



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN**  
**ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**



---

Obtención y microencapsulación de un extracto rico en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante de guayusa (*Ilex guayusa*)

---

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Peñaloza Suárez Adriana Gabriela

**Tutor:** PhD. Orestes Darío López Hernández

**Ambato - Ecuador**

**Septiembre - 2022**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

### **CERTIFICA:**

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de agosto de 2022

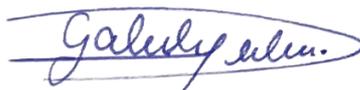
Ph.D. Orestes Darío López Hernández

**C.I. 175478486-4**

**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Adriana Gabriela Peñaloza Suárez, manifiesto que los resultados obtenidos en el Informe Final de Integración Curricular, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature reads "Adriana G. Peñaloza Suárez".

Adriana Gabriela Peñaloza Suárez

**C.I. 185004668-9**

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos docentes calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

Dr. Santiago Casado Rojo

C.I. 1759126954

**Presidente de tribunal**

---

Dra. Jaqueline de las Mercedes Ortiz Escobar

C.I. 1802171353

---

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

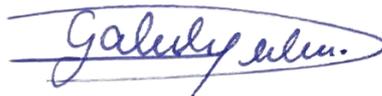
C.I. 1802706596

Ambato, 07 de septiembre del 2022

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature appears to read "Gabriela Peñaloza Suárez".

Adriana Gabriela Peñaloza Suárez

**C.I. 185004668-9**

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por ser, estar y vivir a mi lado cada una de las etapas  
que me trajeron hasta este momento.

A los compañeros y amigos, que vivieron conmigo todo  
el proceso de creación de este trabajo.

## AGRADECIMIENTO

Fue ya hace cinco años que empezó mi camino en la biotecnología, y, a pesar de que no estuvo en mis planes desde un inicio, esta carrera se convirtió en una de mis grandes pasiones. Aun cuando empecé este camino sabiendo que un día terminaría, llegar a culminar este trabajo se siente como un golpe seco contra la realidad. A lo largo de estos años he tenido momentos maravillosos y otros no tan buenos; sin embargo, a pesar de las dificultades agradezco profundamente todo lo que he aprendido en esta etapa de mi vida.

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, por nunca haber dudado de lo que podía alcanzar y siempre haberme brindado su apoyo en cada paso.

A mi tutor, Orestes López, por haber sido más que una increíble guía durante todo el proceso de la elaboración de este trabajo.

Al Dr. William Calero, por haberse convertido también en un mentor para mí durante este proceso.

A Duda, Mela, Ana, Dani, Migue, Zu y Jenny, por haber sido ese apoyo que necesité en esos momentos difíciles, y por hacer de la universidad un lugar al que quiero volver.

Y finalmente quiero agradecer a la Universidad Técnica de Ambato, por convertirse en mi segundo hogar y permitirme conocer a personas magníficas que hoy son una parte muy importante de mi vida.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO .....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1.    Antecedentes investigativos .....	1
1.1.1.    Plantas medicinales en el Ecuador.....	1
1.1.2.    Guayusa ( <i>Ilex Guayusa</i> ).....	1
1.1.2.1.    Generalidades.....	1
1.1.2.2.    Usos .....	2
1.1.2.3.    Taxonomía .....	3
1.1.2.4.    Composición química .....	4
1.1.3.    Antioxidantes .....	6
1.1.3.1.    Generalidades.....	6
1.1.3.2.    Especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo .....	6
1.1.3.3.    Papel de los antioxidantes en la salud.....	7
1.1.4.    Compuestos fenólicos .....	7

1.1.4.1.	Generalidades.....	7
1.1.4.2.	Capacidad antioxidante.....	8
1.1.5.	Microencapsulación .....	9
1.1.5.1.	Generalidades.....	9
1.1.5.2.	Microencapsulación mediante secado por aspersión .....	9
1.1.5.3.	Ventajas del secado por aspersión .....	11
1.1.5.4.	Microencapsulación de compuestos fenólicos.....	11
1.2.	Objetivos .....	12
1.2.1.	Objetivo general .....	12
1.2.2.	Objetivos específicos .....	13
1.3.	Hipótesis .....	13
1.3.1.	Hipótesis nula .....	13
1.3.2.	Hipótesis alternativa .....	13
1.4.	Variables .....	13
1.4.1.	Variables independientes.....	13
1.4.2.	Variables dependientes.....	14
CAPÍTULO II .....		15
METODOLOGÍA .....		15
2.1.	Materiales .....	15
2.1.1.	Materia vegetal .....	15
2.1.2.	Reactivos .....	15
2.1.3.	Materiales de laboratorio.....	15
2.1.4.	Equipos .....	15
2.2.	Métodos .....	16
2.2.1.	Obtención de la materia prima .....	16
2.2.2.	Pretratamiento de las hojas.....	16
2.2.3.	Secado y pulverizado las hojas de guayusa.....	16

2.2.4.	Obtención del extracto vegetal.....	16
2.2.5.	Determinación de sólidos totales del extracto.....	18
2.2.6.	Determinación de los fenoles totales.....	18
2.2.7.	Microencapsulación del extracto mediante secado por aspersión.....	18
2.2.8.	Análisis de espectrometría infrarroja .....	19
2.2.9.	Determinación de la eficiencia de microencapsulación .....	19
2.2.10.	Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	20
2.2.11.	Análisis estadístico de los datos .....	21
CAPÍTULO III.....		22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		22
3.1.	Análisis y discusión de los resultados .....	22
3.1.1.	Obtención de extractos y cuantificación de fenoles totales .....	22
3.1.2.	Microencapsulación .....	26
3.1.3.	Análisis de espectroscopia infrarroja (IFTR).....	30
3.1.4.	Evaluación de la actividad antioxidante.....	33
3.2.	Verificación de hipótesis .....	35
CAPÍTULO IV.....		36
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		36
4.1.	Conclusiones .....	36
4.2.	Recomendaciones .....	37
MATERIALES DE REFERENCIA .....		38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		38
ANEXOS.....		50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 .....	2
<i>Planta de guayusa</i> .....	2
Figura 2 .....	10
<i>Representación esquemática del mecanismo de secado por aspersión</i> .....	10
Figura 3 .....	24
<i>Diagrama de Pareto estandarizada para los compuestos fenólicos</i> .....	24
Figura 4 .....	25
<i>Gráfico de superficie de respuesta estimada</i> .....	25
Figura 5 .....	28
<i>Diagrama de Pareto estandarizada para la eficiencia de microencapsulación</i> .....	28
Figura 6 .....	29
<i>Gráfico de superficie de respuesta estimada</i> .....	29
Figura 7 .....	31
<i>Resultado de la espectrometría infrarroja de todos los microencapsulados y el extracto líquido</i> .....	31
Figura 8 .....	32
<i>Resultado de la espectrometría infrarroja del microencapsulado con mejor eficiencia</i> .....	32

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	3
<i>Usos de la guayusa</i> .....	3
Tabla 2.....	4
<i>Taxonomía de I. guayusa Loes</i> .....	4
Tabla 3.....	5
<i>Contenido total de fenoles de guayusa mediante diversos métodos de extracción</i> .....	5
Tabla 4.....	13
<i>Variables independientes en el proceso de extracción</i> .....	13
Tabla 5.....	14
<i>Variables independientes en el proceso de microencapsulación</i> .....	14
Tabla 6.....	17
<i>Tratamientos de extracción</i> .....	17
Tabla 7.....	19
<i>Tratamientos de extracción</i> .....	19
Tabla 8.....	22
<i>Compuestos fenólicos totales de cada tratamiento de extracción</i> .....	22
Tabla 9.....	26
<i>Resultados de los tratamientos de microencapsulación</i> .....	26
Tabla 10.....	34
<i>Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante in vitro</i> .....	34

## RESUMEN

Los compuestos fenólicos son moléculas bioactivas cuyas propiedades, como su capacidad antioxidante, los ha convertido en sustancias de gran interés en diferentes industrias. En los últimos años, se ha estudiado la guayusa (*Ilex guayusa*) como una fuente importante de estos compuestos. Por ello, en este estudio se determinaron las mejores condiciones de extracción, microencapsulación y la actividad antioxidante de compuestos fenólicos de hojas de guayusa. Se aplicó un diseño experimental tres al cuadrado en el cual se evaluó la concentración de disolvente (etanol) y el tiempo de extracción para optimizar la obtención de fenoles. Las mejores condiciones de extracción indicadas por el análisis de superficie fueron con etanol al 42 por ciento por un tiempo de 62 minutos. En el proceso de microencapsulación se estudiaron las variables: concentración de extracto y temperatura de entrada. Obteniendo como condiciones optimizadas de microencapsulación una concentración de 30 por ciento de sólidos del extracto a una temperatura de entrada de 150 grados centígrados. Finalmente, para la evaluación de la capacidad antioxidante se aplicó el método de DPPH, obteniendo como resultado un mayor porcentaje de inhibición para el extracto líquido que para el microencapsulado con mayor eficiencia.

**Palabras claves:** Polifenoles, secado por aspersión, extracción, DPPH, guayusa.

## ABSTRACT

Phenolic compounds are bioactive molecules whose properties, such as their antioxidant capacity, have made them substances of great interest in different industries. In recent years, guayusa (*Ilex guayusa*) has been studied as an important source of these compounds. Therefore, in this study, the best conditions for extraction, microencapsulation and antioxidant activity of phenolic compounds from guayusa leaves were determined. A three-square experimental design was applied in which the solvent concentration (ethanol) and the extraction time were evaluated to optimize the obtaining of phenols. The best extraction conditions indicated by the surface analysis were with 42 percent ethanol for a time of 62 minutes. In the microencapsulation process, the following variables were studied: extract concentration and inlet temperature. The optimized microencapsulation conditions obtained were a concentration of 30 percent solids of the extract at an inlet temperature of 150 degrees Celsius. Finally, for the evaluation of the antioxidant capacity, the DPPH method was applied, obtaining as a result a higher percentage of inhibition for the liquid extract than for the microencapsulated one with higher efficiency.

**Key words:** Polyphenols, spray drying, extraction, DPPH, guayusa.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes investigativos

#### 1.1.1. Plantas medicinales en el Ecuador

Las plantas medicinales han sido ampliamente utilizadas desde la antigüedad hasta los tiempos actuales (Salmerón-Manzano et al., 2020). En Ecuador, su uso está comúnmente distribuido en todas las provincias del país, con variaciones correspondientes a habilidades y prácticas en las teorías, creencias y experiencias autóctonas de diferentes culturas (Caballero-Serrano et al., 2019). A lo largo de los años, en el país se han documentado más de 17 000 especies de plantas vasculares (de la Torre et al., 2008); dentro de esta gran diversidad de especies vegetales, la flora ecuatoriana se ha caracterizado por una vasta presencia de plantas útiles. Siendo así que de las 5172 especies reportadas como útiles, las empleadas con fines medicinales representan el 60%, y pertenecen a más de 200 familias taxonómicas (Hill et al., 2020).

#### 1.1.2. Guayusa (*Ilex Guayusa*)

##### 1.1.2.1. Generalidades

*Ilex guayusa* conocida comúnmente como “guayusa” (o “wayusa”, en vocablo kichwa), forma parte de las más de 3100 especies de plantas con propiedades medicinales presentes en el Ecuador (Pérez et al., 2021). Es un árbol nativo amazónico (Figura 1) cuya presencia se distribuye en Ecuador, Bolivia, Perú y Colombia, especialmente en zonas cuya altitud ronda entre los 200 y 2000 m sobre el nivel del mar (Sidali et al., 2016). Es especialmente emblemático de la región amazónica ecuatoriana, donde se ha reportado históricamente su uso por diferentes comunidades indígenas principalmente en rituales (Jarrett, 2019).

## Figura 1

*Planta de guayusa*



*Nota.* En la imagen se muestra una fotografía de una planta joven de guayusa de aproximadamente 2 metros de altura. Tomada de **Krause & Ness, (2017)**.

### 1.1.2.2. Usos

El cultivo y usos de esta planta están muy relacionados con las zonas geográficas donde se encuentra presente. Esto debido a que los lugares correspondientes presentan una riqueza biológica y cultural muy alta, que de cierta forma condicionan los diversos usos a los que está destinada la guayusa (**Sidali et al., 2016**). Los usos de este arbusto nativo se extienden a varios aspectos de la vida de la población amazónica (Tabla 1), y ha trascendido a través de varias generaciones.

**Tabla 1**

*Usos de la guayusa*

Áreas de utilización	Usos específicos
<i>Alimentación</i>	Preparación de bebidas aromáticas, refrescantes y con alcohol.
<i>Materiales</i>	Infusión empleada como enjuague bucal y en baños de vapor.
<i>Social</i>	Infusión de corteza y especialmente hojas se usa como estimulante, fortificante y purificante.
<i>Medicina tradicional</i>	La infusión de sus hojas es usada para el tratamiento de varios malestares estomacales como cólicos, diarrea e indigestión. De la misma forma se usa para mitigar la depresión, mareos, estrés y dolor de cabeza.

*Nota.* Los usos expuestos fueron recopilados por **de la Torre et al., (2008)** de diferentes poblaciones étnicas.

**1.1.2.3. Taxonomía**

*I. guayusa* es una de las más de 600 especies incluidas dentro de la familia *Aquifoliaceae*, y una de los ejemplares de su género (Tabla 2) que son usadas con fines terapéuticos (**Yi et al., 2016**). Es un árbol perenne que suele presentar una altura que puede variar entre los 10 y 20 metros, con hojas de hasta 20 cm de largo y 7 de ancho (**Hill et al., 2020**).

**Tabla 2**

*Taxonomía de I. guayusa Loes*

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Filo</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Celastrales</i>
<b>Familia</b>	<i>Aquifoliaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Ilex</i>
<b>Especie</b>	<i>Ilex guayusa</i> Loes.

*Nota.* Tomada de **Sequeda et al., (2016)**.

#### **1.1.2.4. Composición química**

Se han caracterizado más de 200 compuestos presentes en las especies del género *Ilex*, entre los cuales se pueden encontrar triterpenos, esteroides, polifenoles, ésteres, ácidos carboxílicos, entre otros (**Yi et al., 2016**). *I. guayusa* en especial presenta una composición que resalta por un alto contenido de cafeína, además de otros grupos de compuestos como los triterpenos, flavonoides, compuestos fenólicos, ácidos oleanólico y ursólico, etc. (**García-Ruiz et al., 2017; Radice et al., 2017; Villacís-Chiriboga et al., 2018**).

