solución de alimentación externa (350 g) consistió en una solución de AS (7 g) y agua (343 g). Ambas soluciones de alimentación (interna y externa) se alimentaron a un mini-spray drying B-290 (Büchi, Suiza) utilizando una boquilla de tres fluidos con una relación de aire de 600 L/h, presión de atomización de 20 psi, temperatura del aire de entrada de 92°C y velocidad de alimentación de 0,12 mL/min para el flujo de alimentación interno y 1,2 mL/min para el flujo de alimentación externo. De esta manera se obtuvo el sistema ANP-APS/AS.

6.4 Revisión de la bibliografía en relación al uso de ácido ascórbico como secuestrante de oxígeno en micropartículas.

Se realizó una revisión de la literatura en base al uso de ácido ascórbico como secuestrante de oxígeno en micropartículas de aceites obtenidas por secado por atomización en la base de datos de Biblioteca/Universidad de Chile: ISI-Web of Science.

6.5 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVIII, donde cada parámetro se analizó utilizando ANOVA y prueba de Tukey, a un nivel de confianza utilizando una regresión lineal con límites de confianza del 95%.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización del aceite de nuez (AN) y aceite de nuez purificado (ANP)

Los resultados del perfil de ácidos grasos, tocoferoles, acidez, índice de peróxido y periodo de inducción obtenidos se muestran en tabla 3.

Los AGP fueron el grupo principal de ácidos grasos encontrados en el aceite de nuez, con un rango de 70,9 a 73,4%. El perfil de AGP presentes en el AN y ANP muestra como principal ácido graso al ácido linoleico (C18:2  $\omega$ -6) con un 56,5% y 59,1 % respectivamente. En el caso del ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3  $\omega$ -3) el AN presenta 14,4% y ANP 14,3%. La composición en ácidos grasos del AN fue similar con lo reportado por Amaral et al. (2003). El tratamiento de purificación del aceite de nuez no tuvo incidencia en el perfil de ácidos grasos.

En relación al estudio de los tocoferoles, el principal tocoferol encontrado en el AN fue el  $\gamma$ -tocopherol ( $355 \pm 45,25$  mg/kg aceite), mientras que el contenido de  $\delta$ -tocopherol y  $\alpha$ -tocopherol fueron notoriamente más bajos ( $25,1 \pm 1,48$  y  $10,8 \pm 0,94$  mg/kg aceite) respectivamente. Estos resultados concuerdan con reportes de Li et al. (2007). El proceso de purificación del AN dejó en niveles no detectables el contenido de tocoferoles del ANP.

Los valores obtenidos de acidez libre e índice de peróxido para AN y ANP mostraron valores dentro de la norma establecida por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (Ministerio de Salud, 2016). Por otro lado, el periodo de inducción (PI) en el AN (5,6 h) fue significativamente mayor al del ANP (0,4 h), lo cual se explica debido a la ausencia de tocoferoles en el ANP.

Tabla 3. Caracterización del aceite de nuez (AN) y aceite de nuez purificado (ANP)

Parámetro de caracterización	AN	ANP
Perfil de ácidos grasos (% EM)		
C16:0	6,0 ± 0,29 a	5,2 ± 0,35 a
C18:0	2,1 ± 0,12 a	2,1 ± 0,13 a
C18:1 ω-9	13,4 ± 1,29 a	14,8 ± 0,87 a
C18:2 ω-6	56,5 ± 3,98 a	59,1 ± 2,80 a
C18:3 ω-3	14,4 ± 0,94 a	14,3 ± 0,37 a
Tocoferoles (mg/kg aceite)		
α	10,8 ± 0,94	nd
γ	355,0 ± 45,25	nd
δ	25,1 ± 1,48	nd
Acidez (% ácido oleico)	1,90 ± 0,01 a	0,06 ± 0,00 b
Índice de peróxido (mEq O <sub>2</sub> /kg aceite)	1,43 ± 0,10 a	0,25 ± 0,01 b
Periodo de inducción (h)	5,6 ± 0,12 a	0,4 ± 0,01 b

\*AN: aceite de nuez; ANP: aceite de nuez purificado, EM: ésteres metílicos; nd: no detectable

## 7.2 Optimización de la encapsulación del ANP por secado por atomización

En tabla 4 se presentan las condiciones experimentales de la encapsulación de ANP con APS por secado por atomización (ANP-APS). Se aplicó un diseño composito central más punto estrella con un total de 12 experimentos (8 puntos experimentales y 4 puntos centrales), donde las variables independientes fueron: temperatura del aire de entrada al secador y relación ANP-APS. Las variables dependientes: eficiencia de encapsulación mostró un rango entre 57,25 – 84,70% y el periodo de inducción entre 0,38 - 1,01 h.



Tabla 4. Condiciones experimentales para el sistema ANP-APS, eficiencia de encapsulación (EE) y periodo de inducción (PI) para la encapsulación por secado por atomización utilizando un Diseño Composito Central más punto estrella.

Experimento (N°)	ANP (g)	Relación ANP:APS	APS (g)	Temperatura de entrada (°C)	EE (%)	PI (h)
1	2	1:2,2	4,4	100	84,70 ± 0,20	0,70 ± 0,00
2	2	1:2,2	4,4	180	66,45 ± 5,65	0,38 ± 0,01
3	2	1:3,8	7,6	100	69,70 ± 6,80	0,89 ± 0,00
4	2	1:3,8	7,6	180	57,25 ± 0,35	0,66 ± 0,02
5	2	1:3	6,0	92	78,65 ± 0,75	1,01 ± 0,00
6	2	1:3	6,0	188	70,15 ± 0,85	0,60 ± 0,09
7	2	1:2	4,0	140	72,55 ± 1,45	0,50 ± 0,02
8	2	1:4	8,0	140	71,40 ± 13,8	0,57 ± 0,01
9	2	1:3	6,0	140	78,35 ± 6,35	0,56 ± 0,01
10	2	1:3	6,0	140	77,35 ± 7,05	0,59 ± 0,02
11	2	1:3	6,0	140	72,40 ± 6,50	0,52 ± 0,01
12	2	1:3	6,0	140	64,00 ± 1,80	0,52 ± 0,01

ANP: aceite de nuez purificado; EE: eficiencia de encapsulación; PI: periodo de inducción

## 7.2.1 Análisis estadístico

### 7.2.1.1 Eficiencia de encapsulación (EE)

El análisis de varianza Anova para la EE de aceite de nuez purificado mostró que la forma lineal y cuadrática de la temperatura del aire de entrada al secador y la forma lineal y cuadrática de la relación ANP:APS fueron significativas ( $p < 0.05$ ), como lo indica el diagrama de Pareto (figura 5, anexo 1)

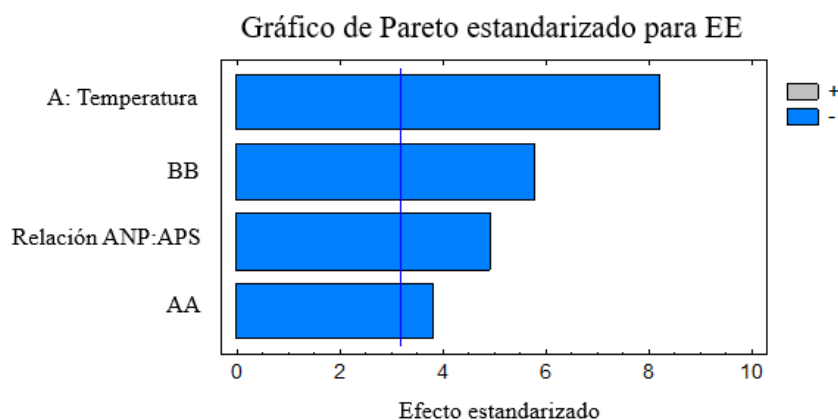


Figura 5. Diagrama de Pareto para la eficiencia de encapsulación de las micropartículas de aceite de nuez purificado con APS (ANP-APS).

