

**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARRERA**

**EVALUACIÓN DE ALTERNATIVAS DE MICRO-ENCAPSULACIÓN PARA
EXTRACTOS DE ARRAYÁN**

Trabajo de Titulación para optar al
Título de Técnico Universitario en
QUÍMICA, MENCIÓN QUÍMICA
ANALÍTICA

Alumno:

Yaritza Cepeda

Profesor Guía:

Gonzalo Sepúlveda Ramírez

Profesor Correferente:

Dr. Lida Fuentes

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias de todo corazón a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta memoria, incluida mi familia ya que hay mucho esfuerzo y sacrificio detrás de este trabajo.

Me gustaría agradecer a mi profesora correferente Lida ya que sin ella no habría tenido un tema para mi tesis, sin su ayuda y conocimientos no habría sido capaz de terminar esta etapa, también me gustaría agradecer a mis compañeras de trabajo ya que ellas fueron piezas fundamentales, me de ayudaron en todo momento en especial a Nicole Gallardo que es una compañera maravillosa que me daba tiempos en el trabajo para que avanzara en la tesis y me ayudó en todo momento desde el día uno, dándome ánimo, ideas y formatos de tesis.

Y por último a mi pareja Gabriel Quinteros el cual fue un apoyo incondicional es todo el tiempo, siempre me daba palabras de aliento y me ayudó en todo lo que estaba a su alcance, por siempre creer en mi y darme todo su amor y cariño.

RESUMEN

Keywords: ARRAYÁN, MICRO-ENCAPSULACIÓN, ANTIOXIDANTE, POLIFENOLES

“Arrayán” [*Luma apiculata* (DC.) Burret] es una especie que pertenece a la familia Myrtaceae y ha sido utilizada de forma ancestral por el pueblo Mapuche en diversos alimentos y preparaciones medicinales. Arrayán ha sido descrito como fuente de compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante, que apoyan su papel funcional. Por otro lado, dentro de los métodos de estabilización están los métodos de deshidratado y de micro-encapsulación que son las técnicas más utilizadas para garantizar la protección de compuestos bioactivos. De éstos, la micro-encapsulación es ampliamente utilizado en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Con la intención de buscar usos potenciales para el extracto de "arrayán" y su estabilización, el objetivo de este estudio es caracterizar el efecto de distintos métodos de deshidratación y de micro-encapsulación de extractos metanólicos de esta fruta nativa de Chile. Los frutos de "Arrayán" se colectan desde la localidad de Antuco, Región del Biobío, Chile y deshidratados por liofilización y secado en horno convector. Los compuestos polifenólicos se extraen con Metanol 100% y concentrados en rotavapor a baja presión y 40 °C. El extracto metanólico (500 mg/mL) se mezcla (1:1) con una solución de alginato de sodio al 2% P/V para su microencapsulación. Los resultados no muestran diferencias significativas en la capacidad antioxidante determinada por ORAC de los extractos obtenidos desde frutas deshidratadas por liofilización (21.804 [µmol] ET/100 [g]) y por secado en horno convector (22.719 [µmol] ET/100 [g]), mientras mediante micro-encapsulación se logran obtener esferas en un rango de tamaño de 0,350 a 0,275 cm. Los resultados indican que es posible obtener extractos con alta capacidad antioxidante y micro-encapsularlos mediante la gelificación iónica externa. Más análisis son necesarios para evaluar la incorporación de estos extractos en matrices cosméticas y / o alimentarias.

ÍNDICE

RESUMEN

SIGLAS Y SIMBOLOGÍAS

INTRODUCCIÓN.....1

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES3

1. ANTECEDENTES GENERALES 5

1.1. ARRAYÁN.....5

1.1.1. PROPIEDADES FUNCIONALES6

1.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES
..... 12

1.2.1. Compuestos fenólicos totales..... 12

1.2.2. Actividad antioxidante 12

1.3. PRESERVACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS..... 13

1.3.1. Proceso de deshidratación..... 13

1.4. MICRO-ENCAPSULACIÓN 16

1.4.1. Fundamento..... 16

1.4.2 Mecanismos de gelificación..... 19

1.4.3 Técnicas de micro-encapsulación 20

1.4.4 Reactivos involucrados en la micro-encapsulación 21

1.5. ANÁLISIS DE CARACTERIZACIÓN 23

1.5.1. Análisis colorimétrico 23

1.5.2. Actividad de agua..... 24

1.5.3. Humedad 25

CAPITULO 2: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL27

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL 29

2.1 EQUIPOS Y MATERIALES.....29

2.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES.....29

2.2.1. Reactivos29

2.2.2. Soluciones30

2.2.3. Muestra.....30

2.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....31

2.3.1. Pruebas preliminares31

1.3.2. Compuestos fenólicos totales,.....31

2.3.3. Capacidad antioxidante32

2.3.4. Micro-encapsulación	33
2.4. PROCEDIMIENTO	34
2.4.1. Liofilización	34
2.4.2. Secado en horno	34
2.4.3. Extracción.....	34
2.4.4. Compuestos fenólicos totales	34
2.4.5. Actividad antioxidante	35
2.4.6. Prueba de evaluación alginato-metanol.....	35
2.4.7. Prueba de evaluación alginato-glicerol	35
2.4.8. Microencapsulación.....	36
2.4.9. Disolución de esferas	36
2.4.10. Humedad	36
2.4.11. Tamaño esferas.....	36
2.4.12. Determinación de color	36
2.4.13. Actividad de agua.....	37
2.5. EXPRESIÓN DE RESULTADOS.....	37
2.5.1. Humedad	37
2.5.2. Promedio	37
2.5.3. Desviación estándar.....	37
2.5.4. Coeficiente de variación.....	38
2.5.5. Correlación de la curva de calibrado.....	38
2.5.6. Determinación de mg de GAE/100g de muestra.....	38
2.5.7. Determinación de μ moles TE/100g de muestra	38
2.5.8. Factor de esfericidad	39
2.5.9. Calculo de eficiencia de la micro-encapsulación	39
CAPITULO 3: RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	41
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	43
3.1. RESULTADOS DE SECADO PARA EL FRUTO DE ARRAYÁN.....	43
3.1.1. Arrayán después de la deshidratación por los métodos de liofilización y horno convector.....	43
3.1.2. Determinación por Colorimetría	43
3.1.3. Cuantificación de Actividad antioxidante y Compuestos fenólicos totales en extractos metanólicos según tipo de secado	45
3.2. RESULTADOS DE LA TECNICA DE MICRO-ENCAPSULACIÓN.....	46
3.2.1. Encapsulación de extractos de arrayán.....	46
3.2.2. Determinación de humedad.....	47

3.2.3. Actividad de agua.....	48
3.2.4. Tamaño y forma de las esferas.....	48
3.2.5. Cuantificación de ORAC y CFT de las micro-capsulas según tipo de solvente	49
3.2.6. Eficiencia de micro-encapsulación	50
3.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS	52
CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXOS	66
ANEXO A: PRUEBAS PRELIMINARES CON METANOL.....	66
ANEXO B: PRUEBAS PRELIMINARES CON GLICEROL	67
ANEXO C: RESULTADOS DE COLOR FRUTOS ARRAYÁN	67
ANEXO D: CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	69
ANEXO E: RESULTADOS DE EXTRACTOS DE ARRAYÁN.....	70
ANEXO F: RESULTADOS DE ESFERICIDAD	71
ANEXO G: RESULTADOS DE HUMEDAD ESFERAS	73
ANEXO H: RESULTADOS DE MICRO-ENCAPSULACIÓN.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Flor (A) y el fruto (B) de arrayán	6
Figura 1-2. Estructura de antioxidantes sintéticos.	8
Figura 1-3. Estructura Del polifenol antioxidante resveratrol.	8
Figura 1-4. Fenol	10
Figura 1-5. Tipos de microcápsulas.	17
Figura 1-6. Modelo "Caja de huevos".	18
Figura 1-7. Mecanismos de gelificación iónica.	20
Figura 1-8. Tipos de monosacáridos.	21
Figura 1-9 Espacio de color CIE L*A*B.	24
Figura 3-1 (A) Arrayán Liofilizado y (B) Arrayán secado en horno.	43
Figura 3-2 Color programa CIELAB para las coordenadas de Arrayán fresco.	44
Figura 3-3 Color programa CIELAB para las coordenadas de Arrayán Liofilizado	44
Figura 3-4 Color programa CIELAB para las coordenadas de Arrayán secado en horno	45
Figura 3-5 Micro-cápsulas. Observación visual y al microscopio.	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Base de datos de contenido de Polifenoles Totales en Frutos	11
Tabla 2-1 Preparación de curva de calibración	32
Tabla 2-2 Preparación de curva de calibración de Trolox	33
Tabla 3-1 Resultados de color de Arrayán fresco	44
Tabla 3-2 Resultados de color de muestras secas.	44
Tabla 3-3 Resultados de las propiedades funcionales de extractos de arrayán.	45
Tabla 3-4 Resultados Humedad	47
Tabla 3-5 Resultados de Actividad de agua	48
Tabla 3-6 Resultados de tamaño y forma de las esferas.	48
Tabla 3-7 Resultados de propiedades funcionales de las micro-capsulas.....	49
Tabla 3-8 Resultados de la eficiencia de encapsulación por solvente	50

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 3-1 Compuestos fenólicos totales de extractos de arrayán.....	46
Gráfico 3-2 Actividad antioxidante de extractos de arrayán	46
Gráfico 3-3 Polifenoles totales de las micro-capsulas de arrayán.....	49
Gráfico 3-4 Actividad antioxidante de las micro-capsulas de arrayán.....	50
Gráfico 3-5 Eficiencia de Polifenoles totales en micro-capsulas de arrayán	51
Gráfico 3-6 Eficiencia de Actividad antioxidante en micro-capsulas de arrayán.	51

SIGLAS Y SIMBOLOGÍAS

SIGLA

UV	: Radiación ultravioleta
%	: Porcentaje
±	: Mas/Menos
PS	: Peso seco
PF	: Peso fresco
HPLC-DAD	: Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de diodos
V/V	: Volumen/Volumen
P/V	: Peso/Volumen
ORAC	: Oxygen radical antioxidant capacity
CFT	: Compuestos fenólicos totales
PBS	: Phosphate buffered saline
m.s.n.m.	: Metros sobre el nivel del mar

SIMBOLIGÍA

α	: Alfa
β	: Beta
δ	: Delta
mg/mL	: Miligramos/mililitro
$\mu\text{mol ET}/100\text{g}$: Micro mol de equivalente trolox/100 gramos
$^{\circ}\text{C}$: Grados Celsius
cm	: Centímetro
μm	: Micrómetro
mg EAG/100g	: Miligramos de equivalente de ácido gálico/ 100 gramos
g	: Gramos
EC ₅₀	: Concentración efectiva 50
g/mL	: Gramos/mililitro
$^{\circ}$: Grados
mL	: Mililitro
nm	: Nanómetro
mm	: Milímetro
μL	: Microlitro

L : Litro
 μM : Micromolar
mM : Milimolar
h : Hora

INTRODUCCIÓN

Las plantas, árboles y frutos presentes en el bosque chileno tienen alrededor de 5.000 especies vasculares de las cuales gran parte son originarias del país, entre ellas se encuentra el maqui, la murta, el arándano, entre otros. Estos frutos se han estudiado en la industria nutricosmética para explotar sus beneficios, como por ejemplo las vitaminas, la capacidad antimicrobiana y la actividad antioxidante. La gran problemática respecto al uso de dichos frutos es la existencia de factores en los procesos de tratamiento del fruto que afectan la optimización de extracción de los compuestos deseados, como por ejemplo la luz, humedad y temperatura.

Dentro del abanico de especies originarias de Chile, una de las plantas fuera de riesgo de extinción, y de gran interés científico, es la especie *Luma apiculata* o Arrayán. El Arrayán se encuentra ubicada en la zona centro sur del país, dentro de sus características se destaca el importante contenido de polifenoles totales presentes en el fruto, de los cuales se han detectado 12 compuestos fenólicos en extractos hidroalcohólicos.

En esta memoria se busca evaluar el efecto del proceso de la capacidad antioxidante, contenido de polifenoles y la posterior caracterización de micro-cápsulas que contienen los extractos de arrayán. Para esto se comparan 2 técnicas de secado, con las cuales se quiere identificar qué proceso micro-encapsula la mayor cantidad de propiedades del fruto. A partir de los frutos secos, se realizan extractos metanólico en base a una extracción con Metanol al 100% para ambos secados.

La caracterización de los extractos se realiza mediante la determinación de la capacidad antioxidante y su contenido de polifenoles totales, la primera técnica se realiza por fluorimetría y comprende la medición del aporte tanto de polifenoles como de aquellos que son de naturaleza no-polifenólicas, mientras que la última mencionada es una técnica fotométrica simple y práctica para la caracterización de un alimento.

La micro-encapsulación por gelificación iónica externa es un método en el cual, a través de una saturación de iones de Calcio, interaccionan los iones de sodio del alginato para formar las micro-cápsulas. Estas micro-cápsulas contienen extracto de arrayán, así se logra caracterizar y comparar la efectividad de la micro-encapsulación en dos solventes diferentes.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar las características antioxidantes y físicas de micro-cápsulas de arrayán obtenidas con distintos procesos de secado y extracción.

Objetivos específicos:

- Comparar el impacto de la deshidratación por liofilización y horno convector sobre el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante.
- Evaluar el efecto de dos tipos de solventes sobre el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y características físicas de micro-cápsulas de extractos de arrayán.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. ARRAYÁN

Muchas especies nativas forman parte de la dieta en la región de América del Sur y se utiliza en la medicina indígena [1]. Por ejemplo, el árbol chileno "arrayán" [*Luma apiculata* (DC.) Burret] también conocido como arrayán rojo, arrayán chileno, palo colorado, quitri, temu, rama, kollimamüll o kütri, es un árbol que pertenece a la familia *Myrtaceae*. Esta es una especie nativa que crece en los bosques templados de Chile y Argentina. En Chile se desarrolla en las regiones de Coquimbo, Valparaíso, Metropolitana de Santiago, O'Higgins, Maule, Biobío, Araucanía, Los Ríos, Los Lagos y Aysén. Es una especie de un gran valor ornamental por el bello color de su tronco, llamativas flores blancas, largo período de floración y frutos negros. El fruto es comestible, de agradable sabor dulce. En Chile se distribuye desde la costa de la Provincia de Valparaíso hasta las provincias de Aysén hacia el sur (V a XI región). Normalmente crece a orillas de lagos, ríos y otros cursos de agua, desde la costa hasta los 1.000 m.s.n.m.

El fruto es una baya negro-violácea, sub-globosa de hasta 1[cm] de diámetro, con 3-6 semillas verdes de 3-6 [mm] de largo, lisas y brillantes [2] El fruto es comestible, de agradable sabor dulce, y del cual se prepara un tónico fortificante y una chicha. Las hojas se emplean para saborear el mate.

Según Simirgiotis *et al.*, (2013) [3], la especie *Luma Apiculata*, Arrayán, tiene una riqueza importante en contenido de Polifenoles Totales, de los cuales se detectaron 12 compuestos fenólicos en extractos hidroalcohólicos de frutos: 2 fueron identificados como Taninos, 5 Antocianidinas y 5 Flavonoles. Además, revela la alta capacidad antioxidante en frutos de Arrayán por el ensayo de DPPH* con resultados de EC₅₀ de 10,41 ± 0,02 [µg/ml] y de contenido de Polifenoles Totales de 29,44 ± 0,10 [mg GAE/g fruto]. [4]

El estudio de extractos con Metanol 100% muestran que hojas y frutos de arrayán poseen un alto contenido de polifenoles [5], destacando que los extractos de frutas de arrayán presentan mayores valores en contenido de polifenoles que los frutos de arándano. extractos metanólicos de arrayán poseen una alta capacidad antioxidante determinada por ORAC de (62,500 ± 7000 µmol/g PS); lográndose detectar la presencia del flavonol peonidin-3-galactosido y las antocianinas, peonidin-3-arabinosido, malvidin-3-arabinosido y petunidin 3-arabinosido, mediante análisis de HPLC-DAD [2]

En arrayán, los compuestos de polifenoles identificados corresponden principalmente a flavonoles como la quercetina 3-rutinosida y sus derivadas, los taninos y sus monómeros, y un número menor de antocianinas [5]

Pese al alto contenido de flavonoides en la familia Myrtaceae [5], antocianinas como peonidin-3-galactoside, petunidin-3-arabinoside, malvidin-3-arabinoside y peonidin-3-arabinoside han sido descritas en los extractos de Metanol-HCl y Metanol de la fruta arrayán [5]. Los tres primeros han sido descritos en arándanos [5] y delphinidin-3-, malvidin-3- y peonidin-3-arabinósido; La peonidina-3 y la malvidina-3-glucósido se describieron en las bayas de murta y calafato [5]. Otras antocianinas como delphinidin-3-arabinósido, cianidin-3-glucósido, peonidin-3-glucósido, malvidina-3-glucósido y petunidin-3-arabinosido se observaron en un extracto de Metanol-HCl en diferentes variedades [5].