La composición química de la guayusa rica en compuestos bioactivos ha sido asociada a algunos de los efectos que esta planta genera en el organismo. De esta manera, se ha reportado en varios estudios que extractos de hojas de guayusa presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, fungicida e incluso antiviral (**Cadena-Carrera et al., 2019; Chianese et al., 2019; Pardau et al., 2017; Villacís-Chiriboga et al., 2018**). Especialmente la actividad antioxidante y protectora contra el daño celular inducido por estrés oxidativo puede atribuirse a la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos (**Radice et al., 2017**). En referencia a estos últimos se han realizados algunos estudios en los cuales se evalúa el contenido de fenoles totales de guayusa en extractos obtenidos por diversos métodos (Tabla 3).

**Tabla 3***Contenido total de fenoles de guayusa mediante diversos métodos de extracción*

<b>TPC (mg GAE/g muestra)</b>	<b>Método de extracción</b>	<b>Condiciones de extracción</b>	<b>Fuente</b>
2,41 ± 0,05	Extracción con solventes asistida con ultrasonido	60 °C; 10 min; 80% et.	(Arteaga-Crespo et al., 2020)
2,17 ± 0,05		60 °C; 20 min; 80% et.	
388,38 ± 0,43	Maceración fría	Temp. ambiente; 30 días; 96% et.	(Cárdenas-Tavera et al., 2022)
54,39 ± 8,2		Agua; 60 min	
67, 23 ± 11,15	Infusión	Agua; 60 min	(Pardau et al., 2017)
198,36 ± 4,11		Agua; 60 min	
108, 33 ± 0,68		Agua; 60 min	
22,33 ± 0,15	Soxhlet	61 °C	(Cadena-Carrera et al., 2019)
106, 62 ± 4,41	Sonicación con solventes	60 min; 60% met + 1% formic acid	(A. García-Ruiz et al., 2007)
33,44 ± 0,48	Sonicación con solventes y agitación	30 min (son); 70% acet.; 20 min (agit, temp. ambiente)	(Villacís-Chiriboga et al., 2018)
8,81 (mg GAE/ml)	Extracción con etanol	300 rpm; 24h; temp. ambiente; 25% et.	(Utreras, 2018)
29,347 (mg GAE/ml)		300 rpm; 24h; temp. ambiente; 50% et.	
27,5066 (mg GAE/ml)		300 rpm; 24h; temp. ambiente; 70% et.	

*Nota.* En esta tabla se muestran los valores del contenido total de fenoles (TPC, por sus siglas en inglés) obtenidos en diversas investigaciones, en las cuales se emplean variados métodos de extracción. Los valores se expresan en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra y por mililitro de extracto ensayados.

### **1.1.3. Antioxidantes**

#### **1.1.3.1. Generalidades**

Los antioxidantes son sustancias naturales o sintéticas que son capaces de prevenir o disminuir la oxidación de otras moléculas al neutralizar la acción oxidante de los radicales libres ( **Anwar et al., 2018; Armstrong & Stratton, 2016**). Los compuestos antioxidantes forman parte de varios mecanismos bioquímicos, y, son ampliamente usados a nivel industrial, principalmente, en campos relacionados a la alimentación y la medicina (**Brewer, 2011; Kurutas, 2016**).

#### **1.1.3.2. Especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo**

Especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) es el término empleado para describir a un grupo de compuestos que incluyen moléculas reactivas y radicales libres que contienen oxígeno (**Gulcin, 2020**). Las ROS son producidos en consecuencia de mecanismos normales del metabolismo aeróbico, como la cadena de transporte de electrones o la oxidación de los lípidos (**Ahsan et al., 2021; Armstrong & Stratton, 2016**). Son fisiológicamente útiles en bajas concentraciones, ya que al reaccionar con moléculas como el ADN, las proteínas y los lípidos, son responsables de la activación de varias vías de señalización sensibles a redox (**Ahsan et al., 2021**).

Cuando se provoca un desequilibrio entre la formación y la capacidad de las células para eliminar los radicales libres, se genera un exceso de los mismos en el organismo, fenómeno conocido como estrés oxidativo (**Pizzino et al., 2017**). Cuando un sistema biológico presenta un excedente de ROS que causan oxidación, pueden darse como resultado procesos metabólicos anormales (**Bano et al., 2022**). En consecuencia, se señala que el estrés oxidativo contribuye significativamente a la patogenia de diferentes enfermedades humanas (**Cruz, 2013**).

### **1.1.3.3. Papel de los antioxidantes en la salud**

Los antioxidantes son inhibidores de la oxidación, por lo que presentan diversas funciones fisiológicas en el cuerpo (Aziz et al., 2019). Uno de sus roles vitales en el organismo es formar parte de los mecanismos para minimizar el daño inducido por la producción excesiva de radicales libres (Huang, 2018; Sharifi-Rad et al., 2020). Esto debido a que los compuestos antioxidantes pueden reaccionar directamente con los radicales reactivos para destruirlos, aceptando o donando electrones que eliminen directamente su estado no apareado (Vandamme & Revuelta, 2016). Además, pueden reducir indirectamente la producción de radicales libres al inhibir la eficacia o expresión de enzimas creadoras de estos, o al estimular las actividades y expresión de otras enzimas antioxidantes (Pizzino et al., 2017).

Cuando el sistema antioxidante se ve comprometido a causa del estrés oxidativo, no se garantiza la protección completa del organismo (Santos-Sánchez et al., 2019). A manera de compensación, el cuerpo puede utilizar antioxidantes de origen exógeno, los cuales han mostrado que pueden ser efectivos en la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades en las condiciones correctas (Kurutas, 2016). A consecuencia de esto, el uso de antioxidantes se ha estudiado arduamente en los últimos años, especialmente en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Anwar et al., 2018).

### **1.1.4. Compuestos fenólicos**

#### **1.1.4.1. Generalidades**

Las moléculas como los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos estructurales que tienen al menos un anillo aromático, a los que se unen uno o más grupos hidroxilo (-OH) (Galanakis, 2017). Se pueden clasificar como fenoles y polifenoles simples según el número de unidades fenólicas en la molécula, sin embargo, muchas de las veces se emplean como sinónimos los términos polifenoles y compuestos fenólicos (Watson, 2014). El término fenol

se usa para un grupo de compuestos ácidos que incluyen derivados hidroxilo de hidrocarburos aromáticos (Olszowy, 2019). Su gran variabilidad química incluye varios miles de compuestos, desde ácidos fenólicos simples hasta flavonoides complejos. Es por ello que una gran cantidad de compuestos de importancia biológica, medicamentos y productos de consumo se incluyen en esta definición (Egbuna et al., 2019).

Estos compuestos están distribuidos de manera ubicua en los tejidos vegetales (Cheynier, 2012). Son metabolitos secundarios sintetizados a través de rutas complejas como la del ácido shikímico o el fenilpropanoide; además poseen numerosas propiedades bioactivas y, aunque no son nutrientes, su ingesta dietética proporciona efectos protectores de la salud (Yahia & Carrillo-López, 2019). Desafortunadamente, es necesario considerar que ciertos tipos de procesamiento y condiciones ambientales, podrían disminuir la estabilidad, cantidad, calidad y biodisponibilidad de estos compuestos, reduciendo consecuentemente sus efectos benéficos (Albuquerque et al., 2021).

#### **1.1.4.2. Capacidad antioxidante**

Los compuestos fenólicos han demostrado varias propiedades beneficiosas *in vitro* al actuar como agentes antioxidantes (Ruskovska et al., 2020). Es debido a ello que su uso e investigación al respecto ha incrementado en los últimos años. En algunos de los estudios en los cuales se ha evaluado la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos se emplean diversas fuentes vegetales como *Bauhinia variegata* (Mishra et al., 2013); *Opuntia ficus-indica* Mill. (Andreu et al., 2018), *Polygonatum verticillatum* L. (Kumar Singh & Patra, 2018); *Vernonia cinerea* (Alara et al., 2018); *Ocimum basilicum* L. (Ahmed et al., 2019); *Thymus vulgaris* L. y *Thymus daenensis* Celak (Bistgani et al., 2019); *Physalis Peruviana* L. (Guiné et al., 2020); especies el género *Rumex* (Feduraev et al., 2022), entre otras. En estos se ha comprobado satisfactoriamente que los extractos de plantas ricos en compuestos fenólicos presentan una gran capacidad para eliminar radicales libres (Lutz et al., 2019).

Haciendo referencia específica al género *Ilex* en la literatura han destacado estudios especialmente sobre *Ilex paraguariensis* (Chianese et al., 2019; Mateos et al., 2018; Tomasi et al., 2021) e *I. guayusa* (Arteaga-Crespo et al., 2020; Cárdenas-Tavera et al., 2022; Chianese et al., 2019 ). En los cuales se ha evaluado con éxito la actividad antioxidante de extractos obtenidos por diferentes métodos y con distintos solventes.

### **1.1.5. Microencapsulación**

#### **1.1.5.1. Generalidades**

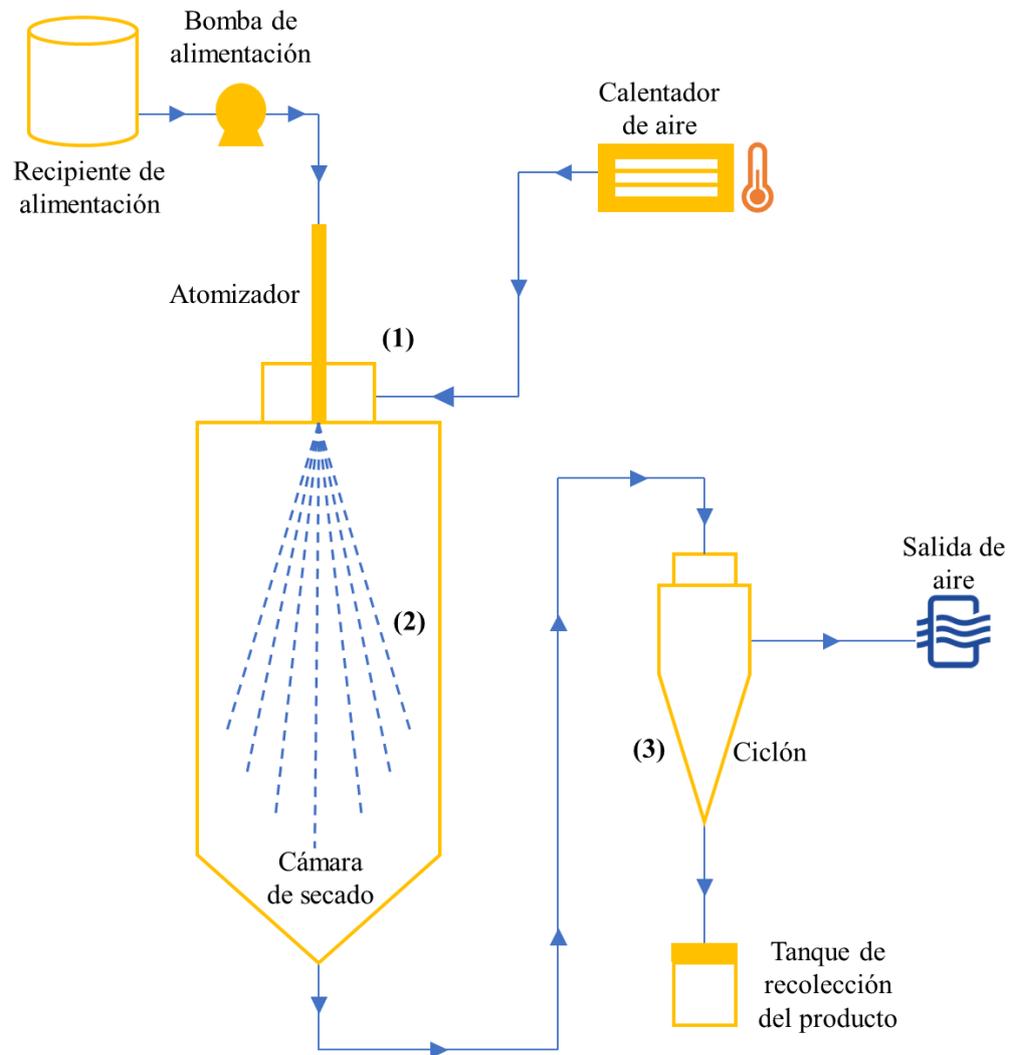
La microencapsulación es la tecnología de protección que consiste en encapsular materiales sólidos, líquidos o gaseosos en micropartículas con un diámetro de 1 a 1000  $\mu\text{m}$  (Mehta et al., 2022). Los objetivos de la microencapsulación son recubrir un compuesto activo con un agente encapsulante, también conocido como material de pared, que aislará el material activo, protegiéndolo así de cambios adversos u ocultando propiedades sensoriales (Chen et al., 2019). El aislamiento proporcionado por el material de encapsulación se romperá con la aplicación de un estímulo específico, liberando la sustancia activa en la ubicación objetivo específica o en condiciones ideales (Choudhury et al., 2021). La microencapsulación como sistema de entrega ha demostrado ser útil en una variedad de aplicaciones comerciales en muchas áreas de la industria. Las técnicas utilizadas para producir estas cápsulas van desde simples operaciones de mezcla hasta complejos sistemas de recubrimiento polimérico (Nickerson et al., 2014).

#### **1.1.5.2. Microencapsulación mediante secado por aspersion**

El secado por aspersion es un método bien conocido de producción de partículas que comprende la transformación de un material fluido en partículas secas, aprovechando un medio gaseoso de secado en caliente (Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015). El mecanismo de secado por aspersion se basa en la eliminación de la humedad utilizando una atmósfera calentada a la que se somete el producto de alimentación (Fu et al., 2020).

**Figura 2**

*Representación esquemática del mecanismo de secado por aspersión*



*Nota.* En la figura se muestra de manera general el mecanismo del secado por aspersión. (1) Atomización. (2) Conversión de gota a partícula. (3) Recolección del producto. Figura de elaboración propia adaptada de Santos et al., (2017).