El modelo explicó un 74,8% ( $R^2$  ajustado por grados de libertad, anexo 1) de la variabilidad en la eficiencia de encapsulación del aceite de nuez purificado. De acuerdo con el análisis Anova, la ecuación 4 describe el efecto de las variables independientes sobre la eficiencia de encapsulación del aceite de nuez purificado.

$$EE = 0.109268 + 0.434639 * \text{Temperatura} + 42.0822 * \text{Relación ANP: APS} - 0.00204503 * \text{Temperatura}^2 - 7.70055 * \text{Relación (ANP:APS)}^2$$

(ecuación 4)

En la figura 6 se presenta el gráfico de superficie de respuesta para eficiencia de encapsulación de ANP-APS. En este trabajo se encontró que el aumento de la temperatura del aire de entrada al secador redujo la eficiencia de encapsulación, esto se podría atribuir a una reducción en la elasticidad en la superficie de la gota lo que conduciría al desarrollo de fisuras en la membrana, lo que lleva a la difusión de aceite a la superficie de las partículas encapsuladas con APS (Shamaei et al., 2017).

A medida que aumenta la relación ANP:APS aumenta la eficiencia de encapsulación hasta un valor de ANP:APS de 1:3 y luego disminuye, esto se explica porque al aumentar la cantidad de agente encapsulante (APS) aumenta el contenido de sólidos y la costra sobre la superficie de la gota se forma más rápido, reteniendo la emulsión y aumentando la EE (Gharsallaoui et al., 2007).

En este estudio se obtuvo una mayor eficiencia de encapsulación a bajas temperaturas de secado y a valores intermedios de la relación ANP:APS, dentro del rango de valores estudiado.

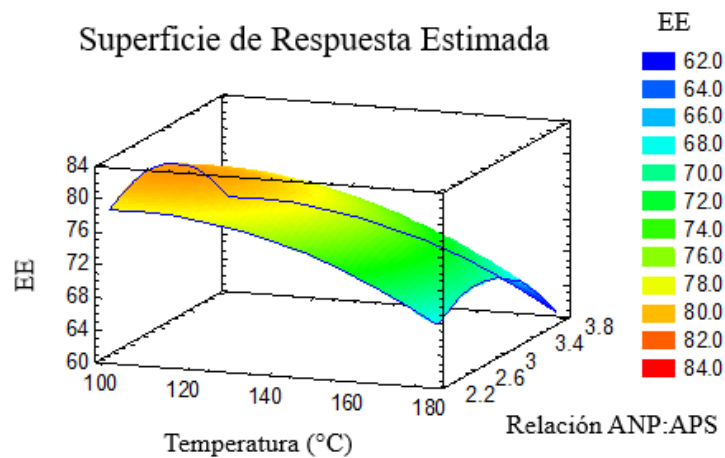


Figura 6. Gráfico de superficie respuesta para la variable dependiente eficiencia de encapsulación (EE).

#### 7.2.1.2 Periodo de Inducción

El análisis Anova para el periodo de inducción muestra que la forma lineal y cuadrática de la temperatura de entrada del aire al secador fueron significativas ( $p < 0,05$ ), sin embargo, solo la forma lineal de la relación ANP:APS fue significativa para el periodo de inducción, como se muestra en el diagrama de Pareto (figura 7) y análisis de varianza (anexo 2).

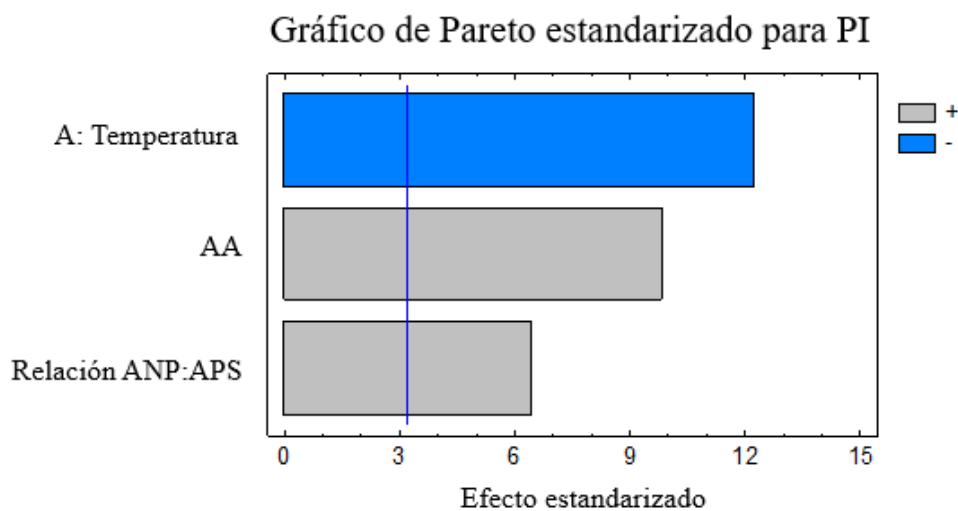


Figura 7. Diagrama de Pareto para el Periodo de inducción de las micropartículas de aceite de nuez purificado con APS (ANP-APS).

El modelo explicó un 88.2% ( $R^2$  ajustado por grados de libertad, anexo 2) de la variabilidad en el período de inducción. De acuerdo con el análisis Anova, la ecuación 5 describe el efecto de las variables independientes sobre la encapsulación del aceite de nuez purificado con APS.

$$PI = 2.67217 - 0.0310489 * Temperatura + 0.10008 * Relación ANP:APS + 0.0000972788 * Temperatura^2$$

(ecuación 5)

El uso de altas temperaturas durante el secado por atomización disminuyó la estabilidad oxidativa de compuestos termosensibles como el ANP, lo que deja en evidencia ser un factor crítico a considerar en la encapsulación de aceites poliinsaturados, por lo tanto, se deberían utilizar temperaturas bajas del aire de entrada al secador para disminuir la oxidación del ANP (Bakry et al., 2016). El gráfico de superficie de respuesta (figura 8) muestra que a medida que aumenta la temperatura hasta los 160°C disminuye la estabilidad oxidativa del ANP. Mientras que, sobre los 160°C, el periodo de inducción aumenta levemente.

En este estudio se obtuvo un mayor valor del periodo de inducción a bajas temperaturas de secado y a valores altos de relación ANP:APS.

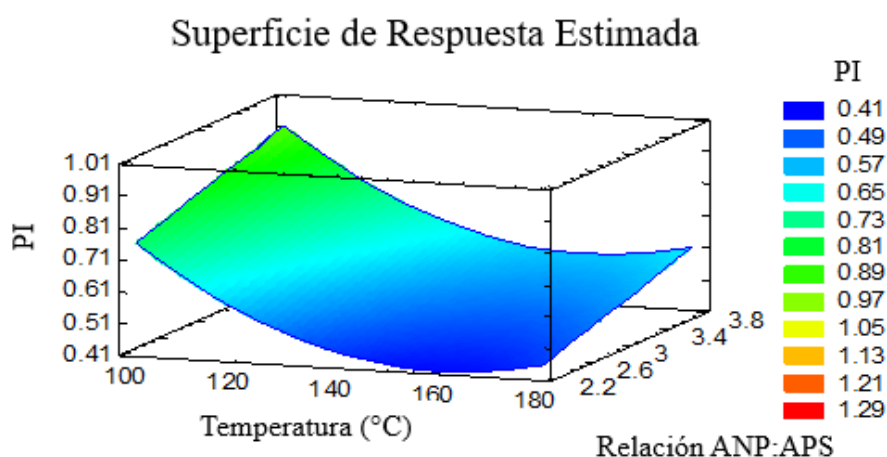


Figura 8. Gráfico de Método de Superficie de Respuesta para la variable dependiente periodo de inducción

### 7.2.1.3 Deseabilidad

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas para la elaboración de las micropartículas del sistema ANP-APS, se aplicó la función deseabilidad, donde se maximizó EE y PI. En la figura 9 se muestra el gráfico de superficie de respuesta para la función deseabilidad en el sistema ANP:APS. La optimización múltiple para las variables se alcanzó a valores intermedios de APS y bajas temperaturas del aire de entrada al secador.