En la figura 1-1 se observa la flor y el fruto de Arrayán



Fuente: <http://www.arbolnativo.cl/arbol.php?idarbol=71>

Figura 1-1 Flor (A) y el fruto (B) de arrayán

1.1.1. PROPIEDADES FUNCIONALES

La investigación de las propiedades antioxidantes de las plantas medicinales y alimenticias lleva décadas marcando un crecimiento sostenido, por su elevado consumo a través de la dieta y la presencia ubicua en muchas especies vegetales. El potencial de los polifenoles como agentes antioxidantes ha sido el más estudiado y ha centrado el interés en estas especies. El estado actual del conocimiento nos muestra que, además de sus beneficios como agentes profilácticos/terapéuticos, para dichos compuestos debemos visualizar aplicaciones en el campo de las formulaciones nutraceuticas e ingredientes

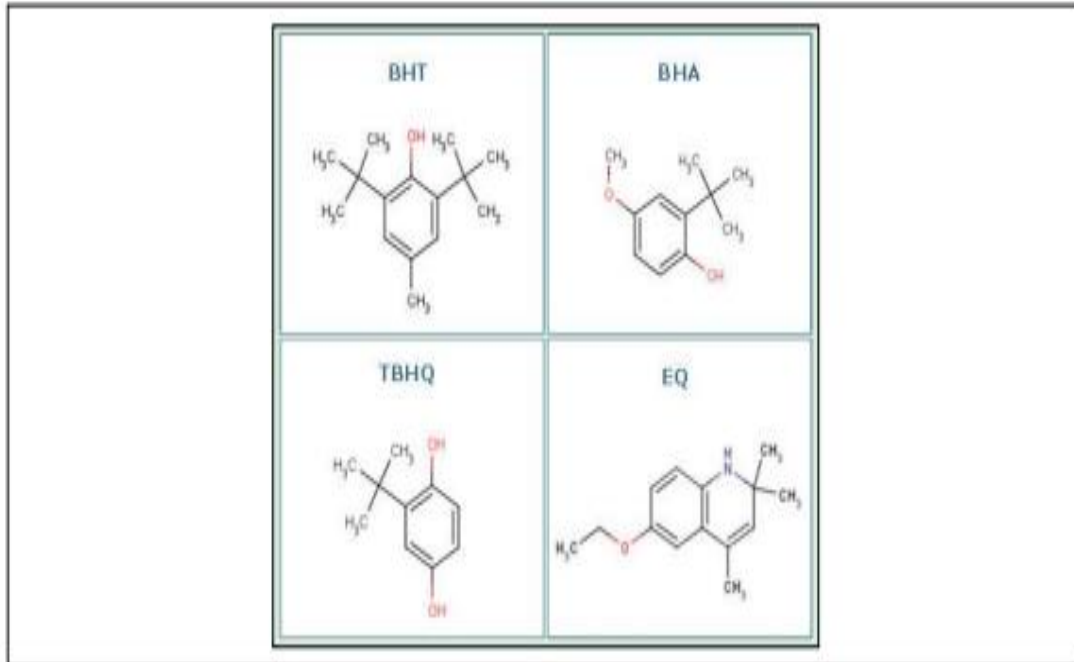
funcionales. En tales productos, a la capacidad antioxidante se sumarían otras propiedades como las antimicrobianas [6].

1.1.1.1. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias químicas que impiden o retrasan la oxidación de diversas sustancias, principalmente de los ácidos grasos; cuyas reacciones se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano [7]. La oxidación es una reacción química donde un elemento se “oxida” por la presencia del oxígeno; entrega electrones e hidrógenos a un elemento reductor [8]. Estas reacciones de oxidación son promovidas en cadena por los llamados radicales libres. Los radicales libres son cualquier especie (moléculas, iones) que contienen un electrón desapareado en su último orbital de energía y que puede subsistir de forma independiente siendo hábiles para reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Los antioxidantes también inhiben algunas reacciones de oxidación al oxidarse los mismos, por lo que se pueden definir como agentes reductores. Los antioxidantes se dividen en dos categorías: sintéticos y naturales. En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquímica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides, así como el ácido ascórbico. Los tipos de antioxidantes antes mencionados se pueden encontrar tanto en alimentos procesados como alimentos naturales (berries, cacao, granos, aceite de oliva, te, orégano y tomillo). En el organismo se encuentran antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Ejemplos de antioxidantes enzimáticos existen la glutanina, super oxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y no enzimáticos están el ácido úrico, glutatión, ubiquinol, melatonina, ácido dihidrolipóico que actúan como retardadores de oxidaciones o reparadores de células dañadas.

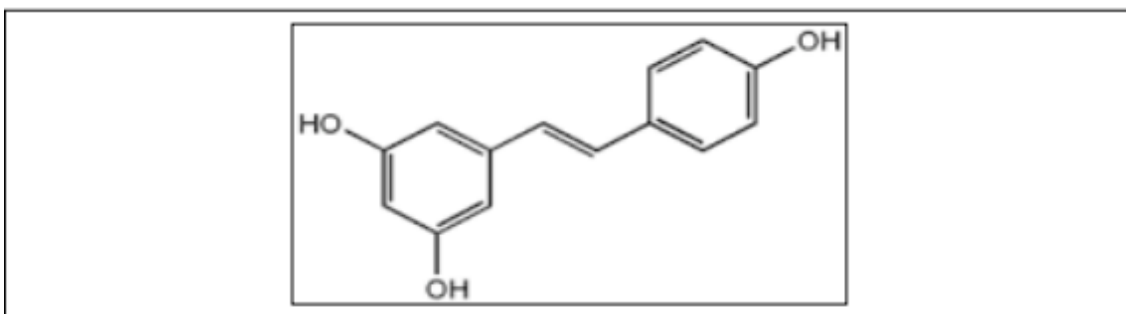
La Figura 1-2., muestra algunos ejemplos de estructuras de diferentes antioxidantes sintéticos.



Fuente: Determinación de Polifenoles Totales, Actividad Antioxidante y Antocianinas de Jugo de Murtilla (*Ugni molinae* Turcz) Obtenido por Condensación de Vapor (2015).

Figura 1-2. Estructura de antioxidantes sintéticos.

Los ejemplos mostrados la mayoría se usa en la industria de los alimentos como preservantes. La Figura 1-3, muestra la estructura de un antioxidante natural.



Fuente: Determinación de Polifenoles Totales, Actividad Antioxidante y Antocianinas de Jugo de Murtilla (*Ugni molinae* Turcz) Obtenido por Condensación de Vapor (2015)

Figura 1-3. Estructura del polifenol antioxidante resveratrol.

Hay dos conceptos de antioxidantes que se deben considerar, por un lado, la presencia natural de antioxidantes en alimentos cumple la función de prevenir y/o retardar el daño oxidativo que afecta a los lípidos, y en menor grado a las proteínas, presentes en éstos; y por otra parte, los compuestos originalmente presentes en los alimentos, que

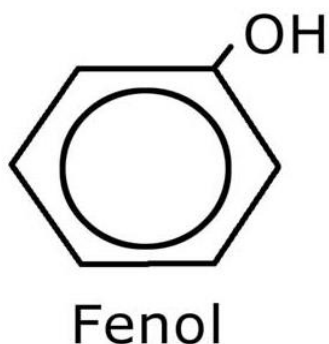
como consecuencia de sus propiedades antioxidantes, tienen efectos beneficiosos para la salud [9].

En la categoría de los antioxidantes esenciales de origen natural se incluyen, el ácido ascórbico (vitamina C, hidrosoluble), los tocoferoles y tocotrienoles (cada uno bajo la forma de isómeros α , β , γ , δ , todos liposolubles) y los carotenoides, entre otros. Aunque entre los tocoferoles α -tocoferol (vitamina E) es el más abundante, y su capacidad antioxidante en aceites comestibles es generalmente menos a la exhibida por el resto de los isómeros [10].

Junto a los antioxidantes esenciales en los alimentos, se encuentran otros componentes bioactivos que aportan de manera significativa propiedades antioxidantes, como son los compuestos fenólicos o polifenoles que provienen del metabolismo secundario de las plantas. Químicamente, son compuestos que tienen al menos un anillo aromático al que están unidos uno o más grupos hidroxilo.

1.1.1.2. Compuestos fenólicos

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional hidroxilo. Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides. Muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro. Los compuestos fenólicos de las plantas son biosintetizados en diferentes rutas, existen dos básicas implicadas: la ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de fenoles en las plantas, y la vía del ácido malónico que, aunque es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, es poco empleada en plantas superiores. Entre los principales compuestos fenólicos naturales se encuentran los taninos y los flavonoides. Los taninos son sustancias complejas que no es posible clasificar dentro de una estructura química única.



Fuente: Compuestos fenólicos como antioxidantes naturales (2015)

Figura 1-4. Fenol

Son sustancias polifenólicas hidrosolubles no nitrogenadas, de origen vegetal, de peso molecular entre 500 y 3.000, que además de dar las reacciones clásicas de los fenoles, precipitan gelatina, sales de alcaloides y metales pesados. Los hay hidrolizables y condensados. El tanino se encuentra principalmente en las raíces, la corteza, y de vez en cuando en las hojas de la planta. Se encuentran especialmente en las familias de las ericáceas, leguminosas, rosáceas y salicáceas.

Los flavonoides son los pigmentos amarillos derivados de la fenil-benzo γ pirona o fenil cromona. Son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Existen seis clases principales, las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavanoles, las antocianidinas, y los taninos condensados, y otras dos más, las xantonas y las auronas. Para los vegetales, estos compuestos son importantes pues, además de ser responsables de las coloraciones de muchas flores, frutos y hojas y por ello intervienen en la polinización atrayendo a los insectos, participan en la vida del vegetal ejerciendo importantes funciones como por ejemplo protegerle de los efectos nocivos de la radiación UV y ejercer una eficaz actividad antioxidante. Dentro de este grupo de flavonoides es necesario mencionar especialmente el grupo de los antocianósidos, pigmentos rojos y azules de las flores, que tienen características especiales, muy solubles en agua. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación de hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante.

1.1.1.3. Flora nativa como fuente de antioxidante

Se ha reportado que los valores de ORAC ($\mu\text{mol Trolox/ 100 g PS}$) de los frutos de maqui (37,174), calafate (72,425), murta (43,574) y arrayán (62,500) son más altos que las bayas comerciales como las frambuesas, los arándanos (*Vaccinium corymbosum* 'Bluegold') (27,412), y moras cultivadas en Chile [11].

Según el Instituto de Nutrición y Tecnología (INTA), en una publicación de antioxidantes naturales financiado por CORFO-Chile, los nativos chilenos como la Murtilla y el Maqui, tienen alto contenido de Polifenoles totales en comparación con los valores del fruto comercial Arándano Bluegold, los cuales son:

Tabla 1-1. Base de datos de contenido de Polifenoles Totales en Frutos

Fruto	[mg EAG/100g fruto_n]
Murtilla	863
Maqui	1664
Arándano Bluegold	497

Fuente: www.portalantioxidante.com

Dichos resultados apuntan a una gran capacidad antioxidante, debido a la alta presencia de compuestos polifenólicos en estos frutos nativos chilenos, superando a los frutos de arándano. Otros informes mostraron valores similares de contenido de polifenoles totales para calafate (33.90 [mg]GAE/[g]PS), maqui (31,16 [mg]GAE/[g]PS) y murta (34,92 [mg]GAE/[g]PS) [11], mientras que otros informes indicaron diferencias significativas entre las bayas patagónicas, con valores más altos para calafate (65 [mg]GAE/[g]PS), seguidos de arrayán (27 [mg]GAE/[g]PS), y menores valores para murta (9 [mg]GAE/[g]PS) [12]. Diferentes estudios sugieren que el mayor contenido total de antocianinas (TAC) se puede encontrar en las bayas de calafate y maqui principalmente, seguidas de las frutas de las especies de la familia *Myrtaceae* -arrayán y murta-[12]. Se informa que las concentraciones totales de antocianinas resultan mayores en el extracto de fruta de calafate (14 y 26 $[\mu\text{mol}]/[\text{g}]PF$) [12] y (22.91–35.99 $[\mu\text{mol}]/[\text{g}]PF$) [13], seguido de bayas de maqui (entre 16 y 20 $[\mu\text{mol}]/[\text{g}]PF$), mientras que murta (0,2 $[\mu\text{mol}]/[\text{g}]PF$) mostró un valor

similar al arándano (2,0 [μmol]/[g]PF) [12]. Brito et al. (2014) informan resultados similares con mayor contenido de antocianina (como [mg] de cianidina 3-O-glucósido/[g]PS) en frutas de calafate (51,6) seguidas de arrayán (15,2) y murta (6,85). [13]

1.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES

1.2.1. Compuestos fenólicos totales

La espectrofotometría es uno de los métodos de análisis más usados, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. Cuando se hace incidir luz monocromática (de una sola longitud de onda) sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida, como consecuencia de la intensidad del rayo de luz sea atenuada desde P_0 a P , siendo P_0 la intensidad de la luz incidente y P la intensidad del rayo de luz transmitido. Dependiendo del compuesto y el tipo de absorción a medir, la muestra puede estar en fase líquida, sólida o gaseosa. En las regiones visibles y ultravioleta del espectro electromagnético, la muestra es generalmente disuelta para formar una solución. Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida, Absorbancia, por la sustancia en cada longitud de onda del espectro electromagnético, es decir, a una determinada longitud de onda de la energía radiante, cada sustancia absorbe una cantidad de radiación que es distinta a la que absorbe otro compuesto [14]

El reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos que permite determinar la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del reactivo, estando el color de la medición a 765 nm determinado por el cambio de pH dado por la adición del Na_2CO_3 . Se ha descrito que la formulación de Folin-Ciocalteu evita el problema de precipitación, dando mayor color, menos variación y mejor recuperación de CFT, siendo considerado hasta ahora como el método oficial para determinar estas moléculas [15]

1.2.2. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se mide por la técnica fluorimétrica conocida como ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity), la cual detecta todos los antioxidantes presentes en una muestra para neutralizar radicales peroxilo por transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT), según reacción:



El ensayo ORAC comprende la medición del aporte tanto de polifenoles como de aquellos que son de naturaleza no-polifenólica en la actividad antioxidante en el extracto analizado. El valor del ORAC se expresa como [μmol] de Trolox Equivalentes (T.E.) /100 [g] muestra. El Trolox es un análogo hidrosoluble de la vitamina E, usualmente empleado como estándar en los ensayos de actividad antioxidante [11].

En la determinación ORAC basada en la emisión de fluorescencia, los radicales libres se producen por efecto de la descomposición térmica de un iniciador azo-radical soluble en agua, 2,2-diclorhidrato de azobis (2-amidinopropano) (AAPH) [16]. El antioxidante agregado a este sistema protege la sonda de fluorescencia de los radicales libres derivados de AAP, y se cuantifica el grado de protección. El curso temporal de la pérdida de fluorescencia durante la liberación de los radicales libres se registra y se convierte en valores ORAC con el análisis asistido por ordenador [17].

1.3. PRESERVACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

1.3.1. Proceso de deshidratación

Los métodos de secado son los más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Aunque estos métodos dan buenos resultados que pueden interpretarse sobre bases de comparación, es preciso tener presente que a) algunas veces es difícil eliminar por secado toda la humedad presente; b) a cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua, y c) también pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua. [18]

1.3.1.1 Liofilización

Para la preservación de nutrientes y compuestos bioactivos se han desarrollado distintas alternativas de secado que incluyen secado horno convector, secador spray y liofilización [19].

La liofilización o secado por congelación es un proceso en el que el agua se congela, seguida de su eliminación de la muestra, inicialmente por sublimación (secado primario) y luego por desorción (secado secundario). El secado por congelación es un proceso de secado en el que el agua se sublima del producto una vez que se congela [19]. Es un proceso de secado aplicable a la fabricación de ciertos productos farmacéuticos y biológicos que son termolábiles o inestables en soluciones acuosas durante períodos prolongados de almacenamiento, pero que son estables en estado seco. El término "liofilización" describe un proceso para producir un producto que "ama el estado seco" [20].

La liofilización o el secado por congelación es un proceso en el que el agua se elimina de un producto después de congelarse y colocarse al vacío, lo que permite que el hielo cambie directamente de sólido a vapor sin pasar a través de una fase líquida [21]. La liofilización se realiza en condiciones de temperatura y presión por debajo del punto triple, para permitir la sublimación del hielo. Todo el proceso se realiza a baja temperatura y presión, por lo que es adecuado para el secado de compuestos termolábiles. Los pasos involucrados en la liofilización comienzan a partir de la preparación de la muestra, seguido de la congelación, el secado primario y el secado secundario, para obtener el producto final seco con el contenido de humedad deseado [22]. El gradiente de concentración de vapor de agua entre el frente de secado y el condensador es la fuerza impulsora para la eliminación de agua durante la liofilización. La presión de vapor del agua aumenta con un aumento de la temperatura durante el secado primario. Por lo tanto, la temperatura de secado primario debe mantenerse lo más alta posible, pero por debajo de la temperatura crítica del proceso, para evitar la pérdida de la estructura de la torta. Esta temperatura crítica del proceso es la temperatura de colapso de la sustancia amorfa, o fusión eutéctica de la sustancia cristalina. Durante la congelación, los cristales de hielo comienzan a separarse hasta que la solución se concentra al máximo. Tras un enfriamiento adicional, tiene lugar la separación de fases del soluto y el hielo [23].

Los pasos fundamentales del proceso.