El proceso puede describirse en tres fases principales: atomización, conversión de gotitas en partículas y recolección de partículas (Figura 2) (**Murugesan & Orsat, 2012; Santos et al., 2017**). Se bombea una solución a un atomizador, rompiendo la alimentación líquida en un rocío de gotas finas; luego, las gotas

se expulsan a una cámara de gas de secado donde se produce la evaporación de la humedad, lo que da como resultado la formación de partículas secas. Finalmente, utilizando un dispositivo apropiado, las partículas secas se separan del medio de secado, siendo luego recolectadas en un tanque (**Jafari & Rashidinejad, 2021**).

#### **1.1.5.3. Ventajas del secado por aspersión**

Algunas de las ventajas del secado por aspersión incluyen su capacidad para ser completamente automatizado y continuo. La tecnología es adecuada para una variedad de materiales de alimentación, siempre que sean bombeables (**Sobulska & Zbicinski, 2022**). Además, permite a los proveedores de ingredientes adaptar la funcionalidad de sus ingredientes. Se puede obtener control sobre la solubilidad del producto final en solución, así como la modificación del color. Asimismo, es atractiva la capacidad del secado por aspersión para formar una amplia gama de morfologías de partículas únicas (**Fu et al., 2020**).

El secado por aspersión se mantiene como un objetivo de estudio e innovación debido a la creciente demanda de partículas complejas con características específicas (**Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015**). Se considera un proceso tecnológico con amplio potencial ya que genera viabilidad a la producción de partículas de flujo libre con un tamaño bien definido. Además, teniendo en cuenta la capacidad de utilizar diferentes materias primas y matrices poliméricas, así como su alta productividad y amplias aplicaciones, hace que esta técnica sea cada vez más atractiva para la comunidad científica (**Santos et al., 2017**).

#### **1.1.5.4. Microencapsulación de compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos se caracterizan por su solubilidad en agua y alterarse con facilidad en respuesta a factores ambientales (**Paini et al., 2015**). Es por ello que la microencapsulación es una técnica bien conocida que se utiliza para

conservar los compuestos fenólicos atrapándolos en una matriz que preserve las funcionalidades bioquímicas (**Shaygannia et al., 2021**). La microencapsulación de extractos ricos en fenoles tiene como objetivo proteger estos compuestos bioactivos para lograr obtener algún efecto deseado (**Navarro-Flores et al., 2020**). En estos casos, el material portador debe ser de calidad y capaz de crear una barrera sólida para la protección celular (**Macías-Cortés et al., 2020**).

Bibliográficamente se han reportado varias investigaciones sobre la microencapsulación de compuestos fenólicos en diversos tipos de extractos. Algunos de ellos como el de **Akdeniz et al., (2018)** o **Desai et al., (2019)** en el que se investiga el efecto de diferentes polímeros de recubrimiento en la microencapsulación de compuestos fenólicos. De la misma forma, otros estudios evalúan la estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos posterior a los procesos de microencapsulación (**Ștefănescu et al., 2022**), o, los efectos de emplear distintas proporciones del polímero sobre la eficiencia de microencapsulación (**Sharayei et al., 2020**).

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

Obtener un extracto microencapsulado rico en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante de guayusa (*Ilex guayusa*).

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Establecer los parámetros adecuados para la obtención de un extracto rico en compuestos fenólicos a partir de hojas de *I. guayusa*.
- Determinar las condiciones adecuadas para la microencapsulación del extracto obtenido mediante secado por aspersión empleando polímeros naturales.
- Evaluar la capacidad antioxidante del extracto microencapsulado rico en compuestos fenólicos de hojas de *I. guayusa*.

## 1.3. Hipótesis

### 1.3.1. Hipótesis nula

No se obtuvo un extracto microencapsulado rico en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante de guayusa.

### 1.3.2. Hipótesis alternativa

Se obtuvo un extracto microencapsulado rico en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante de guayusa.

## 1.4. Variables

### 1.4.1. Variables independientes

- **Proceso de extracción**

**Tabla 4**

*Variables independientes en el proceso de extracción*

<b>Variables</b>	<b>Niveles</b>
<b>Concentración de etanol</b>	25%
	50%

	70%
	30 min
<b>Tiempo de extracción</b>	60 min
	90 min

- **Microencapsulación**

**Tabla 5**

*Variables independientes en el proceso de microencapsulación*

<b>Variables</b>	<b>Niveles</b>
<b>Concentración de sólidos</b>	20 % p/v
	30% p/v
<b>Temperatura de entrada</b>	140°C
	150°C

**1.4.2. Variables dependientes**

Concentración de compuestos fenólicos, eficiencia de microencapsulación, porcentaje de inhibición del radical DPPH

## **CAPÍTULO II METODOLOGÍA**

### **2.1. Materiales**

#### **2.1.1. Materia vegetal**

Hojas de guayusa (*Ilex guayusa*)

#### **2.1.2. Reactivos**

- Etanol al 96 % de pureza
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Ácido gálico
- Carbonato de sodio
- Maltodextrina
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)
- Metanol
- Agua destilada

#### **2.1.3. Materiales de laboratorio**

- Vasos de precipitación de 250 mL
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Magnetos Elicrom
- Frascos ámbar
- Papel aluminio (DIAMOND)
- Papel absorbente
- Pipetas Graduadas (5 mL-25 mL)
- Micropipetas de 100-1000  $\mu$ L y 20-200  $\mu$ L

#### **2.1.4. Equipos**

- Horno secador GANDER MTN
- Molino triturador INOX-EQUIP
- Balanza analítica Ohaus PA-313
- Balanza de humedad Kern MLS 50-3

- Plancha de calentamiento Corning PC-620D
- Refrigerador Indurama
- Espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific accuSkan Go
- Espectroscopio infrarrojo Jasco FT/IR 4100
- Computador Hp con sistema operativo Windows 10
- Mini Spray Dryer BUCHI-B290
- Rotoevaporador IKA HB10
- Software de análisis de datos estadísticos y gráficos, Statgraphics XVI64x

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Obtención de la materia prima**

La guayusa (*I. guayusa*) utilizada, se adquirió en una finca ubicada en la ciudad de Archidona ubicada a 13 kilómetros de la ciudad del Tena en la provincia de Napo. Se obtuvieron 2000 gramos de hojas secas y se colocaron en bolsas ziploc, las cuales fueron almacenadas a temperatura ambiente durante su transporte hasta su uso.

### **2.2.2. Pretratamiento de las hojas**

El material vegetal fue limpiado para eliminar residuos de tierra y otros componentes. Se realizaron cortes en las hojas para una mayor facilidad en la manipulación de las muestras.

### **2.2.3. Secado y pulverizado las hojas de guayusa**

Se realizó un proceso de secado en un horno, a 60 °C durante 8 horas para eliminar el exceso de humedad de las hojas. Se trituraron 500 gramos de hojas secas de *I. guayusa* en un molino obteniéndose un polvo, el cual se almacenó a temperatura ambiente en un recipiente hermético para evitar el contacto con la humedad.

### **2.2.4. Obtención del extracto vegetal**

Una vez obtenido el polvo de guayusa, se procedió a extraer sus compuestos bioactivos mediante soluciones acuosas de etanol, a diferentes concentraciones

(%v/v): 25, 50 y 75. Estas se ensayaron en relación 1:20 (Arteaga-Crespo et al., 2020), 7.5 g de material vegetal en 150 ml de solución a una temperatura de 70 °C (Chianese et al., 2019) y con agitación a 400 rpm. Posterior a ello se evaluó el rendimiento extracción de cada uno. Se estudió a través de un diseño experimental la influencia de los factores, concentración del disolvente y del tiempo de extracción (30, 60 y 90 min) con los tratamientos indicados en la Tabla 3.

**Tabla 6**

*Tratamientos de extracción*

<b>Interacción</b>	<b>Tratamiento</b>
A1B1	Relación 1:20, 70 °C, etanol 25%, 30 min
A1B2	Relación 1:20, 70 °C, etanol 25%, 60 min
A1B3	Relación 1:20, 70 °C, etanol 25%, 90 min
A2B1	Relación 1:20, 70 °C, etanol 50%, 30 min
A2B2	Relación 1:20, 70 °C, etanol 50%, 60 min
A2B3	Relación 1:20, 70 °C, etanol 50%, 90 min
A3B1	Relación 1:20, 70 °C, etanol 75%, 30 min
A3B2	Relación 1:20, 70 °C, etanol 75%, 60 min
A3B3	Relación 1:20, 70 °C, etanol 75%, 90 min

*Nota.* En esta tabla se muestran cada una de las condiciones empleadas en cada tratamiento de extracción.

Una vez determinado que solución de extracción tuvo mejor rendimiento, se realizó una extracción a mayor escala. Se concentró la solución en un rotavapor, a una velocidad de 230 rpm y temperatura de 68 °C. El extracto obtenido se almacenó en frascos ámbar a 4 °C (Radice & Vidari, 2007).

### 2.2.5. Determinación de sólidos totales del extracto

Una vez obtenido los extractos, se determinó humedad residual por triplicado, en una balanza de humedad. El resultado obtenido se lo determinó mediante la ecuación de determinación de sólidos totales.

$$\% SST = 100 - \% humedad$$

### 2.2.6. Determinación de los fenoles totales

La determinación de fenoles totales en los extractos se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu. El ensayo se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro de barrido UV. Se empleó el protocolo de **Arteaga-Crespo et al., (2020)** con modificaciones. Se agregó 50  $\mu\text{L}$  de cada extracto hidroalcohólico y 250  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu en tubos de 10 mL cubiertos con papel de aluminio. La mezcla se dejó reposar durante 10 min y luego se añadió 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10 %. Se completó la solución a 5 ml con agua destilada y se mezcló muy bien. Se dejó reposar durante 2h en la oscuridad a temperatura ambiente, y se registró la absorbancia a 765 nm de longitud de onda, medida frente al blanco que se preparó con 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

El contenido de fenoles totales se expresó en equivalentes gramo de ácido gálico por g de hojas de guayusa; calculado de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$TPC (g GA eq./g d.w.) = \left( \frac{Abs - c}{m} \right) \times DF_T \times \frac{V_{ext}}{m_0}$$

Donde, *Abs* es la absorbancia de la muestra a 765 nm, *m* es la pendiente y *c* es el intercepto en y de la ecuación de la curva estándar de ácido gálico, *DF<sub>T</sub>* es el factor de dilución (100), *V<sub>ext</sub>* es el volumen del extracto y *m<sub>0</sub>* es la masa inicial de material vegetal.

### 2.2.7. Microencapsulación del extracto mediante secado por aspersión

Se preparó una mezcla de extracto-maltodextrina-agua (14,7 equivalentes de dextrosa) con las cantidades establecidas para obtener un 35% de sólidos totales

de la mezcla, y se agitó con la ayuda de una varilla de agitación hasta la completa disolución del polímero.

En el siguiente proceso se utilizó el equipo Mini Spray Dryer BUCHI-B290, utilizando un flujo de aire de 600 L/h. La mezcla se alimentó a la cámara de secado con una bomba peristáltica a un caudal de 7,5 ml/min y un caudal del aspirador del 100 % (capacidad máxima). Las variables probadas fueron la temperatura del aire de entrada o de secado (140 y 150 °C) y la carga de sólidos del extracto en el microencapsulado (20 y 30 %) de acuerdo a los tratamientos mostrados en la tabla 7. Los polvos obtenidos se envasaron en bolsas ziploc y se almacenaron a en un lugar seco a temperatura ambiente.

**Tabla 7**

*Tratamientos de extracción*

<b>Interacción</b>	<b>Tratamiento</b>
A1B1	20% de sólidos, 140 °C
A1B2	20% de sólidos, 150 °C
A2B1	30% de sólidos, 140 °C
A2B2	30% de sólidos, 150 °C

*Nota.* En esta tabla se muestran cada una de las condiciones empleadas en cada tratamiento de microencapsulación.

### **2.2.8. Análisis de espectrometría infrarroja**

Se realizó un análisis de espectroscopía infrarroja tanto de los microencapsulados como el extracto líquido y la matriz polimérica empleando un espectroscopio infrarrojo Jasco FT/IR 4100.

### **2.2.9. Determinación de la eficiencia de microencapsulación**

Para la determinación de la eficiencia de microencapsulación se cuantificó el contenido de fenoles totales y superficiales de la microsfera. Para los fenoles

totales se disolvió 1 g del microencapsulado en agua, mientras que para los superficiales se empleó como disolvente etanol. Las mezclas realizadas con etanol se centrifugaron durante 5 min a 3000 rpm, para después cuantificar la cantidad de fenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu empleando el sobrenadante, y, las diluciones realizadas en agua.

Posterior a ello se evaluó la eficiencia de microencapsulación de las matrices poliméricas mediante la siguiente ecuación.

$$EE\% = \frac{CT_{agua} - CS_{etanol}}{CT_{agua}}$$

Donde:

EE% =Eficiencia de microencapsulación

CT<sub>agua</sub> = Concentración total de fenoles en la microesfera

CS<sub>etanol</sub> = Concentración de fenoles en la superficie de la microesfera

#### **2.2.10. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro***

Para este proceso se utilizó un método descrito por **Bobo-García et al., (2015)**, para lo cual se utilizó DPPH (2,2 difenil-1-picrihidracilo). Para la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de Trolox con concentraciones desde 10 hasta 500 µM. Una vez preparadas las soluciones de la curva, se prepararon también diluciones tanto del extracto líquido como el microencapsulado. En una placa de 96 pocillos, se distribuyó la ubicación de cada dilución y las soluciones de la curva añadiendo además un control (metanol) y un blanco reactivo (agua y DPPH). Para llevar a cabo la reacción se colocó en cada pocillo 20 µL de cada solución, se añadió 180 µL de reactivo DPPH y se dejó reposar durante 40 minutos. Pasado este tiempo se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 515 nm.

El cálculo de porcentaje de inhibición se realizó mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left[ 1 - \left( \frac{A_m - A_c}{A_b - A_c} \right) \times 100 \right]$$

Donde

Am= Absorbancia de la muestra

Ab= Absorbancia del blanco reactivo

Ac= Absorbancia del control

### **2.2.11. Análisis estadístico de los datos**

Los experimentos se llevaron a cabo en dos etapas. En la primera, para la evaluación de variables de extracción se utilizó un diseño  $3^2$ , ya que permite tomar en cuenta los efectos, variaciones de los diferentes factores cuantitativos para poder tomar una variable dependiente o de respuesta (**Plata et al., 2017**). En esta fase se llevaron a cabo 9 tratamientos, con mediciones de las variables cuantitativas por triplicado en cada uno. Se aplicó un análisis ANOVA para evaluar la relevancia de la influencia e interacciones de las variables independientes ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, se utilizó un gráfico de superficie para determinar las condiciones óptimas de extracción que maximizan la obtención del compuesto de interés.