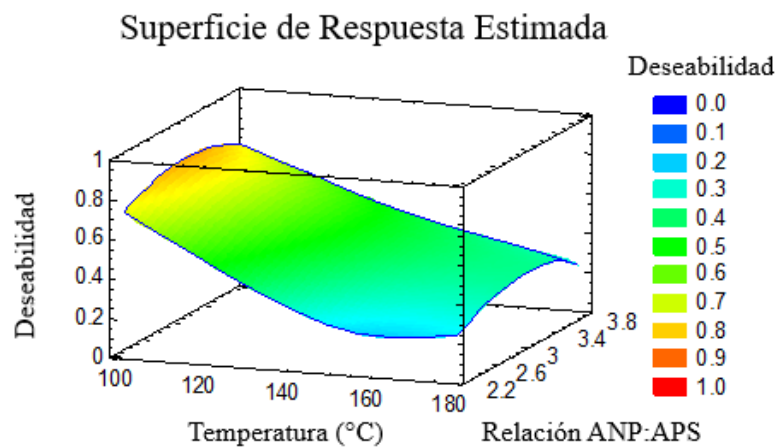


Figura 9. Gráfico de superficie de respuesta para la función deseabilidad, para la encapsulación de aceite de nuez purificado con APS (ANP-APS).

7.3 Caracterización de las micropartículas ANP-APS obtenidas bajo condiciones óptimas contrastado con la literatura.

En tabla 5 se muestran los resultados óptimos a partir del diseño estadístico realizado

Tabla 5. Condiciones óptimas para la elaboración de ANP-APS

Parámetro de caracterización	ANP-APS
Temperatura entrada al secador	92
Relación ANP:APS	1:3
Eficiencia de encapsulación (%)	79,7
Periodo de inducción (h)	0,94
Contenido de ANP (mg ANP/g	247

ANP: aceite de nuez; ANP-APS: aceite de nuez encapsulado con aislado proteico de soya

#### 7.3.1 Temperatura del aire de entrada al secador

El primer parámetro presentado en tabla 5 es la temperatura del aire de entrada al secador, donde el óptimo para el sistema ANP-APS, fue de 92°C. En la literatura, para el secado por atomización de AGP se han reportado temperaturas del aire de entrada al secador entre 90 a 220°C (Geranpour et al., 2020).

Usualmente en los trabajos de encapsulación de aceite de nuez no se realiza un diseño estadístico para optimizar la temtura del aire de entrada al secador, por lo cual la selección de esta variable se realiza en base a otros estudios (Martínez et al., 2015; Luna et al., 2017). En este sentido, se han utilizado diferentes temperaturas del aire de entrada al secador para la encapsulación de aceite de nuez. De este modo, se reportaron temperaturas de 163°C (Martínez et al., 2015) y 180°C (Luna et al., 2017). En otros estudios, donde se aplicó un diseño estadístico para la optimización de la temperatura del aire de entrada al secador, se reportaron temperaturas de trabajo en el rango de 140 a 180°C (Shamaei et al. 2017) y de 120 a 180°C (Cáceres et al., 2020).

El valor óptimo que se obtuvo en el presente trabajo para la temperatura del aire de entrada al secador (92°C) fue menor respecto a los reportados en la literatura. Sin embargo, el valor óptimo de la temperatura de secado para Cáceres et al. (2020), fue de 114°C para la encapsulación de aceite de nuez purificado, siendo este valor el más cercano al óptimo de este estudio.

Altas temperaturas del aire de entrada al secador favorecen la velocidad de formación de la costra sobre la superficie de las gotas atomizadas, obteniendo una mayor retención de la emulsión de ANP dentro de la micropartícula (Gharsallaoui et al., 2007). Por el contrario, utilizar bajas temperaturas del aire de entrada al secador disminuye la velocidad de formación de la costra sobre la superficie de las gotas atomizadas, en consecuencia, existe una menor difusión de agua y se obtienen micropartículas con mayor contenido de humedad. Las micropartículas son propensas a aglomerarse debido al mayor contenido de humedad lo que lleva a la formación de puentes entre partículas generando aglutinamiento y colapso de las partículas. Además, el agua presente en las micropartículas podría actuar como plastificante, conduciendo a micropartículas con menores Tg, pardeamiento, oxidación y/o hidrólisis de los triglicéridos (Cáceres et al., 2020; Encina et al., 2016).

Asimismo, la temperatura del aire de entrada al secador es un factor que altera la morfología de las micropartículas, donde utilizar altas temperaturas del aire de entrada al secador generan una contracción y superficies agrietadas en las micropartículas debido a la rápida evaporación y alta presión interna de las partículas durante el proceso de secado, además el tamaño de partícula aumenta cuando se incrementa la temperatura de secado debido a la rápida formación de la costra. Sin embargo, bajas temperaturas de secado pueden también formar abolladuras porque las partículas tienen un mayor tiempo para encogerse.

### 7.3.2 Relación aceite de nuez: biopolímero

El resultado de la optimización entre la relación de ANP: APS fue de 1:3 (tabla 5), rango dentro de los valores reportados para aceite: agente encapsulante de 1:1 a 1:10 en secado por atomización (Geranpour et al., 2020).

Generalmente, en los trabajos de encapsulación de aceite de nuez no se aplica un diseño estadístico para optimizar la relación aceite: agente encapsulante, seleccionando esta variable en base a otros estudios (Martínez et al., 2015; Calvo et al., 2012; Shamaei et al., 2017; Luna et al., 2017). En este contexto, para la encapsulación de aceite de nuez se han utilizado diferentes relaciones de aceite: agente encapsulante dependiendo del biopolímero o mezcla de biopolímeros. Así, relaciones

de 1:2 se reportó con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) + maltodextrina (MD) (Martínez et al., 2015); 1:1 y 1:1,5 con mezcla de caseinato de sodio + MD y carboximetilcelulosa (CMC) + MD (Calvo et al., 2012); relación 1:2 con leche desnatada en polvo (SMP) + MD (Shamaei et al., 2017). Mientras que, un rango más amplio para la relación de aceite de nuez: agente encapsulante (MD + goma arábica + gelatina) de 1:10 y 3:10 reporto por Luna et al. (2017). En otro estudio, donde se aplicó un diseño composito central para la encapsulación de aceite de nuez purificado utilizando capsul como agente encapsulante se reportó una relación de aceite de nuez: biopolímero de 1:5,42 (Cáceres et al., 2020)

Aunque la relación entre aceite de nuez: biopolímero es un factor importante en la encapsulación de aceite de nuez, también se debe considerar el contenido de sólidos. Por lo tanto, a mayor contenido de agente encapsulante implica un mayor contenido de sólidos lo que favorece una mayor velocidad de formación de costra sobre la superficie de las gotas atomizadas (Gharsallaoui et al., 2007). Sin embargo, la viscosidad de la emulsión es un factor limitante en la metodología de secado por atomización, en general, el límite crítico es la viscosidad a la que la emulsión no se puede atomizar adecuadamente (Calvo et al., 2012). En el presente estudio al utilizar APS y ser una proteína altamente viscosa fue un factor crítico a la hora de definir las relaciones de trabajo, lo cual limitó el uso de 2 g de aceite hasta 8 g de APS (1:4) para realizar el diseño estadístico.