1. Congelación: El producto está congelado. Esto proporciona una condición necesaria para el secado a baja temperatura.
2. Vacío: Después de congelar, el producto se coloca al vacío. Esto permite que el solvente congelado en el producto se vaporice sin pasar a través de la fase líquida, un proceso conocido como sublimación.
3. Calor: el calor se aplica al producto congelado para acelerar la sublimación.

4. Condensación: las placas del condensador a baja temperatura eliminan el solvente vaporizado de la cámara de vacío convirtiéndolo nuevamente en un sólido. Esto completa el proceso de separación [24]. El producto resultante tiene un área de superficie muy grande que promueve la rápida disolución del producto seco [25].

1.3.1.2. Secado al horno

La determinación de secado en estufa o al horno se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles. El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa y balanza analítica, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra [26].

Notas sobre las determinaciones de humedad en horno.

- Los productos con un elevado contenido en azúcares y las carnes con un contenido alto de grasa deben deshidratarse en estufa de vacío a temperaturas que no excedan de 70°C.
- Los métodos de deshidratación en estufa son inadecuados para productos, como las especias, ricas en sustancias volátiles distintas del agua.
- La eliminación del agua de una muestra requiere que la presión parcial de agua en la fase de vapor sea inferior a la que alcanza en la muestra; de ahí que sea necesario cierto movimiento del aire; en una estufa de aire se logra abriendo parcialmente la ventilación y en las estufas de vacío dando entrada a una lenta corriente de aire seco.
- La temperatura no es igual en los distintos puntos de la estufa, de ahí la conveniencia de colocar el bulbo del termómetro en las proximidades de la muestra. Las variaciones pueden alcanzar hasta más de tres grados en los tipos antiguos, en los que el aire se mueve por convección. Las estufas más modernas de este tipo están equipadas con eficaces sistemas, que la temperatura no varía un grado en las distintas zonas.
- Muchos productos son, tras su deshidratación, bastante higroscópicos; es preciso por ello colocar la tapa de manera que ajuste tanto como sea posible inmediatamente después de abrir la estufa y es necesario también pesar la cápsula tan pronto como alcance la temperatura ambiente; para esto puede precisarse hasta una hora si se utiliza un desecador de vidrio.

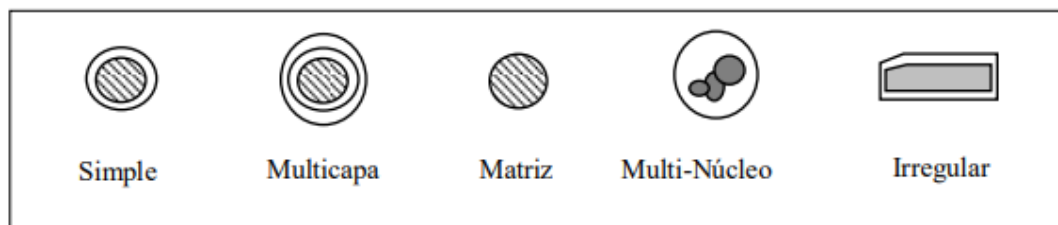
- La reacción de pardeamiento que se produce por interacción entre los aminoácidos y los azúcares reductores libera agua durante la deshidratación y se acelera a temperaturas elevadas. Los alimentos ricos en proteínas y azúcares reductores deben, por ello, desecarse con precaución, de preferencia en una estufa de vacío a 60°C. [27]

1.4. MICRO-ENCAPSULACIÓN

1.4.1. Fundamento

El concepto de encapsulación se ha fundamentado en la incorporación de una matriz polimérica, la cual forma un ambiente capaz de controlar su interacción con el exterior. La técnica de micro-encapsulación ha sido descrita como un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo integrado a las cápsulas con variadas aplicaciones [28]. Una definición general de encapsulación dada por Desai y Park (2005) [29] se refirió al empaquetado de materiales sólidos, líquidos o gaseosos mediante cápsulas que liberan su contenido de forma controlada bajo condiciones determinadas. Estas especificaciones han llevado a describir la micro-encapsulación como, la técnica de obtención de una barrera que retarda las reacciones químicas con el medio que lo rodea promoviendo un aumento en la vida útil del producto, la liberación gradual del compuesto encapsulado e incluso facilitando su manipulación al convertir un material líquido o gaseoso a una forma sólida llamada micro cápsula) [30]. Una micro-cápsula consiste en una membrana esférica, semipermeable, delgada y fuerte que rodea un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que varía de pocos micrones a 1000 μm . El núcleo que compone la micro-cápsulas es también denominado fase interna o principio activo, así como a la membrana se puede nombrar capa externa o matriz. En este sentido, las micro-partículas, micro-cápsulas o micro-esferas son definidas como el producto del proceso de micro-encapsulación dependiendo de cuál sea su morfología y estructura interna [31]. Las micro-cápsulas se han diferenciado de las micro-esferas principalmente por la distribución del principio activo. En el primer caso, el núcleo puede ser de naturaleza líquida o sólida incluido en una especie de reservorio recubierto por una película del material. Mientras que, en las micro-esferas, el principio activo se encuentra altamente disperso en forma de partículas o moléculas en una matriz. La obtención de un tipo de estructura u otra depende de las propiedades físico-químicas del principio activo y de la matriz, así como de la técnica empleada para su preparación [32]. Las micro-cápsulas

pueden tener forma esférica o irregular. Asimismo, pueden estar constituidas por una membrana simple, múltiples capas e incluso núcleos múltiples cuya matriz puede ser del mismo material o una combinación de varios tal como se muestra en la Figura 1-5. [33]. Los hidrocoloides han sido empleados como matriz debido a su capacidad para absorber agua, fácil manipulación e inocuidad. El alginato es un hidrocoloide que posee tanto estas características como propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes, razones por las cuales ha sido de gran interés para la industria alimentaria. El alginato es descrito como un polisacárido lineal poliiónico e hidrofílico proveniente de algas marinas conformado por dos monómeros en su estructura, el ácido α -L-gulurónico (G) y el ácido β -D-manurónico (M) que se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-), M-bloques (-MMM-) o heteropolímeros donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-).

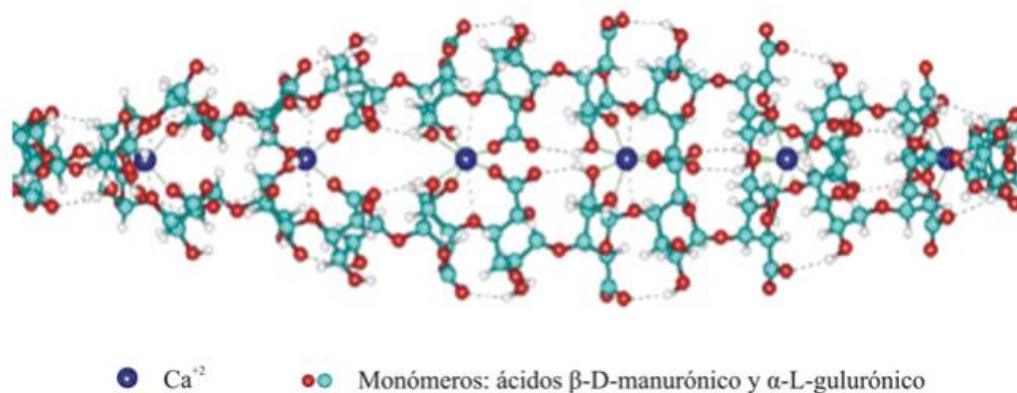


Fuente: Encapsulation in the food industry: a review. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 50(3):213-224 1999

Figura 1-5. Tipos de microcápsulas.

Tanto la distribución de sus monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxílicos confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido en G. Si en su estructura polimérica se tiene mayor cantidad de G-bloques, generalmente el gel es fuerte y frágil, mientras que con la presencia de mayor proporción de M-bloques el gel formado se presenta suave y elástico. El proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes (excepto el magnesio) donde el ion Calcio es el más empleado por la industria alimentaria. La gelificación tiene lugar al producirse una zona de unión entre un G-bloque de una molécula de alginato que se enlaza físicamente a otro bloque contenido en otra molécula de alginato a través del ion Calcio. La visualización de la estructura física es denominada modelo “caja de huevos” por Draget (2000)[34], mostrada en la Figura. 1-6. [35]. Entre las sales de alginato más empleadas se han encontrado la sal de sodio debido a su alta solubilidad en agua fría y característica transición sol-gel de forma instantánea e irreversible ante el ion Calcio [36].

También, se han desarrollado alginatos modificados químicamente tales como el alginato de propilenglicol empleado en la fabricación de cervezas y aderezos para ensaladas por su alta solubilidad a bajos pH. Así como otras dos nuevas familias, los derivados de la sal de amonio cuaternaria del ácido algínico y los obtenidos de injertos con acrilato caracterizados por la obtención de geles fuertes y altamente deformables [37-38].



Fuente: Effect of different co-polymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid.

International Journal of PharmTech Research. 2(4):2198-2203 2010

Figura 1-6. Modelo "Caja de huevos".

En contraste con la mayoría de los polisacáridos, el alginato forma geles prácticamente independientes de la temperatura, aspecto que lo ha hecho atractivo en la elaboración de cremas, quesos, salsas, y aderezos. Sin embargo, la exposición prolongada a tratamientos de calor y variaciones extremas de pH degrada al polímero, presentado como consecuencia pérdidas en las propiedades del gel [39-40]. Adicionalmente, la condición de polielectrolito le ha conferido la capacidad de interactuar con otras moléculas permitiendo formar sistemas mixtos que muestran mejoras en las propiedades estructurales del gel de alginato. Por tanto, al seleccionar una matriz polimérica para la micro-encapsulación deben considerarse sus propiedades físico-químicas, solubilidad, transición sol-gel (cinética) y permeabilidad [41]. La micro-encapsulación aplicada en alimentos con el objetivo de preparar productos funcionales, debe tener en cuenta que la incorporación de micro-cápsulas, micro-partículas o micro-esferas no puede interferir con la textura ni sabor original del alimento [42]. En este sentido, se han descrito diferentes aplicaciones de micro-encapsulación empleando como principio activo: vitaminas, minerales, ácidos grasos, microorganismos probióticos, proteínas, aminoácidos, polifenoles, fibras y enzimas [43]. Su versatilidad incluso ha llegado a ser aplicada en la alta cocina con el término "Esferificación", técnica culinaria con el propósito de modificar

las propiedades texturales de los alimentos para así desarrollar nuevas sensaciones en el comensal [44].

1.4.2 Mecanismos de gelificación

El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de Calcio externa o interna desde donde el ion Calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica, como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel. El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ion Calcio y el contenido de los G-bloques [36]. La transición sol-gel se ha visto esencialmente controlada por la habilidad de introducir el ion vinculante al alginato. También se ha observado que la cinética de gelificación y las propiedades del gel pueden depender del tipo de contra-ion, es decir, el ion monovalente de la sal de alginato (K o Na). Los mecanismos de gelificación iónica se han llevado a cabo fundamentalmente por dos procesos: la gelificación externa y la gelificación interna.

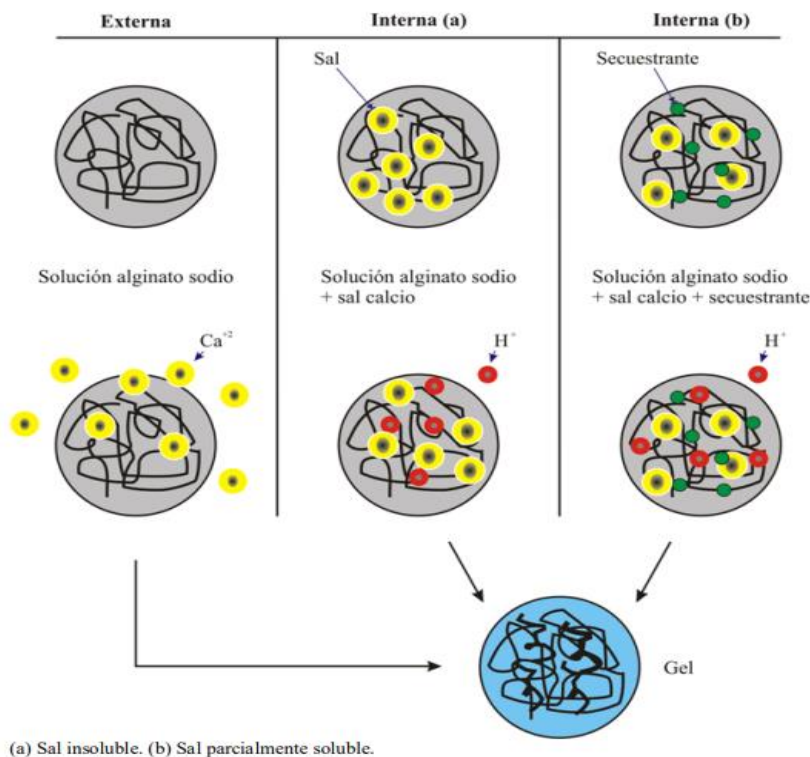
1.4.2.1. Gelificación externa

El proceso de gelificación externa ocurre con la difusión del ion Calcio desde una fuente que rodea al hidrocoloide hacia la solución de alginato de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interface y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones Calcio, de manera que el ion sodio proveniente de la sal de alginato es desplazado por el catión divalente solubilizado en agua. Este interacciona con los G-bloques de diferentes moléculas poliméricas, enlazándolas entre sí. Aunque, la fuente de Calcio más usada ha sido el CaCl_2 (cloruro de Calcio) debido a su mayor porcentaje de Calcio disponible, existen otras sales empleadas con menor frecuencia tales como el acetato monohidratado y el lactato de Calcio [38].

1.4.2.2 Gelificación interna

El proceso de gelificación interna consiste en la liberación controlada del ion Calcio desde una fuente interna de sal de Calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa en la solución de alginato de sodio. Donde la liberación del ion Calcio puede ocurrir de dos formas, si se tiene una sal de Calcio insoluble a pH neutro pero soluble a pH ácido, por lo que es necesario adicionar un ácido orgánico que al difundirse hasta la sal permita la acidificación del medio consiguiendo solubilizar los iones Calcio. En este caso, las sales de Calcio más

empleadas son el Carbonato de Calcio y el Fosfato Tricálcico, y en casos específicos el Fosfato Dicálcico y el Citrato Tricálcico. Para la acidificación del medio se cuenta con ácidos orgánicos como el Acético, Adípico y el Glucono delta-lactona. Si la sal de Calcio es parcialmente soluble, el proceso de gelificación interna consiste en la adición a la mezcla alginato-sal de Calcio, un agente secuestrante como el Fosfato, Sulfato o Citrato de Sodio. Al adicionar un secuestrante este se enlaza con el Calcio libre retardando así el proceso de gelificación, el Sulfato de Sodio ha sido comúnmente el más empleado debido a su bajo costo y conveniente solubilidad. Los mecanismos de gelificación iónica son descritos en la Figura. 1-7.[38]. La principal diferencia entre el mecanismo de gelificación externa e interna es la cinética del proceso. Si lo que se pretende es el control de la transición sol-gel, en el proceso de gelificación externa los factores a manipular son la concentración de Calcio y composición del polímero. Mientras que, para el proceso de gelificación interna se deben considerar la solubilidad y concentración de la sal de Calcio, concentración del agente secuestrante y del ácido orgánico empleado [34].



Fuente Alginates. In Food stabilizers, thickeners and gelling agents. (pp. 50-72). United Kingdom: WileyBlackwell. 2010

Figura 1-7. Mecanismos de gelificación iónica.

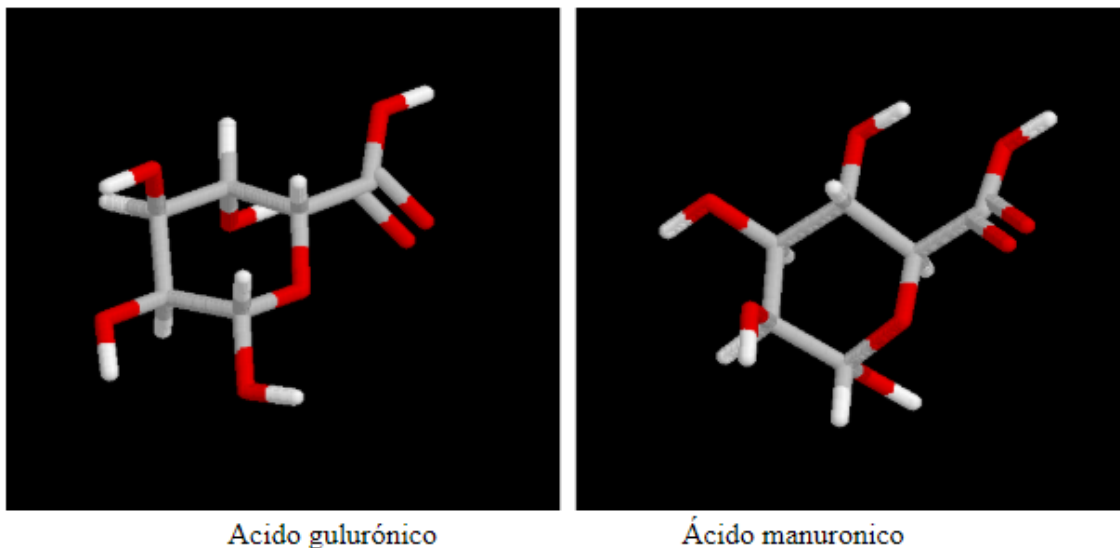
1.4.3 Técnicas de micro-encapsulación

La micro-encapsulación de pequeñas moléculas como enzimas hasta células y microorganismos puede realizarse por diferentes técnicas. La selección de la técnica de encapsulación adecuada se ve determinada por las propiedades físico-químicas del material soporte y la aplicación final deseada con el objeto de asegurar la biodisponibilidad de los compuestos, su funcionalidad e incluso su fácil incorporación en los alimentos sin la alteración de sus propiedades sensoriales [45]. Al emplear el alginato como matriz polimérica, las técnicas de micro-encapsulación en aplicaciones alimentarias se reducen a: extrusión, emulsión y secado por atomización.

