



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**BIOACCESIBILIDAD DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE  
ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens*)  
MICROENCAPSULADOS MEDIANTE SECADO POR  
ASPERSIÓN**

---

Por:

**Manuel de Jesús Bernal Millán**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE  
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Manuel de Jesús Bernal Millán, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

Dr. José Basilio Heredia  
Director de tesis

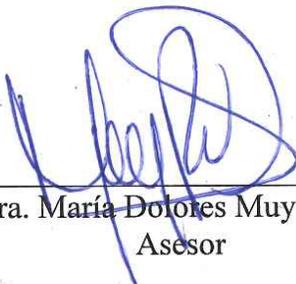


---

MC. Laura Aracely Contreras Angulo  
Asesor

---

Dra. Leticia Xochitl López Martínez  
Asesor



---

Dra. María Dolores Muy Rangel  
Asesor

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Manuel de Jesús Bernal Millán, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

---

Dr. José Basilio Heredia  
Director de tesis

---

MC. Laura Aracely Contreras Angulo  
Asesor



---

Dra. Leticia Xochitl López Martínez  
Asesor

---

Dra. María Dolores Muy Rangel  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Bioaccesibilidad de Extractos Fenólicos de Orégano Mexicano (*Lippia graveolens*) Microencapsulados Mediante Secado por Aspersión” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD). Se permiten y se agradecen las citas breves del material contenido en la tesis sin permiso especial del autor Manuel de Jesús Bernal Millán, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

**CIAD**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

  
Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC (CIAD), por darme la oportunidad de formar parte de su institución.

Al proyecto CONACyT Ciencia Básica #252416 [“Biodisponibilidad y Potencial Antiinflamatorio de Compuestos Fenólicos de Orégano (*Hedeoma patens* Jones)], del cual se deriva y financia este trabajo de investigación.

A mi director de tesis, Dr. José Basilio Heredia por darme la oportunidad de ser parte del LAFN, por tener siempre las puertas abiertas para cualquier situación, por todo su apoyo y paciencia. Gracias por confiar en mí.

A los miembros del comité de tesis, Dra. Xochitl López, Dra. María Dolores Muy y MC. Laura Contreras por toda la asesoría brindada, las sugerencias acertadas, la confianza y su buena disposición en todo momento durante la realización del proyecto.

A mi Maestra favorita, mi guía, amiga y segunda madre, gracias por todos los aprendizajes y enseñanzas que me transmitió, por sus consejos siempre tan acertados, su apoyo y su cariño sincero, Maestra Laura gracias por ser parte fundamental de mi vida y de esta travesía, mi más sincero respeto y admiración para usted, la aprecio y la quiero mucho.

A mi amigo MC. Alexis, gracias por todo tu apoyo tanto en lo profesional como en lo personal, fuiste pieza clave en este proyecto, gracias por ser mi aliado, por estar siempre al pie del cañón; gracias por todos los buenos momentos, por esa sincera amistad. Te aprecio mucho.

A todos los integrantes del LAFN: Gaby, Luis Ángel, Sara, Alicia, Alejandra, Rigoberto, Aurelio y en especial a Marilyn y Brianda por ser tan buenas personas. Un agradecimiento especial al Dr. Erick por su amistad y su apoyo en tema relacionado al proyecto.

A mis compañeros de generación, Yudit, Arlet, Juan Carlos, Aramis, Eduardo, María José, Lucia, Elizabeth, Daizha y Judith por su amistad y hacer más ligero este viaje.

A mi compañera de generación y mejor amiga Olimpia, gracias por soportarme todo este tiempo, por todos los consejos y regaños, por apoyarme en buenas y malas; gracias por esta gran amistad, te admiro y te quiero mucho.

Agradecimientos especiales a Mónica y Jenny por su amistad y buenas pláticas. A Leslie por su amistad y disponibilidad para cualquier trámite de biblioteca, gracias por tenerme paciencia. A Magdalena por compartir conocimiento y buenos momentos en laboratorio, gracias por la bonita amistad que generamos.

A mis padres Fernanda Millán y José Luis Bernal por su apoyo incondicional, por creer en mí y tenerme esa confianza total, gracias por permitirme soñar, impulsarme a cumplir mis metas, jamás los defraudaré; gracias por su inmenso cariño.

A mis hermanos Damián, Oscar y Anabel por todo su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por nunca soltarme la mano y de una u otra forma siempre estar presentes. Gracias a mis sobrinos Lupita, Marely, Eduardo, Johana y MariFer por todo su cariño, su amor puro y sincero, por todos los momentos felices que me hacen pasar, los quiero mucho.

A toda mi familia, principalmente a la familia Millán, por siempre estar al pendiente de lo que realizo, por apoyarme en todo momento y por ser esa familia tan unida que muchos desearían tener. Un agradecimiento especial hasta el cielo, a mi ángel Ana Lilia Millán, por haber sido una excelente tía, por siempre alagarme y estar orgullosa de mí, siempre te extrañaré.

Finalmente gracias a todas las personas que de alguna manera han sido participes en mi formación académica y personal.

## DEDICATORIA

*A mi madre Fernanda, la mujer que ha dado su vida entera por mi y mis hermanos, quien nos ha enseñado a seguir el buen camino y nos ha impulsado a luchar por todos nuestros sueños.  
Je Amo Mamá.*

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	4
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	5
<b>DEDICATORIA</b> .....	7
<b>CONTENIDO</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1 Generalidades del Orégano.....	15
2.2 Compuestos Fenólicos.....	16
2.2.1 Funcionalidad Biológica.....	18
2.2.2 Métodos de Capacidad Antioxidante .....	18
2.3 Bioaccesibilidad y Biodisponibilidad.....	20
2.4 Proceso de Digestión Gastrointestinal.....	21
2.4.1 Fase Salival.....	21
2.4.2 Fase Gástrica .....	22
2.4.3 Fase Intestinal.....	22
2.5 Microencapsulación.....	23
2.5.1 Secado por Aspersión.....	25
2.5.1.1 Atomización .....	25
2.5.1.2. Proceso de secado .....	26
2.5.1.3. Recuperación y separación de producto seco .....	26
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	29
<b>4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	30
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	31
<b>6. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	32
<b>7. JUSTIFICACIÓN</b> .....	33
<b>8. OBJETIVOS</b> .....	34
<b>9. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	35
9.1 Material Vegetal .....	35
9.2 Extracción de Compuestos Fenólicos.....	35
9.3 Formulación y Proceso de Encapsulación .....	35

9.4 Caracterización Nutracéutica de Microencapsulado Óptimo .....	36
9.4.1 Determinación de Compuestos Fenólicos .....	36
9.4.1.1 Extracción de Compuestos Fenólicos Totales.....	36
9.4.1.2 Extracción de Compuestos Fenólicos Superficiales. ....	36
9.4.1.3 Análisis de Compuestos Fenólicos. ....	37
9.4.1.4 Compuestos Fenólicos Realmente Encapsulados. ....	37
9.4.2 Métodos de Capacidad Antioxidante .....	37
9.4.2.1 Inhibición del Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil .....	37
9.4.2.2 Inhibición de la Absorbancia del Radical ABTS .....	38
9.4.3 Identificación y Cuantificación de Compuestos Fenólicos por Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución/Espectrometría de Masas (UPLC/MS).....	38
9.5 Caracterización Física del Microencapsulado Óptimo.....	39
9.5.1 Morfología.....	39
9.5.2 Humedad.....	39
9.5.3 Rendimiento .....	40
9.6 Digestión Gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	40
9.6.1 Bioaccesibilidad de Compuestos Fenólicos .....	41
9.7 Diseño Experimental .....	42
9.7.1 Optimización por Metodología de Superficie de Respuesta.....	42
9.7.2 Análisis Estadístico .....	43
<b>10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
10.1 Optimización del Proceso de Microencapsulación.....	44
10.2 Caracterización Antioxidante del Microencapsulado Óptimo.....	49
10.3 Identificación de Compuestos Fenólicos por Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución/Espectrometría de Masas (UPLC-MS) .....	51
10.4 Caracterización Física del Microencapsulado Óptimo.....	54
10.5 Bioaccesibilidad de los Compuestos Fenólicos Microencapsulados.....	57
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>12. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>13. REFERENCIAS .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Superficie de respuesta de variables rendimiento (a) y compuestos fenólicos encapsulados (b) para la encapsulación de fenólicos de orégano <i>Lippia graveolens</i> mediante secado por aspersión.....	47
2. Condiciones de temperatura de entrada y cantidad de agente encapsulante óptimas (en rojo) y valores máximos esperados (en azul).....	48
3. Región óptima para la encapsulación de compuestos fenólicos de <i>Lippia graveolens</i> mediante secado por aspersión.....	49
4. Estructuras químicas de compuestos fenólicos identificados en los extractos de orégano <i>Lippia graveolens</i> microencapsulados.....	52
5. Micrografías de la estructura de las micropartículas producidas con maltodextrina 10 DE como agente encapsulante de compuestos fenólicos de orégano mexicano mediante secado por aspersión.....	56
6. Interacción entre maltodextrina y compuestos fenólicos.....	56
7. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos durante el proceso de digestión <i>in vitro</i> .....	58
8. Capacidad antioxidante de extractos microencapsulados durante el proceso de digestión <i>in vitro</i> .....	59

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. Métodos de microencapsulación.....	24
2. Composición de jugos digestivos simulados.....	41
3. Variables naturales del diseño central compuesto de dos factores para la microencapsulación de compuestos fenólicos de <i>Lippia graveolens</i> mediante secado por aspersión.....	42
4. Resultados experimentales del proceso de microencapsulación.....	45
5. Análisis de varianza del efecto de los factores temperatura (°C) y agente encapsulante (%), ajustadas a un modelo cuadrático, en el rendimiento (tasa de recuperación de polvos) del proceso de encapsulación.....	45
6. Análisis de varianza del efecto de los factores temperatura (°C) y agente encapsulante (%), ajustadas a un modelo cuadrático, en el contenido de compuestos fenólicos microencapsulados recuperados después del proceso de encapsulación.....	46
7. Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de orégano microencapsulados.....	50
8. Capacidad antioxidante de extractos fenólicos de orégano microencapsulados.....	51
9. Compuestos fenólicos identificados y cuantificados por UPLC-MS en los extractos de orégano microencapsulados mediante secado por aspersión.....	53
10. Caracterización física de los microencapsulados óptimos producidos con maltodextrina 10 DE mediante secado por aspersión.....	55