### 7.3.3 Eficiencia de encapsulación (EE)

Se entiende por eficiencia de encapsulación como la cantidad de un compuesto activo que se encuentra dentro de la micropartícula (Shamaei et al., 2017). Sin embargo, como el secado por atomización es un método de inmovilización más que de encapsulación, parte de los activos (aceite) también quedan dispuestos en la superficie de la micropartícula, correspondiendo a los compuestos activos superficiales (Voos et al., 2010) los cuales quedan expuestos a condiciones del medio ambiente (Tonon et al., 2011). Por lo tanto, el aumento de la estabilidad oxidativa del aceite se da al reducir la cantidad de aceite superficial expuesto a condiciones ambientales, en donde los activos superficiales están directamente relacionados con la EE, siendo un parámetro



fundamental para encapsulación de aceite por secado por atomización (Geranpour et al., 2020).

La estabilidad de la emulsión y el tamaño de las gotas tienen un efecto en la EE. En general, las emulsiones con una mayor estabilidad y tamaño de gota más pequeño pueden conducir a un mejor proceso de microencapsulación (Shamaei et al., 2017).

Otro de los parámetros que influye en la eficiencia de encapsulación de aceites es la selección del tipo de biopolímero o agente encapsulante. En la figura 10 se muestra el efecto del tipo de agente encapsulante sobre la eficiencia de encapsulación de aceite de nuez. En general, se han utilizado como agentes encapsulantes: polisacáridos o mezclas de polisacáridos con proteínas, obteniendo altas EE de aceite de nuez. El uso de proteínas como agente encapsulante mostró EE sobre un 79% (Shamaei et al., 2017).

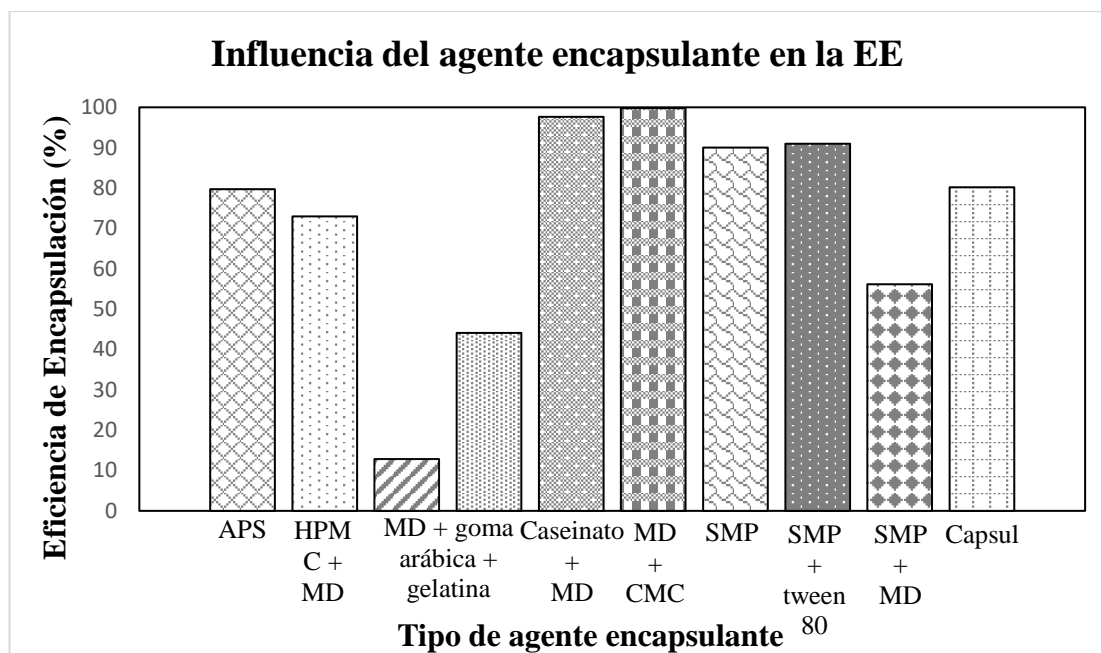


Figura 10. Influencia del agente encapsulante en la eficiencia de encapsulación (EE). APS: aislado proteico de soya; HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa; MD: maltodextrina; CMC: carboximetilcelulosa; SMP: leche desnatada en polvo.

La eficiencia de encapsulación obtenida para la encapsulación de ANP con APS alcanzó un valor de 79,7% (tabla 5) en condiciones óptimas. Al comparar estos resultados de eficiencia de encapsulación con la literatura (figura 11) se han informado

valores similares de EE para encapsulación de aceite de nuez. Cáceres et al. (2020) obtuvo una EE para el aceite de nuez purificado encapsulado con capsul de un 80,2%.

Calvo et al. (2012) obtuvo altas eficiencias de encapsulación utilizando mezclas de proteínas con carbohidratos (caseinato+MD 97,67%) y mezclas de carbohidratos (MD+CMC 99,79%). Sin embargo, se han reportado valores de EE más bajos, por ejemplo, Luna et al. (2017) informó EE de 12,82% y 44,1% para la encapsulación de nuez con MD + gelatina + goma arábica variando el contenido inicial de aceite de nuez.

Martínez et al. (2015) obtuvo una eficiencia de encapsulación de 73% utilizando HPMC+MD. Shamaei et al. (2017) obtuvo eficiencias de encapsulación de 90% y 91% cuando encapsuló AN con leche desnatada en polvo (SMP) y SMP + Tween-80, respectivamente, pero al utilizar la mezcla de SMP y maltodextrina como agente encapsulante la EE disminuyó a 56,2% debido a la reducción de elasticidad en la superficie de la gota, por lo tanto, esta reducción en la elasticidad podría conducir al desarrollo de fisuras en la membrana de la gota atomizada llevando a la difusión de aceite a la superficie de las partículas disminuyendo la EE.

La temperatura del aire de entrada al secador y el contenido de sólidos en la alimentación son otros factores que influyen sobre la eficiencia de encapsulación.

#### Efecto de la temperatura de entrada al secador

Una mayor temperatura del aire de entrada al secador se ha asociado con una mayor eficiencia de encapsulación de aceite y una menor cantidad de aceite sin encapsular en la superficie de las micropartículas, donde el aceite superficial se degrada y es más propenso a la oxidación que el aceite encapsulado (Encina et al., 2016). Además, mayores temperaturas favorecen la rápida formación de la costra sobre la superficie de las gotas atomizadas (Cáceres, et al., 2020).

En la figura 11 se muestra el efecto de la temperatura del aire de entrada al secador sobre la eficiencia de encapsulación de aceite de nuez. En el presente estudio se observa una EE de 79,7% al utilizar una temperatura de 92°C (tabla 5), en Cáceres et

al. (2020) se informó una EE similar (80,2%) utilizando una temperatura del aire de entrada al secador de 114°C.

Sin embargo, Shamaei et al. (2017) reportó un incremento de la EE del aceite de nuez al aumentar la temperatura del aire de entrada al secador de 140 a 180°C (56,2% a 90%). Valores similares de temperaturas del aire de entrada al secador (163°C) resultó en una EE de 73% (Martínez et al., 2015). A pesar que Luna et al. (2017) utilizó altas de temperatura de trabajo (180°C) obtuvo bajas EE (12,82% y 44,1%), con estos resultados se observa que la EE es muy variable para las diferentes temperaturas del aire de entrada al secador en los reportes encontrados, indicando que otros parámetros también influyen la EE de aceite.