1.4.4 Reactivos involucrados en la micro-encapsulación

1.4.4.1. Alginato

El alginato está formado por dos tipos de monosacáridos, los dos con un grupo ácido, el ácido Gulurónico y el ácido Manurónico. Sorprendentemente, hasta 1955 no se descubre la presencia del ácido Gulurónico en el alginato. Anteriormente se consideraba que estaba compuesto exclusivamente por ácido manurónico.



Fuente: BIOQUIMICA DE LOS ALIMENTOS. [En línea]

<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucres/alginato.html>

Figura 1-8. Tipos de monosacáridos.

Las algas sintetizan el alginato inicialmente como un polímero de ácido Manurónico, que posteriormente modifican transformando unidades de Manurónico en Gulurónico mediante una epimerización enzimática. El producto final contiene zonas formadas por

Gulurónico, zonas formadas por Manurónico y zonas con Gulurónico y Manurónico alternados. Las zonas de ácido Manurónico son casi planas, con una estructura semejante a una cinta, mientras que las de ácido Gulurónico presentan una estructura con entrantes y salientes.

El alginato, en forma de sal sódica, potásica o magnésica, es soluble en soluciones acuosas a pH por encima de 3,5. También es soluble en mezclas de agua y solventes orgánicos miscibles con ella, como el alcohol, pero es insoluble en leche, por la presencia de Calcio. La viscosidad de las soluciones de alginato depende de la concentración, elevándose mucho a partir del 2%, y de la temperatura, disminuyendo al aumentar ésta. Las soluciones de alginato tienen un comportamiento no newtoniano, con una viscosidad que disminuye mucho al aumentar la velocidad del movimiento. En ausencia de Calcio, el alginato se pliega formando cada uno de los bloques constituyentes hélices mantenidas por puentes de Hidrógeno.

En presencia de Calcio, el alginato puede formar una estructura conocida como "caja de huevos". En esta estructura, los iones de Calcio se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido gulurónico.

1.4.4.2. Metanol

El alcohol Metílico o Metanol, cuya fórmula molecular es CH₃OH, al estado puro es un líquido incoloro de olor agradable, volátil, soluble en agua, alcohol y éter. Posee un punto de ebullición de 65° C, un punto de fusión de -97° C y una densidad de 0,79g/mL a 20° C. [46]

La presencia del Metanol en las bebidas alcohólicas es de gran importancia dada su toxicidad, éste se metaboliza en el organismo como aldehído fórmico y se excreta por la orina como formiato. Se distribuye de acuerdo con el contenido acuoso de los tejidos, lo que provoca la alta concentración en los humores del ojo y del nervio óptico, lesionándolos. Se considera como dosis mortal de Metanol para el ser humano 6 [mL] de Metanol por kilo de peso.[47]

1.4.4.3. Glicerol

El propan 1,2,3-triol, glicerol o glicerina (C₃H₈O₃) (del griego *glykos*, dulce) es un alcohol con tres grupos hidroxilos (-OH). Se trata de uno de los principales productos de la degradación digestiva de los lípidos, paso previo para el ciclo de Krebs y también aparece como un producto intermedio de la fermentación alcohólica. Además, junto con los ácidos grasos, es uno de los componentes de lípidos como los triglicéridos y

los fosfolípidos. Se presenta en forma de líquido a una temperatura ambiental de 25 ° C y es higroscópico e incoloro. Posee un coeficiente de viscosidad alto y tiene un sabor dulce como otros polialcoholes.[48]

El glicerol está presente en todos los aceites, grasas animales y vegetales en forma combinada, es decir, vinculado a los ácidos grasos como el ácido Esteárico, Oleico, Palmítico y ácido Láurico para formar una molécula de triglicéridos. Los aceites de coco y de palma contienen una cantidad elevada (70 - 80 por ciento) de ácidos grasos de cadena de carbono 6 a 14 átomos de carbono.

Estos producen más moléculas de glicerol en los aceites que contienen ácidos grasos de 16 a 18 átomos de carbono, como las grasas, el aceite de semilla de algodón, el aceite de soja, el aceite de oliva y el aceite de palma. El glicerol combinado también está presente en todas las células animales y vegetales como parte de su membrana celular en forma de fosfolípidos [49].

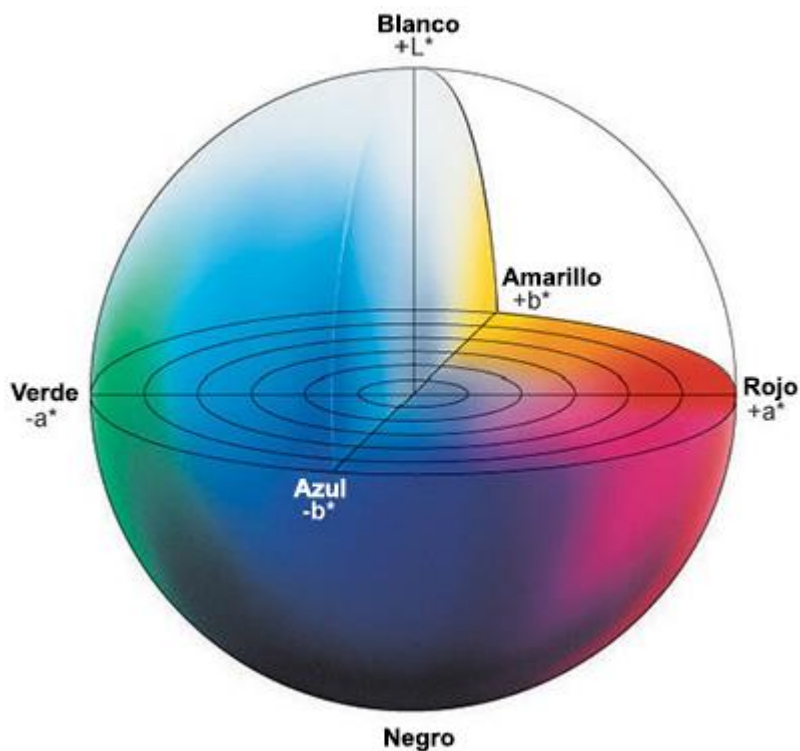
El glicerol es reconocido como seguro para el consumo humano desde 1959. Puede ser utilizado en diversos productos alimenticios para diferentes propósitos. Los niveles de la dosis letal mediana en ratas son de 12 600 [mg] por [kg], en conejillos de Indias de 18 700 mg por kg. Varios estudios han demostrado que una gran cantidad de glicerol (sintético o natural) se puede administrar sin la aparición de efectos adversos para la salud.[50]

1.5. ANÁLISIS DE CARACTERIZACIÓN

1.5.1. Análisis colorimétrico

Los instrumentos de medición de color, incluyendo espectrofotómetros y colorímetros, pueden cuantificar los atributos de color fácilmente; ellos determinan el color de un objeto dentro del espacio de color y lo representan numéricamente. Un espacio de color puede ser descrito como un método para expresar el color de un objeto usando algún tipo de anotación, como pueden ser los números. La *Commission Internationale de l'Éclairage* (CIE), que es considerada como la autoridad en la ciencia de la luz y el color, ha definido espacios de color, incluyendo CIE XYZ, CIE L*C*h, y CIE L*a*b*, para comunicar y expresar el color objetivamente.

El espacio de color $L^*a^*b^*$, también referido como CIELAB, es actualmente uno de los espacios de color más populares y uniformes usado para evaluar el color de un objeto, porque correlaciona los valores numéricos de color consistentemente con la percepción visual humana. El espacio de color $L^*a^*b^*$ fue modelado en base a una teoría de color oponente que establece que dos colores no pueden ser rojo y verde al mismo tiempo, o amarillo y azul al mismo tiempo. Como se muestra a continuación, el parámetro L^* indica la luminosidad, y a^* y b^* son coordenadas cromáticas, donde a^* corresponde a las coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde), y b^* indica las coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul) [2]. En la figura 1-9 se ve representado todos los parámetros.



Fuente: Characterization of fruit development and potential health benefits of arrayán (*Luma apiculata*), a native berry of South America. Food Chem 196:1239-47 (2016).

Figura 1-9 Espacio de color CIE L^*A^*B .

1.5.2. Actividad de agua

La medición de la actividad del agua se utiliza para predecir la estabilidad y la seguridad de los alimentos con respecto al crecimiento microbiano, las tasas de reacciones de deterioro y las propiedades químicas / físicas. [2]

1.5.3. Humedad

Los métodos de secado son los más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Aunque estos métodos dan buenos resultados que pueden interpretarse sobre bases de comparación, es preciso tener presente que a) algunas veces es difícil eliminar por secado toda la humedad presente; b) a cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua, y c) también pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua. [51]

CAPITULO 2: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 EQUIPOS Y MATERIALES

- Material usual de laboratorio
- Espectrofotómetro JASGO, modelo V-630 spectrophotometer
- Equipo de Fluorescencia
- Placa Fluorimétrica de 96 pocillos
- Estufa MEMMERT
- Rotavapor STUART
- Bomba Vacío modelo ROCKER 300
- Micro encapsulador BUCHI, modelo B-390
- Agitador magnético DLAB, modelo MS-H280-PRO
- Micro-pipetas de 200 y 1000 μL DISCOVERY
- Micro-pipeta 5000 μL DLAB
- Microscopio HUND, WETZLAR
- Agitador rodillos LAB TECH
- Balanza Analítica BOECO GERMANY, modelo BAS 31 plus
- Balanza semi-analítica TOMS
- pHmetro, VisionPLUS modelo Ph6175
- Vortex DRAGONLAB MX-S
- Celdas de plástico 1 cm, 4 mL
- Colorímetro, modelo CR-300
- Higrómetro, modelo 4T AQUALab

2.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

2.2.1. Reactivos

- Reactivo Folin-Ciocalteau 1,24 g/mL MERCK
- Carbonato de Sodio AR, 99,5% MERCK
- Ácido Gálico 98%, MERCK
- Tampón PBS 97% SIGMA

- Reactivo AAPH 97%, ALDRICH 2,2 -Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride
- Cloruro de Calcio 95% MERCK
- Glicerol 99,5% WINKLER
- Citrato de Sodio p.a., WINKLER
- Trolox. 97% ALDRICH
- Fluoresceína SIGMA
- Metanol 99,0% 0,792 [g/mL] MERCK
- Alginato de Sodio SIGMA

2.2.2. Soluciones

- Alginato al 2% P/V
- Cloruro de Calcio 5% P/V
- Carbonato de sodio 10% P/V
- Reactivo Folin-Ciocalteu 50% V/V
- Ácido Gálico 0,25 [g/L]
- Citrato de Sodio 0,5 [Mm] pH 7,5
- Metanol al 100% V/V
- Metanol 75% V/V
- Metanol al 60% V/V
- Metanol al 50% V/V
- Glicerol al 60% V/V
- Glicerol al 50% V/V
- Fluoresceína Stock
- Fluoresceína solución intermedia
- Fluoresceína solución final
- Solución AAPH
- Trolox Stock

2.2.3. Muestra

Los frutos maduros de arrayán berry (*L. apiculata*) se recolectan de una población natural ubicada en Antuco, Región del Biobío, Chile (37 ° 22035.0100 S; 71 ° 29021.2000 W; 850 msnm). Las frutas sin defectos superficiales se desinfectan, luego molidas y almacenadas a -80 ° C hasta su deshidratación.

2.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

2.3.1. Pruebas preliminares

- Metanol 75% V/V

Se mide 75 [mL] de Metanol, se agregan 25 [mL] de agua destilada y se homogeniza.

- Metanol al 60% V/V

Se mide 60 [mL] de Metanol, se agregan 40 [mL] de agua destilada y se homogeniza.

- Metanol al 50% V/V

Se mide 50 [mL] de Metanol, se agregan 50 [mL] de agua destilada y se homogeniza.

- Glicerol al 60% V/V

Se mide 60 [mL] de glicerol, se agregan 40 [mL] de agua destilada y se homogeniza.

- Glicerol al 50% V/V

Se mide 50 [mL] de Metanol, se agregan 50 [mL] de agua destilada y se homogeniza.

1.3.2. Compuestos fenólicos totales

- Reactivo Folin-Ciocalteu 50% V/V

Se miden 10 [mL] del reactivo folin, se agrega 10 [mL] luego se homogeniza y se debe guardar en un recipiente ámbar

- Carbonato de sodio al 10% P/V

Se pesan en una balanza 2 [g] de carbonato, y se agregan 20 [mL] de agua destilada, se homogeniza hasta disolución completa.

- Patrón Ácido galico 0,25 [g/L]

Se pesan 0,0250 [g] de ácido gálico con precisión al 0,1 [mg] en balanza analítica, se trasfiere a un matraz de aforo de 100 [mL] aforando con el solvente utilizado para hacer previamente las extracciones que se desean medir

En la tabla 2-1 se presenta la curva de calibración del patrón de Ácido Gálico

Tabla 2-1 Preparación de curva de calibración

Puntos	Patrón (mL)	Solvente (mL)	Concentración teórica (g/L)
1	0,05	0,95	0,0119
2	0,15	0,85	0,0356
3	0,25	0,75	0,0593
4	0,35	0,65	0,830
5	0,45	0,55	0,1067
6	0,55	0,45	0,1304
7	0,60	0,40	0,1422

Fuente: Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. 1956

2.3.3. Capacidad antioxidante

- Fluoresceína Stock

Se disuelven 22,5 [mg] de fluoresceína en 50 [mL] de tampón fosfato 75 [mM] a pH 7,4 (PBS), debe ser protegida de la luz.

- Fluoresceína solución intermedia

50 [μl] de solución stock de fluoresceína es diluida en 10 [mL] de tampón PBS, debe ser protegida de la luz.

- Fluoresceína solución final

320 [μl] de solución intermedia de fluoresceína es diluida en 20 [mL] de tampón PBS, debe ser protegida de la luz.

- Preparación de AAPH

Se pesan 216 [mg] con precisión al 0,1 [mg] en balanza analítica del reactivo AAPH en 10 [mL] de tampón PBS, esta solución se prepara justo antes de ser utilizada

- Reactivo PBS

Se diluye una pastilla en 200 [ml] de agua destilada.

- Patrón Trolox

Se pesan 25 [mg] con precisión al 0,1 [mg] en balanza analítica y se aforan a 50 [mL] con PBS y 2 [mL] de etano

1

La tabla 2-2 presenta la curva teórica de calibración del patrón de Trolox

Tabla 2-2 Preparación de curva de calibración de Trolox

Puntos	Patrón (μL)	PBS (μL)	Concentración teórica (μM/)
1	5	995	10
2	10	990	20
3	15	985	30
4	20	980	40
5	25	975	50
6	30	970	60
7	35	965	70
8	40	960	80
9	45	955	90
10	50	950	100

Fuente: Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC—fluorescein) assay. J Agric Food Chem. 2004

2.3.4. Micro-encapsulación

- Alginato 2% P/V

Se pesan 20 [g] de alginato y se disuelve en 500 [mL] de agua destilada tibia.

Cloruro de Calcio al 5% P/V

Se pesan 5 [g] de cloruro, se agregan 100 [mL] de agua destila y se homogeniza.

- Citrato de sodio 50 [mM] (pH 7,5)

Se pesan 6,45 [g] con precisión al 0,1 [mg] en balanza analítica, se trasfiere a un matraz aforado de 500 [mL] y se afora con agua destilada, ajustar pH de ser necesario.

2.4. PROCEDIMIENTO

2.4.1. Liofilización

El fruto se congela a -80°C y se deja varias horas para que los cristales de hielo que se formen en el fruto sean más compactos, luego el equipo debe acondicionarse en paralelo a las muestras y se deja a la temperatura de -56°C a una presión de 50 bar por un tiempo de 5 horas.

2.4.2. Secado en horno

Se secan las muestras de fruta madura en un horno de aire caliente (MEMMERT) a 60°C durante 48 [h] seco, las muestras se muelen finamente a mano y se pulverizan, el polvo de la planta se almacena en recipientes estériles sellados (32 [oz]) a -20°C hasta la extracción

2.4.3. Extracción

Cuatro extracciones independientes de diez gramos de las muestras secas y pulverizadas se mezclan con 150 [mL] de Metanol al 100% y luego se incuban en un agitador orbital (Cole-Palmer, EE. UU.) a 100 [rpm] a temperatura ambiente durante 24 [h], Después de la extracción, cada muestra se filtra usando un Miracloth y luego a través de un filtro Whatman No. 1 (Whatman International Ltd, Reino Unido) para obtener un extracto claro. Los extractos filtrados se secan luego a presión reducida a 40°C , utilizando un evaporador rotativo. Los extractos crudos se reconstituyen con Metanol a una concentración de 500 [mg/mL]. Los extractos se esterilizan por filtración a través de un filtro de jeringa de 0,45 [μm]. Y se almacenan en recipientes estériles a 20°C hasta la determinación de capacidad antioxidante, contenido de polifenoles y ensayos de microencapsulación. -

2.4.4. Compuestos fenólicos totales

Para la cuantificación de CFT se adicionan 3,75 [mL] de agua destilada en un tubo de ensayo y se agregan 0,5 [mL] de la muestra que se desea determinar, luego se agrega 0,

25 [mL] del reactivo Folin-Ciocalteu diluido al 50% V/V para luego homogeneizar el tubo, además se agregan 0,5 [ml] de carbonato de sodio al 10% P/V, se homogeniza nuevamente y se deja reposar 1 [h] a temperatura ambiente y resguardados de la luz.