En la segunda fase se evaluó las variables independientes en el proceso de microencapsulación mediante un diseño  $2^2$ , con un total de 4 tratamientos. Se evaluó la eficiencia de microencapsulación de todos los ensayos mediante un análisis ANOVA y mediante un gráfico de superficie se evaluó las condiciones óptimas de microencapsulación. Para el análisis de todos estos datos se empleó el paquete estadístico Statgraphics XVI64x.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis y discusión de los resultados

##### 3.1.1. Obtención de extractos y cuantificación de fenoles totales

Para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos se evaluó la influencia de los factores: concentración de solvente y tiempo de extracción. Del diseño experimental 3<sup>2</sup> que se aplicó, se obtuvo el contenido total de fenoles en mg equivalentes de ácido gálico por cada gramo de material vegetal empleado. En la tabla 8, se muestra la media del contenido de fenoles obtenido de cada tratamiento.

**Tabla 8**

*Compuestos fenólicos totales de cada tratamiento de extracción*

Tratamiento	Concentración de etanol (% v/v)	Tiempo de extracción (min)	TPC (mg GAE/g material vegetal)
A1B1	25	30	64,190 ± 1,155
A1B2	25	60	69, 238 ± 1,003
A1B3	25	90	72,000 ± 1,738
A2B1	50	30	80, 667 ± 2,182
A2B2	50	60	80,571 ± 3,245
A2B3	50	90	56,762 ± 1,625
A3B1	75	30	51, 714 ± 3,010
A3B2	75	60	54,476 ± 2, 106
A3B3	75	90	53,429 ± 2,339

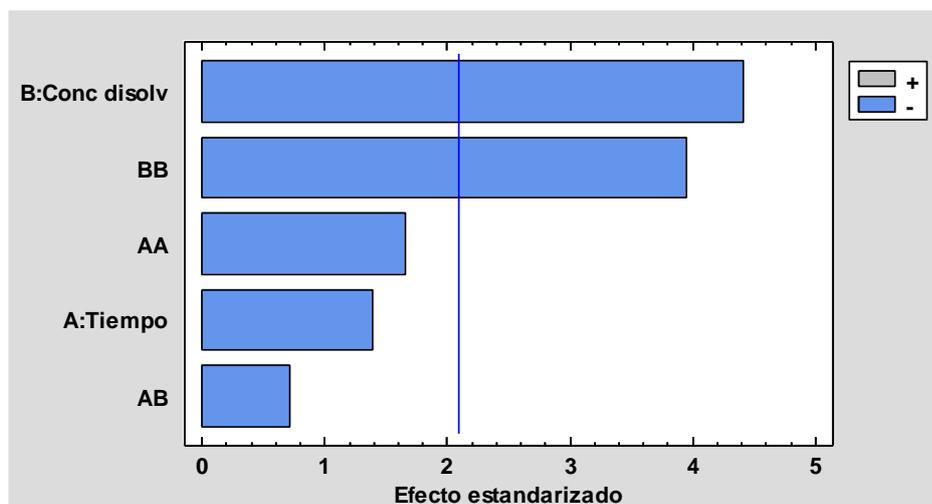
*Nota.* En esta tabla se muestra el contenido de fenoles totales determinado en cada extracto por el método de Folin-Ciocalteu, empleando una relación 1:20 material vegetal/volumen de solvente.

Como resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos de los diferentes extractos se obtuvieron valores que fluctuaron entre los  $51,714 \pm 3,010$  y los  $80,667 \pm 2,182$  mg GAE/g material vegetal. Estos valores contrastan ampliamente con valores obtenidos en otras investigaciones, en los que se obtienen cantidades que varían entre los  $2,41 \pm 0,05$  (Arteaga-Crespo et al., 2020) y los  $388,38 \pm 0,43$  mg GAE/g muestra (Cárdenas-Tavera et al., 2022). Sin embargo, se considera que las condiciones de extracción y procesamiento previo del material vegetal empleado influyen notablemente en el contenido fenólico total del producto obtenido (Tungmunnithum et al., 2018). Es así que en las plantas los fenoles pueden encontrarse ligados a las membranas/paredes celulares o libres por lo que algunos métodos de procesamiento pueden provocar la liberación de estos compuestos incrementando su disponibilidad. Asimismo, se indica que temperaturas elevadas pueden modificar la biodisponibilidad de los fenoles, mientras que el procesamiento térmico puede tener efectos negativos sobre estos compuestos bioactivos disminuyendo así su cantidad (Minatel et al., 2017).

Una vez obtenido el contenido fenólico, se realizó un análisis estadístico de los datos. Las figuras 2 y 3, muestran el efecto estandarizado y la superficie de respuesta de los factores evaluados, respectivamente. La figura 2, muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño además traza una línea de referencia para indicar los efectos que son estadísticamente significativos (Burstein, 2015). De acuerdo a ello, el tiempo de extracción no es un factor determinante del contenido fenólico, a diferencia de la concentración de disolvente que presenta un efecto de significancia estadística sobre esta variable. De la misma forma, la tabla ANOVA (Anexo 4) particiona la variabilidad de Polifenoles en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces, prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. Mostrando así que, en este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

**Figura 3**

*Diagrama de Pareto estandarizada para los compuestos fenólicos*



*Nota.* En el gráfico se observa el efecto de los factores que influyen en la extracción de los compuestos fenólicos de acuerdo al diseño experimental empleado. Donde AA y BB, con las interacciones cuadráticas de cada factor, y, AB la interacción entre los dos factores. Obtenido de Statgraphics.

El análisis estadístico muestra claramente que el factor determinante de la concentración final de fenoles es la concentración de disolvente empleado. En referencia a ello, un estudio previo en el cual se optimiza la extracción de fenoles de *Ilex kudingcha* concluye que, al aumentar la concentración etanólica, el contenido de polifenoles incrementa; sin embargo, concentraciones superiores al 70 % de etanol provocan una disminución del contenido de TPC (Sun et al., 2011). En esa misma línea, en un estudio en el cual se analiza el impacto de seis disolventes diferentes en el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides de seis plantas medicinales sudanesas, se encontró que la mayor concentración de compuestos fenólicos se obtuvo en los extractos de EtOH al 50 %, EtOH al 70 % y acetona (Dirar et al., 2019). Mientras que en el estudio de Lohvina et al., (2022) se obtuvo la mejor extracción de compuestos fenólicos con etanol al 50 %.

**Figura 4**

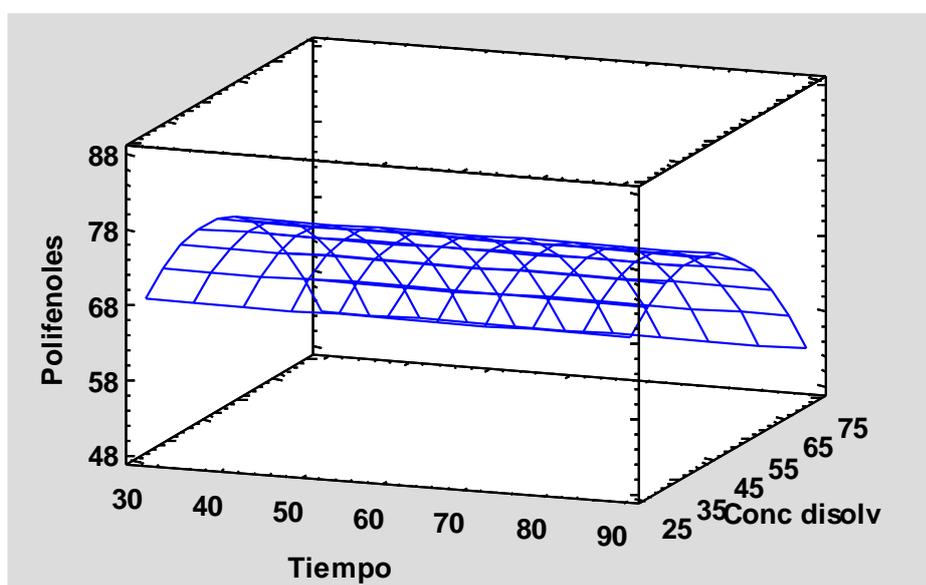
*Gráfico de superficie de respuesta estimada*

**Optimizar Respuesta**

Meta: maximizar Polifenoles

Valor óptimo = 73,899

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Tiempo	30,0	90,0	62,1354
Concentración disolvente	25,0	75,0	41,9326



*Nota.* El gráfico muestra la influencia de cada uno de los factores de extracción sobre el contenido de fenoles totales en los extractos y las condiciones óptimas de extracción sugeridas por el paquete estadístico para optimizar la cantidad de fenoles extraídos.

La figura 3 muestra la superficie de respuesta, la cual típicamente es utilizada para modelar y analizar un proceso en el que la respuesta de interés se ve afectada por diversas variables, y, el objetivo de este método es optimizarla (Aydar, 2018). En función de los indicado, se muestra la influencia del tiempo de extracción y concentración de disolvente sobre el contenido fenólico de los extractos. Además, e presentan las condiciones de optimización del proceso, siendo estas un tiempo de 62 minutos con una concentración de etanol aproximada del 42 %.

### 3.1.2. Microencapsulación

La eficiencia de microencapsulación es el criterio más importante para evaluar si el extracto se ha encapsulado correctamente. Esta se puede ver determinada por varios factores, entre ellos se puede destacar principalmente las temperaturas tanto de entrada como de salida del proceso, ya que estas dependen de, la termosensibilidad de los compuestos de interés como de la humedad que se busca en el producto final, respectivamente (Macías-Cortés et al., 2020). Asimismo, la microencapsulación depende en gran medida del polímero empleado y la concentración del mismo en la solución (Chen et al., 2019).

En este estudio, para los procesos de microencapsulación se ensayaron cuatro tratamientos, en los cuales se evaluó el efecto de la carga de sólidos en las microesferas y la temperatura de entrada o de secado. En la tabla 9 se evidencia los resultados obtenidos para el rendimiento del proceso y la eficiencia de microencapsulación. Esta última determinada a partir de la cuantificación de fenoles totales y los fenoles superficiales presentes en las microesferas.

**Tabla 9**

*Resultados de los tratamientos de microencapsulación*

Tratamiento	Carga de sólidos	Temperatura de entrada	Rendimiento (%)	Eficiencia de microencapsulación (%)
A1B1	20 %	140 °C	77,637	96,073 ± 0,153
A1B2		150 °C	81,971	96,468 ± 0,111
A2B1	30 %	140 °C	82,013	97,155 ± 0,041
A2B2		150 °C	84,936	97,615 ± 0,007

*Nota:* En esta tabla se muestra el rendimiento y la eficiencia de microencapsulación de cada tratamiento; expresados en porcentajes de, peso del microencapsulado por peso de sólidos totales de la mezcla, y, fenoles superficiales totales por fenoles totales, respectivamente.

Si bien la microencapsulación de fenoles de guayusa no es un tema del cual se han realizado investigaciones previas, existen varios estudios sobre microencapsulación de compuestos fenólicos de otras especies vegetales. Siendo uno de los casos la microencapsulación de fenoles de orujo de cereza agria, en el cual se obtuvieron eficiencias de microencapsulación superiores al 69 % empleando una mezcla de maltodextrina y goma arábica (Cilek et al., 2012). Akdeniz et al., (2018) en su estudio de microencapsulación de compuestos fenólicos de piel de cebolla indica que la eficiencia varía entre 55,64 y 89,15 % de acuerdo a las diferentes combinaciones de materiales encapsulantes. Del mismo modo, en un estudio de microencapsulación de extractos de hojas de *Vaccinium* se obtuvieron eficiencias superiores al 79 %, empleando como polímero maltodextrina al 80% (Ștefănescu et al., 2022).

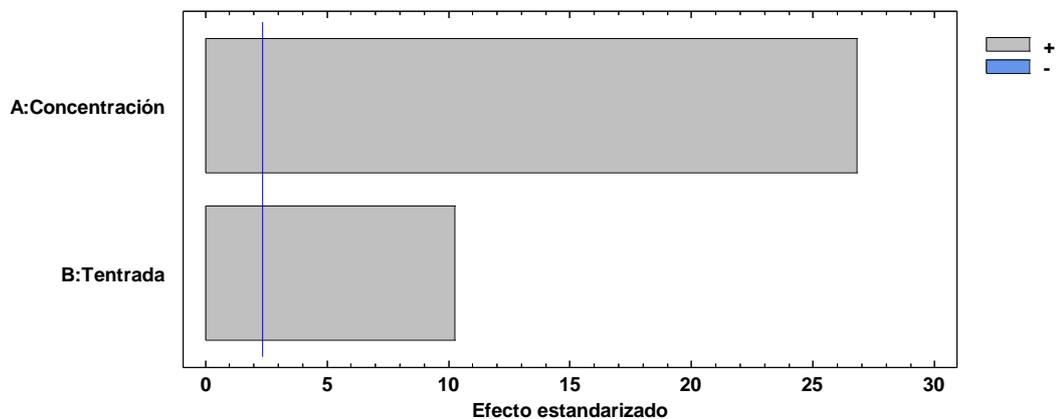
Considerando que la obtención de valores superiores de eficiencia se ven influenciados principalmente por la concentración y las características del material de pared, así como por las condiciones del secado por aspersión (Mehta et al., 2022), y, en concordancia con los datos expuestos, la obtención de una eficiencia de microencapsulación superior al 75 % es prometedora. Siendo así, los valores obtenidos de eficiencia de microencapsulación del extracto rico en compuestos fenólicos de guayusa (Tabla 9), siendo superiores al 96 %, son más altos que los expuestos en las investigaciones previas.

Se realizó un análisis estadístico para evaluar los efectos de las variables concentración de sólidos y temperatura de entrada en los microencapsulados resultantes. Para ello se empleó un diseño experimental  $2^2$ , del cual se obtuvieron los gráficos presentados en las figuras 4 y 5. De acuerdo al análisis de varianza (Anexo 5) obtenido para las eficiencias de microencapsulación se observa una diferencia significativa entre los tratamientos ensayados. Otros de los parámetros estadísticos como el R-Cuadrado indica que el modelo, así ajustado, explica 99,17 % de la variabilidad en Eficiencia de microencapsulación. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 98,69 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es

0,0720483 y el error medio absoluto (MAE) de 0,0475278 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0 %, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0 %.