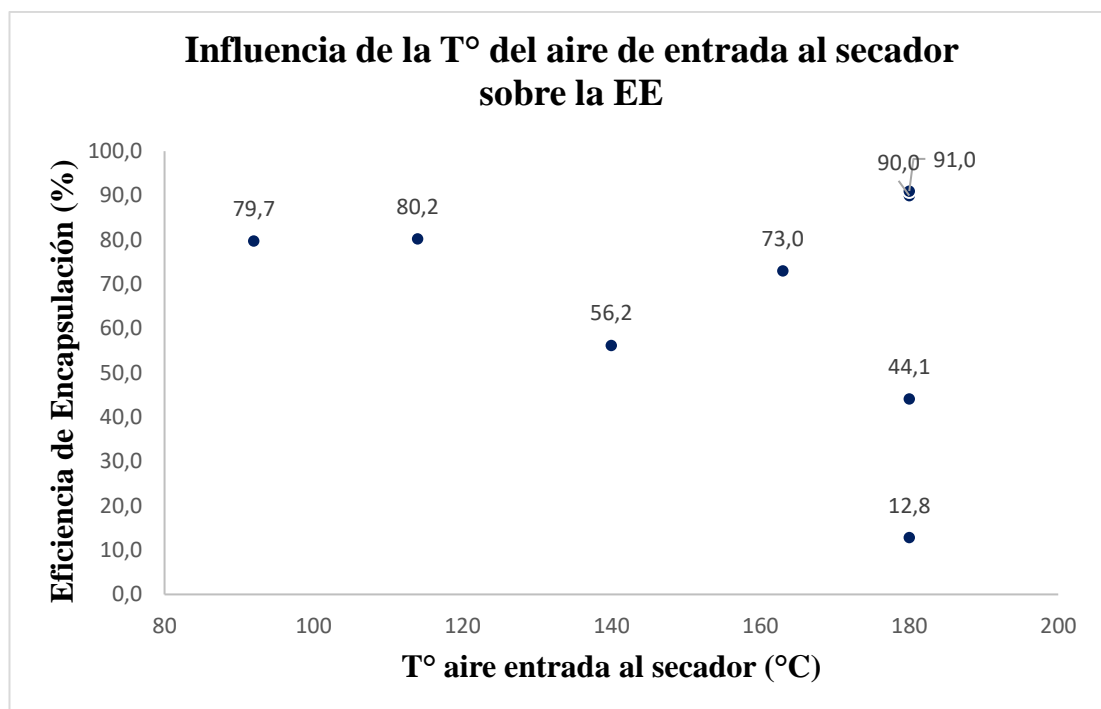


Figura 11. Influencia de la temperatura del aire de entrada al secador sobre la eficiencia de encapsulación (EE).

### Efecto del contenido de sólidos

Un aumento en el contenido de sólidos totales (cantidad de agente encapsulante y aceite) permite mejorar la eficiencia de encapsulación, debido a que un mayor contenido de sólidos logra una mayor retención de la emulsión en el interior de la micropartícula (Gharsallaoui et al., 2007; Luna et al., 2017). Sin embargo, en figura 12 se observa que al encapsular AN y aumentar el contenido de sólidos no necesariamente la EE aumenta ya que depende también del efecto de otras variables del proceso y formulaciones tales como: temperatura del aire de entrada al secador y tipo de agente encapsulante (polisacáridos, proteínas, mezclas entre ellos, relaciones que se utilizan, entre otros).

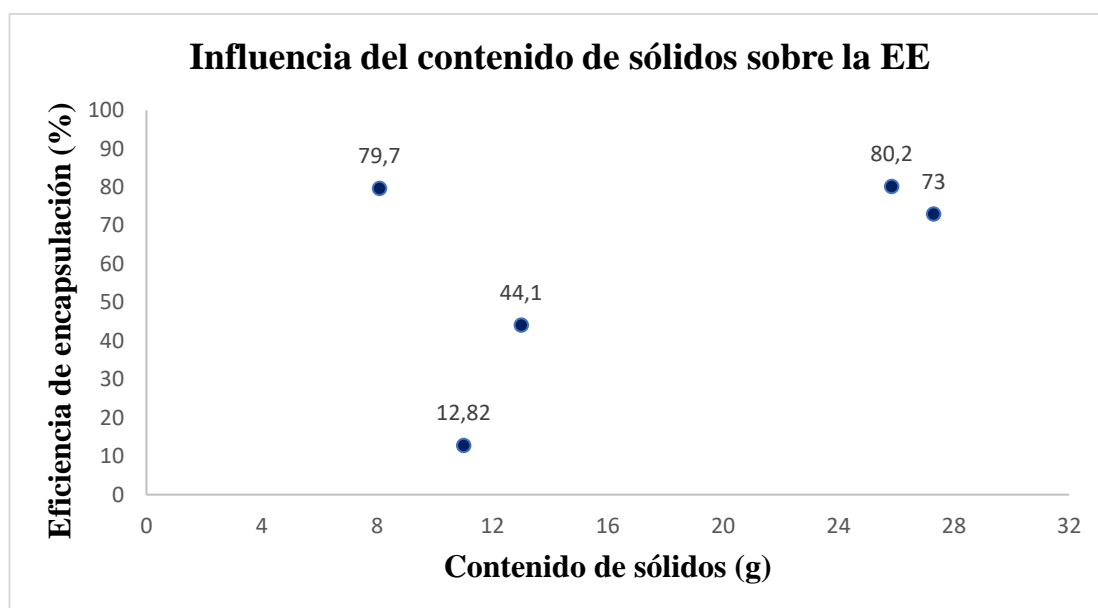


Figura 12. Influencia del contenido de sólidos sobre la eficiencia de encapsulación (EE).

#### 7.3.4 Periodo de inducción (PI)

El periodo de inducción es un parámetro que indica la estabilidad oxidativa en aceites y grasas, donde valores más altos reflejan una mayor estabilidad oxidativa. Se determina a través de la oxidación acelerada de la muestra aplicando temperatura y burbujeo de oxígeno, registrando los cambios en la conductividad del agua, debido a

la formación de compuestos volátiles durante la reacción (Amo et al., 1992; Velasco et al. 2009).

El resultado que se obtuvo de PI para las micropartículas de ANP-APS fue de 0,94 h (tabla 5), en comparación al aceite de nuez purificado sin encapsular (ANP) cuyo valor fue de 0,41 h, mostrando el efecto protector de la encapsulación sobre el ANP con APS. Estos resultados coinciden con lo reportado en otras investigaciones, Cáceres et al. (2020) reportó un valor similar de 0,99 h en micropartículas de ANP con Capsul; Martínez et al. (2015) informó un PI de 2,88 h en micropartículas de AN con una mezcla de HPMC y maltodextrina. En este contexto, la encapsulación por secado por atomización mostró un efecto protector de los lípidos sobre la oxidación, porque el agente encapsulante actuaría como una barrera física evitando la degradación provocada por la temperatura y oxígeno entre otros (Bakry et al., 2016; Ruiz et al., 2015).

Por otro lado, Cáceres et al. (2020) mostró que la incorporación de una capa externa de AS aumentó significativamente la EE (>90%) en comparación con las micropartículas sin la capa de alginato (< 85%), por lo tanto, la incorporación de la capa externa a las micropartículas ayuda a encapsular el aceite superficial que queda en las micropartículas de ANP-Capsul. La misma tendencia ocurrió con el PI al utilizar una capa externa de AS para las micropartículas de ANP-C/AS, el valor que se obtuvo fue de 1,84 h. Basándose en estos resultados, se puede inferir que las micropartículas de ANP-APS/AS seguirían el mismo comportamiento del aumento en el valor de EE y PI, ya que los resultados sin la capa externa de AS son similares en ambos trabajos (anexo 3).

#### 7.3.5 Contenido de ANP

El contenido de ANP corresponde a los mg de aceite utilizados en la formulación respecto al contenido de sólidos en la alimentación. El resultado que se obtuvo para las micropartículas obtenidas de ANP-APS fue de 247 mg aceite/g polvo (tabla 5). Se reportaron resultados similares por Luna et al. (2017) para la encapsulación de AN utilizando un 3% de aceite en la formulación, donde obtuvo 230,8 mg aceite/ g polvo, sin embargo, en la misma investigación al disminuir el contenido inicial de aceite a un

1% el contenido de AN disminuyó considerablemente a 90,9 mg aceite/ g polvo Cáceres et al. (2020), informó un contenido de ANP de 154,7 mg aceite/ g polvo.