Una vez transcurrido el tiempo se procede a leer la curva de calibración y luego las muestras a 765 [nm] en un espectrofotómetro UV/Visible

Para realizar la curva de calibrado se debe utilizar un patrón de ácido gálico, del cual se pesan 25 [mg] en una balanza analítica al 0,1 [mg] en un matraz de aforo de 100 [mL], se afora con el solvente que se utiliza para las extracciones de las muestras a cuantificar, luego se hacen una serie de diluciones del patrón de ácido gálico y las diluciones se tratan como si fuera una muestra por lo que se le realiza el mismo procedimiento antes mencionado, para su cuantificación.

2.4.5. Actividad antioxidante

La actividad ORAC se realiza para el extracto de Metanol como descrito por (Speisky et al., 2012). utilizando 2,20-azobis (2-amidinopropanil) dihidrocloruro (AAPH) como fuente de radicales peroxilo y la fluoresceína como sonda oxidable. En resumen, 45 uL del Metanol.

El extracto (diluido en tampón Fosfato 75 [mM], pH 7,4) es transferido a microplacas de 96 pocillos, cada una de las cuales contiene 75 [uL] de APPH (18 [mM]) y 200 [uL] de fluoresceína (108 [nM]). Los platos se colocan en un lector de microplacas multimodo. Y se incuban durante 60 [min] a 37 ° C con agitación cada 3 [min]. Durante la incubación, la fluorescencia (485 [nm] / 538 [nm]) se monitoriza cada 3 [min] a lo largo del experimento. El análisis de cada muestra se hace por triplicado. Los resultados de la actividad ORAC se estiman sobre la base de una curva estándar de Trolox usando una regresión obtenida entre la concentración de Trolox y el área neta bajo la curva de caída de fluorescencia. Actividad ORAC se expresa como micromoles de equivalentes de Trolox (ET) por 100 [g] de peso seco ([umol] de ET / 100 [g] PS).

2.4.6. Prueba de evaluación alginato-Metanol

Se realizan cuatro pruebas con diluciones de 100%, 75%, 60% y 50% V/V de Metanol para luego mezclar en una proporción (1:1) con alginato de sodio al 2% P/V, con el fin de seleccionar la mejor condición para la micro-encapsulación.

2.4.7. Prueba de evaluación alginato-glicerol

Se realizan cuatro pruebas con diluciones de 60% y 50% V/V de glicerol para luego mezclar en una proporción (1:1) con alginato de sodio al 2% P/V, con el fin de seleccionar la mejor condición para la micro-encapsulación.

2.4.8. Microencapsulación

Para obtener las esferas de los extractos de Arrayán, se utilizó alginato de sodio al 2% P/V como matriz encapsulante, el cual fue mezclado, en relación (1:1), con el extracto en estudio por 5 minutos protegido de la luz. La gelificación se lleva a cabo por goteo en una solución de Cloruro de Calcio (CaCl_2) al 5% P/V, en agitación magnética lenta constante, utilizando una bomba jeringa con un flujo constante de 5 [mL/min], para una jeringa de 1 [mL].

Las esferas permanecen en la solución de cloruro de Calcio 15 [min], se filtran y se lavan con abundante agua. Luego, es retirado el exceso de agua en la superficie de las cápsulas, para ser usadas en los ensayos posteriores.

2.4.9. Disolución de esferas

Se pesan 500 [mg] de esferas al 0,1 [mg], en un recipiente con tapa, se agrega las esferas y 5 ml de solución de citrato de sodio 0,5 mM pH 7,5, el cual actúa como agente quelante, desintegrando el gel de alginato de Calcio completamente [29] y luego se deja en agitación durante la noche resguardado de la luz.

2.4.10. Humedad

Las muestras pesadas inicialmente se llevan a un horno de convección (Mettler) a 105 °C por 24 [h]. Finalmente, se pesan para determinar su contenido de humedad.

2.4.11. Tamaño esferas

Para determinar el diámetro de las esferas con extractos de arrayán, se tomaron fotografías a las esferas húmedas, Se utiliza el software UEYE COKPIT para analizar las imágenes.

2.4.12. Determinación de color

El color de los frutos deshidratados se determina utilizando un colorímetro acoplado a un procesador de datos Minolta DP-301 y expresado en base a la escala Cielab. Para la

determinación de color se miden los parámetros de luminosidad L, a (escala de rojo, - verde, + rojo) b (escala de amarillo, -azul, +amarillo), C (intensidad del color).

2.4.13. Actividad de agua

La actividad de agua se mide utilizando 1 [g] de muestra en un higrómetro 4T AQUALab a 25 °C

2.5. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

2.5.1. Humedad

$$\% \text{ Humedad} = \frac{Mh - Ms}{Mh - Mr} * 100$$

En donde:

Mr = corresponde al peso recipiente.

Mh = peso del recipiente más muestra inicial húmeda.

Ms = peso del recipiente más muestra final seca.

2.5.2. Promedio

$$P = \frac{\sum_{i=1}^n xi}{n}$$

Donde:

n = cantidad de valores

$\sum_{i=1}^n xi$ = sumatoria de resultados

2.5.3. Desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (xi - P)^2}{n - 1}}$$

Donde:

n = cantidad de valores

xi= resultado

p= promedio

$\sum_{i=1}^n (xi - P)^2 =$ sumatoria

2.5.4. Coeficiente de variación

$$C.V = \frac{\sigma}{P} \times 100$$

Donde:

P= promedio

σ = Desviación estándar

2.5.5. Correlación de la curva de calibrado

$$Y = mx + n$$

Donde :

Y : Es la concentración buscada

m : Pendiente de la recta

n : Intercepto de la recta

2.5.6. Determinación de [mg] de GAE/100[g] de muestra

$$\frac{mg \text{ GAE}}{100g \text{ de muestra}} = \frac{GAE \left[\frac{g}{L} \right] * V * 100}{gM}$$

Donde:

GAE [g/L] = Resultado correlación de la curva de calibrado

V = Volumen recuperado (mL)

gM = Gramos de muestra

2.5.7. Determinación de [μmoles] TE/100[g] de muestra

$$\frac{\mu\text{mol TE}}{100\text{g de muestra}} = \frac{\text{TE} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right] * V * 100}{1000 * \text{gM}}$$

Donde:

TE [$\mu\text{mol/L}$] = Resultado correlación de la curva de calibrado

V = Volumen recuperado (mL)

gM = Gramos de muestra

2.5.8. Factor de esfericidad

$$f_e = \frac{d_{max} - d_{min}}{d_{max} + d_{min}}$$

Donde:

d_{max} : es el valor del diámetro más largo

d_{min} : al diámetro perpendicular al mismo, el factor de esfericidad comprende valores desde 0 para esferas perfectas y se aproxima a la unidad para formas elongadas

2.5.9. Cálculo de eficiencia de la micro-encapsulación

$$\% \text{ EE} = \frac{m_c}{m_e} * 100$$

Donde:

m_c : corresponde al contenido de Polifenoles Totales encapsulados, y m_e es el contenido de Polifenoles Totales presente en el extracto en el cual se originó la formulación.

m_c : se determina disolviendo una cantidad conocida de esferas en una solución de Citrato de Sodio al 0,5 [mM] durante una noche en un agitador magnético a temperatura ambiente y a 125 [rpm].

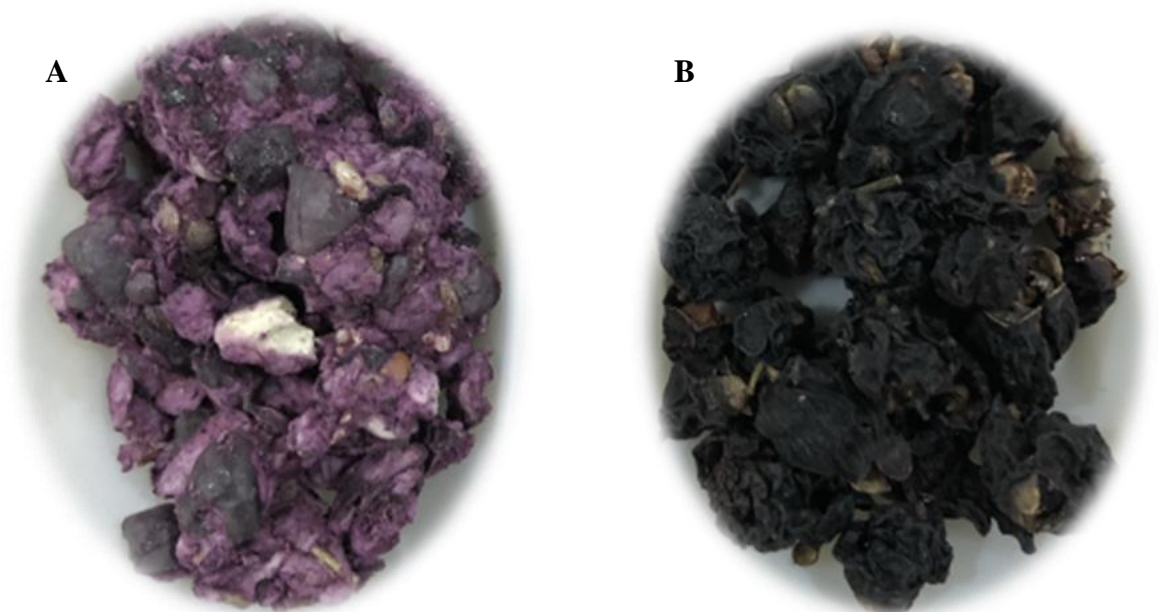
CAPITULO 3: RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. RESULTADOS DE SECADO PARA EL FRUTO DE ARRAYÁN

3.1.1. Arrayán después de la deshidratación por los métodos de liofilización y horno convector

Se presenta el fruto de arrayán después de ser sometido a los métodos de deshidratación estudiados para una evaluación visual en la Figura 3-1.



Fuente: Datos obtenidos después de la deshidratación de las muestras

Figura 3-1 (A) Arrayán Liofilizado y (B) Arrayán secado en horno.

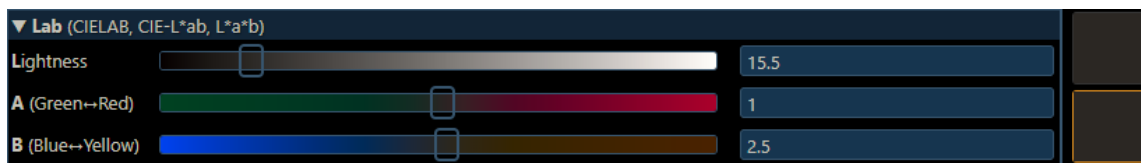
3.1.2. Determinación por Colorimetría

Las muestras se evalúan por la técnica de color como fruta fresca y luego sometidas a cada uno de los métodos de deshidratación, los resultados obtenidos están representados en la tabla 3-1 y 3-2

Tabla 3-1 Resultados de color de Arrayán fresco

Muestra	L* (luminosidad)	a* (- verde, + rojo)	b* (-azul, + amarillo)	C* (color)
Arrayán fresco	17,28	0,78	2,31	2,49

Fuente: Datos obtenidos de forma experimental



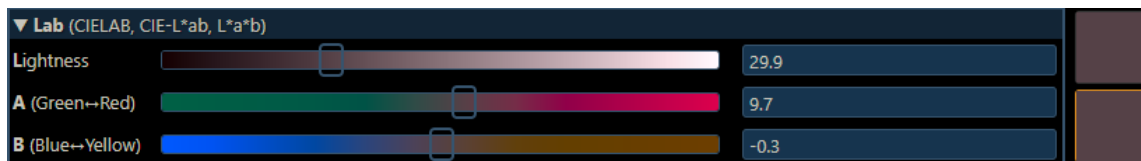
Fuente: Datos obtenidos de Colorizer.org

Figura 3-2 Color programa CIELAB para las coordenadas de Arrayán fresco.

Tabla 3-2 Resultados de color de muestras secas.

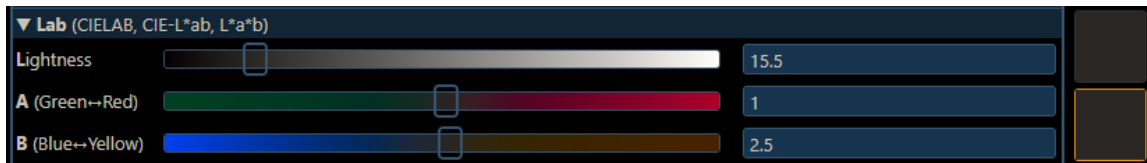
Muestra	L* (luminosidad)	a* (- verde, + rojo)	b* (-azul, + amarillo)	C* (color)
Arrayán Liofilizado	29,9	9,7	-0,30	10,5
Arrayán secado en horno	15,5	1,0	2,5	2,7

Fuente: Datos obtenidos de forma experimental



Fuente: Fuente: Datos obtenidos de Colorizer.org

Figura 3-3 Color programa CIELAB para las coordenadas de Arrayán liofilizado



Fuente: Fuente: Datos obtenidos de Colorizer.org

Figura 3-4 Color programa CIELAB para las coordenadas de Arrayán secado en horno

3.1.3. Cuantificación de Actividad antioxidante y Compuestos fenólicos totales en extractos metanólicos según tipo de secado

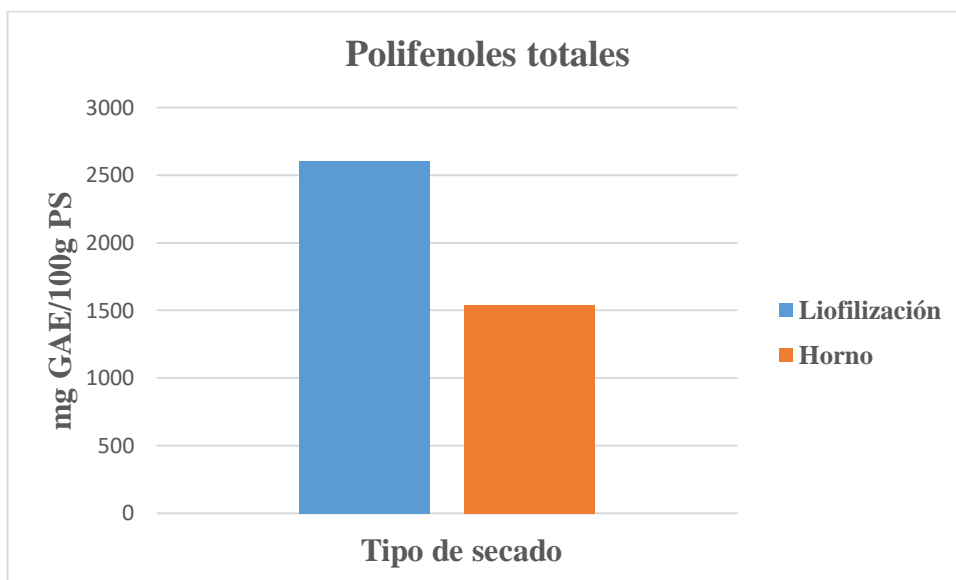
La evaluación de Polifenoles totales se realiza por medio de la determinación de Compuestos Fenólicos Totales (CFT) y Actividad antioxidante por el método de Capacidad antioxidante radical de oxígeno (ORAC) en frutos de Arrayán para cada método de secado representada en la tabla 3-3

Tabla 3-3 Resultados de las propiedades funcionales de extractos de arrayán.

Tipo de secado	Actividad antioxidante ORAC [(μ moles) TE/100[g] PS)	Polifenoles totales ([mg] GAE/100[g] PS)
Liofilización	21.804	2.606
Horno	22.719	1.540

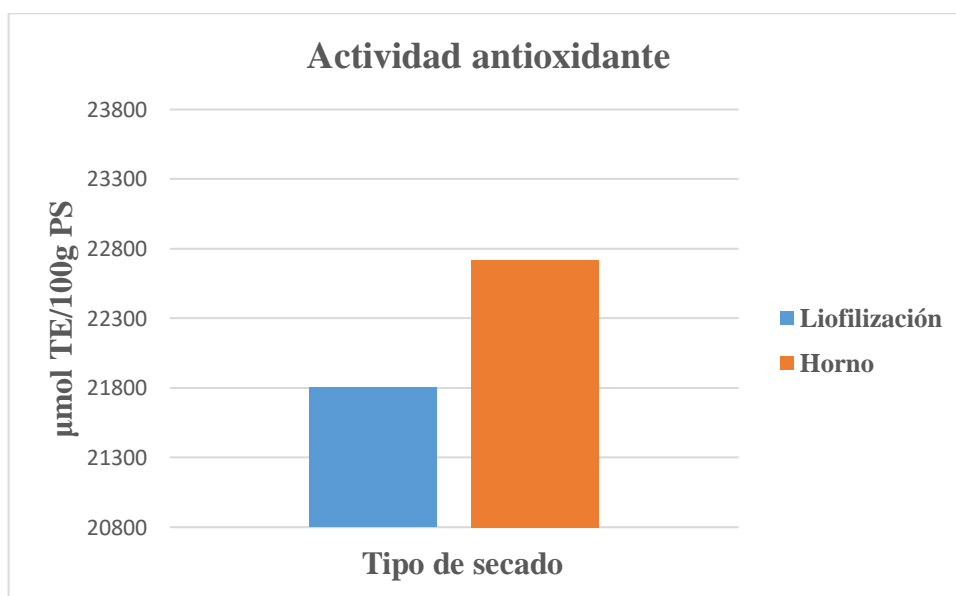
Fuente: Datos obtenidos por fluorimetría y UV visible

Gráfico 3-1 Compuestos fenólicos totales de extractos de arrayán.