## RESUMEN

Orégano es una planta con alto contenido de compuestos fenólicos los cuales se han relacionado con la prevención, control y reparación de diversas enfermedades crónico-degenerativas y cáncer. Sin embargo, para lograr esta bioactividad es necesario primeramente que sean bioaccesibles para su absorción. La microencapsulación mediante secado por aspersion es una tecnología que brinda protección a los compuestos fenólicos utilizando matrices poliméricas como la maltodextrina y permite una mayor bioaccesibilidad de los fenólicos. En esta investigación se evaluó el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos microencapsulados mediante un proceso de secado por aspersion optimizado. Se elaboró un extracto stock de fenólicos de orégano y se microencapsuló en maltodextrina con un Spray Dryer Yamato ADL311S de acuerdo a un diseño central compuesto rotatable, controlando las variables temperatura de entrada y porcentaje de agente encapsulante. Las propiedades antioxidantes evaluadas fueron el contenido de compuestos fenólicos totales, la capacidad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS mediante ensayos colorimétricos, y el perfil de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS). Las propiedades físicas analizadas fueron la morfología por microscopía electrónica y la humedad. Las condiciones óptimas de operación fueron temperatura de entrada (145.42 °C) y el porcentaje de agente encapsulante (16.14 %) obteniendo un rendimiento de 77.42% y una recuperación de compuestos fenólicos microencapsulados de 71.58%. Los extractos de orégano microencapsulados presentaron un contenido de compuestos fenólicos totales de 14.05 mg AG/g. La capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) fue de 50.83  $\mu\text{mol ET/g}$  y 85.17  $\mu\text{mol ET/g}$  respectivamente. Las microparticulas presentaron una forma esférica con contracciones y tamaño variables entre 2-12  $\mu\text{m}$ , así como un porcentaje de humedad bajo (3.55%). Durante la simulación gastrointestinal se determinó una bioaccesibilidad de 85% en la etapa intestinal. La tecnología de microencapsulación mediante secado por aspersion es una buena alternativa para estabilizar y proteger compuestos bioactivos de orégano e impulsar su utilización como ingrediente funcional.

**Palabras claves:** orégano, compuestos fenólicos, bioaccesibilidad, secado por aspersion.

## ABSTRACT

Oregano is a plant with a high content of phenolic compounds which have been related to the prevention, control and even repair of different chronic-degenerative diseases and cancer. However, in order to achieve this bioactivity, first they need to be bioaccessible for their absorption. Microencapsulation by spray drying is a technology that provides protection to phenolic compounds using polymers such as maltodextrin and allows higher bio accessibility of phenolics. In this research, the effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of microencapsulated phenolic compounds was evaluated through an optimized spray drying process. A stock extract of oregano phenolics was elaborated and microencapsulated in a Yamato ADL311S Spray Dryer following a central composite rotatable design, controlling the variables, inlet temperature and percentage of encapsulating agent. The antioxidant properties evaluated were the content of total phenolic compounds, antioxidant capacity DPPH and ABTS by colorimetric assays, phenolic profile by ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS). The analyzed physical properties were morphology by electron microscopy and humidity. The optimal operating conditions were inlet temperature (145.42 °C) and encapsulating agent (16.14%) obtaining a yield of 77.42% and a recovery of microencapsulated phenolic compounds of 71.58%. The microencapsulated oregano extracts had a content of 14.05 mg AG / g total phenolic compounds. The antioxidant capacity (DPPH and ABTS) was 50.83  $\mu\text{mol ET} / \text{g}$  and 85.17  $\mu\text{mol ET} / \text{g}$ , respectively. The microparticles presented a spherical shape with contractions and different sizes between 2-12  $\mu\text{m}$ , as well as a low humidity percentage (3.55%). During the gastrointestinal simulation a bio accessibility of 85% was determined in the intestinal stage. Microencapsulation technology by spray drying is a good choice to stabilize and protect bioactive compounds of oregano and promote its use as a functional ingredient.

**Keywords:** oregano, phenolic compounds, bioaccessibility, spray drying.

## 1. INTRODUCCIÓN

El orégano es una de las riquezas florísticas presentes en México, se ha utilizado desde la antigüedad en la cocina tradicional para dar sabor a ciertos platillos, así como en la medicina doméstica. Actualmente, el orégano es ampliamente estudiado por sus propiedades funcionales y nutraceuticas, las cuales son atribuidas a sus compuestos fenólicos (Leyva-López, 2017). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios generados por las plantas como medio de defensa a diferentes factores bióticos y abióticos (Quiñones, 2011). La funcionalidad que se le atribuye a los compuestos fenólicos se relaciona con sus grupos hidroxilo, estos actúan generalmente como captadores y estabilizadores de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, previniendo, controlando y reparando diversas enfermedades crónicas-degenerativas y cáncer principalmente (Fraga, 2010). Para que los compuestos fenólicos tengan un efecto benéfico deben ser bioaccesibles y por consiguiente biodisponibles, para llegar al sitio de acción y ser bioactivos. Cabe mencionar que cuando los compuestos son liberados en el organismo se denominan bioaccesibles y después de ser absorbidos a través del epitelio intestinal son biodisponibles. Sin embargo, diversos estudios señalan que los compuestos fenólicos son liberados antes de llegar a la fase intestinal provocando su degradación y/o transformación y con ello la pérdida de la biodisponibilidad (Velderrain-Rodríguez et al., 2014). En un estudio se evaluó la bioaccesibilidad *in vitro* de extractos de orégano, este mostró un bajo porcentaje de bioaccesibilidad en el intestino (7.55 %) (Gutiérrez-Grijalva et al., 2019). Una alternativa para poder obtener una mayor liberación de compuestos fenólicos en el intestino es la encapsulación, siendo el secado por aspersión una tecnología posiblemente eficaz, ya que es un método económico, rápido y también adecuado para el secado de bioactivos sensibles al calor (Huertas, 2011); Canizales (2015), microencapsuló mediante secado por aspersión polifenoles de maíz azul híbrido, logrando alcanzar 88% de bioaccesibilidad al someterlos a un modelo de digestión *in vitro*. Por todo lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) microencapsulados mediante secado por aspersión.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del Orégano

El orégano es una planta arbustiva caducifolia perenne que llega a alcanzar hasta 2 metros de altura y 1 metro de diámetro de cobertura foliar, es muy ramificado, con un crecimiento relativamente rápido y un ciclo de vida corto (5-10 años). Se distribuye extensamente en los climas semiáridos de México y América Central y es resistente a la sequía (Vega-Gaxiola, 2014).

Al menos 61 especies y 17 géneros pertenecientes a seis familias botánicas se conocen como orégano, siendo las familias Verbenaceae y Lamiaceae las más importantes. Dentro de la familia Verbenaceae se encuentran las plantas pertenecientes al género *Lippia* y *Lanata*, mientras que la familia Lamiaceae contiene al género *Origanum* y *Hedeoma*, entre otras (Kintzios, 2012).

La planta de orégano es una de las riquezas florísticas presentes en México, se produce en 24 estados del país, generando una producción anual nacional alrededor de 4000 toneladas, cabe señalar que el precio promedio de este cultivo es de 170 dólares por kilogramo dependiendo de su calidad la cual se mide por concentración de carvacrol y timol (aceites que se extraen de la especia) presentes en ella. México ocupa el segundo lugar en producción de orégano seco siendo los estados de la franja norte los principales productores, entre ellos se encuentran Baja California, Sonora, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí, Sinaloa, entre otros (SAGARPA, 2013).

El orégano se ha utilizado desde la antigüedad en la cocina tradicional para darle sabor a ciertos platillos, además ha sido usada en la medicina doméstica para la estimulación de la menstruación. También, infusiones concentradas de orégano se han empleado contra problemas de envenenamiento, así como infusiones diluidas para combatir gripe e infecciones estomacales (CONAFOR, 2003).

Actualmente ha crecido el número de estudios para probar sus propiedades como conservador de alimentos, plaguicida y antimicrobiano (SAGARPA, 2013). Sin embargo, las investigaciones se dirigen al estudio de sus propiedades funcionales y nutraceuticas, las cuales son atribuidas a los compuestos fenólicos que contiene.

## 2.2 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8000 compuestos distintos. Su forma más frecuente es la de polímeros o lignina insoluble, mientras que su presencia en los tejidos animales está relacionada con el consumo e ingestión de alimentos vegetales (Valverde et al., 2000). Los fenolicos se originan principalmente en las plantas que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario, algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales, otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos como hídrico, luminoso, entre otros (Quiñones, 2011).

Los compuestos fenólicos presentan una gran diversidad de estructuras químicas, pero su característica principal es que cuentan con un anillo aromático, el cual se encuentra hidroxilado; en la naturaleza estos compuestos suelen estar unidos a otras moléculas, principalmente azúcares, como glucosa, galactosa, ramnosa, entre otros (Vieira da Silva et al., 2016).

Los compuestos fenólicos se clasifican de acuerdo a su estructura molecular en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides (Del Rio et al., 2013). Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Martínez-Florez et al., 2002). Estos, de acuerdo con sus características estructurales se pueden clasificar en: flavonoles (quercetina y kaemferol), flavonas (apigenina y luteolina), flavanonas (hesperetina y naringenina), flavanoles (catequinas y epicatequinas), isoflavonas (daidzeina y genisteina) y antocianidinas (cianidina y delfinidina) (Leyva-López, 2017). Los compuestos no flavonoides, usualmente nombrados ácidos fenólicos, tienen un anillo aromático unido a diferentes grupos funcionales o esterificado a otros ácidos orgánicos. El ácido gálico y el ácido clorogénico son los ácidos fenólicos más comunes, algunos otros no flavonoides son taninos, estilbenos, ligninas y lignanos (Gutiérrez-Grijalva et al., 2016).