Por lo tanto, a mayor contenido de sólidos totales disminuye el contenido de aceite en la micropartícula, sin embargo, lo ideal es tener micropartículas con alta carga de aceite para ser utilizadas como ingredientes en la industria de alimentos.

#### 7.4 Incorporación de Alginato de Sodio (AS) como capa de recubrimiento.

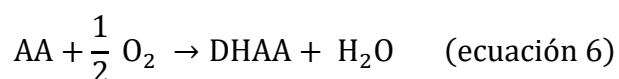
Se obtuvieron micropartículas de ANP-APS recubiertas con una capa externa de AS (ANP-APS/AS) donde se utilizó una boquilla de 3 fluidos. La relación del flujo de alimentación interior: exterior fue de 1:10. Por lo tanto, la formulación utilizada para la alimentación interna fue de 35g y la alimentación externa de 350 g (descrita en la sección 6.3).

#### 7.5 Revisión de la bibliografía en relación al uso de ácido ascórbico como secuestrante de oxígeno en micropartículas.

El ácido ascórbico (AA), además de ser un ingrediente alimentario ampliamente utilizado con actividad biológica de vitamina C y reconocido como seguro (GRAS), es un secuestrante de oxígeno natural, capaz de eliminar el oxígeno rápidamente en condiciones de pH neutro (Janjarasskul et al., 2011). No obstante, el papel del AA en la prevención de la oxidación lipídica sería multifuncional, teniendo diversos mecanismos de acción, entre los cuales se pueden mencionar:

- reducción de radicales libres, con formación de un radical semideshidroascorbato menos reactivo o ácido deshidroascórbico (DHAA)
- atrapamiento de oxígeno singlete
- regeneración de otros antioxidantes, por ejemplo, a través de la reducción del radical tocoferol
- absorción de oxígeno, dado que la oxidación preferencial de AA a DHAA disminuye su concentración (Damodaran et al., 2007; Uluata et al., 2015).

El mecanismo de acción del AA se explica por las propiedades reductoras del grupo enediol en los carbonos 2 y 3 (figura 13), que le permite oxidarse a DHAA a través de transferencias de uno o dos electrones, lo que a su vez lo hace capaz de captar oxígeno (ecuación 6) (Uluata et al., 2015; Janjarasskul et al., 2011; Damodaran et al., 2007).



El AA a bajas concentraciones y con una alta presión de oxígeno puede actuar como un pro-oxidante. Esto podría ocurrir por la mediación del AA en la generación de radicales hidroxilos ( $\text{OH}^\bullet$ ) u otras especies reactivas (Damodaran et al., 2007). Para asegurar que el AA tenga un efecto antioxidante y no pro-oxidante, se debe considerar la concentración a utilizar y los factores que alteran la oxidación de lípidos (Uluata et al., 2015).

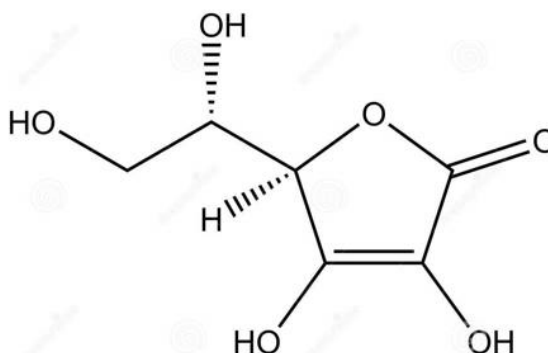


Figura 13. Estructura química del ácido ascórbico

El AA es un compuesto muy polar y esencialmente insoluble en aceites, a concentraciones adecuadas, es sorprendentemente eficaz como antioxidante cuando se dispersa, ya sea en aceites o en emulsiones (Damodaran et al., 2007). En el área de alimentos, Janjarasskul et al., 2011 incorporaron AA (0,05; 0,1 o 0,2 M) a una película comestible de aislado de proteína de suero y glicerol y evaluaron su potencial como secuestrante de oxígeno, obteniendo que la incorporación de AA en la película disminuyó la permeabilidad al  $\text{O}_2$ , mejorando además las propiedades mecánicas.

En efecto, el uso de AA como antioxidante y/o secuestrante de oxígeno podría ser aplicado en aceites altamente insaturados, encapsulados mediante secado por atomización, incorporando AA, ya sea a la solución acuosa formada por el agente encapsulante, y/ o a una capa externa a través de una boquilla 3-N, con el fin de eliminar el oxígeno residual y evitar su difusión al interior de las micropartículas, prolongando así su vida útil.

Cáceres et al. (2020), incorporó AA como secuestrante de oxígeno para eliminar el oxígeno residual y evitar la difusión de oxígeno dentro de las micropartículas de aceite de nuez encapsulado con capsul (C) y recubiertas con AS (ANP-C/AS) por secado por atomización con boquilla 3-N. El AA se adicionó en tres lugares específicos de la micropartícula durante el proceso de encapsulación de ANP, generando 3 nuevos sistemas de micropartículas como se observa a continuación en la figura 14:

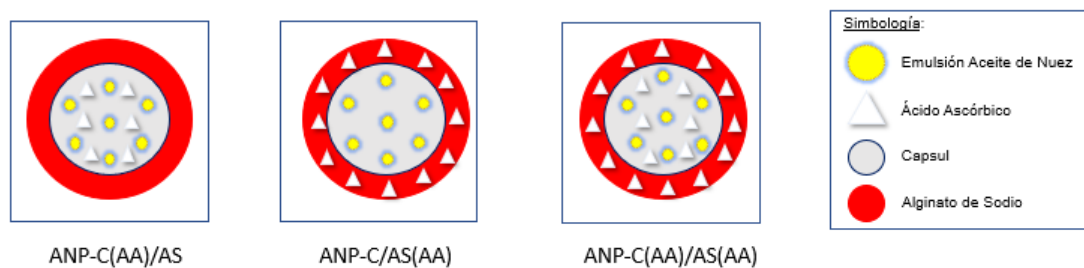


Figura 14. Incorporación de AA en diferentes localizaciones de la micropartícula.

- i. ANP-C(AA)/AS: ácido ascórbico adicionado en la emulsión de alimentación interna de ANP-C.
- ii. ANP-C/AS(AA): ácido ascórbico adicionado en la capa externa de alginato de sodio.
- iii. ANP-C(AA)/AS(AA): ácido ascórbico adicionado en la emulsión de alimentación interna de ANP-C y en la solución de alimentación externa de alginato de sodio.



En la figura 15 se muestra la evolución del PI con concentraciones crecientes de AA (10 a 50mM) en las tres localizaciones estudiadas por Cáceres et al. (2020). A concentraciones de AA desde 40 mM hubo diferencias significativas entre las diferentes localizaciones. El AA localizado en la emulsión interna ANP-C(AA)/AS presentó el mayor PI (9,19 h), mostrando que la remoción del oxígeno residual que se incorporó durante el proceso de emulsificación es el factor más importante a considerar (Cáceres et al., 2020; Young et al., 2018)

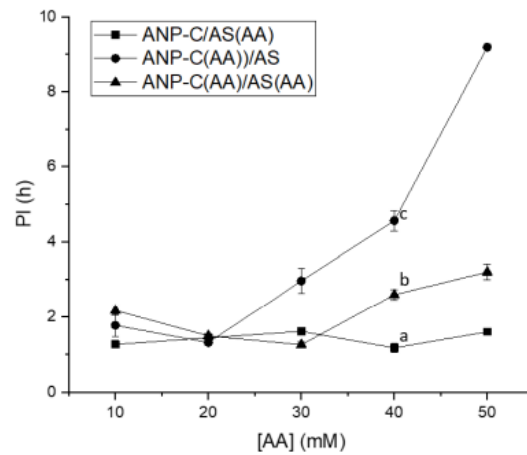


Figura 15. Efecto de la adición de AA en distintas concentraciones y localizaciones sobre el PI en el sistema ANP-C/AS (Cáceres et al., 2020)