Fuente: Datos obtenidos de la tabla 3-3

Gráfico 3-2 Actividad antioxidante de extractos de arrayán

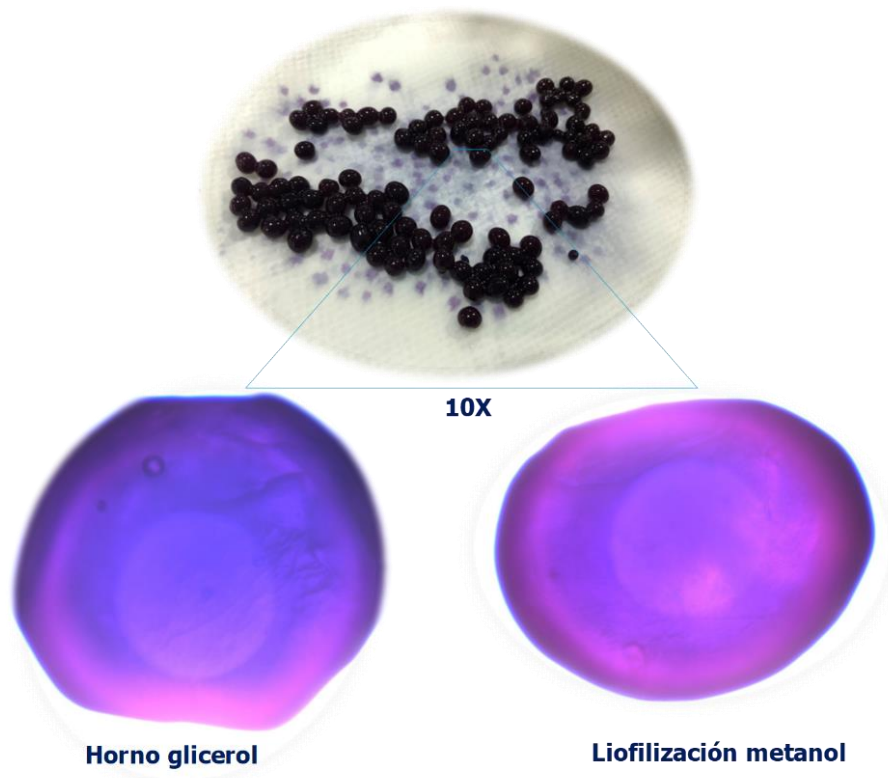


Fuente: Datos obtenidos de la tabla 3-3

3.2. RESULTADOS DE LA TECNICA DE MICRO-ENCAPSULACIÓN

3.2.1. Encapsulación de extractos de arrayán

Por medio de la técnica de gelificación iónica externa utilizada, se alcanza un sistema del tipo matricial obteniendo esferas de extracto encapsulado. Las esferas de extracto de fruto de Arrayán se muestran en la figura 3-5 mediante la observación visual y al microscopio.



Fuente: Fotografías obtenidas a través de microscopio

Figura 3-5 Micro-cápsulas. Observación visual y al microscopio.

3.2.2. Determinación de humedad

Los resultados obtenidos de humedad de las esferas de los extractos de Arrayán se muestran en la siguiente tabla 3-4

Tabla 3-4 Resultados Humedad

Muestras	% Humedad
Liofilizado/Metanol	93,76
Liofilizado/Glicerol	91,93
Horno/Metanol	94,54
Horno/Glicerol	90,98

Fuente: Datos obtenidos de forma experimental

3.2.3. Actividad de agua

Los resultados obtenidos de actividad de agua que sirven para evaluación de parámetros de conservación y caracterización de las muestras de los frutos, los valores se muestran en la tabla 3-5.

Tabla 3-5 Resultados de Actividad de agua

Muestras	Actividad de agua (a_w)
Liofilizado /Metanol	0,901
Liofilizado/Glicerol	0,871
Horno/Metanol	0,921
Horno/Glicerol	0,925

Fuente: Datos obtenidos por higrómetro

3.2.4. Tamaño y forma de las esferas

El tamaño de las esferas de ambos extractos de los frutos de Arrayán se muestra a continuación en la tabla 3-6

Tabla 3-6 Resultados de tamaño y forma de las esferas.

Muestras	Diámetro máximo (mm)	Diámetro mínimo (mm)	Factor de esfericidad
Liofilizado/Metanol	3,53	2,79	0,12
Liofilizado/Glicerol	3,52	2,94	0,09
Horno/Metanol	3,33	2,67	0,11
Horno/Glicerol	3,53	2,96	0,09

Fuente: Datos obtenidos a través del microscopio

3.2.5. Cuantificación de ORAC y CFT de las micro-capsulas según tipo de solvente

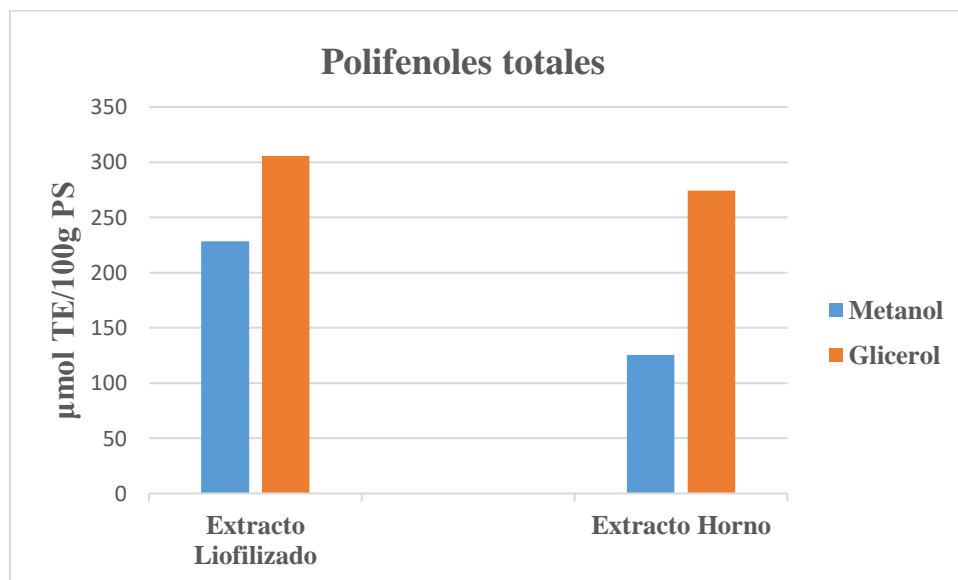
La evaluación de Polifenoles totales se realiza por medio de la determinación del contenido de Polifenoles Totales (CFT) y Actividad antioxidante total por el método de ORAC para cada solvente evaluado para su encapsulación de los extractos de arrayán representada en la tabla 3-7

Tabla 3-7 Resultados de propiedades funcionales de las micro-cápsulas

Muestra	Actividad antioxidante ORAC (μmol TE/100[g])	Polifenoles totales ([mg] GAE/100[g])
Liofilizado/Metanol	1.984	228,49
Liofilizado/Glicerol	4.042	305,45
Horno/Metanol	1.807	125,62
Horno/Glicerol	3.526	274,09

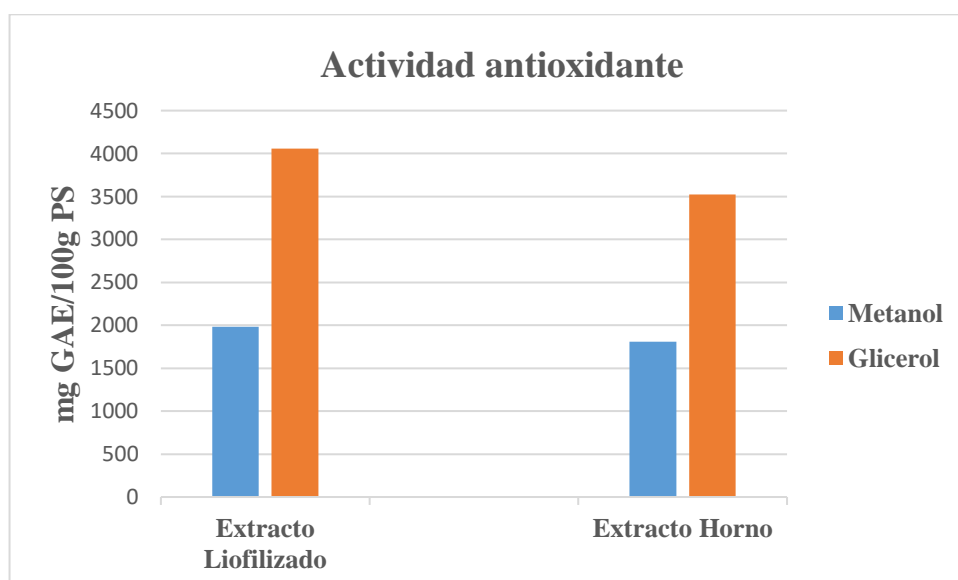
Fuente: Datos obtenidos por fluorimetría y UV visible

Gráfico 3-3 Polifenoles totales de las micro-capsulas de arrayán



Fuente: Datos obtenidos de la tabla 3-7.

Gráfico 3-4 Actividad antioxidante de las micro-capsulas de arrayán



Fuente: Datos obtenidos de la tabla 3-7

3.2.6. Eficiencia de micro-encapsulación

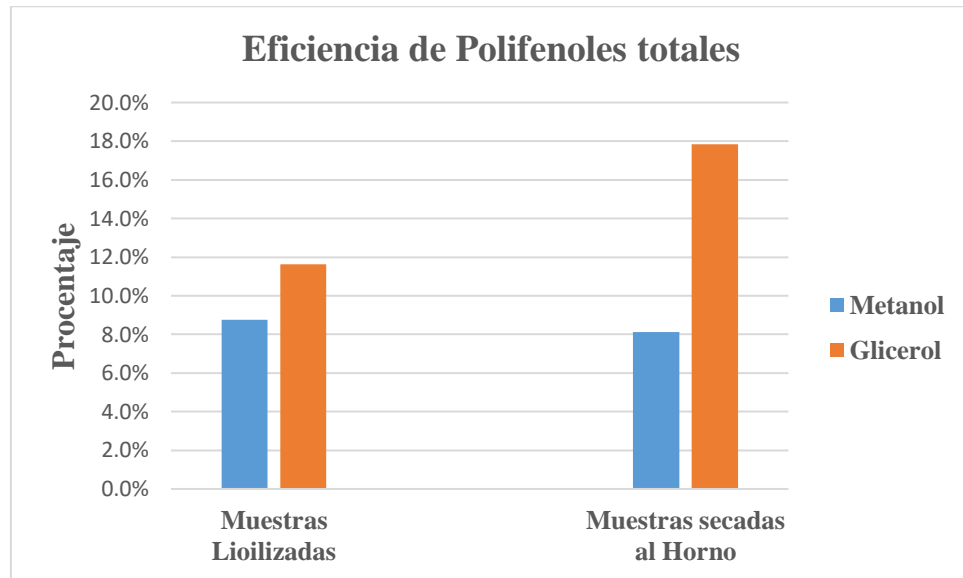
Los resultados de la eficiencia de encapsulación de cada solvente en estudio se presentan en la tabla 3-8

Tabla 3-8 Resultados de la eficiencia de encapsulación por solvente

Muestras	Eficiencia de Polifenoles totales (%)	Eficiencia de Actividad antioxidantes (%)
Liofilizado/Metanol	9,8	9,1
Liofilizado/Glicerol	11,6	18,5
Horno/Metanol	8,1	15,4
Horno/Glicerol	17,8	7,9

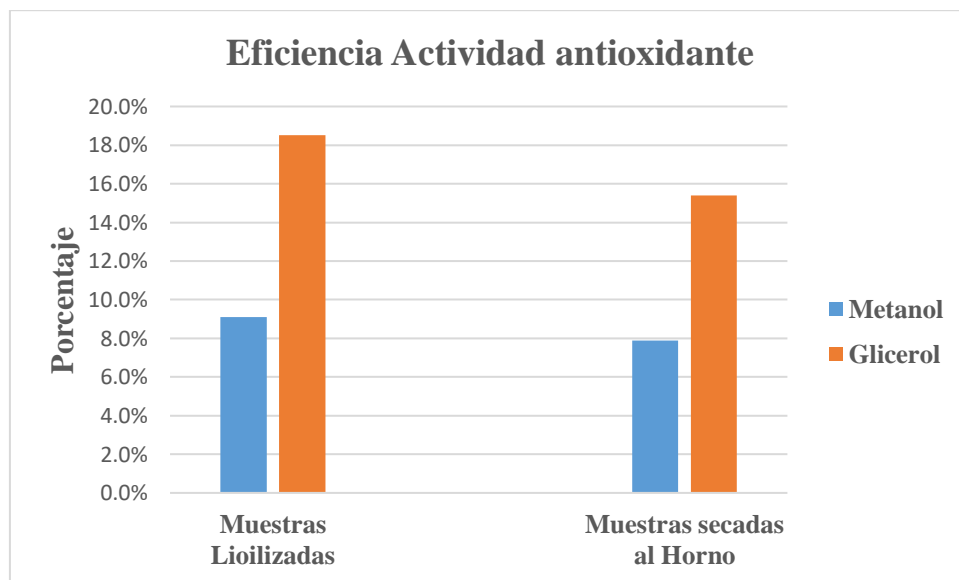
Fuente: Datos obtenidos por microscopia

Gráfico 3-5 Eficiencia de Polifenoles totales en micro-capsulas de arrayán



Fuente: Datos obtenido de la tabla 3-8

Gráfico 3-6 Eficiencia de Actividad antioxidante en micro-capsulas de arrayán.



Fuente: Datos obtenidos de la tabla 3-8

3.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este estudio se evalúa el efecto que tienen dos tipos de secados –liofilización y secado en horno convector- sobre la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles en frutos de arrayán. Además, se evalúan las diferencias obtenidas sobre la capacidad antioxidante, el contenido de polifenoles totales y parámetros físicos de micro-cápsulas obtenidas utilizando dos solventes de naturaleza alcohólica, pero con características diferentes. El arrayán es un fruto que ha sido descrito con alta capacidad antioxidante y propiedades funcionales [2], por lo que evaluar las alternativas de preservación de las moléculas bioactivas es de suma importancia para potenciar el futuro uso de este fruto como alimento funcional o en la industria farmacéutica.

Durante los procesos de secado es posible modificar la riqueza de compuestos bioactivos de la materia prima, en función de la combinación de temperatura y tiempo aplicado en el proceso [52]. El secado por liofilización (FD) puede producir productos de alta calidad, pero es comparativamente más caro [53] por lo que la optimización de las temperaturas de secado (40-60°C) y de los tiempos continuos de éste en horno (menores de 2 días) sigue siendo una alternativa en la industria. Es por ello es importante evaluar su aplicación a materias primas que presentan un alto contenido de moléculas bioactivas y que pueden servir como fuente de alimentos funcionales donde este método es cada vez más usado.