En estudios realizados por Leyva-López (2017), Gutiérrez-Grijalva et al. (2017) y Criollo-Mendoza (2018) sobre la identificación de compuestos fenólicos de 3 especies orégano, reportan que para la especie *Lippia graveolens* los compuestos fenólicos más sobresalientes son del grupo

de los flavonoides entre los que destacan luteolina, apigenina, quercetina, naringenina y eriodictiol, sin embargo se identificaron algunos ácidos fenólicos como ácido cafeico y ácido vanílico. Estos reportes señalan el potencial de compuestos fenólicos contenidos en dicha planta, por lo que su estudio es prometedor para lograr posibles aplicaciones terapéuticas a mediano o largo plazo. Por ello, primeramente, un punto importante a considerar es el proceso de extracción de los compuestos fenólicos. Este grupo de compuestos fitoquímicos se extraen generalmente con disolventes acuoso-orgánicos. La extracción dependerá de la naturaleza química y del grado de polimerización de los propios compuestos, del método de extracción (polaridad de los solventes), del tamaño de partícula de la muestra y de las sustancias que pueden ejercer un efecto de interferencia. A veces se requieren pasos adicionales o previos a la extracción para eliminar sustancias no deseadas que pueden interferir en los análisis (e.g., grasa, carbohidratos y clorofila) normalmente mediante extracción en fase sólida (Martínez, 2010). En general, cualquier proceso está basado en una primera extracción con disolventes orgánicos o la mezcla de algunos de ellos (e.g., metanol, etanol, propanol, acetona, agua, dimetilformamida y acetato de etilo entre otros) obteniéndose en el extracto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos. Además de los disolventes, el tiempo de extracción es determinante para obtener un mayor rendimiento. Se han reportado tiempos de extracción desde 1 minuto hasta 24 horas teniendo en cuenta que largos periodos de extracción pueden producir oxidaciones, que se minimizan añadiendo agentes reductores (Antolovich et al., 2000).

Para cuantificar el contenido de compuestos fenólicos en diferentes matrices se utilizan ensayos espectrofotométricos *in vitro* como lo es el ensayo de Folin-Ciocalteu. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos el cual funciona midiendo la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del reactivo (Singleton et al., 1999). Sin embargo, este reactivo no sólo mide los fenoles totales, sino que reacciona con cualquier sustancia reductora. En consecuencia, el reactivo mide la capacidad reductora total de una muestra, no sólo el nivel de compuestos fenólicos (Gomez, 2014). El contenido de compuestos polifenólicos en una planta está relacionado con sus propiedades bioactivas y su funcionalidad biológica.

### **2.2.1 Funcionalidad Biológica**

La funcionalidad que se le atribuye a los compuestos fenólicos se relaciona con sus grupos hidroxilos, estos actúan generalmente como captadores y estabilizadores de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, pudiendo producir quelación de aquellos metales que poseen en su estructura grupos carboxílicos (Fraga, 2010).

Los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, generando gran inestabilidad, y por tanto reactividad. Se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidación de proteínas y fosfolípidos), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. Estos mecanismos son activados por diversos factores como una inadecuada alimentación, consumo de drogas, contaminación, rayos UV, inflamación, entre otros (Gutiérrez, 2002). Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicales, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS). Las principales EROS son el radical hidroxilo (OH), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $^{\cdot}O_2$ ), oxígeno singlete ( $O_2$ ), oxígeno nítrico (NO) y peróxido (ROO) (Sarvajeet et al., 2010). Todas las reacciones mencionadas provocadas por radicales libres son importantes en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, por ejemplo, cáncer, hipertensión y aterosclerosis, entre otras (Panchawat, 2011).

### **2.2.2 Métodos de Capacidad Antioxidante**

La capacidad antioxidante es considerada como la actividad biológica responsable del efecto preventivo del daño celular y depende de las características estructurales de la molécula, de su reactividad hacia los peróxidos y otras especies reactivas, al mismo tiempo de factores externos como temperatura, luz, concentración, tipo de sustrato, medio de reacción y la presencia de algunos

componentes que puedan actuar como prooxidantes o sinérgistas. Esta capacidad antioxidante evaluada de un compuesto químico *in vitro* puede usarse como un indicador indirecto de la actividad *in vivo*. La mayoría de los métodos para determinar capacidad antioxidante consisten en acelerar la oxidación en un sistema biológico (Moyano, 2012).

La capacidad antioxidante de un producto alimenticio está determinada por interacciones entre diversos compuestos con diferentes mecanismos de acción. Por esto mismo, la determinación de la capacidad antioxidante de extractos complejos se lleva a cabo usualmente por diferentes métodos complementarios, que evalúen diversos mecanismos de acción. Algunos de los métodos más utilizados, por su simplicidad y reproducibilidad, son DPPH (depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) el cual consiste en reducir su cromógeno púrpura por la acción de un compuesto antioxidante a un hidrazin, compuesto que colorea a un tono amarillo pálido y este cambio se cuantifica por espectrofotometría a una absorbancia de 515-540 nm (Karadag et al., 2009). Otro método importante es el ensayo ABTS [ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzoatiazolin-6-sulfónico)] el cual está basado en la inhibición de la absorbancia del radical  $ABTS^+$  ocasionada por la reacción con antioxidantes donde el cambio de absorbancia encuentra su pico máximo de absorción a 415 nm y un pico máximo secundario a 660, 734 y 820 nm. Cuando se utiliza el trolox (Análogo hidrosoluble de la vitamina E) como estándar, el método se denomina TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) por sus siglas en inglés (Singh et al., 2008). Al poner en contacto al compuesto ABTS con un agente altamente oxidante, como el persulfato de potasio, se genera el radical catión  $ABTS^+$ , el cual presenta un color azul-verde muy intenso. La intensidad en la coloración del radical se ve disminuida al reaccionar con un antioxidante, por lo que la concentración de antioxidantes que proporciona el mismo cambio de absorbancia del  $ABTS^+$  como 1 mM de trolox se denomina como TEAC (Huang et al., 2005).

Existen otras técnicas que miden la capacidad antioxidante como FRAP (poder antioxidante reductor del hierro), por sus siglas en inglés, CUPRAC (capacidad antioxidante reductor de ion cúprico), ABAP (depleción del 2'-azobis (2-amidopropano)), DMPO (depleción de óxido N-5,5-dimetil-1-pirrolina), ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno) y TRAP (capacidad antioxidante total), entre otras (Mercado, 2013).

Como se mencionó anteriormente, todos los radicales libres y EROS causan daño en los tejidos y con ello una diversidad de enfermedades entre las que destacan enfermedades crónico-degenerativas, inflamación y cáncer. El consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos

participa en la prevención, control y reparación de estas enfermedades (Velderrain-Rodríguez et al., 2014). Sin embargo, muchos de estos compuestos no presentan el efecto esperado en el cuerpo humano, esto puede deberse a la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos presentes en el alimento.

### 2.3 Bioaccesibilidad y Biodisponibilidad

Todos los alimentos que consumimos están compuestos de nutrientes y no nutrientes, sin embargo, tanto los nutrientes como los no nutrientes están sujetos a su bioaccesibilidad y biodisponibilidad después del consumo (Tao et al., 2006).

En la ciencia nutricional, que cubre la ingesta de nutrientes esenciales y otros componentes de la dieta, el concepto de biodisponibilidad carece de los estándares bien definidos comúnmente utilizados para los medicamentos. A diferencia de la mayoría de los medicamentos, la absorción, distribución y utilización de nutrientes (incluidos los fitoquímicos) están sujetos a la influencia del estado de equilibrio de los nutrientes, así como al estado fisiológico del sujeto. Para estar disponible para la absorción en el tracto gastrointestinal, un alimento no nutritivo debe ser liberado primero de la matriz alimenticia (o ser bioaccesible) y ser capaz de atravesar la barrera intestinal (Velderrain-Rodríguez et al., 2014). La bioaccesibilidad se describe como la cantidad de cualquier componente alimenticio que está presente de forma digerible en el intestino, como consecuencia de su liberación de la matriz sólida y que puede atravesar la barrera intestinal (Palafox-Carlos et al., 2011). Por otro lado, la biodisponibilidad se define como la proporción de compuestos bioaccesibles que se absorben y penetran en el torrente sanguíneo, por lo que pueden distribuirse y metabolizarse dentro de los órganos del cuerpo y lograr ser bioactivos (D'Archivio et al., 2010).

Después de la absorción por la pared intestinal, el metabolismo de primer paso de las células intestinales y el hígado reduce significativamente la concentración de bioactivos que alcanzan la circulación sistémica. Por lo tanto, los sistemas de administración diseñados con propiedades funcionales que son capaces de mejorar la solubilidad, potenciar la captación celular y el transporte, alterar la cinética de liberación del compuesto y evitar actividades metabólicas rápidas han ganado

mucha popularidad en muchas investigaciones como enfoques para aumentar la biodisponibilidad oral de un compuesto (Ting et al. 2014).

Por todo lo anterior es recomendable analizar el proceso de digestión en el tracto gastrointestinal para conocer el comportamiento de los compuestos fenólicos o matrices alimentarias consumidas.

## 2.4 Proceso de Digestión Gastrointestinal

### 2.4.1 Fase Salival

Los nutracéuticos (incluidos compuestos fenólicos) que se consumen como suplementos dietéticos se pueden ingerir en forma de tabletas, cápsulas, geles blandos, cápsulas de gel, líquidos, polvos o parte de la matriz alimenticia, y se ingieren con o sin masticación. Durante el tiempo de parada en la cavidad oral, la masticación descompone los alimentos ingeridos en trozos pequeños, los mezcla con la saliva y los convierte en bolo (McClements et al., 2008). La saliva es un líquido muy diluido, que consiste en 99.5% de agua y el 0.5% restante consiste en electrolitos, proteínas (glucoproteína mucina, albúminas, inmunoglobulinas, lactoferrina), compuestos antibacterianos (IgA secretora y lisozima), hormonas, ácidos nucleicos, moléculas nitrogenadas (ácido úrico, urea y amoníaco), antioxidantes (ascorbato, glutatión) y enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilasa) (Ginsburg et al., 2013).

Dependiendo de la estructura y las propiedades químicas, los nutracéuticos son digeridos de forma variable por la enzima mientras experimentan cambios en el pH (5.6-7.6), la temperatura, la fuerza iónica y el perfil de flujo complejo. Aunque el tiempo de residencia del alimento o producto en la boca es relativamente corto (15-20 s), la mezcla con la saliva inicia el proceso de digestión, permite una deglución más fácil y permite una mejor digestión en el estómago (Chen, 2009).

### **2.4.2 Fase Gástrica**

El bolo ingerido pasa a través del esófago y luego ingresa en el estómago donde experimenta una caída significativa de pH (pH 1-3). Los nutraceuticos se retienen en el estómago durante 0.3-2 h, dependiendo del volumen y su composición. Durante este período, la acción agitadora y el ácido permiten la descomposición física y química de los alimentos masticados. Tales acciones también ayudan a liberar compuestos fenólicos de la matriz de alimentos (Hur et al., 2011).