**Figura 5**

*Diagrama de Pareto estandarizada para la eficiencia de microencapsulación*



*Nota.* En este gráfico se observa el efecto de los factores que influyen en el proceso de microencapsulación de acuerdo al diseño experimental empleado. Donde, la interacción entre los dos factores se excluyó ya que no presentó efecto significativo. Obtenido de Statgraphics.

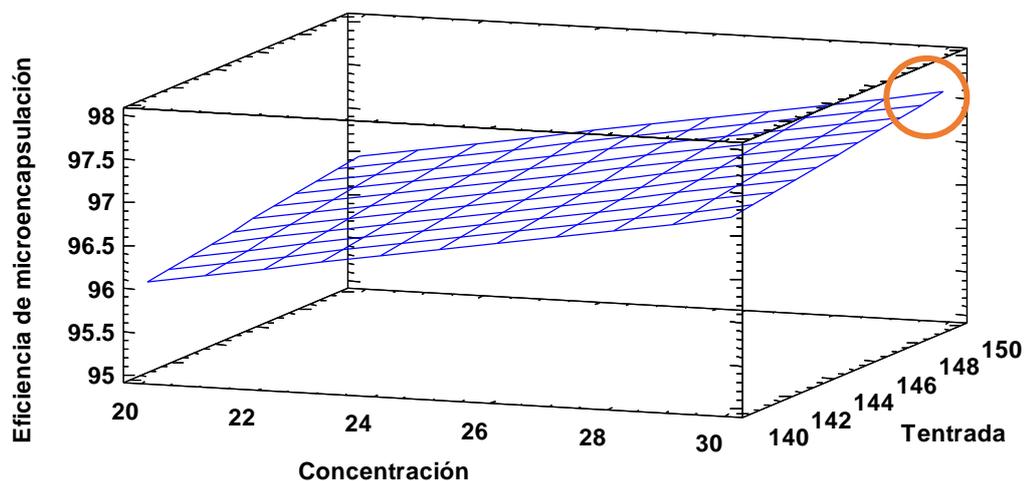
En las figuras 5 y 6, se muestran el diagrama de Pareto estandarizado para la eficiencia de microencapsulación y el gráfico de superficie estimada, respectivamente. De acuerdo a lo que se muestra en la figura 5, tanto la concentración de sólidos en las microesferas como la temperatura de entrada muestran efectos significativos sobre la eficiencia de microencapsulación. Sin embargo, es principalmente la concentración la que juega un papel más relevante sobre la variable dependiente.

En estudios previos se ha evaluado la influencia de diversos factores del proceso de secado por aspersion sobre la eficiencia de microencapsulación. En una investigación

sobre la microencapsulación de aceite de café, los resultados mostraron que la eficiencia se ve influenciada significativamente tanto por el contenido de sólidos como por la temperatura de entrada; sin embargo, el contenido de sólidos generaba un incremento de la misma que podría estar relacionado con la viscosidad de la solución y el tamaño de las gotas (Frascareli et al., 2012). De igual forma se indica que a mayor cantidad de sólidos se reduce el porcentaje de humedad de los productos finales, debido a la reducción en el contenido total de agua en la muestra (Choudhury et al., 2021).

**Figura 6**

*Gráfico de superficie de respuesta estimada*



*Nota.* El gráfico muestra la influencia de cada uno de los factores ensayados en la microencapsulación y las condiciones adecuadas que optimizan este proceso para obtener una mayor eficiencia de microencapsulación.

De acuerdo a lo mostrado en la figura 6, las condiciones óptimas de microencapsulación corresponden al cuarto tratamiento, en el cual se empleó un porcentaje de sólidos del extracto del 30 % y una temperatura de entrada de 150 °C. Si bien, la temperatura de entrada no muestra el efecto más significativo sobre la variable dependiente, hay que tener en cuenta que la carga térmica del gas de secado refleja su capacidad para secar las gotitas atomizadas húmedas y, por lo tanto, las

temperaturas de entrada más altas permiten tasas de evaporación de solventes más elevadas, que modifican a su vez otras condiciones que afectan el producto final. Debido a ello, se debe hacer una sabia elección de la temperatura de entrada, balanceada con estos factores, de acuerdo con las propiedades de la materia prima **(Santos et al., 2017)**.

Es importante mencionar que la humedad del polvo resultante es indicativo de una operación de secado satisfactoria, ya que mientras menor sea la cantidad de agua en el polvo, este puede ser adecuado para ser almacenado por mayor tiempo **(Ozdikicierler et al., 2014)**. La humedad de los polvos obtenidos de los cuatro tratamientos no superó el 4,68 %, resultados concordantes con la humedad relativa correspondiente a las temperaturas empleadas en el gráfico psicrométrico.

### **3.1.3. Análisis de espectroscopia infrarroja (IFTR)**

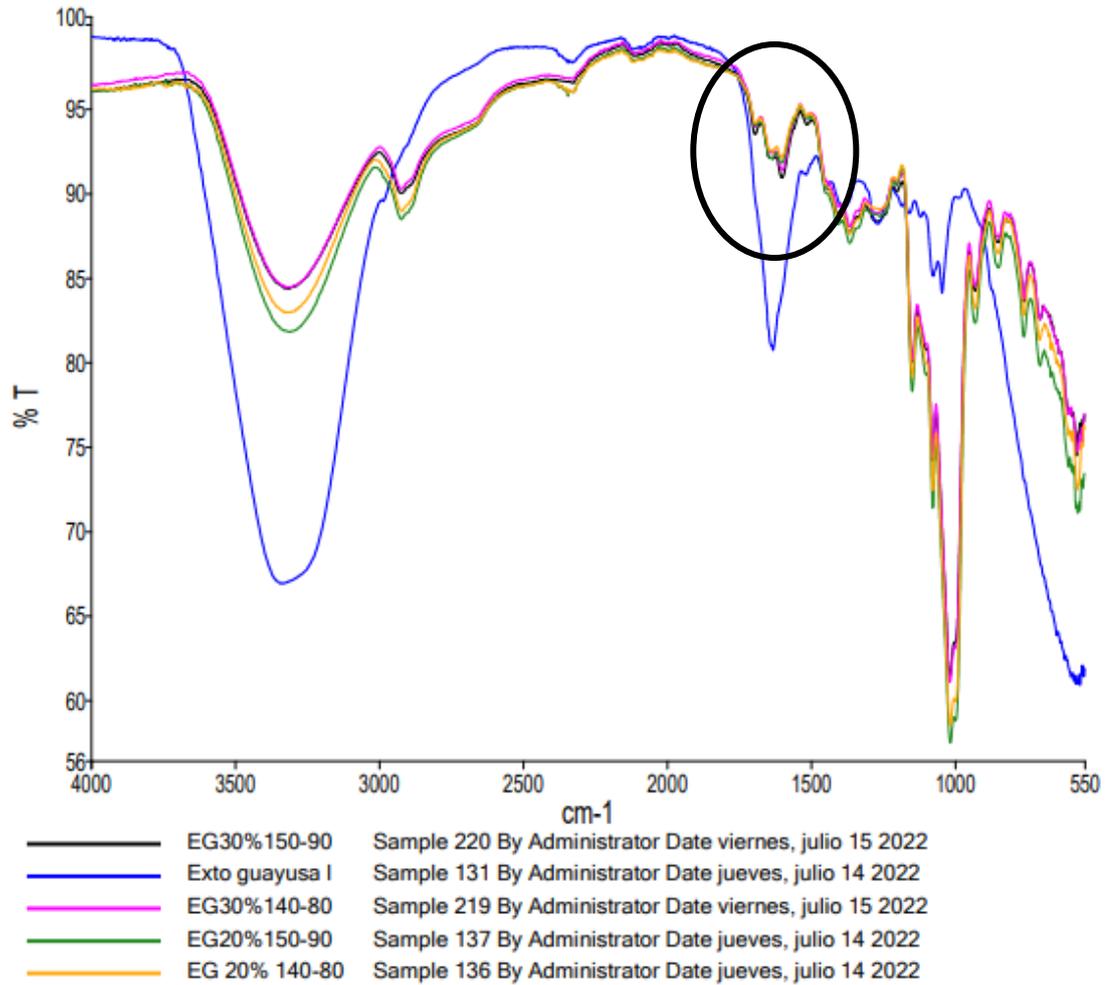
La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) utiliza la transformada de Fourier para traducir los datos sin procesar (patrón de interferencia) en el espectro real. Es una técnica que se utiliza para obtener el espectro infrarrojo de absorción, emisión y fotoconductividad de sólidos, líquidos y gases **(Azad, 2015)**. El espectro FTIR consta de picos de absorción que corresponden a las frecuencias de vibración entre los enlaces de los átomos en la partícula. Es una técnica excelente para el análisis cualitativo; la intensidad máxima es una indicación directa de la naturaleza de los materiales presentes **(Hussain, 2020)**.

En esta investigación se realizó el análisis de espectroscopia infrarroja utilizando un espectroscopio infrarrojo Jasco FT/IR 4100. Se analizó tanto la matriz polimérica empleada como el extracto líquido y cada uno de los tratamientos de microencapsulación. De este estudio se obtuvo los espectros presentados en las figuras 6 y 7. En la figura 7, se analizó los microencapsulados y el extracto líquido de guayusa. Como se puede observar, no se aprecia una diferencia significativa entre los espectros correspondientes a los microencapsulados. Sin embargo, el extracto líquido evidencia

ciertos picos sobresalientes, que son los correspondientes a los compuestos presentes en el mismo.

### Figura 7

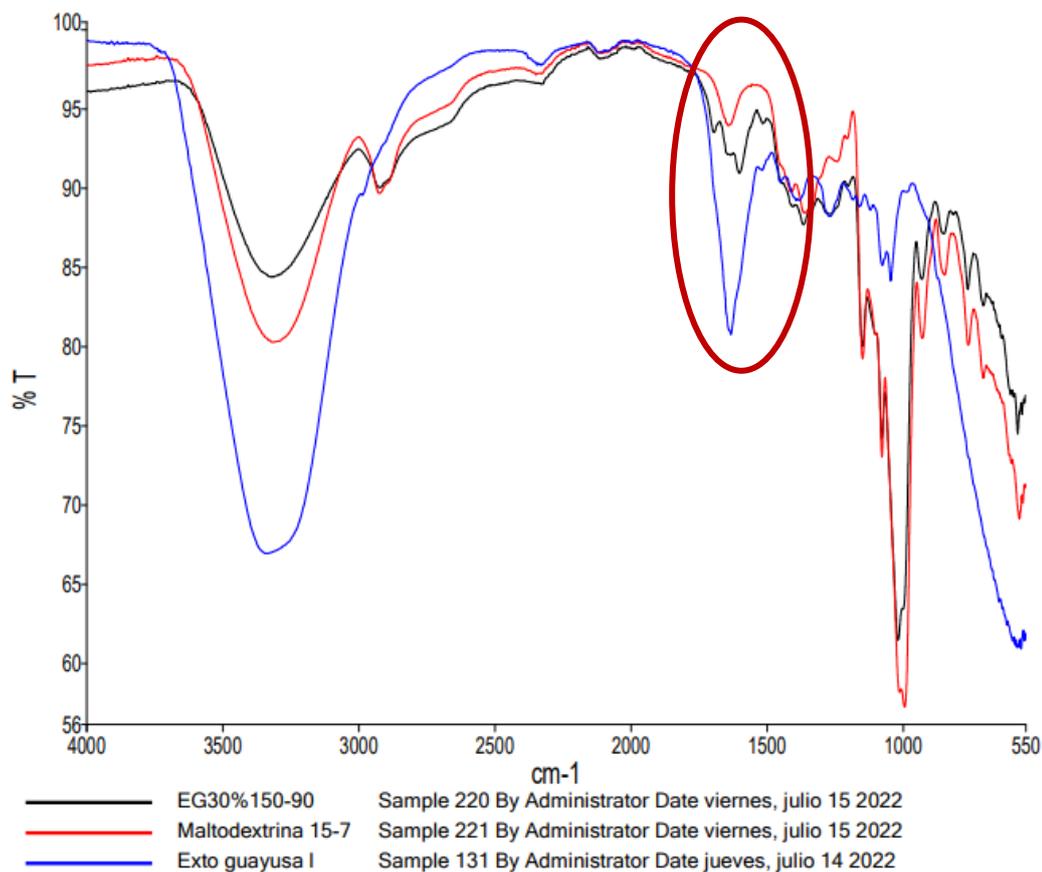
*Resultado de la espectrometría infrarroja de todos los microencapsulados y el extracto líquido*



*Nota.* En esta figura se puede observar los espectros obtenidos para cada uno de los microencapsulados junto al extracto líquido de guayusa.

**Figura 8**

*Resultado de la espectrometría infrarroja del microencapsulado con mejor eficiencia*



*Nota.* En la figura se muestra la comparación de los espectros obtenidos del tratamiento con 30 % de carga y 150 °C de temperatura de entrada, la maltodextrina y el extracto líquido de guayusa.

FTIR es un método útil para detectar la formación de complejos de inclusión, que se revelan por cambios en los espectros infrarrojos, como la reducción, desaparición o desplazamiento de las bandas de absorción, debido a interacciones intermoleculares débiles (Ozdikicierler et al., 2014). De manera específica, los espectros del extracto líquido y los microencapsulados mostraron bandas específicas asociadas con compuestos fenólicos. Los picos que rondan alrededor de 1600  $\text{cm}^{-1}$  (Anexos 6-10) se debieron a la vibración de estiramiento C=C del anillo aromático fenólico y las vibraciones de flexión C-H de los grupos CH (Escobar-Avello et al., 2021).

Como se muestra en la figura 8, el espectro del microencapsulado es mucho más cercano al espectro de la matriz polimérica, que al del extracto líquido. De esta manera, se indica que los sólidos del extracto se encuentran incorporados con el polímero. Igualmente, las semejanzas presentes entre estos dos espectros mencionados se deben a los compuestos bioactivos residuales presentes en la superficie de las microesferas. Dado que esta técnica permite identificar los grupos funcionales característicos a partir de las bandas espectrales para conocer la conjugación entre el nanomaterial y las biomoléculas adsorbidas (Pandey et al., 2015), se observó un claro desplazamiento de las bandas características en el extracto líquido, demostrando que posterior al proceso de microencapsulación las moléculas, como los polifenoles, se encuentran inmersos en el material encapsulante.