Los primeros resultados que se obtienen en el presente trabajo muestran que se obtiene una diferencia de color visual e instrumental (escala Cielab) después de ser sometida a los procesos a los distintos mecanismos de secado (figura 3-1). De esta manera, el fruto de arrayán liofilizado presenta un tono purpura más luminoso, lo cual se confirma instrumentalmente con las diferencias observadas en el parámetro L* (10,5) en cambio en la muestra secada al horno se aprecia un color purpura intenso y muy oscuro con un valor de L (2,7) (Tabla 3-1 y 3-2; Figuras 3-2 y 3-3). De esta manera, se observa que el color instrumental para el fruto fresco tiene una tonalidad muy oscura, casi negro. Es importante destacar que se ha descrito que el color negro que determina el equipo para los frutos de arrayán puede estar dado por la falta de luminiscencia del fruto y la saturación del color, porque el color determinado por el equipo muchas veces no coincide con la observación visual (color purpura de la fruta fresca) [2]. Así, el fruto secado al horno presenta un color instrumental parecido al fruto fresco lo que puede deberse a las limitaciones instrumentales del equipo, en cambio el fruto liofilizado indica un color purpura oscuro el cual coincide con la observación visual de la figura 3-1. Además de los parámetros

visuales, es importante evaluar el efecto de los distintos procesos de secado en el contenido de moléculas bioactivas. El secado por convección de aire caliente (40 a 80 ° C) de las bayas de maqui muestra que una carga térmica y no una temperatura alta son los principales factores que afectan la estabilidad de los compuestos bioactivos. A 40 ° C, hay una larga exposición de las bayas al aire caliente en comparación con el proceso de secado a 80 ° C [54]. Por encima de 60 ° C, los componentes bioactivos, tales como -caroteno, tocoferoles, antocianinas y vitamina B6, no se ven significativamente afectados, mientras que los ácidos gálico y elágico aumentan, como resultado de la conversión de Taninos hidrolizables. Este fenómeno indica que la pérdida de actividad antioxidante se compensa por una probable formación de componentes bioactivos directamente relacionados con el contenido de polifenoles totales (CFT) [54]. Estudios similares en bayas de murta (40 a 80 ° C) muestra que el contenido de -caroteno, fenólico total y flavonoide muestran una disminución significativa durante el proceso de secado en comparación con la fruta fresca. Sin embargo, el valor ORAC muestra una actividad antioxidante similar a temperaturas de secado más altas (70–80 ° C) en comparación con las frutas frescas [55]. Este fenómeno, puede explicar lo observado en el presente trabajo, donde los valores de capacidad antioxidante determinada por ORAC obtenidos por la deshidratación por liofilización y secado al horno son de 21.824 y 22.888 [μmol] ET/100[g] PS respectivamente, no observándose diferencias significativas, lo que indica que la muestra por secado al horno logra conservar los antioxidantes de forma similar al proceso de liofilización, esto puede deberse a que la temperatura de secado empleada (60°C) y el tiempo de este no es lo suficientemente alta para descomponer los antioxidante del fruto. Además, se ha descrito que el fruto de arrayán presenta principalmente moléculas como la rutina (quercitina-3-rutinosido) en vez de antocianinas que son más avilés al calor [2]. Un estudio comparativo realizado para evaluar el efecto del secado por convección de aire caliente a 65 y 80 ° C y liofilización de compuestos bioactivos de la variedad Red Pearl-INIA de frutas murta muestran que en frutos de la misma familia que el arrayán, frutos de murta (*Ugni molinae*) muestran que la fruta secada por el proceso de liofilización retuvo valores más altos para CFT (21.924 [mg/g] PS) y contenido de antocianos totales (0.134 [mg/g] PS) que la murta secada por aire caliente convectivo [56]. De forma similar, en el presente trabajo los valores de CFT de las muestras deshidratadas por liofilización (2.606 [mg] GAE/100 [g] en PS) y secado en horno (1.540 [mg] GAE/100 [g] PS) indican que el método de deshidratado por liofilización permite preservar un mayor contenido de polifenoles, esto concuerda con la bibliografía puesto que la técnica de liofilización es un secado a temperaturas bajas en comparación a otros métodos

A pesar de que la metodología de secado por liofilización es una técnica ampliamente utilizada debido a que protege las características de los productos, el secado al horno sigue siendo una alternativa para la deshidratación de materias primas con las condiciones

adecuadas para la obtención de extractos ricos en polifenoles y actividad antioxidante puesto que las diferencias entre ambos métodos son bajas y se tiene que hacer un estudio más riguroso para la determinación del mejor método que logra preservar dichos compuestos.

La tecnología de microencapsulación puede ser utilizado como estrategia para proteger antocianinas de maqui y las presentes en otros frutos nativos como el arrayán en ingredientes alimenticios saludables. Bastás-Montes y cols., (2019) [57]. La microencapsulación es una tecnología protectora. alternativa a través de la cual ciertas sustancias bioactivas en estado sólido, líquido o gaseoso se transforman en micropartículas con un diámetro de 1 a 1000 [m], y ha sido ampliamente utilizado en los campos de la medicina, la cosmética, la alimentación, textil y materiales avanzados [58-59]. La ventaja única de la microencapsulación radica en el hecho que el material del núcleo está completamente recubierto y aislado del entorno externo. El objetivo es preservarlos de varios agentes, así como protegerlos de las reacciones de oxidación causadas por luz u oxígeno. [57-60]

Para la estabilización de los extractos en estudio se utiliza la técnica de micro-encápsulas por gelificación iónica externa con la cual se consiguen esferas de tipo matricial con el extracto, para esto previamente se realizan pruebas con los 2 solventes que se desea utilizar para poder estudiar el comportamiento de éste con la solución de alginato de sodio para conseguir las esferas. Se mezclan diferentes concentraciones de Metanol con alginato al 2%, en este caso son 100%, 75%, 60% y 50% V/V de Metanol, en este caso las condiciones que obtienen mejores resultados son las concentraciones de 50 y 60% V/V, en cambio las concentraciones de 100 y 75% Metanol, al ser mezclados con alginato se forma una masa sólida que no permite realizar la encapsulación. Para el caso del solvente glicerol se prueban 2 condiciones, 60% y 50% V/V, ambas condiciones se logran realizar la micro-encapsulación de las esferas. Con los resultados de estas pruebas se toma la decisión de trabajar con las concentraciones de 50% V/V de Metanol y glicerol puesto que al ser sometidos a la técnica se forman esferas más uniformes. Para evaluar la efectividad de los solventes en la micro-encapsulación de compuestos bioactivos de extractos de arrayán la tabla 3-7 presenta la medición de la muestra liofilizada con las condiciones de Metanol y glicerol, los cuales se obtuvo 228,49 y 305,45 [mg] GAE/100[g] respectivamente lo cual nos indica que se logra una mayor concentración al formar capsulas con glicerol, esto también sucede en la muestra de horno, que es tratada de la misma manera del extracto antes mencionado, en el grafico 3-3 se muestran los mismos niveles de polifenoles y en ambos casos el glicerol logra encapsular una gran cantidad de compuestos, lo que indica que en términos de CFT el solvente más adecuado es el glicerol.

En cuanto a la cuantificación de la actividad antioxidante de las capsulas en la tabla 3-7 también presenta los resultados para los dos solventes en estudio, en la cual, se observa que se logra encapsular en el extracto liofilizado 4.042 [μmol] ET/100[g] con glicerol y 1.984 [μmol] ET/100[g] con Metanol. En el extracto al horno se logran valores de 3.526 [μmol] ET/100[g] para glicerol y 1.807 [μmol] ET/100[g] de Metanol, esto quiere decir que el glicerol es capaz de micro-encapsular y estabilizar los componentes bioactivos con mayor efectividad que el solvente Metanol como se muestra el grafico 3-4 en donde se hace notar la diferencia de concentraciones, la cantidad de antioxidantes encapsulados por glicerol duplican los valores alcanzados con Metanol logrando mayor eficiencia.

Los parámetros de humedad, actividad de agua y esfericidad obtenidos en las capsulas de extracto de arrayán que se muestran en las tablas 3-4;3-5 y 3-6 se utilizan para hacer una caracterización de su uniformidad y estabilidad. Los factores de esfericidad que se muestran en la tabla 3-4 van desde los 0,09 a los 0,012, los cuales son muy favorables para decir que las micro-capsulas que se logran con ambos solventes son uniformes en cuanto a tamaño, aunque al tener un valor muy alto de actividad de agua puede aumentar las posibilidades del crecimiento de microorganismos que hacen que las esferas se deterioren con más rapidez

La aplicación e investigación de los polifenoles en frutos han sido el foco de estudio para la incorporación en productos de alimentos funcionales, nutraceuticos y de la industria farmacéutica, debido a sus potenciales beneficios para la salud de los seres humanos. Sin embargo, la eficacia de polifenoles depende en la preservación de la estabilidad, bioactividad y biodisponibilidad de los ingredientes activos. El sabor desagradable de la mayoría de los compuestos fenólicos también limita su aplicación. La utilización de encapsulación de polifenoles, en lugar de compuestos libres, puede efectivamente aliviar estas deficiencias [61]

Lo cual los resultados obtenido son muy beneficiosos puesto que el glicerol es un solvente que no hay evidencias que demuestren motivos para pensar que nocivo para la salud. El glicerol es actualmente utilizado como solvente inocuo para extractos vegetales ricos en compuestos bioactivos como es el caso de extractos de *Pelargonium sidoides* comercialmente conocido como Kaloba, por lo que a futuro este fruto podría ser empleado en la industria farmacéutica.

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

- La extracción de los compuestos activos del fruto de arrayán no se ve afectado por las técnicas de secado al horno y deshidratación por liofilización a pesar de las diferencias en los resultados de polifenoles totales.
- Ambas técnicas de secado utilizadas en el estudio son óptimas para la preservación de las propiedades bioactivas de los frutos.
- Es posible obtener microcápsulas de extractos de arrayán utilizando metanol y glicerol como disolventes de los compuestos bioactivos.
- El solvente óptimo para la encapsulación de extractos con un alto contenido compuestos bioactivos es el glicerol, obteniendo una mayor eficiencia en la técnica.
- Para la comparación de las técnicas de secado y evaluación de la eficiencia de micro-encapsulación se recomienda efectuar un estudio estadístico de t de Student de diferencia de medias ya que permite comparar muestras que sean del mismo universo, pero con tratamientos distintos para identificar si hay diferencias significativas en las técnicas que se están comparando y para que sea representativo debe haber una cantidad mínima de 15 mediciones por muestra.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Theodore WR & James AS. Freezing and Annealing Phenomena in Lyophilization. Indian journal of pharmaceutical sciences, 2005, 69, 46- 61.

[2] Fuentes L, Valdenegro M, Gómez MG, Ayala-Raso A, Quiroga E, Martínez JP, Vinet R, Caballero E and Figueroa CR, Characterization of fruit development and potential health benefits of arrayán (*Luma apiculata*), a native berry of South America. Food Chem 196:1239-47 (2016).

[3] Massardo, F., & Rozzi, R. (1996). Usos medicinales de la flora nativa chilena. Ambiente y Desarrollo, 12, 76–81.

[4] Simirgiotis, M. J., Bórquez, J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2013). Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC–DAD–ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *Luma chequen*. Food Chemistry, 139, 289–299.

[5] Ruiz A, Hermosín I, Mardones C, Vergara C, Herlitz C, Vega M, Dorau C, Winterhalter P, Von Baer D. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from southern Chile. J Agric Food Chem. 2010;58:6081–6089.DOI:10.1021/jf100173x.

[6] Pastene, E. R., 2009. Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), pp. 449 - 455.

[7] Pastene, E. R., 2009. Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), pp. 449 - 455.

[8] ZAMORA, J. 2007.” Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud” Rev. Chil. Nutr.34 (1), pp. 17-26.

- [9] Pedrola, I., 2010. Polifenoles y sus propiedades antioxidantes, Madrid, España: s.n.
- [10] Speisky, H., 2006. Antioxidantes en Alimentos. *Indualimentos, Salud*, pp. 28-31.
- [11] Speisky H, López Alarcón C, Gómez M, Fuentes J, Sandoval Acuña C. First web-based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the South Andes Region of South America. *J Agric Food Chem.* **2012**; *60*: 8851–8859. DOI: 10.1021/jf205167k
- [12] Ruiz A, Hermosín I, Mardones C, Vergara C, Herlitz C, Vega M, Dorau C, Winterhalter P, Von Baer D. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from southern Chile. *J Agric Food Chem.* 2010;*58*:6081–6089. DOI: 10.1021/jf100173x.
- [13] Ruiz A, Hermosín-Gutiérrez I, Vergara C, Von Baer D, Zapata M, Hitschfeld A, Obando L, Mardones C. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DADESI-MS/MS. *Food Res Int.* 2013;*51*:706–713. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.043.
- [14] Nieves Abril Díaz¹, J. Antonio Bárcena Ruiz¹, Emilio Fernández Reyes¹, Aurora Galván Cejudo¹, Jesús Jorrín Novo¹ Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas, 14071-Córdoba
- [15] Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.
- [16] Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC—fluorescein) assay. *J Agric Food Chem.* 2004; *52*:48–54. DOI: 10.1021/jf0305231.
- [17] Sueishi, M. Ishikawa, D. Yoshioka et al., “Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of cyclodextrin-solubilized flavonoids, resveratrol and astaxanthin as measured with ORACEPR method,” *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 50, no. 2, pp. 127–132, 2012.
- [18] PEARSON. D; *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*; Acribia, S.A. Zaragoza (España) 1993.
- [19] (Kwok et al., 2004; Rababah et al., 2005; Choi et al., 2006; Garau et al., 2007; Miranda, 2004).

[20] Akers MJ, Fites AL, Robinson RL. Types of parenteral administration. *Journal of parenteral science and Technology*, 1987, 41, 88-95.

[21] Lippincott, Williams K. Remington, *The Science & practice of pharmacy, Parenteral Preparation*, 20th ed, ISE publication, Philadelphia. 2000, 1, 804-819.

[22] Remington: *The science and practice of pharmacy*, 21st ed, Gennaro RA, Lippincott Williams & wilkins publisher, 2000, 1.

[23] Jeff SJ. *Basic Cycle Development Techniques for Lyophilized Products*. 2009, 35, 126-128.

[24] Adams GD, Irons LI. Some implications of structural collapse during freeze drying using *Erwinia caratovora* l-asparaginase as a model. *J Chem Biotechnol*, 1993, 58, 71–76.

[25] Pikal MJ, Roy ML, Shah S. Importance of freeze-dried pharmaceuticals: role of the vial. *J Pharm Sci*, 1984, 73(9), 1224–1237.

[26] NOLLET, Leo M. L.; *Handbook of food analysis*; M. Dekker, New York 1996.

[27] HART F. L.; *Análisis moderno de los alimentos*; Acribia. Zaragoza (España), 1991.

[28] Borgogna, M.; Bellich, B.; Zorzini, L.; Lapasin, R. and Cesàro, A. 2010. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*. 122(2):416-423.

[29] Desai, Kashappa Goud H. and Park, Hyun Jin. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*. 23(7):1361-1394.

[30] Fang, Zhongxiang and Bhandari, Bhesh. 2010. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*. 21(10):510-523.

[31] Anal, Anil Kumar and Singh, Harjinder. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 18:240-251.}

- [32] Lopretti, M.; Barreiro, F.; Fernandes, I.; Damboriarena, A.; Ottati C. y Olivera A. 2007. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. INNOTECH. (Publicación anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay). 2:19-23.
- [33] Gibbs, Bernard F.; Kermasha, Selim; Alli, Inteaz and Mulligan, Catherine N. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 50(3):213-224.
- [34] Draget, K.I. 2000. Alginates. In *Handbook of hydrocolloids*. (pp. 379-395). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited - Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC.
- [35] Reddy-K, Ravindra and Reddy-P., Sabitha. 2010. Effect of different co-polymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid. *International Journal of PharmTech Research*. 2(4):2198-2203.
- [36] Funami, Takahiro; Fang, Yapeng; Noda, Sakie; Ishihara, Sayaca; Nakauma, Makoto; Draget Kurt I. Nishinari, Katsuyoshi and Phillips, Glyn O. 2009. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*. 23(7):1746- 1756.
- [37] Draget, Kurt Ingar; Skjåk-Bræk, Gudmund and Smidsrød, Olav. 1997. Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*. 21(1-2):47- 55.
- [38] Helgerud, Trond; Gåserød, Olav; Fjæreide, Therese; Andersen, Peder O. and Larsen, Christian K. 2010. Alginates. In *Food stabilizers, thickeners and gelling agents*. (pp. 50-72). United Kingdom: WileyBlackwell.
- [39] Mancini, Marco; Moresi, Mauro and Rancini, Roberto. 1999. Mechanical properties of alginate gels: empirical characterisation. *Journal of Food Engineering*. 39(4):369- 378.
- [40] Soares, J.P.; Santos, J.E.; Chierice, G.O. and Cavalheiro, E.T.G. 2004. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*. 29(2):57-63.
- [41] Champagne, Claude P. and Fustier, Patrick. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(2):184-190.

[42] de Vos, Paul; Faas, Marijke M.; Spasojevic, Milica and Sikkema, Jan. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 20(4):292-302.

[43] Sanguansri, Luz and Augustin, Mary Ann. 2010. Microencapsulation in functional food product development. In *Functional food product development*. (pp. 1-23). United Kingdom: Wiley-Blackwell.

[44] Corell, P.; García-Segovia, Purificación; Sapiña, F.; Farré, I.; Castells, P. y Martínez-Monzó, J. 2007. Efecto del ión calcio sobre las propiedades texturales de esferas de alginato aplicadas a cocina. *Alimentaria*. 388:79-83.

[45] Draget, K.I. 2000. Alginates. In *Handbook of hydrocolloids*. (pp. 379-395). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited - Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC.

[46] GALLARDO Bravo, Mabel Angélica y PALOMINO Pérez, Diana Carolina. Optimización de un sistema de microextracción en fase sólida (SPME) para la determinación de analitos volátiles semivolátiles. Memoria Técnico Universitario en control de alimentos, Viña del mar, Chile; Universidad Técnica Federico Santa María, Sede viña del Mar 2010. Capítulo 1, página 7

[47] GALLARDO Bravo, Mabel Angélica y PALOMINO Pérez, Diana Carolina. Optimización de un sistema de microextracción en fase sólida (SPME) para la determinación de analitos volátiles semivolátiles. Memoria Técnico Universitario en control de alimentos, Viña del mar, Chile; Universidad Técnica Federico Santa María, Sede viña del Mar 2010. Capítulo 1, página 32

[48] Kerton, Francesca (2009). *Alternative solvents for green chemistry*. The Royal Society of Chemistry.