Dependiendo de la composición del bolo y la cantidad, el pH del estómago puede aumentarse en varios grados, para lo cual el ambiente fisicoquímico ya no está en condiciones óptimas para una importante actividad enzimática. La capacidad de amortiguación del jugo gástrico evita el aumento gradual del pH, lo que puede causar la pérdida de la bioactividad enzimática. Durante la digestión del estómago, el bolo se desplaza lentamente al intestino delgado en forma de quimo, que se produce mediante la mezcla muscular continua, la digestión enzimática gástrica y la oxidación del ácido clorhídrico (Ting et al., 2014).

Aunque el estómago no es el sitio principal para la absorción de compuestos fenólicos, los compuestos pequeños, los ácidos fenólicos, que no están firmemente unidos a la matriz alimentaria pueden estar disponibles para su absorción en el estómago (Lafay et al., 2006).

### **2.4.3 Fase Intestinal**

El intestino delgado con una longitud promedio de 500 cm se subdivide en tres secciones consecutivas, duodeno, yeyuno e íleon. El duodeno y el yeyuno son los principales sitios de absorción y transformación de los compuestos fenólicos (DeSesso et al., 2001). El quimo se transporta del estómago al duodeno y su valor de pH cambia de ácido a alcalino debido a la neutralización del ácido con la bilis y el jugo pancreático. En este sentido los compuestos fenólicos son inestables en un medio alcalino, por lo que están sujetos a sufrir transformaciones, esto dependiendo de su estructura química (Frontela et al., 2011).

Durante el período de retención en el intestino, los nutrientes parcialmente digeridos continúan procesándose cuando se mezclan con bicarbonato de sodio, sales biliares, fosfolípidos y enzimas por abducción dinámica. Con la recolección de varias enzimas digestivas, el intestino delgado es el sitio principal donde la mayoría de los nutrientes se digieren y se descomponen en moléculas más pequeñas disponibles para su absorción (Ting et al., 2014). Sin embargo, además de la matriz alimentaria consumida, la fisiología y la anatomía del consumidor, las características de los compuestos fenólicos, por ejemplo, la dimensión molecular, la polimerización, la estereoquímica del resto glicosídico y la hidrofobicidad determinan su absorción en el intestino delgado (Porrini et al., 2008).

Recientemente, se han realizado investigaciones en este ámbito, Juaniz et al. (2017) estudiaron la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de cardo crudo después de la digestión gastrointestinal simulada, encontrando que solo el 1.96% de los compuestos fenólicos totales era bioaccesibles después de la digestión. Un estudio similar realizaron Gutiérrez-Grijalva et al., (2017) , quienes estudiaron el efecto de la digestión *in vitro* sobre el contenido fenólico de 3 especies de orégano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*), analizaron la fase salival, gástrica e intestinal, obteniendo como resultado mayor bioaccesibilidad en la fase gástrica que en la intestinal, además de perder el 100% de algunos tipos de compuestos fenólicos, estos resultados probablemente se deban a la liberación de los compuestos en el estómago debido a la acidez y algunas enzimas.

Por lo anterior, se buscan alternativas para poder obtener una mayor bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en el intestino, es decir que la mayor liberación de estos compuestos se lleve a cabo en ese sitio para su absorción. Una de las alternativas son los procesos de microencapsulación.

## 2.5 Microencapsulación

La microencapsulación se puede definir como una tecnología que implica el envasado de una sustancia gaseosa, líquida o sólida dentro de un material secundario en pequeñas cápsulas en el intervalo de aproximadamente de 0.5 a 2000  $\mu\text{m}$ . La sustancia que está encapsulada puede

denominarse material de núcleo, agente activo, relleno, fase interna o fase de carga útil. La sustancia que encapsula puede denominarse revestimiento, membrana, cubierta, material de soporte, material de la pared, fase externa o matriz. El material de soporte de los encapsulados utilizados en productos o procesos alimenticios debe ser de grado alimentario y ser capaz de formar una barrera para el agente activo y sus alrededores (Nedovic et al. 2010). Esta tecnología protege y estabiliza la sustancia encapsulada y permite el suministro controlado en un sitio y velocidad deseados cuando la cápsula se expone a condiciones específicas que proporcionan un desencadenante o estímulo para la descomposición de la cápsula (Livney et al., 2017).

La estructura formada por el agente microencapsulante alrededor de la sustancia microencapsulada (núcleo) es llamada pared, esta protege el núcleo contra el deterioro y liberación bajo condiciones deseadas. La técnica de microencapsulación ha permitido solucionar algunos problemas limitando las aplicaciones de ingredientes y aditivos alimenticios, puesto que puede controlar la eliminación de saborizantes, así como reducir volatilidad, higroscopicidad y reactividad incrementando la estabilidad de productos bajo condiciones ambientales adversas (Huertas, 2011).

La identificación del método de microencapsulación está en función del tamaño de la partícula, material de cobertura, composición del principio activo, estructura, aplicación final y costos de producción (Rosas, 2016). Las técnicas para la formación de microcápsulas se dividen en dos categorías, los métodos químicos y los físico-mecánicos (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Métodos de microencapsulación**

<b>Métodos Químicos</b>	<b>Métodos Físico-Mecánicos</b>
Coacervación	Liofilización
Liposomas	Extrusión
Co-Cristalización	Secado por aspersión

La selección del proceso apropiado para la producción de microcápsulas requiere la consideración de (1) problemas técnicos, como las propiedades inherentes del núcleo, la matriz encapsulante, el tamaño y la morfología de la partícula, los mecanismos que activan la liberación del núcleo y el formato de entrega; (2) el costo, la consistencia y la sostenibilidad de las materias primas y la

formulación; y (3) la economía de la tecnología de microencapsulación, que incluye cada vez más la huella ambiental asociada del proceso (Sanguansri et al., 2017)

Entre los métodos más comunes para la encapsulación de agentes activos se encuentra el secado, este convierte los materiales líquidos en partículas sólidas o semisólidas. El proceso da como resultado la producción de polvos, gránulos o aglomerados secos. Para aplicaciones alimentarias, los formatos de polvo son generalmente preferidos a las suspensiones o emulsiones. Los polvos son mucho más fáciles de manipular y transportar, tienen una mayor estabilidad de almacenamiento y pueden agregarse fácilmente a una variedad de formulaciones de alimentos. Los métodos de secado más comunes para la preparación de ingredientes microencapsulados son el secado por aspersión y el secado por congelación.

### **2.5.1 Secado por Aspersión**

El secado por aspersión es uno de los procesos más antiguos para encapsular el agente activo, es tan común en los alimentos que no siempre se percibe como un encapsulado, por ejemplo, un aroma en forma deshidratada (Shimoni et al., 2010).

De los métodos de secado, el secado por aspersión es el método preferido, ya que es de fácil ejecución, bajo costo, continuo y también es adecuado para el secado de bioactivos sensibles al calor (Sanguansri et al., 2017). Además, esta tecnología permite obtener micropartículas con condiciones bajas de humedad, higroscopicidad y densidad aparente, reduciendo el riesgo de oxidación de fenólicos por contacto con moléculas de agua y oxígeno atmosférico. También, se obtienen partículas esféricas y de tamaños homogéneos las cuales son óptimas para su uso en la industria alimentaria (Mishra et al. 2014).

Las etapas principales en un proceso de secado por aspersión son:

2.5.1.1 Atomización. Es uno de los pasos de procesamiento más importantes durante el secado por aspersión. El objetivo de esta etapa es crear una superficie de transferencia de calor máxima entre las gotas de líquido y el medio seco para optimizar la transferencia de calor y masa. La atomización

de líquidos en pequeñas gotas puede ser generada por atomizadores; la selección y operación del atomizador es crítica en el secado por aspersión, ya que la eficiencia del secado, el tamaño de partícula, la distribución del tamaño y la eficiencia de la recolección del polvo dependen del rendimiento del atomizador. La elección del atomizador también depende de la naturaleza y la viscosidad de la solución de alimentación y las características deseadas del polvo seco. Por ejemplo, el uso de una boquilla de presión permitirá la formación de gotitas más finas con una mayor entrada de energía. A un nivel de energía constante, el tamaño de las partículas formadas aumenta al aumentar la velocidad de alimentación, sin embargo, el tamaño de partícula aumenta cuando tanto la viscosidad como la tensión superficial del líquido inicial son altas (Bhandari et al., 2017).

2.5.1.2. Proceso de secado. Se inicia al contacto de las gotitas de líquido atomizado con aire caliente en la cámara de secado. Durante un proceso de secado en paralelo, el tiempo medio de residencia de las partículas es pequeño, y las partículas secas no tienen que pasar a través de la zona de alta temperatura; por lo tanto, es adecuado para el secado de materiales termosensibles, como compuestos bioactivos. Típicamente, la temperatura de entrada del aire caliente varía de 150 a 220 °C, y la evaporación se produce instantáneamente. Los polvos secos están expuestos a temperaturas moderadas (50-80 °C), lo que limita su degradación térmica. Para la encapsulación por secado por aspersión, la exposición a corto tiempo para mantener la temperatura central por debajo de los 40 °C ayuda a evitar daños en el producto. Por otro lado, el secado por aspersión a contracorriente también tiene ventajas, debido a que el producto seco estará expuesto a altas temperaturas durante el proceso de secado, los polvos generalmente tendrán un contenido de humedad final bajo, lo que es beneficioso para la vida útil del producto seco. Otra ventaja del proceso contracorriente es que se considera más económico en términos de ahorro de energía (Livney et al., 2017).

2.5.1.3. Recuperación y separación de producto seco. Los polvos secos se suministran desde la cámara de secado a un separador de polvo mediante el flujo de aire de secado. Para los modernos secadores por aspersión de múltiples etapas, el flujo de aire de la cámara de secado contiene típicamente alrededor del 10-50 % del polvo total, dependiendo del material y del tipo de secador por aspersión y las condiciones de operación. En general, las partículas se recuperan incorporando uno o más de los separadores de ciclón, filtros de bolsa o depuradores húmedos. Con el uso de un

ciclón, las partículas golpean la pared del ciclón debido a la fuerza centrífuga y luego se desploman debido a la gravedad (Bhandari et al., 2017)

En resumen, el principio del secado por aspersión es la producción de un polvo seco por medio de la atomización de una dispersión o emulsión en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. Una de las grandes ventajas de este proceso, en comparación con otros métodos de microencapsulación, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales muy volátiles y sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s) (Hernández, 2010). Un factor importante al usar esta tecnología es el tipo de material encapsulante a utilizar.