#### **3.1.4. Evaluación de la actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a la capacidad de capturar radicales libres, donando átomos de hidrógeno, electrones o quelatos de cationes metálicos (Lutz et al., 2019). Es importante recordar que las estructuras moleculares, particularmente el número y posiciones de los grupos hidroxilo, y la naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos, es lo que confiere a los compuestos fenólicos la capacidad de inactivar radicales libres. Los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo adyacentes (o-difenol), ubicado en varias posiciones de los anillos A, B y C, los dobles enlaces del anillo bencénico y el doble enlace de la función oxo ( $-C=O$ ) de algunos flavonoides, proporcionan a estos compuestos su alta actividad antioxidante (Galanakis, 2015). En esta investigación para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del extracto rico en compuestos fenólicos se empleó el ensayo de DPPH. Este se aplicó tanto para el extracto líquido como para el microencapsulado. Los resultados obtenidos se expresan con porcentaje de inhibición del radical DPPH y se presentan en la tabla 10.

**Tabla 10**

*Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante in vitro*

<b>Tratamiento</b>	<b>Factor de Dilución</b>	<b>% de Inhibición</b>	<b>μmol E. Trolox L<sup>-1</sup></b>
Extracto líquido	100	84,408 ± 0,416	44 536,578 ± 216,088
A2B2		74,050 ± 0,496	39 155,733 ± 257,594

*Nota.* En esta tabla se muestra el porcentaje de inhibición del radical DPPH obtenida para el mejor tratamiento de microencapsulación y el extracto líquido de guayusa.

El porcentaje de inhibición obtenido para el extracto líquido es mayor al obtenido con el microencapsulado, considerando que se ajustó la cantidad de sólidos totales de ambos para que la relación sea comparable. Sin embargo, a pesar de la diferencia, se aprecia que ambos presentan un porcentaje de inhibición superior al de otras investigaciones reportadas, como la de **Tolun et al., (2016)**, en la que se obtuvieron porcentajes no superiores al 30 % de inhibición en compuestos fenólicos de uva. De manera similar, en un estudio sobre microencapsulación de fenoles recuperados de lías de vino, se obtuvo porcentajes de inhibición entre 27 y 36 % para microencapsulados con eficiencias que variaron entre 65,5–94,2 % (**Ricci et al., 2022**).

Considerando la susceptibilidad de los fenoles a las condiciones extrínsecas en otros estudios se encontró que la capacidad antioxidante del extracto líquido era mayor que la actividad antioxidante de las microcápsulas, sin embargo, la diferencia al no ser tan alta no se considera significativa (**Akdeniz et al., 2018; Edrisi Sormoli & Langrish, 2016**). **Ferreira et al., (2022)** indica que la mayor actividad antioxidante del extracto crudo en relación a la micropartícula se justifica debido a una disminución de compuestos fenólicos después del proceso de secado, lo que consecuentemente también redujo la actividad antioxidante del microencapsulado.

Si bien, de manera general la actividad antioxidante de los microencapsulados resulta menor a la de los extractos líquidos y secos, a largo plazo se considera es una mejor opción para la conservación de las propiedades físicas y químicas de los compuestos (**García-Gurrola et al., 2019**). Ya que de esta manera se puede preservar la estabilidad de los mismos, incrementando su vida útil, en condiciones normales de almacenamiento (**Gabbay-Alves et al., 2018**). En función de esto, se considera importante recordar que la proporción de fenoles a maltodextrina afecta la cantidad de fenoles en la superficie de la microcápsula. Cuanto menor sea la cantidad de compuestos fenólicos en las superficies de las microcápsulas, mayor será la estabilidad de las mismas. Las altas proporciones de material de recubrimiento pueden garantizar una estabilidad de almacenamiento más prolongada del material del núcleo (**Çam et al., 2014**).

### **3.2. Verificación de hipótesis**

$H_0 \neq 0$  Se rechaza la hipótesis nula.

$H_a = 0$  Se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que si se obtuvo y se microencapsuló el extracto rico en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante de guayusa.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

- Los extractos de *I. guayusa* ensayados presentaron un contenido de compuestos fenólicos superior a otros obtenidos en investigaciones similares. La cantidad de fenoles se vio levemente afectada por los procesos térmicos, como la evaporación del solvente y la microencapsulación. Sin embargo, tanto los microencapsulados como el extracto concentrado presentaron una actividad antioxidante equivalente mayor a  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Trolox.
- Se establecieron los parámetros adecuados de extracción de compuestos fenólicos de guayusa. De los nueve tratamientos ensayados se obtuvo los efectos de cada uno de las variables independientes de extracción, y se optimizó el proceso mediante un análisis de superficie. De ello se obtuvo que las condiciones óptimas consideradas para optimizar la cantidad de fenoles obtenidos corresponden a una concentración de etanol al 41,93 % durante un tiempo de 62 minutos. Donde el factor más influyente en el contenido de fenoles totales fue la concentración del disolvente.
- De los cuatro ensayos de microencapsulación evaluados las mejores condiciones correspondieron a 30 % de carga de la partícula y una temperatura de entrada de  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ . La eficiencia de microencapsulación se vio influenciada principalmente por la concentración de sólidos del extracto presentes en las microesferas. Mientras que la temperatura no se consideró como un factor totalmente determinante del proceso.
- El extracto microencapsulado exhibió una capacidad antioxidante menor a la del extracto líquido de guayusa. Considerando que los procesos empleados para la obtención del microencapsulado final implican temperaturas elevadas, se asume que la concentración de compuestos fenólicos se ve comprometida debido a ello afectando consecuentemente la capacidad antioxidante. Sin embargo, la microencapsulación continúa siendo una alternativa viable para la preservación de la estabilidad de los compuestos a largo plazo.

#### **4.2. Recomendaciones**

- Realizar la evaluación de la actividad antioxidante mediante otros métodos tanto *in vitro* como *in vivo*.
- Evaluar otras metodologías de extracción alternativas empleando diversos solventes de manera que se pueda maximizar el contenido total de fenoles en los extractos finales.
- Comparar otros factores que influyen en el proceso de microencapsulación como la temperatura de salida y mezclas de polímeros, además de emplear más niveles de cada variable, con el fin de determinar de manera más fiable el efecto de cada una de ellas sobre las características del producto final.
- Aplicar estudios de estabilidad y biodigestibilidad de los microencapsulados para evaluar el efecto del proceso de secado por aspersión sobre la estabilidad y disponibilidad de los compuestos.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, A. F., Attia, F. A. K., Liu, Z., Li, C., Wei, J., & Kang, W. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.07.004>
- Ahsan, H., Hasan, M., & Ahmad, R. (2021). Reactive Oxygen Species (ROS) in the Pathophysiology of Rheumatoid Arthritis (RA). In *Reactive Oxygen Species [Working title]*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101333>
- Akdeniz, B., Sumnu, G., & Sahin, S. (2018). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from onion (*Allium cepa*) skin. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(7). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13648>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2018). Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 11, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.07.003>
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A. 8., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food and Function*, 12(1), 14–29. <https://doi.org/10.1039/d0fo02324h>
- Anandharamakrishnan, C., & Ishwarya, S. P. (2015). *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation*.
- Andreu, L., Nuncio-Jáuregui, N., Carbonell-Barrachina, Á. A., Legua, P., & Hernández, F. (2018). Antioxidant properties and chemical characterization of Spanish *Opuntia ficus-indica* Mill. cladodes and fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1566–1573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8628>
- Anwar, H., Hussain, G., & Mustafa, I. (2018). Antioxidants from natural sources. In *Antioxidants in Foods and its Applications* (1st ed., p. 178). IntechOpen.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.75961>

- Armstrong, D., & Stratton, R. (2016). *Oxidative Stress and Antioxidant Protection* (1st ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Arteaga-Crespo, Y., Radice, M., Bravo-Sanchez, L. R., García-Quintana, Y., & Scalvenzi, L. (2020). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon*, 6(1), 0–7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>
- Aydar, A. Y. (2018). Utilization of response surface methodology in optimization of extraction of plant materials. In V. Silva (Ed.), *Statistical Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73690>
- Azad, A. K. (Ed.). (2015). *Advances in clean energy technologies* (Vol. 7, Issue 1). Academic Press.
- Aziz, M., Diab, A., & Mohammed, A. (2019). Antioxidant categories and mode of action. In *Antioxidants*. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- Bano, A., Gupta, A., Rai, S., Fatima, T., Sharma, S., & Pathak, N. (2022). Mechanistic role of reactive oxygen species and its regulation via the antioxidant system under environmental stress. In *Plant Stress Physiology*.
- Bistgani, Z. E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., & Morshedloo, M. R. (2019). Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 135, 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.055>
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food And*, 95(1), 2014–2209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>

- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221–247. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
- Burstein, L. (2015). *MATLAB® in quality assurance sciences* (1st ed.). Woodhead Publishing.
- Caballero-Serrano, V., McLaren, B., Carrasco, J. C., Alday, J. G., Fiallos, L., Amigo, J., & Onaindia, M. (2019). Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00524. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00524>
- Cadena-Carrera, S., Tramontin, D. P., Cruz, A., Cruz, R. C., Müller, J. M., & Hense, H. (2019). Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol as cosolvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104543>
- Çam, M., İçyer, N. C., & Erdoğan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.011>
- Cárdenas-Tavera, C. F., Castañeda-Villate, J. C., Hernández-Roa, M. J., Rodríguez-Aguirre, O. E., Borrego-Muñoz, P., & Pombo-Ospina, L. M. (2022). High polarity extracts obtained from *Ilex guayusa* Loes. leaves, exhibit antioxidant capacity. *Vitae*, 29(1), 1–10. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v29n1a347297>
- Chen, L., Gnanaraj, C., Arulselvan, P., El-Seedi, H., & Teng, H. (2019). A review on advanced microencapsulation technology to enhance bioavailability of phenolic compounds: Based on its activity in the treatment of Type 2 Diabetes. *Trends in Food Science and Technology*, 85(January), 149–162. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.026>
- Cheyrier, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2–3), 153–177. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>
- Chianese, G., Golin-Pacheco, S. D., Tagliatalata-Scafati, O., Collado, J. A., Muñoz, E., Appendino, G., & Pollastro, F. (2019). Bioactive triterpenoids from the

- caffeine-rich plants guayusa and maté. *Food Research International*, 115, 504–510. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.005>
- Choudhury, N., Meghwal, M., & Das, K. (2021). Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. *Food Frontiers*, 2(4), 426–442. <https://doi.org/10.1002/fft2.94>
- Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., & Sumnu, G. (2012). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: Effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, 235(4), 587–596. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1786-8>
- Cruz, A. P. S. (2013). Antioxidant Nutraceuticals Preventive and Healthcare Applications. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- de la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. In *Herbario QCA & Herbario AAU* (1st ed.).
- Desai, N. M., Haware, D. J., Basavaraj, K., & Murthy, P. S. (2019). Microencapsulation of antioxidant phenolic compounds from green coffee. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(4), 400–406. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1575858>
- Dirar, A. I., Alsaadi, D. H. M., Wada, M., Mohamed, M. A., Watanabe, T., & Devkota, H. P. (2019). Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 120, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.003>
- Edrisi-Sormoli, M., & Langrish, T. A. G. (2016). Spray drying bioactive orange-peel extracts produced by Soxhlet extraction: Use of WPI, antioxidant activity and moisture sorption isotherms. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.033>
- Egbuna, C., Kumar, S., Ifemeje, J. C., Ezzat, S. M., & Kaliyaperumal, S. (2019).

Phytochemicals as lead compounds for new drug discovery. In *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*. Elsevier Inc.

Escobar-Avello, D., Avendaño-Godoy, J., Santos, J., Lozano-Castellón, J., Mardones, C., von Baer, D., Luengo, J., Lamuela-Raventós, R. M., Vallverdú-Queralt, A., & Gómez-Gaete, C. (2021). Encapsulation of phenolic compounds from a grape cane pilot-plant extract in hydroxypropyl beta-cyclodextrin and maltodextrin by spray drying. *Antioxidants*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/antiox10071130>

Feduraev, P., Skrypnik, L., Nebreeva, S., Dzhobadze, G., Vatagina, A., Kalinina, E., Pungin, A., Maslennikov, P., Riabova, A., Krol, O., & Chupakhina, G. (2022). Variability of Phenolic Compound Accumulation and Antioxidant Activity in Wild Plants of Some Rumex Species (*Polygonaceae*). *Antioxidants*, *11*(2), 311. <https://doi.org/10.3390/antiox11020311>

Fernandes, C. E. F., Scapinello, J., Bohn, A., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Magro, J. D., Palliga, M., Oliveira, J. V., & Tres, M. V. (2017). Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(1), 98–104. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2440-4>

Ferreira, L. M. de M. C., Rocha-Pereira, R., Carvalho-Guimarães, F. B., Santos, A. S., Ribeiro-Costa, R. M., & Silva, J. O. (2022). Green extraction by ultrasound, microencapsulation by spray drying and antioxidant activity of the tucuma coproduct (*Astrocaryum vulgare* Mart.) almonds. *Polymers*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/biom11040545>

Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V., & Hubinger, M. D. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, *90*(3), 413-424 <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.002>

Fu, N., Xiao, J., Woo, M. W., & Chen, X. D. (2020). Frontiers in Spray Drying. In *Frontiers in Spray Drying*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429429859>

Gabbay-Alves, T. V., Silva da Costa, R., Aguiar-Gomes, A. T., Ferreira-da Costa, C.