## 8. CONCLUSIONES

- La temperatura del aire de entrada al secador (variable de proceso) y la relación de ANP:APS (variable de formulación) fueron las variables que afectaron significativamente a la EE de ANP y al PI. Temperaturas del aire de entrada al secador bajas (92 °C) y relación ANP:APS intermedias (1:3) alcanzó una EE de 79,7% y 0,94 h de PI. Un recubrimiento de las partículas de ANP-APS/AS aumenta la EE del ANP sobre un 90%.
- La configuración de las micropartículas utilizando boquilla de tres fluidos permite la incorporación de ácido ascórbico en diferentes localizaciones de las micropartículas. Estudios similares mostraron que la incorporación de AA en la emulsión interna de las micropartículas (ANP-C(AA)/AS) fue capaz de presentar una mayor estabilidad oxidativa medida por Rancimat, mostrando que el oxígeno incorporado en la emulsión presentó la menor oxidación del aceite en las micropartículas.
- Sistema de micropartículas de ANP-APS con recubrimiento y secuestrante de oxígeno se proyectan como ingredientes para la formulación de alimentos saludables con un importante aporte de ALA ( $\omega$ -3).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- AENOR (1991). Asociación Española de Normalización. Norma UNE 55037-73. Catálogo de Normas UNE, Madrid
- Amaral, J. S., Casal, S., Pereira, J. A., Seabra, R. M., and Oliveira, B. P. (2003). Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7698-7702.
- Amaral, J. S., Alves, M. R., Seabra, R. M. and Oliveira, B. P. (2005). Vitamin E composition of walnuts (*Juglans regia* L.): a 3-year comparative study of different cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5467-5472.
- Amo, M., Esteves, W., and Barrera, D. (1992). Determinación del periodo de inducción de aceite de soya. Correlación entre Rancimat y otros índices. Instituto de Tecnología de Alimentos, Brasil.
- AOCS Official Method Cd 3d-63. Acid value. In *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 3<sup>rd</sup> ed.; AOCS Publishing: Champaign, IL, USA, 1993.
- AOCS Official Method Cd 8-53. Peroxide value—Acetic acid-chloroform method. In *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*; AOCS Publishing: Champaign, IL, USA, 1992.
- AOCS Official Method Cd 8-89. Tocopherols and Tocotrienols in Vegetable Oils and Fats by HPLC. In *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 3<sup>rd</sup> ed.; AOCS Publishing: Champaign, IL, USA, 1993.
- AOCS. 1993. American oil Chemists Society. *Official methods recommended practices of American Oil Chemists Society (3<sup>rd</sup> ED.)*. Champaign, IL:AOCS.
- Arpi, E (2015). Microencapsulación del aceite de pescado de anchoveta (*Engraulis ringens*) mediante doble emulsificación empleando aislado proteico de soya reticulado con transglutaminasa, Facultad de Ingeniería, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.

- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A. and Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143-182.
- Berenzon, S. and Saguy, I. S. (1998). Oxygen absorbers for extension of crackers shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, 31(1), 1-5.
- Cáceres, D., Giménez, B., Márquez, G., Holgado, F., Vergara, C., Romero, P., Soto, E., and Robert, P. (2020). Influence of the location of ascorbic acid in walnut oil spray-dried microparticles with outer layer on the physical characteristics and oxidative stability. *Antioxidants*, 9, 1272.
- Calvo, P., Lozano, M., Espinosa-Mansilla, A., and González-Gómez, D. (2012). In vitro evaluation of the availability of  $\Omega$ -3 and  $\Omega$ -6 Fatty acids and tocopherols from microencapsulated walnut oil. *Food Research International*, 48 (1), 316-321.
- Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C., and Silva, B. M. (2010). Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 441-447.
- Cichello, S. (2015). Oxygen absorbers in food preservation: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1889-1895.
- Damodaran, S., Parkin, K. L. and Fennema, O. R. (2007). *Fennema's Food Chemistry*. CRC press, Fourth Edition, 849-884.
- Desai, H y Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394.
- Voos, P., Faas, M., Spasojevic, M., and Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 292-302.
- Dziezak, J.D. (1998). Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. *Food Technology*, 42(4), 136.
- Encina, C., Vergara, C., Giménez, B., Oyarzún-Ampuero, F. and Robert, P. (2016). Conventional spray-drying and future trends for the

- microencapsulation of fish oil. *Trends in Food Science and Technology*, 56, 46-60
- Gallardo, G., Guida, L., Martínez, V., López, M.C., Bernhardt, D., Blasco, R., Pedroza-Islas, R., Hermida, L. G. (2013). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52(2), 473- 482.
  - George, M. and Abraham, T.E. (2007). pH sensitive alginate–guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 335(1), 123-129.
  - Geranpour, M., Assadpour, E., Mahdi, S. (2020). Recent advances in the spray drying encapsulation of essential fatty acids functional oils. *Trends in Food Science y Technology*, 102, 71-90.
  - Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. and Saurel, R.(2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.
  - Gursul, S., Karabulut, I., Durmaz, G. (2019). Antioxidant efficacy of thymol and carvacrol in microcapsulated walnut oil triacylglycerols. *Food Chemistry*, 278, 805-810.
  - Heck, R., Lorenzo, J., Dos Santos, B., Cichoski, A., Menezes, C., and Bastianello, P. (2020). Microencapsulation of healthier oils: an efficient strategy to improve the lipid profile of meat product. *Food Science*, (40), 6-12.
  - ISO, P. (2000). Animal and vegetable fats and oils–preparation of methyl esters of fatty acids. Polish Standard Method PN-EN ISO, 5509, 2000.
  - Janjarasskul, T., Tananuwong, K. and Krochta, J. M. (2011). Whey protein film with oxygen scavenging function by incorporation of ascorbic acid. *Journal of Food Science*, 76(9), 561-565.
  - Johansen Crosby, E. (1989). Spray drying handbook: k. Masters Longman Group LTD Harlow, Essex 710 pp. *Drying Technology*, 7(2), 419-425.
  - Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T. and Matsumura, Y. (2003). Oxidative stability, structure, and physical

- characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science*, 68(7), 2248-2255.
- Kim, K.B., Nam, Y.A., Kim, H.S., Hayes, A.W and Lee, B.M. (2014). A-Linolenic acid: nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, 70, 163-178.
  - Kolanowski, W., Ziolkowski, M., Weißbrodt, J., Kunz, B., and Laufenberg, G. (2006). Microencapsulation of fish oil by spray drying-impact on oxidative stability. Part 1. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 336-342.
  - Kondo, K., Niwa, T. and Danjo, K. (2014). Preparation of sustained-release coated particles by novel microencapsulation method using three-fluid nozzle spray drying technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51, 11-19.
  - Kumar, A., Sharma, A. and C Upadhyaya, K. (2016). Vegetable Oil: Nutritional and Industrial Perspective. *Current Genomics*, 17(3), 230-240.
  - Li, L., Tsao, R., Yang, R., Kramer, J. K., & Hernandez, M. (2007). Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. cordiformis) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1164-1169.
  - Liu, X., Zhou, J., Zeng, Y. y Ouyang, X. (2004). The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor. *Journal of Food Engineering* 65, 391-396.
  - Loewe, V., González M. (2001). Nogal Común (*Juglans Regia*): Una alternativa para producir madera de alto valor. *Universidad de Chile*, 11-36.
  - Luna, J., Ochoa, C., Hernández, P., Guerrero, J. (2017). Microencapsulation of walnut, peanut and pecan oils by spray drying. *Food Structure*, 12, 26-32.
  - Mahieu, A., Terrie, C. and Leblanc, N. (2017). Role of ascorbic acid and iron in mechanical and oxygen absorption properties of starch and polycaprolactone multilayer film. *Packaging Research*, 2(1), 1-11.
  - Magaña, D., Fumasi, R. (2021). Five-Year Walnut Market Outlook: Will demand grow to match supply and competition. *Food and Agribusiness*, 1-6.