### **2.5.2 Agentes Encapsulantes**

Existe una gran diversidad de compuestos que se pueden utilizar para atrapar o encapsular sin embargo, existe un número limitado de matrices que han sido certificadas para la aplicación en alimentos y son generalmente reconocidas como materiales seguros (“GRAS” por sus siglas en inglés) (Wandrey et al., 2010).

Los criterios para la selección del material encapsulante se basan en las propiedades fisicoquímicas de la sustancia a encapsular (porosidad y solubilidad) y del agente encapsulante (viscosidad y propiedades mecánicas), además de la compatibilidad entre los dos materiales (el material debe ser insoluble y no reaccionar con el núcleo) y de los factores económicos. También, deben tomarse en cuenta aspectos como toxicidad, eficiencia de encapsulación, estabilidad, grado de protección de la base, entre otras. Los principales agentes encapsulantes utilizados son las gomas, almidones, maltodextrina, inulina, celulosa y derivados, entre otros (Alcaraz, 2013).

Para la microencapsulación de compuestos bioactivos uno de los agentes encapsulantes más utilizados es la maltodextrina, este es un biopolímero hidrosoluble que se obtiene de la hidrólisis del almidón; su estructura se conforma de cadenas lineales de D-glucosa unidas mediante enlaces  $\alpha$ -1,4. Este polímero presenta diversas propiedades como formación de películas, reducción de la permeabilidad de oxígeno, fácil producción a escala industrial, se considera un material inocuo y es de bajo costo. Asimismo, el uso de este polímero permite la generación de micropartículas

esféricas con homogeneidad superficial. La maltodextrina puede clasificarse en cuatro tipos de acuerdo a sus equivalentes de dextrosa (DE, por sus siglas en ingles) en 5, 10, 15 y 20, aunque hay algunas que alcanzan los 30 DE. Con base a esto, las propiedades existentes entre una maltodextrina y otra serán diferentes, por ejemplo, a mayor DE menor será la viscosidad, pero mayor efecto en la osmolaridad, retención de compuestos bioactivos y rendimiento del proceso de encapsulación (Canizales, 2015).

Con respecto al proceso de microencapsulación por secado por aspersión de compuestos bioactivos se han realizado estudios para conocer las mejores condiciones de proceso que permitan obtener buenos rendimientos y eficacia de encapsulación; en 2015 Paini et al., encapsularon mediante secado por aspersión, polifenoles del orujo de oliva usando maltodextrina a diferentes concentraciones, se estudiaron los efectos de la temperatura de entrada (130 °C y 160 °C) y el flujo de alimentación (5 y 10 ml/min). Los mejores resultados se presentaron utilizando una temperatura de entrada de 130 °C, una concentración de maltodextrina de 100 g/l y un flujo de alimentación de 10 ml/min obteniendo así un rendimiento de 94 % y una eficacia de encapsulación de 76 %.

Una vez familiarizados con el mecanismo y las condiciones adecuadas de microencapsulación mediante secado por aspersión para compuestos fenólicos, se debe dar seguimiento a la microencapsulación de estos para tratar de solucionar el problema de bioaccesibilidad de estos al ser consumidos. Ydjedd et al., (2017) estudiaron el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre compuestos fenólicos encapsulados y no encapsulados extraídos de pulpa de algarroba (*Ceratonia siliqua L.*) y su actividad antioxidante, para el proceso de encapsulación utilizaron el método de la doble emulsión/evaporación; metil-celulosa y alcohol polivinílico como agentes encapsulantes y rotavapor como medio de evaporación, teniendo como resultado un 56 % de eficiencia de encapsulación. Después de obtener los encapsulados realizaron las digestiones simuladas a muestras encapsuladas y no encapsuladas, mostrando claramente que la encapsulación protegía los compuestos y por tanto había una mayor liberación de bioactivos en el intestino. En otro estudio Martínez-Ramírez et al. (2015) evaluaron la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos encapsulados de xoconostle mediante secado por aspersión, ellos utilizaron una mezcla de maltodextrina-goma arábiga al 30% como agente encapsulante, logrando aumentar la bioaccesibilidad de 42 a 64 % concluyendo que el proceso de encapsulación fue favorable.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El orégano es una planta rica en compuestos bioactivos, entre los que destacan los compuestos fenólicos. Sin embargo, estos compuestos están expuestos a diversos factores ambientales como la humedad, la luz, el oxígeno, calor, entre otros, los cuales afectan su estabilidad. Además, los compuestos fenólicos al ser consumidos se ven afectados por los cambios de acidez, enzimas y otros factores a lo largo del tránsito digestivo, por lo que no logran ser absorbidos por el intestino delgado para que cumplan su función bioactiva. En este sentido la microencapsulación ha tomado importancia como tecnología emergente para la protección de los compuestos fenólicos tanto de los factores ambientales como de las condiciones en las fases digestivas. Por ello, es importante seleccionar un método de encapsulación y material de pared apropiado para proteger este tipo de compuestos.

#### 4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuáles son las condiciones óptimas de operación para el proceso de secado por aspersión que proporcionan mayores rendimientos y eficiencia de microencapsulación de extractos fenólicos de orégano (*Lippia graveolens*)?
2. ¿Cuál es la capacidad antioxidante y perfil de compuestos fenólicos en el microencapsulado optimizado?
3. ¿Cuál es la bioaccesibilidad de los extractos fenólicos de orégano (*Lippia graveolens*) microencapsulados después del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*?

## 5. HIPÓTESIS

1. Una temperatura de entrada de 130-150 °C, y maltodextrina del 10-20 % como material de pared son las condiciones que proporcionan mayores rendimientos y contenido de compuestos fenólicos de orégano (*Lippia graveolens*) microencapsulados.
2. El microencapsulado presenta una capacidad antioxidante superior a los 500  $\mu$ moles ET/100 g y compuestos fenólicos de tipo flavonoides, principalmente.
3. La bioaccesibilidad de compuestos fenólicos microencapsulados es mayor al 50 % al finalizar el proceso de digestión *in vitro*.

## 6. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Se realizó un trabajo descriptivo y experimental en el Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos de CIAD, A.C., Unidad Culiacán. El trabajo se dividió en las siguientes etapas:

### Etapas Experimentales

- Optimización del proceso de microencapsulación de compuestos fenólicos utilizando un modelo de superficie de respuesta.
- Simulación del proceso de digestión *in vitro* y ensayos para evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos del orégano microencapsulados.

### Etapas descriptivas

- Extracción de compuestos fenólicos de orégano *Lippia graveolens*.
- Caracterización antioxidante del microencapsulado óptimo.
- Caracterización física (morfología, humedad, rendimiento) del microencapsulado óptimo.

## 7. JUSTIFICACIÓN

Debido a la reciente demanda por el consumo de compuestos bioactivos de origen natural, se ha estudiado al orégano como fuente potencial de compuestos fenólicos, sin embargo, estudios recientes señalan que estos compuestos son afectados por factores ambientales, así como por las condiciones durante el proceso de digestión, disminuyendo o perdiendo su bioaccesibilidad y con ello su funcionalidad. Por ello, es importante emplear un proceso de microencapsulación para proteger y mantener estable a los compuestos bioactivos durante su almacenamiento y fases gastrointestinales, logrando así ser aprovechados de forma eficaz. Una buena alternativa para microencapsular compuestos bioactivos es la utilización del secado por aspersión ya que es la tecnología más empleada debido a su sencillez, continuidad y uso de materiales de nula o baja toxicidad. Los resultados de esta investigación sentarán las bases para futuros avances en la industria farmacéutica, ya que se encontrarán las condiciones de operación que garanticen los mayores rendimientos del proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión, así como también se determinará el efecto de la digestión sobre la liberación y absorción de los compuestos fenólicos extraídos de orégano.

## 8. OBJETIVOS

### 8.1. Objetivo General:

Evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de orégano (*Lippia graveolens*) microencapsulados mediante un proceso secado por aspersión optimizado.

### 8.2. Objetivos Específicos:

1. Formular y desarrollar microencapsulados óptimos de extractos fenólicos de orégano bajo el proceso de secado por aspersión utilizando un modelo de superficie de respuesta.
2. Evaluar el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) del microencapsulado óptimo.
3. Identificar y cuantificar compuestos fenólicos en el microencapsulado óptimo.
4. Caracterizar propiedades físicas del microencapsulado óptimo de extracto fenólico de orégano.
5. Evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante del microencapsulado óptimo.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 Material Vegetal

El orégano (*Lippia graveolens*) fue obtenido en la zona indígena de Temohaya, Municipio de Mezquital, Durango (coordenadas N: 23.299722; W: 104.509167). Las hojas secas de orégano se trituraron en un molino IKA hasta que se obtuvo una consistencia de polvo fino. El polvo de orégano se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### 9.2 Extracción de Compuestos Fenólicos

Para la obtención de un extracto stock de compuestos fenólicos se utilizó por cada 1 g de orégano, 10 mL de agua destilada, la mezcla se agitó y homogeneizó en una placa de agitación (Thermo Scientific Cimarec) por 2 h, luego se filtró con una malla de organza. Posteriormente, el extracto obtenido se centrifugó a 6,000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se colectó, se filtró a vacío con papel Whatman #4 y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Esta técnica se realizó en repetidas ocasiones para obtener 5 L de extracto, aproximadamente.

### 9.3 Formulación y Proceso de Encapsulación

El proceso de encapsulación del extracto fenólico de orégano se realizó mediante un secador por aspersión Yamato ADL311S utilizando maltodextrina 10 DE como agente encapsulante. Las variables a controlar fueron temperatura de entrada (°C) y cantidad de agente encapsulante (%). Se tomaron 150 mL de extracto stock y se homogeneizó con maltodextrina 10 DE. El intervalo de temperatura utilizado fue de 112 a 168 °C y el de cantidad de agente encapsulante de 5.9 a 34.1%.

Las condiciones del secador que se mantuvieron constantes fueron la presión de atomización ajustada a 0.1 MPa, el flujo de alimentación a 5 mL/min y el flujo de aire a 0.32 m<sup>3</sup>/min, para cada corrida, se registró la temperatura de salida. Los polvos recuperados fueron pesados para obtener el rendimiento del proceso y posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente en recipientes oscuros para su análisis.