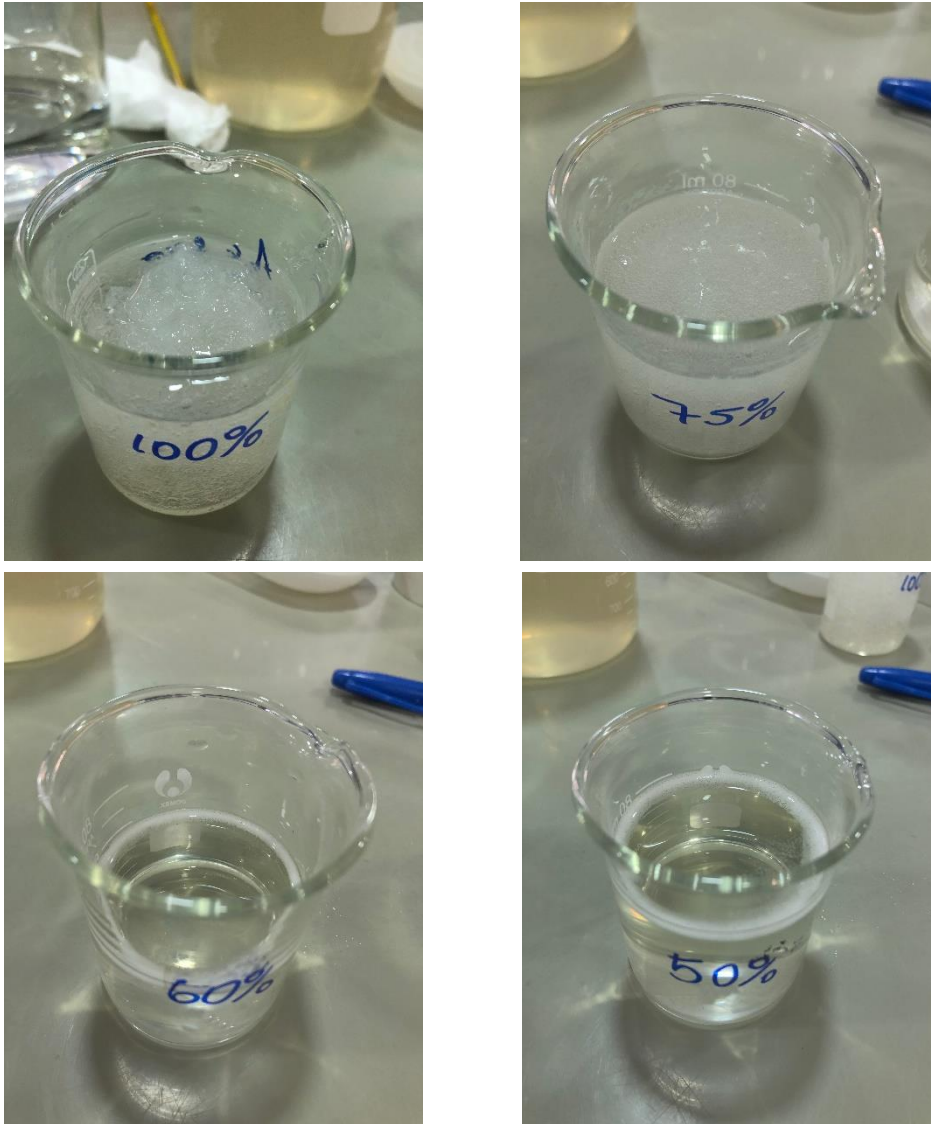
[49] Da Silva. G.P., Mack.M, Contiero. J. (2009). «Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology». *Biotechnology Advances* 27. p. 30-39

[50] Norhasyimi. R, Ahmad Zuhari. A, Abdul Rahman. M. (2010). «Recent progress on innovative and potencial technologies for glycerol transformations into fuel additives: A critical review.». *Renewable and sustainable energy reviews* 14. p. 987-1000.

- [51] PEARSON. D; Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos; Acribia, S.A. Zaragoza (España) 19
- [52] Galaz, P.; Valdenegro, M.; Ramírez, C.; Nuñez, H.; Almonacid, S.; Simpson, R. Effect of drum drying temperature on drying kinetic and polyphenol contents in pomegranate peel. *J. Food Eng.* 2017, 208, 19–27.
- [53] Valdenegro M, Almonacid S, Henríquez C, Lutz M, Fuentes L, Simpson, R. 2013. The Effects of Drying Processes on Organoleptic Characteristics and the Health Quality of Food Ingredients Obtained from Goldenberry Fruits (*Physalis peruviana*). 2: 642 doi:10.4172/scientificreports.642
- [54] Rodríguez, K.; Ah-Hen, K.S.; Vega-Gálvez, A.; Vásquez, V.; Quispe-Fuentes, I.; Rojas, P.; Lemus-Mondaca, R. Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying. *LWT Food Sci. Technol.* 2016, 65, 537–542.
- [55] Rodríguez, K.; Ah-Hen, K.; Vega-Gálvez, A.; López, J.; Quispe-Fuentes, I.; Lemus-Mondaca, R.; Galvez-Ranilla, L. Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during convective drying of murta (*Ugni molinae* T.) berries. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2014, 49, 990–1000.
- [56] Alfaro, S.; Mutis, A.; Quiroz, A.; Seguel, I.; Scheuermann, E. Effects of drying techniques on murtilla fruit polyphenols and antioxidant activity. *J. Food Res.* 2014, 3, 73–82.
- [57] Bastias-Montes, J.M.; Alarcón-Enos, J.; Quevedo-León, R.; Muñoz-Fariña, O.; Vidal-San-Martín, C. Effect of spray drying at 150, 160, and 170°C on the physical and chemical properties of maqui extract (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz). *Chil. J. Agric. Res.* 2019, 79, 144–152.
- [58] Pasin, B.; González, C.; Maestro, A. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Cienc Tecnol Alimentos* 2012, 3, 130–151.
- [59] Saénz, C.; Tapia, S.; Chávez, J.; Robert, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem.* 2009, 114, 616–622.

[60] Dubey, R.; Shami, T.C.; Bhasker Rao, K.U. Microencapsulation Technology and Applications. *Def. Sci. J.* 2009, 59, 82–95.

[61] Fanga, Z. & Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends in Food Science & Technology*, Volumen 21, pp. 510-523.

ANEXOS**ANEXO A: PRUEBAS PRELIMINARES CON METANOL**

Pruebas experimentales con diferentes concentraciones de metanol

ANEXO B: PRUEBAS PRELIMINARES CON GLICEROL



Pruebas experimentales con diferentes concentraciones de glicerol

ANEXO C: RESULTADOS DE COLOR FRUTOS ARRAYÁN

Resultados de color fruto maduro arrayán

Muestra	L* (luminosidad)	a* (- verde, + rojo)	b* (-azul, + amarillo)	C* (color)
Fruto Maduro	18,85	0,32	1,57	1,61
	19,13	1,33	2,63	2,95
	16,33	0,65	2,32	2,41
	13,03	1,67	3,11	3,53
	19,05	-0,07	1,94	1,94
Promedio	17,28	0,78	2,31	2,49
Desviación estándar	2,65	0,72	0,60	0,77

Resultados color muestra arrayán secado al horno

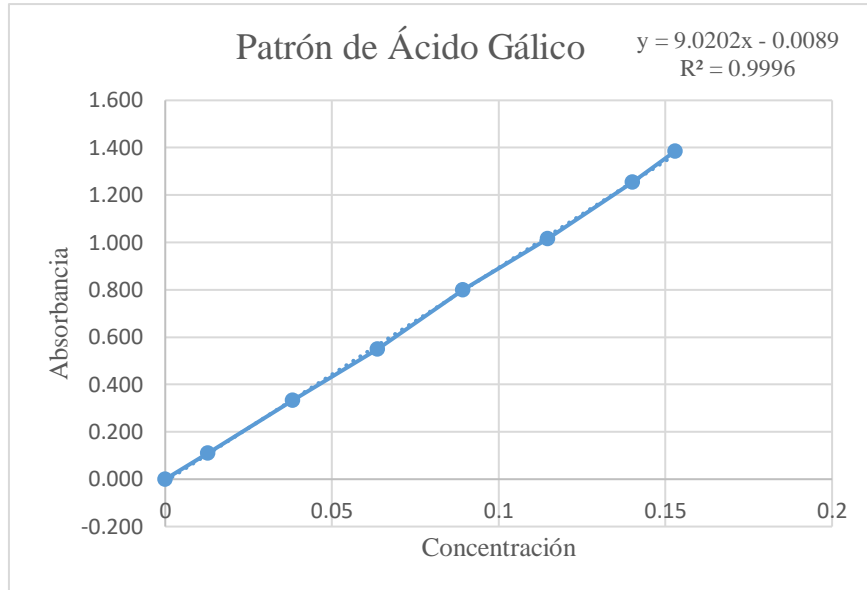
Muestra	L* (luminosidad)	a* (- verde, + rojo)	b* (-azul, + amarillo)	C* (color)
Arrayán secado horno	16,52	0,38	1,65	1,69
	13,80	0,56	1,64	1,73
	15,53	1,27	3,17	3,42
	15,96	1,6	3,47	3,82
Promedio	15,45	0,95	2,48	2,66
Desviación estándar	1,17	0,58	0,98	1,12

Resultados de color arrayán liofilizado

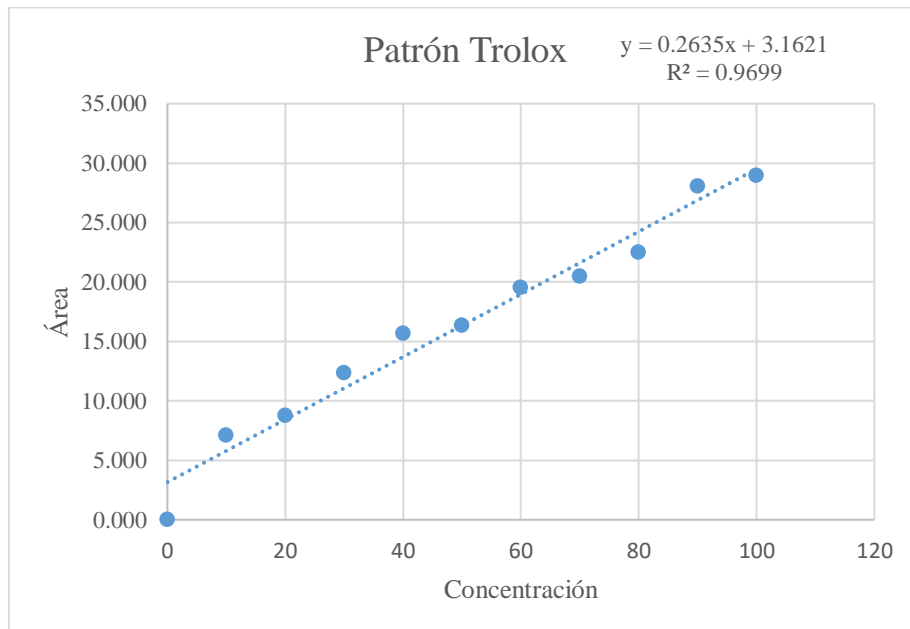
Muestra	L* (luminosidad)	a* (- verde, + rojo)	b* (-azul, + amarillo)	C* (color)
Arrayán liofilizado	23,27	11,29	-0,81	11,32
	26,77	10,88	-2,3	11,12
	35,32	5,68	1,6	8,83
	34,16	10,72	0,32	10,72
Promedio	29,88	9,64	-0,29	10,50
Desviación estándar	5,81	2,65	1,66	1,14

ANEXO D: CURVAS DE CALIBRACIÓN

Curva de calibración para Compuestos Fenólicos Totales



Curva de calibración para Actividad Antioxidante



ANEXO E: RESULTADOS DE EXTRACTOS DE ARRAYÁN

Resultados de Compuestos fenolicos totales para los métodos de secado

Muestra	Replica 1	Replica 2	Promedio	$\mu\text{mol ET/L}$	$\mu\text{mol ET/100 g}$	Promedio	Desviación estándar
Extracción L1	119.905	140.435	130.170	332.629	24.781	21.824	4.181
Extracción L2	103.800	83.845	93.822	214.404	18.868		
Extracción H1	108.707	128.490	118.598	294.992	21.387	22.888	2.122
Extracción H2	122.620	142.930	132.775	341.102	24.389		

L1: Liofilizado 1, L2: Liofilizado 2, H1: Horno 1, H2: Horno 2

Resultados de Actividad antioxidante para los métodos de secado

Muestras	Replca 1	Replca 2	Promedio	Concentración (g/L)	mg de GAE/100g	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Extracción L1	1,079	1,089	1,084	32.8816	2449,68	2.606	221,278	8,49
Extracción L2	1,032	1,038	1,035	31.3934	2762,62			
Extracción H1	0,669	0,678	0,674	20.4136	1479,99	1.539	84,611	5,49
Extracción H2	0,735	0,741	0,738	22.3727	1599,65			

L1: Liofilizado 1, L2: Liofilizado 2, H1: Horno 1, H2: Horno 2

ANEXO F: RESULTADOS DE ESFERICIDAD

Resultados del factor de esfericidad muestra con metanol

Metanol Horno 1				
Medida máxima(mm)	Medida mínima(mm)	Esfericidad	Promedio esfericidad	Desviación estándar
3,205	2,842	0,060	0,108	0,040
3,387	2,285	0,194		
3,051	2,633	0,074		
2,965	2,616	0,063		
3,480	2,994	0,075		
3,463	2,600	0,142		
3,450	2,555	0,149		
2,579	2,194	0,081		
3,461	2,805	0,105		
3,475	2,636	0,137		
3,481	2,684	0,129		
3,481	2,576	0,149		
3,490	2,985	0,078		
3,488	2,985	0,078		
3,415	2,723	0,113		

Resultados del factor de esfericidad muestra con glicerol

Horno Glicerol 2				
Medida máxima(mm)	Medida mínima (mm)	Esfericidad	Promedio esfericidad	Desviación estándar
3,510	2,944	0,088	0,088	0,0139
3,533	2,984	0,084		
3,557	2,994	0,086		
3,559	2,995	0,086		
3,567	2,996	0,087		
3,502	2,985	0,080		
3,514	2,984	0,082		
3,518	2,983	0,082		
3,548	2,753	0,126		
3,486	2,984	0,078		

Resultados del factor de esfericidad muestra con glicerol

Liofilizado Glicerol 2				
Medida máxima (mm)	Medida mínima(mm)	Esfericidad	Promedio esfericidad	Desviación estándar
3,506	2,984	0,080	0,091	0,028
3,472	2,984	0,076		
3,557	2,995	0,086		
3,552	2,994	0,085		
3,562	2,996	0,086		
3,555	2,984	0,087		
3,586	2,983	0,092		
3,481	2,456	0,173		
3,496	2,984	0,079		
3,486	2,985	0,077		
3,497	2,984	0,079		

Resultados del factor de esfericidad muestra con metanol

Liofilizado Metanol 1				
Medida máxima(mm)	Medida mínima(mm)	Esfericidad	Promedio esfericidad	Desviación estándar
3,549	2,304	0,213	0,119	0,059
3,573	2,995	0,088		
3,595	2,984	0,093		
3,526	2,280	0,215		
3,518	2,983	0,082		
3,538	2,995	0,083		
3,505	2,984	0,080		
3,494	2,985	0,079		
3,485	2,395	0,185		
3,480	2,984	0,077		

ANEXO G: RESULTADOS DE HUMEDAD ESFERAS

Resultados humedad de las esferas

Muestra	Tara	Gramos de muestra	Tara + muestra seca	Humedad (%)	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Liofilizado/ Metanol	0,3742	0,3697	0,3978	93,62	93,76	0,0020	0,21%
Liofilizado/ Metanol	0,3956	0,4064	0,4204	93,90			
Liofilizado/ Glicerol	0,3888	0,2292	0,4073	91,93	91,93	0,0000	0,00%
Liofilizado/ Glicerol	0,3765	0,3122	0,4017	91,93			
Horno/Metanol	0,3743	0,4258	0,3982	94,39	94,54	0,0021	0,22%
Horno/Metanol	0,3956	0,4459	0,4193	94,68			
Horno/Glicerol	0,3826	0,2742	0,4076	90,88	90,98	0,0013	0,15%
Horno/Glicerol	0,3925	0,2823	0,4177	91,07			

ANEXO H: RESULTADOS DE MICRO-ENCAPSULACIÓN

Resultados de Compuestos fenolicos totales de micro-cápsulas

Muestras	Replica 1	Replica 2	Promedio	Concentración (g/L)	mg de GAE/100g	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Liofilizado/ Metanol	0,220	0,218	0,219	0,2329	228,43	0,001	0,65
Liofilizado/ Glicerol	0,298	0,288	0,293	0,3149	302,89	0,007	2,41
Horno/Metanol	1,166	1,197	1,182	0,1300	125,00	0,022	1,86
Horno/Glicerol	0,265	0,265	0,265	0,2839	274,67	0,000	0,00

Resultados de Actividad antioxidante de micro-cápsulas

Muestra	Replic a 1	Replic a 2	Promedi o	μmol ET/L	μmol ET/100 g	Desviació n estándar	Coficien te de variación (%)
Liofilizado/Metanol	8394	8.588	8.491	2.022	1.984	0,1375	1,62
Liofilizado/Glicerol	14.280	14.007	14.143	4.167	4.042	0,1927	1,36
Horno/Metanol	8.304	7.879	8.092	1.870	1.807	0,3005	3,71
Horno/Glicerol	12.834	12.738	12.786	3.652	3.526	0,0679	053