- E., Perego, P., Carréra-Silva, J. O., Converti, A., & Ribeiro-Costa, R. M. (2018). Quality control of Amazonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) by-products and microencapsulated extract by thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *134*(2), 993–1000. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7300-1>
- Galanakis, C. M. (Ed.). (2015). *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (1st ed.). Woodhead Publishing.
- Galanakis, C. M. (Ed.). (2017). *Nutraceutical and Functional Food Components* (1st ed.). Academic Press.
- García-Gurrola, A., Rincón, S., Escobar-Puentes, A. A., Zepeda, A., & Martínez-Bustos, F. (2019). Microencapsulation of red sorghum phenolic compounds with esterified sorghum starch as encapsulant materials by spray drying. *Food Technology and Biotechnology*, *57*(3), 341–349. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.03.19.6146>
- García-Ruiz, A., Baenas, N., Benítez-González, A., Stinco, C., Meléndez-Martínez, A., Moreno, D., & Ruales, J. (2007). Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal of Organizational Behavior*, *28*(3), 303–325. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8255>
- García-Ruiz, Almudena, Baenas, N., Benítez-González, A. M., Stinco, C. M., Meléndez-Martínez, A. J., Moreno, D. A., & Ruales, J. (2017). Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(12), 3929–3936. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8255>
- Guiné, R. P. F., Gonçalves, F. J. A., Oliveira, S. F., & Correia, P. M. R. (2020). Evaluation of Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Bioaccessibility in *Physalis Peruviana* L. *International Journal of Fruit Science*, *20*(S2), S470–S490. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1741056>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In *Archives of Toxicology* (Vol. 94, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Hill, S. L., Paniagua-zambrana, N. Y., & Bussmann, R. W. (2020). Ethnobotany of the

- Andes. In *Ethnobotany of the Andes*. <https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-77093-2>
- Hussain, C. M. (2020). *Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications*. Elsevier Inc.
- Jafari, S., & Rashidinejad, A. (2021). *Spray drying encapsulation of bioactive materials*. Taylor & Francis.
- Jarrett, C. (2019). *The social life of guayusa from amazonian Ecuador: an examination of livelihood, landscapes, and politics*. University of Texas.
- Krause, T., & Ness, B. (2017). Energizing agroforestry: *Ilex guayusa* as an additional commodity to diversify amazonian agroforestry systems. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services and Management*, 13(1), 191–203. <https://doi.org/10.1080/21513732.2017.1303646>
- Kumar Singh, S., & Patra, A. (2018). Evaluation of phenolic composition, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of *Polygonatum verticillatum* L. *Journal of Integrative Medicine*, 16(4), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.04.005>
- Kurutas, E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutrition Journal*, 15(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>
- Lohvina, H., Sándor, M., & Wink, M. (2022). Effect of ethanol solvents on total phenolic content and antioxidant properties of seed extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) varieties and determination of phenolic composition by hplc-esi-ms. *Diversity*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/d14010007>
- Lutz, M., Fuentes, E., Ávila, F., Alarcón, M., & Palomo, I. (2019). Roles of phenolic compounds in the reduction of risk factors of cardiovascular diseases. *Molecules*, 24(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules24020366>
- Macías-Cortés, E., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., Moreno-Jiménez, M. R., Medina-Torres, L., & González-Laredo, R. F. (2020). Microencapsulation of phenolic compounds: Technologies and novel polymers. *Revista Mexicana de*

*Ingeniera Quimica*, 19(2), 491–521. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim642>

- Mateos, R., Baeza, G., Sarriá, B., & Bravo, L. (2018). Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 241, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.085>
- Mehta, N., Kumar, P., Verma, A. K., Umaraw, P., Kumar, Y., Malav, O. P., Sazili, A. Q., Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2022). Microencapsulation as a Noble Technique for the Application of Bioactive Compounds in the Food Industry: A Comprehensive Review. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(3), 1–34. <https://doi.org/10.3390/app12031424>
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A., Chen, C., & Pereira, G. (2017). Phenolic Compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. In *Phenolic Compounds - Biological Activity* (p. 13).
- Mishra, A., Sharma, A. K., Kumar, S., Saxena, A. K., & Pandey, A. K. (2013). *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/915436>
- Murugesan, R., & Orsat, V. (2012). Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients-A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0638-z>
- Navarro-Flores, M. J., Ventura-Canseco, L. M. C., Meza-Gordillo, R., Ayora-Talavera, T. del R., & Abud-Archila, M. (2020). Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials. *Journal of Food Science and Technology*, 57(11), 4111–4122. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04447-w>
- Nickerson, M., Yan, C., Cloutier, S., & Zhang, W. (2014). Protection and Masking of Omega-3 and -6 Oils via Microencapsulation. In *Microencapsulation in the Food Industry*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-404568-2.00037-6>

- Olszowy, M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiology and Biochemistry*, *144*, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>
- Ozdikicierler, O., Dirim, S. N., & Pazir, F. (2014). The effects of spray drying process parameters on the characteristic process indices and rheological powder properties of microencapsulated plant (*Gypsophila*) extract powder. *Powder Technology*, *253*, 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.12.004>
- Paini, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Lagazzo, A., Botter, R., & Perego, P. (2015). Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: A study of operative parameters. *Lwt*, *62*(1), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.022>
- Pandey, A., Höfer, R., Taherzadeh, M., Nampoothiri, K. M., & Larroche, C. (Eds.). (2015). *Industrial biorefineries & white biotechnology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63453-5.01001-6>
- Pardau, M. D., Pereira, A. S. P., Apostolides, Z., Serem, J. C., & Bester, M. J. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* teas. *Food and Function*, *8*(12), 4601–4610. <https://doi.org/10.1039/C7FO01067B>
- Pérez, M., Caicedo, W., Bravo, L., Arias, R., Radice, M., & Abreu, R. (2021). *Some ancestral Amazonian plants for health and nutrition*. 11213. <https://doi.org/10.3390/mol2net-07-11213>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Plata, A., Ramírez, S., & Luna, C. E. R. (2017). Método de superficie de respuesta para optimizar las condiciones de producción de ácido láctico a partir de subproductos lácteos: SLC. *Nova*, *10*(18).
- Radice, M., Scalvenzi, L., & Sablón Cossio, N. (2017). *Ilex guayusa*: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and

- Biotrade Opportunities. *Mol2Net*, 2, 3868. <https://doi.org/10.3390/mol2net-02-03868>
- Radice, M., & Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja*, 6(2), 3. <https://doi.org/10.17163/lgr.n6.2007.01>
- Ricci, A., Arboleda Mejia, J. A., Versari, A., Chiarello, E., Bordoni, A., & Parpinello, G. P. (2022). Microencapsulation of polyphenolic compounds recovered from red wine lees: Process optimization and nutraceutical study. *Food and Bioproducts Processing*, 132, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.12.003>
- Ruskovska, T., Maksimova, V., & Milenkovic, D. (2020). Polyphenols in human nutrition: From the *in vitro* antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability - An overview and perspective. *British Journal of Nutrition*, 123(3), 241–254. <https://doi.org/10.1017/S0007114519002733>
- Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J. A., & Manzano-Agugliaro, F. (2020). Worldwide research trends on medicinal plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>
- Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In *Antioxidants* (p. 419). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77838>
- Santos, D., Colette, A., Sencadas, V., Domingos, J., Fernandes, M., & Gomes, P. (2017). Spray drying: An overview. In *Biomaterials - Physics and chemistry* (p. 13). <https://doi.org/10.5772/intechopen.72247>
- Sequeda, L., Modesti, G., Celis, C., Gamboa, F., Gutierrez, S., & Luengas, P. (2016). *Ilex Guayusa* Loes. (*Aquifoliaceae*): Amazon and. *Pharmacologyonline*, 3, 193–202.
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., & Ramaswamy, H. S. (2020). Effect of microencapsulation on antioxidant and antifungal properties of aqueous extract of pomegranate peel. *Journal of Food Science and Technology*, 57(2), 723.

<https://doi.org/10.1007/S13197-019-04105-W>

- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M. El, Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., ... Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, *11*(July), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
- Shaygannia, S., Reza Eshagi, S., Fazel, M., & Hashemiravan, M. (2021). The Effect of Microencapsulation of Phenolic Compounds from Lemon Waste by Persian and Basil Seed Gums on the Chemical and Microbiological Properties of Mayonnaise. *Preventive Nutrition and Food Science*, *26*(August 2020), 82–91.
- Sidali, K. L., Morocho, P. Y., & Garrido-Pérez, E. I. (2016). Food tourism in indigenous settings as a strategy of sustainable development: The case of *Ilex guayusa* Loes. In the Ecuadorian amazon. *Sustainability (Switzerland)*, *8*(10). <https://doi.org/10.3390/su8100967>
- Sobulska, M., & Zbicinski, I. (2022). Flame Spray Drying: Equipment, Mechanism, and Perspectives. In *Angewandte Chemie International Edition*, *61*(11), 951–952.
- Ștefănescu, B. E., Nemes, S. A., Teleky, B. E., Călinoiu, L. F., Mitrea, L., Martău, G. A., Szabo, K., Mihai, M., Vodnar, D. C., & Crișan, G. (2022). Microencapsulation and Bioaccessibility of Phenolic Compounds of *Vaccinium* Leaf Extracts. *Antioxidants*, *11*(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antiox11040674>
- Sun, Y., Xu, W., Zhang, W., Hu, Q., & Zeng, X. (2011). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, *78*(3), 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.01.038>
- Tolun, A., Altintas, Z., & Artik, N. (2016). Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *Journal of Biotechnology*, *239*, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.001>

- Tomasi, J. D. C., De Lima, G. G., Wendling, I., Helm, C. V., Hansel, F. A., De Godoy, R. C. B., Grunennvaldt, R. L., De Melo, T. O., Tomazzoli, M. M., & Deschamps, C. (2021). Effects of different drying methods on the chemical, nutritional and colour of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. *International Journal of Food Engineering*, 17(7), 551–560. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2020-0312>
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Utreras, V. (2018). *Determinación de la concentración mínima de fenoles presentes en extractos etanólicos de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes.) con mayor actividad inhibitoria en las enzimas  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosidasa.* <http://200.12.169.19/bitstream/25000/19244/1/T-UCE-0008-CQU-152.pdf>
- Vandamme, E., & Revuelta, J. (2016). *Industrial biotechnology of vitamins, biopigmentes, and antioxidants* (1st ed.). Wiley-VCH Verlag.
- Villacís-Chiriboga, J., García-Ruiz, A., Baenas, N., Moreno, D. A., Meléndez-Martínez, A. J., Stinco, C. M., Jerves-Andrade, L., León-Tamariz, F., Ortiz-Ulloa, J., & Ruales, J. (2018). Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1927–1934. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8675>
- Watson, R. R. (2014). Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. In *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation* (2nd ed.). Academic Press Inc.
- Yahia, E., & Carrillo-López, A. (Eds.). (2019). *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc.
- Yi, F., Zhao, X., Peng, Y., & Xiao, P. (2016). Genus *Ilex* L.: Phytochemistry, Ethnopharmacology, and Pharmacology. *Chinese Herbal Medicines*, 8(3), 209–230. [https://doi.org/10.1016/s1674-6384\(16\)60044-8](https://doi.org/10.1016/s1674-6384(16)60044-8)

## ANEXOS

### Anexo 1

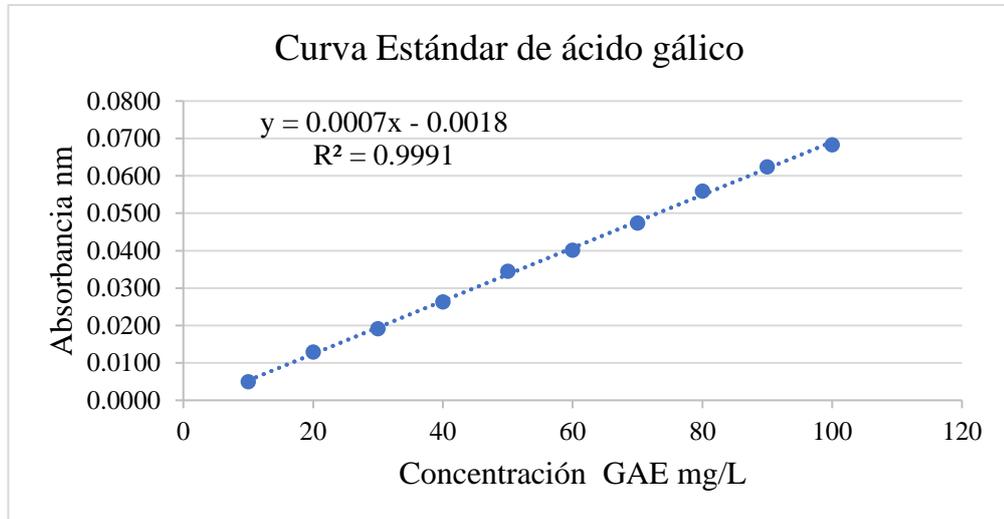
*Porcentaje de sólidos totales obtenidos de cada extracto*

<b>Tratamiento</b>	<b>% Humedad</b>	<b>% Sólidos totales</b>
A1B1	98,700	1,300
A1B2	98,688	1,312
A1B3	98,633	1,337
A2B1	98,695	1,305
A2B2	98,651	1,349
A2B3	98,661	1,339
A3B1	98,794	1,206
A3B2	98,711	1,289
A3B3	98,689	1,311

*Nota.* En esta tabla se muestra el porcentaje de humedad y sólidos totales determinados de cada extracto, empleando 5 mL de muestra en una balanza de humedad.

## Anexo 2

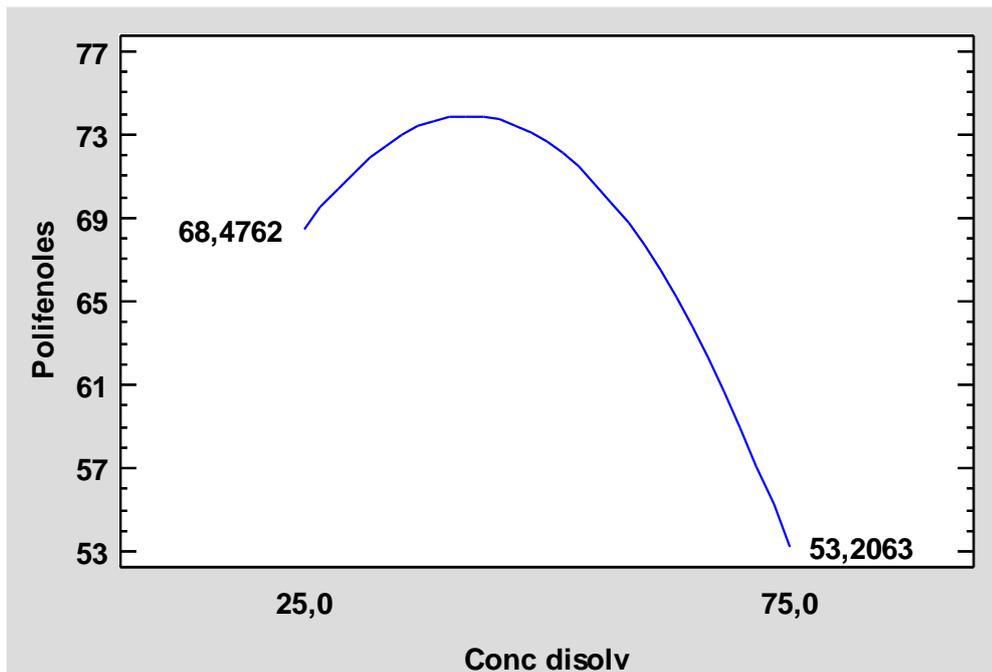
### Curva estándar de ácido gálico para cuantificación de fenoles



*Nota.* En la figura se presenta la curva estándar de ácido gálico empleando concentraciones de 10 a 100 mg/L. Además, se evidencia la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación de la misma.