## 9.4 Caracterización Nutracéutica de Microencapsulado Óptimo

### 9.4.1 Determinación de Compuestos Fenólicos

9.4.1.1 Extracción de Compuestos Fenólicos Totales. Los compuestos fenólicos totales fueron extraídos siguiendo el método de Cilek (2012) con algunas modificaciones. 200 mg de polvo de orégano encapsulado se pesaron con precisión y se disolvieron en 2 ml de mezcla de etanol/ácido acético/agua (50:8:42). Esta mezcla se agitó usando un vortex (Vortex-Genie 2) durante 1 min y se filtró con acrodisco de nylon (0.45 µm) para su posterior análisis.

9.4.1.2 Extracción de Compuestos Fenólicos Superficiales. Los compuestos fenólicos superficiales fueron extraídos siguiendo el método de Cilek (2012) con algunas modificaciones. 200 mg de polvo de orégano encapsulado se pesaron con precisión y se disolvieron en 2 mL de mezcla de etanol/metanol (50:50). Esta mezcla se agitó usando un vortex durante 1 min y se filtró con acrodisco de nylon (0.45 µm) para su posterior análisis.

9.4.1.3 Análisis de Compuestos Fenólicos. El contenido de fenólicos se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu utilizando el método propuesto por Swain & Hillis (1959) con algunas modificaciones. Brevemente, el procedimiento consistió en mezclar 10  $\mu\text{L}$  de las muestras, 230  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 10  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu en una microplaca de 96 pocillos. La mezcla se incubó durante 3 min, y luego se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4 N, incubando de nuevo a temperatura ambiente durante 2 h en la oscuridad. Después de la incubación, se midió la absorbancia a 725 nm usando un lector de microplacas Synergy HT. Los cálculos se realizaron utilizando una curva estándar de ácido gálico (de 0 a 0,4 mg/mL), y los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de polvo obtenido (mg AG/g).

9.4.1.4 Compuestos Fenólicos Realmente Encapsulados. Estos se calcularon mediante la resta entre la cantidad de compuestos fenólicos totales y el contenido de compuestos fenólicos superficiales (Saenz et al., 2009)

$$\text{CF Encapsulados} = \text{Fenoles Totales} - \text{Fenoles Superficiales}$$

## 9.4.2 Métodos de Capacidad Antioxidante

9.4.2.1 Inhibición del Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Este método utiliza el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y consiste en reducir su cromógeno púrpura por la acción de un compuesto antioxidante a un hidrazin, compuesto que colorea a un tono amarillo pálido (Karadag et al., 2009). Este ensayo de eliminación de radicales DPPH se llevó a cabo de acuerdo con (Karadag et al., 2009) para lo cual se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra en una microplaca transparente de fondo plano de 96 pocillos. Luego, se agregaron 280  $\mu\text{L}$  del radical DPPH y se dejó incubar durante 30 min en ausencia de luz blanca. Finalmente, se midió la absorbancia a 515 nm usando un lector de microplacas Synergy HT. Se utilizó una curva de Trolox de 0.1 a 1 mmol TE/g para calcular los resultados, que se expresan como mmol de Trolox equivalente por gramo de polvo (mmol TE/g). Cada muestra se midió por triplicado ( $n = 3$ ).

9.4.2.2 Inhibición de la Absorbancia del Radical ABTS. La capacidad antioxidante por ABTS de los encapsulados fue determinada como lo describen Thaipong et al., (2006). El ABTS fue disuelto en agua destilada a una concentración de 7.4 mM (solución stock). El radical ABTS<sup>•+</sup> fue producido mezclando la solución stock de ABTS con persulfato de potasio 2.6 mM (1:1 v/v) e incubando la mezcla en oscuridad a 25 ° C por 12-16 h antes de su uso. Posteriormente, se preparó la solución de reacción tomando 100 µL del radical y se disolvió en 2900 µL de disolvente para ajustar la absorbancia.

Para el ensayo se tomaron alícuotas de 15 µL de extracto y se agregaron 285 µL de la solución de reacción y se homogenizó utilizando un vortex. Posteriormente, se dejó incubar en la oscuridad por 2 h. Transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 734 nm en un lector de microplacas, utilizando placas transparentes de fondo plano de 96 pocillos. La solución de reacción se tomó como blanco. Se utilizó una curva de Trolox de 0.1 a 1 mmol TE/g para calcular los resultados, que se expresan como mmol de Trolox equivalente por gramo de polvo (mmol TE/g). Cada muestra se midió por triplicado (n = 3).

### **9.4.3 Identificación y Cuantificación de Compuestos Fenólicos por Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución/Espectrometría de Masas (UPLC/MS)**

Se usó cromatografía de líquidos-masas para llevar a cabo la separación, cuantificación e identificación de compuestos fenólicos individuales a partir de extracto de orégano sin encapsular y encapsulados. El análisis se realizó en un equipo UPLC clase H (Waters Corporation, EUA) acoplado a un analizador de masas G2-XS QToF (cuadrupolo y tiempo de vuelo). La separación de ácidos fenólicos se realizó con una columna UPLC BEH C18 (1.7 µm × 2.1 mm × 100 mm) a 40 °C, con una solución de elución en gradiente A (agua-ácido fórmico al 0.1%) y solución B, compuesta de metanol, que se suministra a un flujo de 0.3 ml/min. Por otro lado, la separación de flavonoides se realizó con un conjunto diferente de condiciones que incluye una columna UPLC BEH C18 (1.7 µm × 2,1 mm × 100 mm) a 30 °C, con una solución A de gradiente de elución compuesta de agua-ácido fórmico (ácido fórmico al 0.05%) y solución B compuesta de acetonitrilo, que se suministra a un flujo de 0.3 ml/min. La ionización de los compuestos se realizó por

electrospray (ESI) y los parámetros utilizados consistieron en un voltaje de capilar de 1.5 kV, cono de muestreo: 30 V, gas de desolvatación de 800 (L/h) y una temperatura de 500 °C. Se utilizó una rampa de colisión de 0-30 V. Para la identificación de compuestos se utilizó la base de datos Massbank de América del Norte (MoNA). El contenido de compuestos fenólicos se expresó en mg.100 • g-1 del encapsulado. La identificación de compuestos fenólicos por UPLC se realizó por duplicado (n = 2), mientras que para cuantificar el contenido de compuestos fenólicos este se realizó en función del área del pico de la longitud de onda de absorción máxima. Los estándares utilizados fueron ácido cafeico, luteolina, naringenina, floretina y quercetina.

## 9.5 Caracterización Física del Microencapsulado Óptimo

### 9.5.1 Morfología

La morfología de la muestra optimizada se analizó en un microscopio electrónico de barrido ambiental (modelo EVO-50, Carl, Zeiss, Alemania). La muestra sin ningún tratamiento previo se montó sobre un porta muestras con ayuda de una cinta de carbono de doble cara adhesiva. La observación se realizó en condiciones de alto vacío, con un detector de electrones secundarios (SE1) y voltaje de aceleración de 15 kV.

### 9.5.2 Humedad

La cantidad de agua existente en los microencapsulados se determinó mediante un método gravimétrico 925.09 de la AOAC (1997).

### 9.5.3 Rendimiento

El rendimiento del proceso de encapsulación se calculó mediante una técnica gravimétrica como la relación que existe entre la cantidad de sólidos alimentados en el secador respecto a los sólidos recuperados a la salida del secador y se reportó en porcentaje (Krishnaiah et al., 2012)

$$\% \text{ Rendimiento} = (\text{Sólidos Recuperados} \times 100) \div \text{Sólidos Alimentados}$$

### 9.6 Digestión Gastrointestinal *in vitro*

Se realizó un modelo de digestión *in vitro* utilizando el método desarrollado por Flores et al., (2014) con algunas modificaciones. Este modelo de digestión *in vitro* consistió en un procedimiento de 3 pasos que simula la digestión en boca, estómago e intestino delgado aplicando un modelo fisiológico del tracto digestivo humano, imitando la composición química, pH de los fluidos digestivos, temperatura (37 °C) y tiempos de tránsito. La composición de los jugos digestivos sintéticos se detalla en el Cuadro 2.

El proceso de digestión simulado se realizó en tubos de 50 mL de la siguiente manera: La digestión comenzó agregando 1.71 mL de jugo salival a 1 g de microencapsulado, y la mezcla se agitó suavemente (55 rpm) durante 5 min a 37 °C. En el siguiente paso, las muestras se suplementaron con 3.42 mL de jugo gástrico, el pH se ajustó a 1.30 y la mezcla se incubó a 37 °C (2 h, 55 rpm). Finalmente, se agregaron 3.42 mL de jugo intestinal y las muestras se incubaron durante 2 h a 37 °C (55 rpm); al término de la digestión intestinal, el pH se ajustó 8.1. Al final del proceso de digestión *in vitro*, los tubos de digestión se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min y el sobrenadante resultante se mantuvo a -20 °C para su posterior análisis. Las muestras de maltodextrina se corrieron en paralelo como blancos para diferenciar los efectos de los fluidos digestivos en los ensayos. Cada muestra se procesó por triplicado (n = 3).

**Cuadro 2.** Composición de jugos digestivos simulados

Jugo salival	Jugo gástrico	Jugo intestinal
500 mL de agua destilada	500 mL de agua destilada	500 mL de agua destilada
58.5 mg NaCl	2.752 g NaCl	7.012 g NaCl
74.5 mg KCl	0.824 g KCl	0.564 g KCl
1.05 g NaHCO <sub>3</sub>	0.266 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.388 g NaHCO <sub>3</sub>
0.2 g Urea	0.399 g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	80.0 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0.306 g NH <sub>4</sub> Cl	50.0 mg MgCl <sub>2</sub>
	0.085 g Urea	0.1 g Urea
<b>Adjuntos</b>		
0.5 g Mucina	2.5 g Pepsina	9.0 g Pancreatina
1.0 g $\alpha$ -Amilasa	3.0 g Mucina	1.5 g Lipasa
<b>pH</b>		
6.8 $\pm$ 0.2	1.30 $\pm$ 0.02	8.1 $\pm$ 0.2

### 9.6.1 Bioaccesibilidad de Compuestos Fenólicos

La bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos fue medida mediante un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* y se calculó con la ecuación:

$$\text{Porcentaje de bioaccesibilidad} = (\text{concentración final} / \text{concentración inicial}) \times 100$$

Donde la concentración final es el contenido fenólico al final de la fracción intestinal, y la concentración inicial es el contenido fenólico en las muestras no digeridas.