- Martínez, M.L., Curti, M.I., Roccia, P., Llabot, J.M., Penci, M.C., Bodoira, R. M., and Ribotta, P. D. (2015). Oxidative stability of walnut (*Juglans Regia* L.) and chia (*Salvia Hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. *Powder Technology*, 270, 271-277.
- McClements, D. J. (2014). Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds. CRC Press. Thirteenth Edition, 133-136.
- Ministerio de Salud (2016). Reglamento Sanitario de los Alimentos. Decreto Supremo N° 977/96, 1998.
- Morelo, G., Giménez, B., Márquez-Ruiz, G., Holgado, F., Romero-Hasler, P., Soto-Bustamante, E., and Robert, P. (2019). Influence of the Physical State of Spray-Dried Flavonoid-Inulin Microparticles on Oxidative Stability of Lipid Matrices. *Antioxidants*, 8, 520
- ODEPA, 2017. “Nueces: Chile la mayor tasa de crecimiento productivo medio anual” [En línea] <<https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2017/12/Nueces.pdf>> [Consulta: 02/09/2019].
- Ray, S., Raychaudhuri, U. and Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76-83.
- Redagráfica, (2018). “Nogales y otros frutales de nuez” Conversación técnica sobre agricultura, Chile.
- Ruiz, J.C.; Ortiz, E.L.; Segura, M.R. (2015). Encapsulation of vegetable oils as source of omega-3 fatty acids for enriched functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 1423–1434.
- Reineccius, G. A. and Yan, C. (2016) Factors controlling the deterioration of spray dried flavourings and unsaturated lipids. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(1), 5-21.
- Savage, G.P., Dutta, P.C., and McNeil, D.L. (1999). Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76(9), 1059-1063.

- Shamaei, S., Seiedlou, S., Aghbashlo, M., Tsotsas, E., and Kharaghani, A. (2017). Microencapsulation of walnut oil by spray drying: Effects of wall material and drying conditions on physicochemical properties of microcapsules. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*, 39, 101-112.
- Sunderland, T., Kelly, J. G. and Ramtoola, Z. (2013). Application of a novel 3-fluid nozzle spray drying process for the microencapsulation of therapeutic agents using incompatible drug-polymer solutions. *Archives of Pharmacal Research*, 38(4), 566-573.
- Tonon, R. V., Grosso, C. R., and Hubinger, M. D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*, 44(1), 282-289.
- Uluata, S., McClements, D. J. and Decker, E. A. (2015). How the multiple antioxidant properties of ascorbic acid affect lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1819-1824.
- Vargas, N., Mendoza, G., González, G., Lemus, G., Lara, M., Carus, M., Bianchini, V., Millar, J., Valenzuela, D. (2020). *Manual de Manejos Productivos del Nogal en Chile*. CORFO y CHILENUT, 7-62.
- Velasco, J., Dobarganes, C., Holgado, F., and Márquez-Ruiz, G. (2009). A follow-up oxidation study in dried microencapsulated oils under the accelerated conditions of the Rancimat test. *Food Research International*, 42(1), 56-62.
- Vibrasec, 2021. Plantas de secado por atomización, principio de funcionamiento [En línea] <<https://vibrasec.com/productos/plantas-de-secado-por-atomizacion/#principio-de-funcionamiento>> [Consulta: 08/10/2021].
- Wang, Y., Liu, W., Chen, X. D. and Selomulya, C. (2016). Microencapsulation and stabilization of DHA containing fish oil in protein-based emulsion through mono-disperse droplet spray dryer. *Journal of Food Engineering*, 175, 74-84.



- Yáñez, J., Salazar, J. A., Chaires, L., Jiménez, J., Márquez, M., and Ramos, E. G. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21, 313-319
- Yoshida, H., Kondo, I., and Kajimoto, G. (1992). Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(11), 1136-1140
- Young, S.; Basiana, E.; Nitin, N. (2018). Effects of interfacial composition on the stability of emulsion and encapsulated bioactives after thermal and high pressure processing. *Journal of Food Engineering*, 231, 22–29.
- Zakarian, A.J. y King, C.J. (1982). Volatiles loss in the zone during spray drying of emulsions. *Industrial Engineering Chemistry Process Design and Development*, 21, 107–113
- Zhou, D., Pan, Y., Ye, J., Jia, J., Ma, J., Ge, F. (2017). Preparation of walnut oil microcapsules employing soybean protein isolate and maltodextrin with enhanced oxidation stability of walnut. *Trends in Food Science and Technology*, 83, 292-297.
- Zimmermann, H., Shirley, S. G. and Zimmermann, U. (2007). Alginate-based encapsulation of cells: past, present, and future. *Current Diabetes Reports*, 7(4), 314-320.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1: Análisis de varianza para la variable EE

#### Analysis of Variance for EE

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
A: Temperatura	211.009	1	211.009	67.99	0.0037
B: Relación ANP: APS	75.3059	1	75.3059	24.27	0.0160
AA	45.8998	1	45.8998	14.79	0.0310
BB	104.13	1	104.13	33.55	0.0102
Lack-of-fit	74.0716	4	18.5179	5.97	0.0870
Pure error	9.31	3	3.10333		
Total (corr.)	519.727	11			

R-squared = 83.9566 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 74.789 percent

Standard Error of Est. = 1.76163

Mean absolute error = 2.23645

Durbin-Watson statistic = 2.0538 (P=0.4570)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.130919

#### Regression coeffs. for EE

<i>Coefficient</i>	<i>Estimate</i>
constant	0.109268
A:Temperatura	0.434639
B:Ralacion ANP:proteina	42.0822
AA	- 0.0020450

	3
BB	-7.70055

## Anexo 2: Análisis de varianza para la variable PI

### Analysis of Variance for Rancimat

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
A: Temperatura	0.160987	1	0.160987	150.05	0.0012
B: Relación ANP: APS	0.0444115	1	0.0444115	41.39	0.0076
AA	0.10386	1	0.10386	96.80	0.0022
Lack-of-fit	0.025646	5	0.00512919	4.78	0.1140
Pure error	0.00321875	3	0.00107292		
Total (corr.)	0.338123	11			

R-squared = 91.4632 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 88.262 percent

Standard Error of Est. = 0.0327554

Mean absolute error = 0.0440855

Durbin-Watson statistic = 1.36535 (P=0.0997)

Lag 1 residual autocorrelation = 0.249334

### Regression coeffs. for Rancimat

<i>Coefficient</i>	<i>Estimate</i>
constant	2.67217
A: Temperatura	-0.0310489
B: Relación ANP:APS	0.10008
AA	0.000097278

	8
--	---

Anexo 3: Resultados obtenidos en Cáceres et al. (2020) para la caracterización de micropartículas.

Tabla 6. Caracterización de las micropartículas de ANP: ANP-C, ANP-C/AS, ANP-C(AA)/AS, ANP-C/AS(AA) y ANP-C(AA)/AS(AA).

Parámetro	ANP-C	ANP-C/AS	ANP-C(AA)/AS	ANP-C/AS(AA)	ANP-C(AA)/AS(AA)
EE (%)	80,2 ±	94,0 ± 1,3	93,8 ± 1,5	93,9 ± 5,0 b	92,9 ± 1,2 b
PI (h)	0,99 ±	1,84 ± 0,1b	4,56 ± 0,27	1,17 ± 0,1 a	2,6 ± 0,1 c
Recuperación AA	-	-	86,3 ± 1,7	85,2 ± 2,2 b	83,8 ± 2,0 b

\*Letras distintas indican diferencias significativas entre sistemas de micropartículas (p valor<0,05)