## Anexo 3

### Gráfica de efectos principales para polifenoles



#### Anexo 4

##### ANOVA del diseño experimental del proceso de extracción

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tiempo	103,406	1	103,406	1,92	0,1824
<b>B:Conc disolv</b>	1049,26	1	1049,26	19,43	<b>0,0003</b>
AA	148,1	1	148,1	2,74	0,1141
AB	27,8636	1	27,8636	0,52	0,4813
<b>BB</b>	839,039	1	839,039	15,54	<b>0,0009</b>
bloques	23,4073	2	11,7037	0,22	0,8071
Error total	1025,84	19	53,9915		
Total (corr.)	3216,91	26			

#### Anexo 5

##### Análisis de Varianza para Eficiencia de microencapsulación

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Concentración	3.72522	1	3.72522	717.64	<b>0.0000</b>
B:Tentrada	0.546987	1	0.546987	105.37	<b>0.0000</b>
bloques	0.041942	2	0.020971	4.04	0.0681
Error total	0.0363367	7	0.00519095		
Total (corr.)	4.35048	11			

R-cuadrada = **99.1648** por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **98.6875** por ciento

Error estándar del est. = **0.0720483**

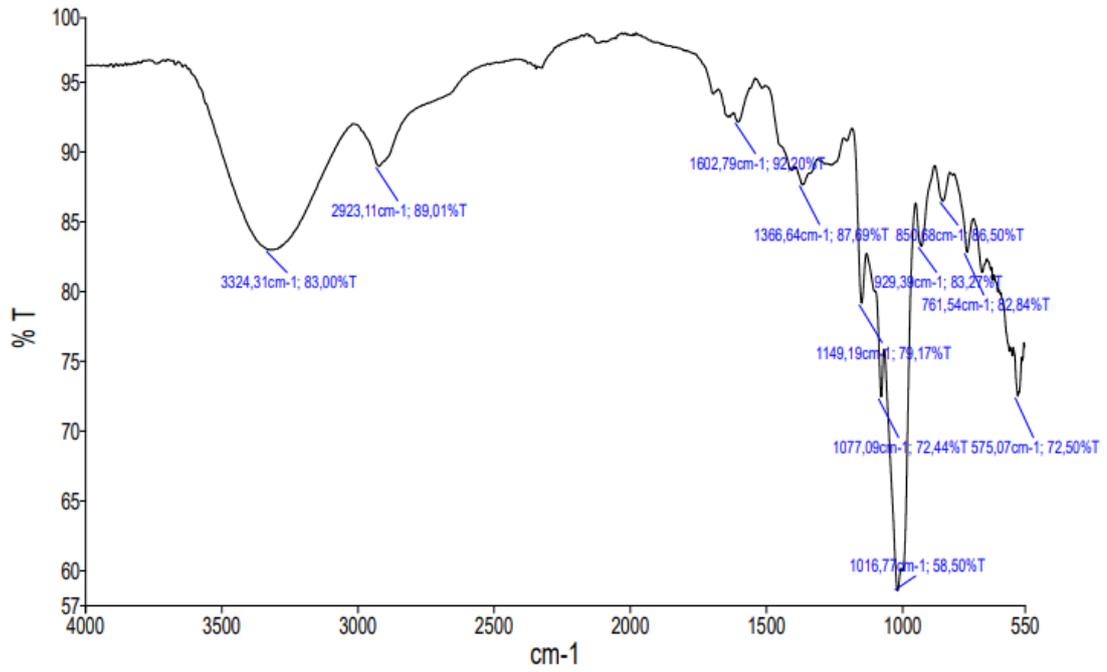
Error absoluto medio = **0.0475278**

Estadístico Durbin-Watson = 2.59824 (P=0.7499)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.522029

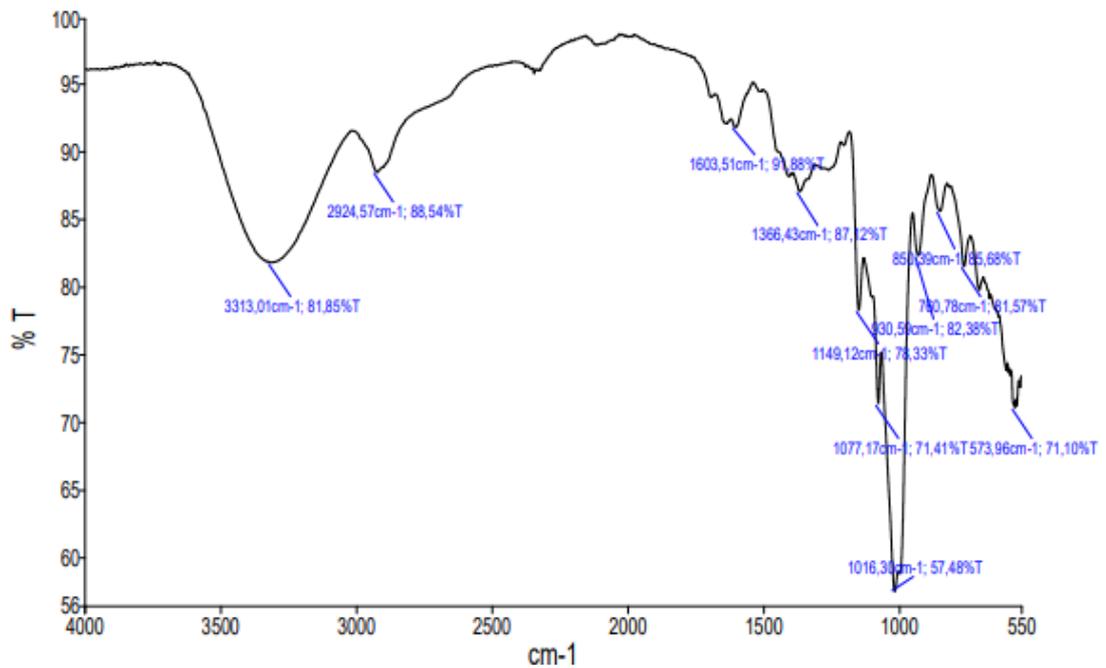
## Anexo 6

### Resultados de espectrometría infrarroja del tratamiento A1B1



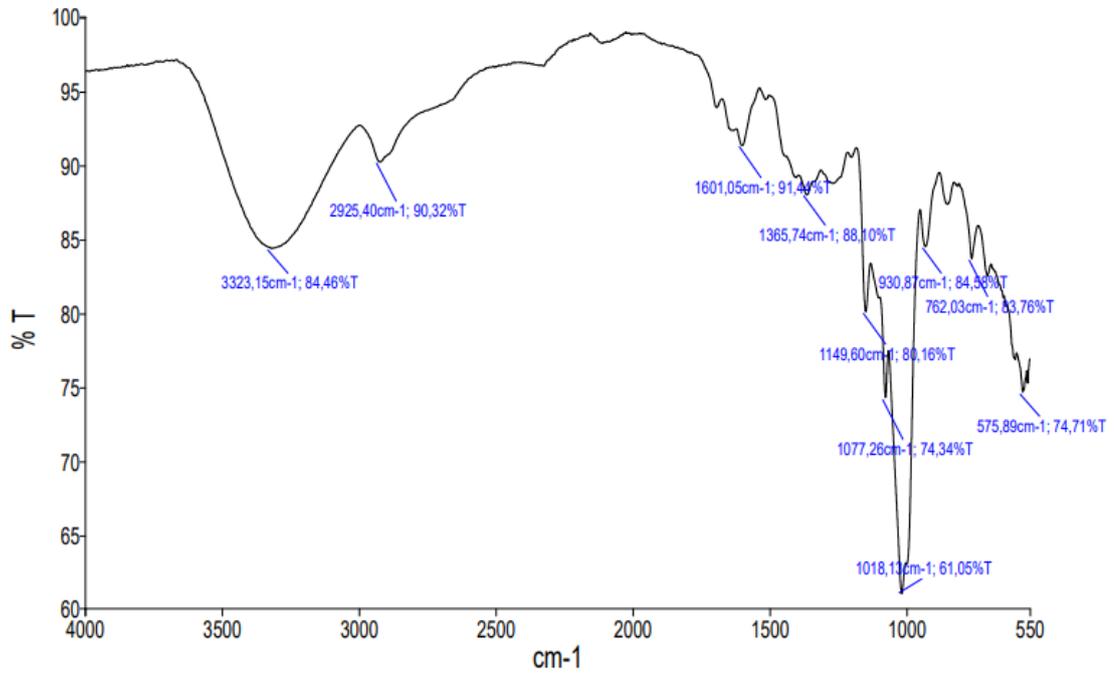
## Anexo 7

### Resultados de espectrometría infrarroja del tratamiento A1B2



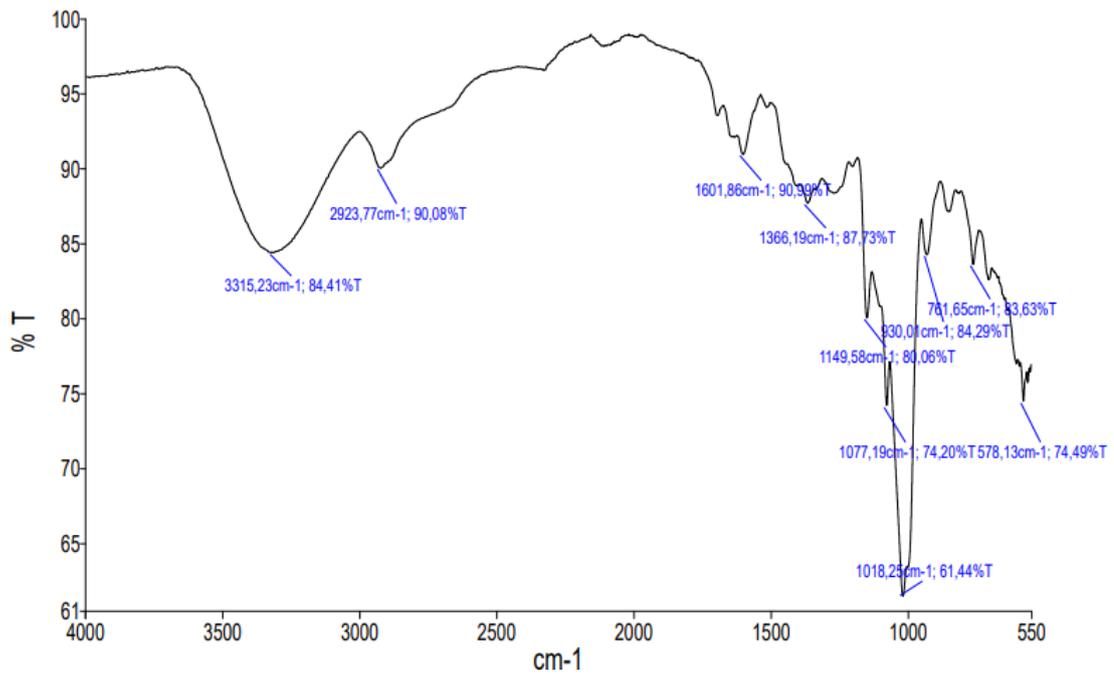
## Anexo 8

### Resultados de espectrometría infrarroja del tratamiento A2B1



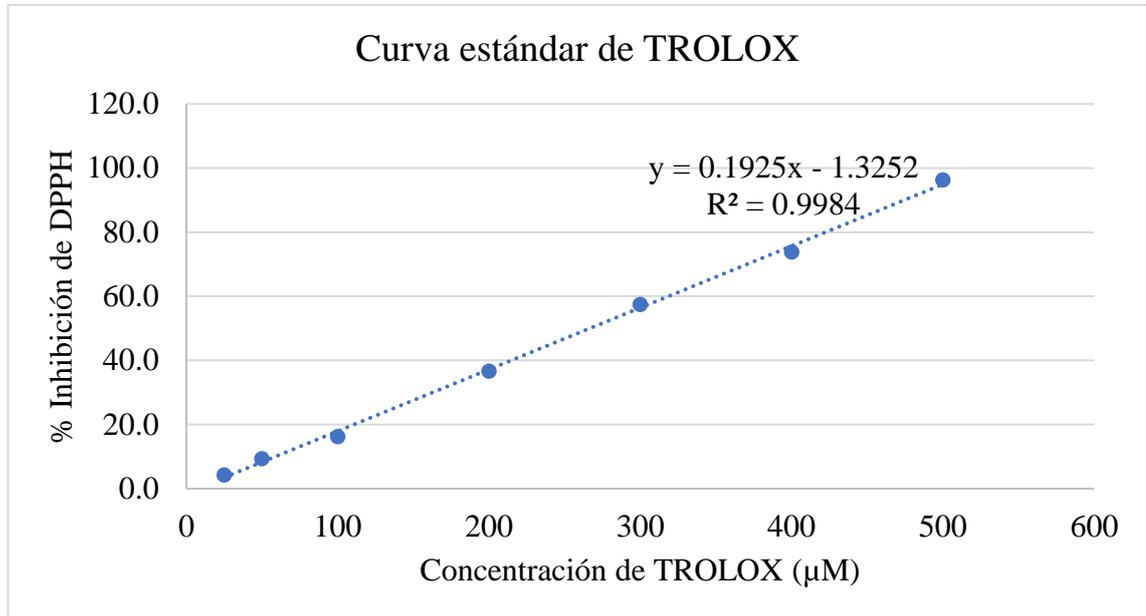
## Anexo 9

### Resultados de espectrometría infrarroja del tratamiento A2B2



## Anexo 10

*Curva estándar de Trolox para la determinación de la actividad antioxidante in vitro*



*Nota.* En esta figura se muestra la curva estándar de Trolox elaborada para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de los microencapsulados. Las concentraciones empleadas fueron de 25 a 500 µM para las cuales se obtuvieron porcentajes de inhibición desde 4,26 hasta 96,25, respectivamente.