## 9.7 Diseño Experimental

### 9.7.1 Optimización por Metodología de Superficie de Respuesta

La optimización del proceso de microencapsulación de extractos fenólicos de orégano *Lippia graveolens* mediante secado por aspersión se realizó empleando la metodología de superficie de respuesta (MSR), donde el rendimiento y el contenido de fenólicos totales microencapsulados fueron las variables de respuesta, y se usó un diseño central compuesto rotatable. Las variables optimizadas fueron la temperatura de entrada (112 -168 °C) y la cantidad de agente encapsulante (5.9 – 34.1 %), los intervalos de valores para las variables independientes se seleccionaron de acuerdo a lo reportado en la literatura (Canizales 2015; Tolun et al., 2016; Saenz et al., 2009; Cilek et al., 2012). El diseño arrojó 13 experimentos que fueron realizados en orden aleatorio (Cuadro 3). Para la validación del modelo generado, tres muestras de extracto fenólico *Lippia graveolens* fueron microencapsuladas en las condiciones óptimas determinadas. El diseño de la MSR, el análisis de los resultados, las figuras de superficie de respuesta y de contornos, así como la optimización se realizaron empleando el software Minitab 17 y Design-Expert 7.0.0 Trial.

**Cuadro 3.** Variables naturales del diseño central compuesto de dos factores para la microencapsulación de compuestos fenólicos de *Lippia graveolens* mediante secado por aspersión.

ID	Corrida	Factor 2:	
		Factor 1: Temperatura de entrada (°C)	Agente encapsulante (%)
1	1	120	10
2	4	160	10
3	5	120	30
4	7	160	30
5	2	112	20
6	12	168	20
7	9	140	5.9
8	6	140	34.1
9	11	140	20
10	10	140	20
11	8	140	20
12	3	140	20
13	13	140	20

### **9.7.2 Análisis Estadístico**

Los resultados del proceso de microencapsulación se obtuvieron bajo un diseño de superficie de respuesta utilizando un diseño central compuesto rotable con dos factores (temperatura de entrada y cantidad de agente encapsulante). La liberación de los compuestos fenólicos encapsulados se obtuvo bajo un diseño experimental completamente al azar de un factor (etapa de digestión) y cuatro niveles (sin digerir, oral, gástrica, intestinal).

Los diseños propuestos fueron contrastados mediante un análisis de varianza, haciendo la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) en caso de presentar diferencia significativa. Las variables de respuesta utilizadas para el diseño central compuesto fueron % de rendimiento y compuestos fenólicos encapsulados; mientras que para el diseño completamente al azar fue el contenido de polifenólicos y capacidad antioxidante. El paquete estadístico empleado para el análisis de resultados fue Minitab v.17.

## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 10.1 Optimización del Proceso de Microencapsulación

Los resultados experimentales, bajo un diseño central compuesto rotatable, mostraron para la variable de respuesta <rendimiento> valores entre 34.76 % (112 °C y 20 % de agente encapsulante (AE)) y 71.85% (140 °C y 20 % AE), mientras que para la variable de respuesta compuestos fenólicos encapsulados (CFE) se mostraron intervalos entre 138 mg AG (112 °C y 20 % AE) y 284.38 mg AG (140 °C y 20 % AE) (cuadro 4). Los términos que resultaron significativos estadísticamente ( $p < 0.05$ ) del ANOVA en un modelo cuadrático para la variable de respuesta (rendimiento) en función de la temperatura de entrada y porcentaje de agente encapsulante se muestran en el cuadro 5, mientras que para la variable de respuesta (compuestos fenólicos encapsulados) en función de las mismas variables, se muestran en el cuadro 6. En particular, tanto el término lineal como el término cuadrático de agente encapsulante resultaron significativos respecto a la variable de respuesta rendimiento, en este sentido, este modelo presentado en la ecuación 1 mostró un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 79.36% explicando una alta variabilidad en los rendimientos. En lo que respecta a la variable de respuesta compuestos fenólicos encapsulados, el término lineal y cuadrático de los dos factores temperatura y agente encapsulante resultaron significativos, mostrando para este modelo (ecuación 2) un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 87.29%.

$$(1) \text{ Rendimiento} = -435 + 7.04T - 0.57AE - 0.02514T^2 - 0.0554AE^2 + 0.0163TAE$$

$$(2) \text{ Compuestos fenólicos encapsulados} = -1171 + 29.70T - 9.13AE - 0.1103T^2 - 0.2381AE^2 + 0.1188TAE$$

Donde:

T= Temperatura de Entrada (°C)

AE=Agente encapsulante (%)

Rendimiento= % de recuperación  
 Compuestos fenólicos totales= miligramos de ácido gálico

**Cuadro 4.** Resultados experimentales del proceso de microencapsulación

Estándar	Corrida	T (°C)	% AE	% R	CFE (mg AG/ 430 mg AG)
1	1	120	10	<b>58.93</b>	<b>251.15</b>
2	4	160	10	<b>53.85</b>	<b>212.59</b>
3	5	120	30	<b>40.22</b>	<b>150.59</b>
4	7	160	30	<b>48.15</b>	<b>207.10</b>
5	2	111.7	20	<b>34.76</b>	<b>138.00</b>
6	12	168.2	20	<b>69.39</b>	<b>260.63</b>
7	9	140	5,8	<b>66.92</b>	<b>259.57</b>
8	6	140	34.1	<b>55.30</b>	<b>220.29</b>
9	11	140	20	<b>69.05</b>	<b>277.39</b>
10	10	140	20	<b>66.42</b>	<b>284.38</b>
11	8	140	20	<b>69.27</b>	<b>276.55</b>
12	3	140	20	<b>71.85</b>	<b>282.36</b>
13	13	140	20	<b>68.61</b>	<b>281.40</b>

T= Temperatura de entrada; %AE= Porcentaje de agente encapsulante; %R= Porcentaje de rendimiento; CFE= Compuestos fenólicos encapsulados; AG= ácido gálico.

**Cuadro 5.** Análisis de varianza del efecto de los factores temperatura (°C) y agente encapsulante (%), ajustadas a un modelo cuadrático, en el rendimiento (tasa de recuperación de polvos) del proceso de encapsulación.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p
Modelo	5	1416.50	283.30	5.38	<b>0.0239</b>
A-T de entrada	1	335.53	335.53	6.38	<b>0.0395</b>
B-% AE	1	208.49	208.49	3.96	0.0868
AB	1	42.33	42.33	0.80	0.3996
A <sup>2</sup>	1	703.63	703.63	13.37	<b>0.0081</b>
B <sup>2</sup>	1	213.51	213.51	4.06	0.0838
Residuos	7	368.40	52.63		
Falta de ajuste	3	353.44	117.81	31.50	0.0031
Error puro	4	14.96	3.74		
Total	12	1784.91			

R<sup>2</sup>=79.35%

**Cuadro 6.** Análisis de varianza del efecto de los factores temperatura (°C) y agente encapsulante (%), ajustadas a un modelo cuadrático, en el contenido de compuestos fenólicos encapsulados recuperados después del proceso de encapsulación.

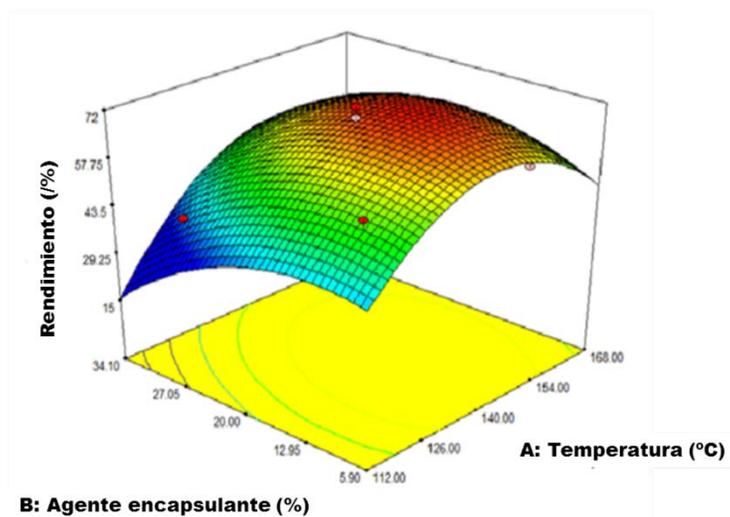
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p
Modelo	5	25942.68	5188.54	9.62	<b>0.0049</b>
A-T de entrada	1	4597.07	4597.07	8.52	<b>0.0224</b>
B-% AE	1	3279.71	3279.71	6.08	<b>0.0431</b>
AB	1	2240.55	2240.55	4.15	0.0809
A <sup>2</sup>	1	13524.35	13524.35	25.07	<b>0.0016</b>
B <sup>2</sup>	1	3934.76	3934.76	7.29	<b>0.0306</b>
Residuos	7	3776.05	539.44		
Falta de ajuste	3	3731.52	1243.84	111.74	0.0003
Error puro	4	44.53	11.13		
Total	12	29718.72			

R<sup>2</sup>=87.25%

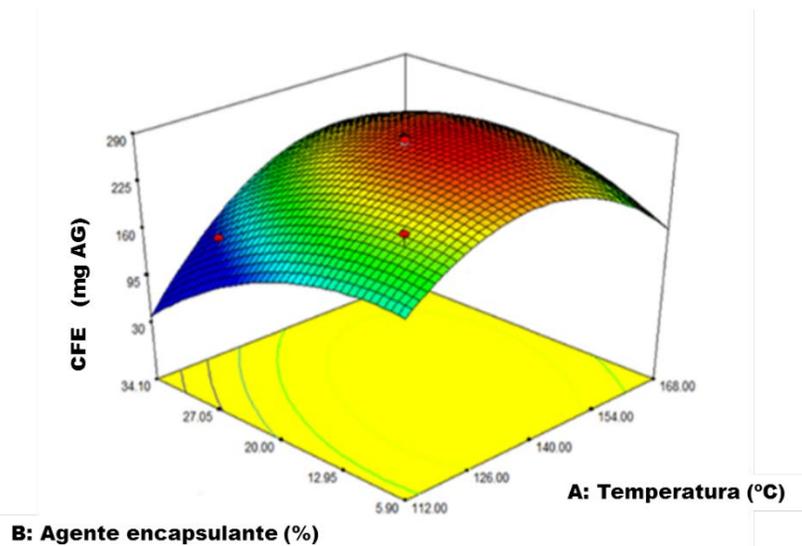
En la Figura 1 se muestra la gráfica de superficie de respuesta para las dos variables de respuesta, las cuales tienen un comportamiento similar, indicando que el mayor rendimiento y cantidad de compuestos fenólicos microencapsulados tienden a alcanzarse en valores de temperaturas centrales de 140 y 155 °C) y cantidades de agente encapsulante entre 15 y 25%.

Para encontrar las condiciones óptimas de microencapsulación se realizó un análisis de optimización de las respuestas, en función de deseabilidad compuesta. Se determinó un valor máximo de rendimiento de 70.855% y un contenido de compuestos fenólicos encapsulados de 285.41 mg de AG a las condiciones de 145.42 °C y 16.14 % de agente encapsulante para una deseabilidad compuesta de 0.9866 (Figura 2), el cual se aproxima más a los valores encontrados en las condiciones de los puntos centrales del diseño central compuesto (T=140°C y AE= 20%).

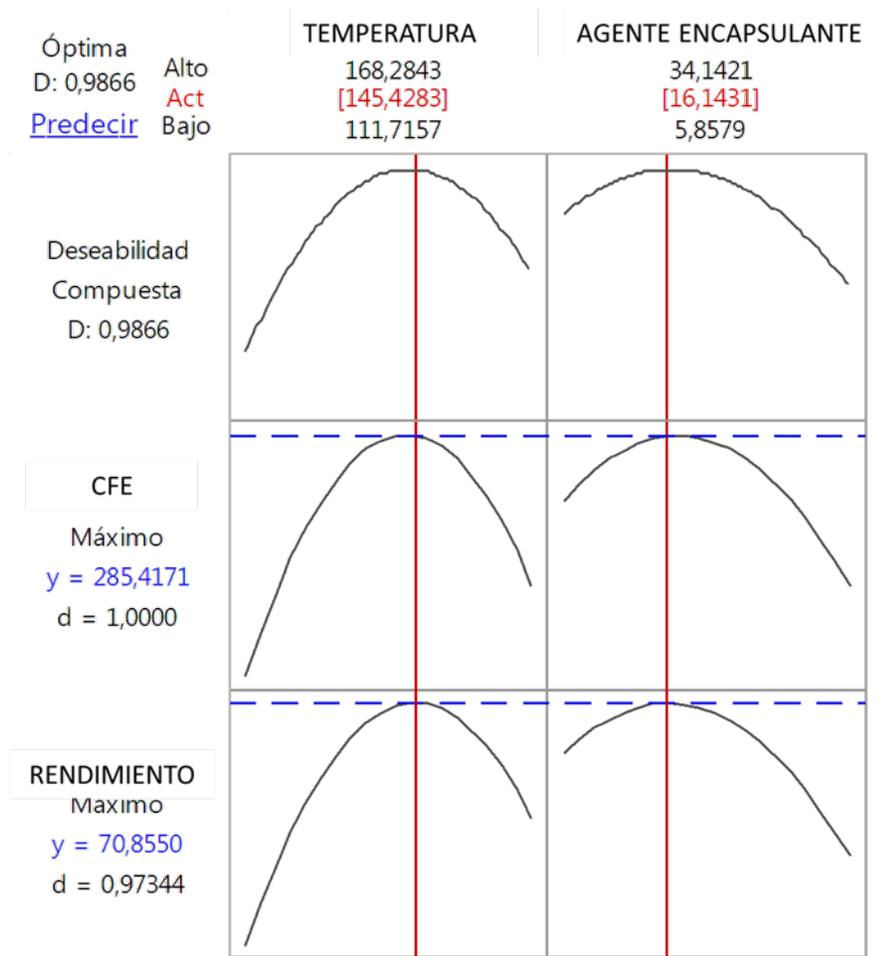
(a)



(b)

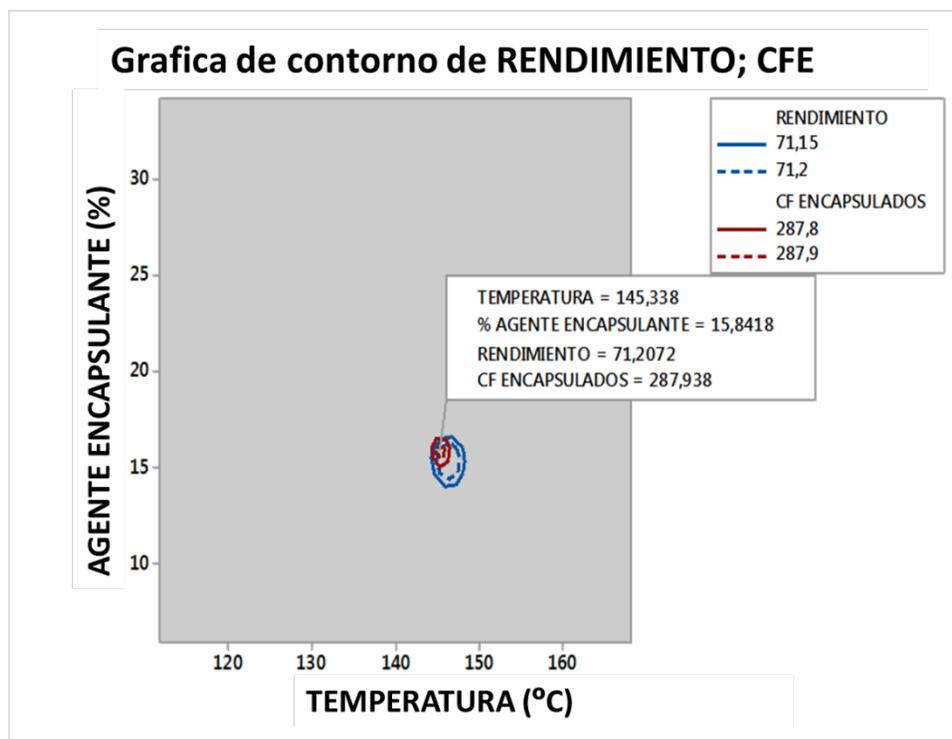


**Figura 1.** Superficie de respuesta de las variables, % de rendimiento (a) y compuestos fenólicos encapsulados (b) para la encapsulación de fenólicos de orégano *Lippia graveolens* mediante secado por aspersión.



**Figura 2.** Condiciones de temperatura de entrada y cantidad de agente encapsulante óptimas (en rojo) y valores máximos esperados (en azul).

Para asegurar estas condiciones de la Figura 2, se identificó la región óptima en una gráfica de contornos superpuesta en la cual los dos predictores continuos producen conjuntamente resultados aceptables para una o más respuestas (Figura 3). Los valores encontrados son muy similares a los predichos por el optimizador de respuestas, por tanto, se prosigió a correr el experimental a las condiciones óptimas.



**Figura 3.** Región óptima para la encapsulación de compuestos fenólicos de *Lippia graveolens* mediante secado por aspersión.

Por otro lado, los resultados experimentales obtenidos a las condiciones consideradas como óptimas ( $T = 145.42\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $AE = 16.14\%$ ) fueron de 308.32 mg de AG encapsulados y un rendimiento de 77.26%, ambos valores fueron superiores a lo estimado por el modelo.

Una vez realizado el microencapsulado a las condiciones óptimas, se prosiguió con la caracterización física y antioxidante, además de la evaluación de la bioaccesibilidad en un modelo de digestión *in vitro*.

### 10.2 Caracterización Antioxidante del Microencapsulado Óptimo

En el Cuadro 7 se muestra el contenido de compuestos fenólicos de los extractos de orégano microencapsulados con maltodextrina 10 DE, los cuales presentaron un contenido de fenólicos totales encapsulados de 14.05 mg AG/g de polvo, este resultado se calculó mediante la diferencia entre los fenólicos totales y los fenólicos superficiales, estos últimos son aquellos metabolitos que

no lograron encapsularse. Con estos datos se determinó el porcentaje de compuestos fenólicos encapsulados por gramo de polvo, obteniendo un 97.21% de compuestos realmente encapsulados. El contenido de compuestos fenólicos microencapsulados (14.05 mg AG/g) fue inferior a lo encontrado en un extracto de orégano sin encapsular (33.66 mg AG/g de orégano), sin embargo, el resultado es relevante ya que al agregar agente encapsulante a un extracto la distribución espacial de los polifenólicos es dispersa y su cuantificación por unidad de masa disminuye (Peng et al., 2013). Los valores obtenidos fueron similares a los reportados por Canizales (2015) para microencapsulados de fenólicos de maíz azul (13.9 mg AG/g) y superiores a lo encontrado por Tolun (2016) quien microencapsuló compuestos fenólicos de uva (5.4-8.5 mg AG/g).

**Cuadro 7.** Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de orégano microencapsulados

Muestra	CFT	CF Superficiales	CFT Encapsulados
Polvo óptimo	14.45 ± 0.34	0.40 ± 0.02	14.05 ± 0.31

Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por cada gramo de microencapsulado (mg AG/g). Datos mostrados como medias ± desviación estándar de tres replicas.

Respecto a la capacidad antioxidante del microencapsulado (Cuadro 8), se encontró para la inhibición del radical DPPH un valor de 50.83  $\mu\text{mol ET/g}$ , mientras que para ABTS fue de 85.17  $\mu\text{mol ET/g}$ . Los valores obtenidos fueron superiores a lo reportado por Cilek (2012) para extractos de orujo de cereza microencapsulados con una mezcla de maltodextrina/goma arábica utilizando el método de DPPH (17.98  $\mu\text{mol ET/g}$ ) y por Saénz (2009) para extractos de cáscara de cactus (*Opuntia ficus-indica*) microencapsulados con maltodextrina 10 DE utilizando el método de ABTS (19.2  $\mu\text{mol ET/g}$ ).

Estas diferencias se deben a diversos factores fisicoquímicos, los autores señalan que la capacidad antioxidante de un producto está determinada por interacciones entre diferentes compuestos con diferentes mecanismos de acción. Además, depende de la concentración de especies químicas presentes en el extracto a microencapsular y a su diversidad estructural, así como a la interacción de las mismas con la matriz encapsulante.

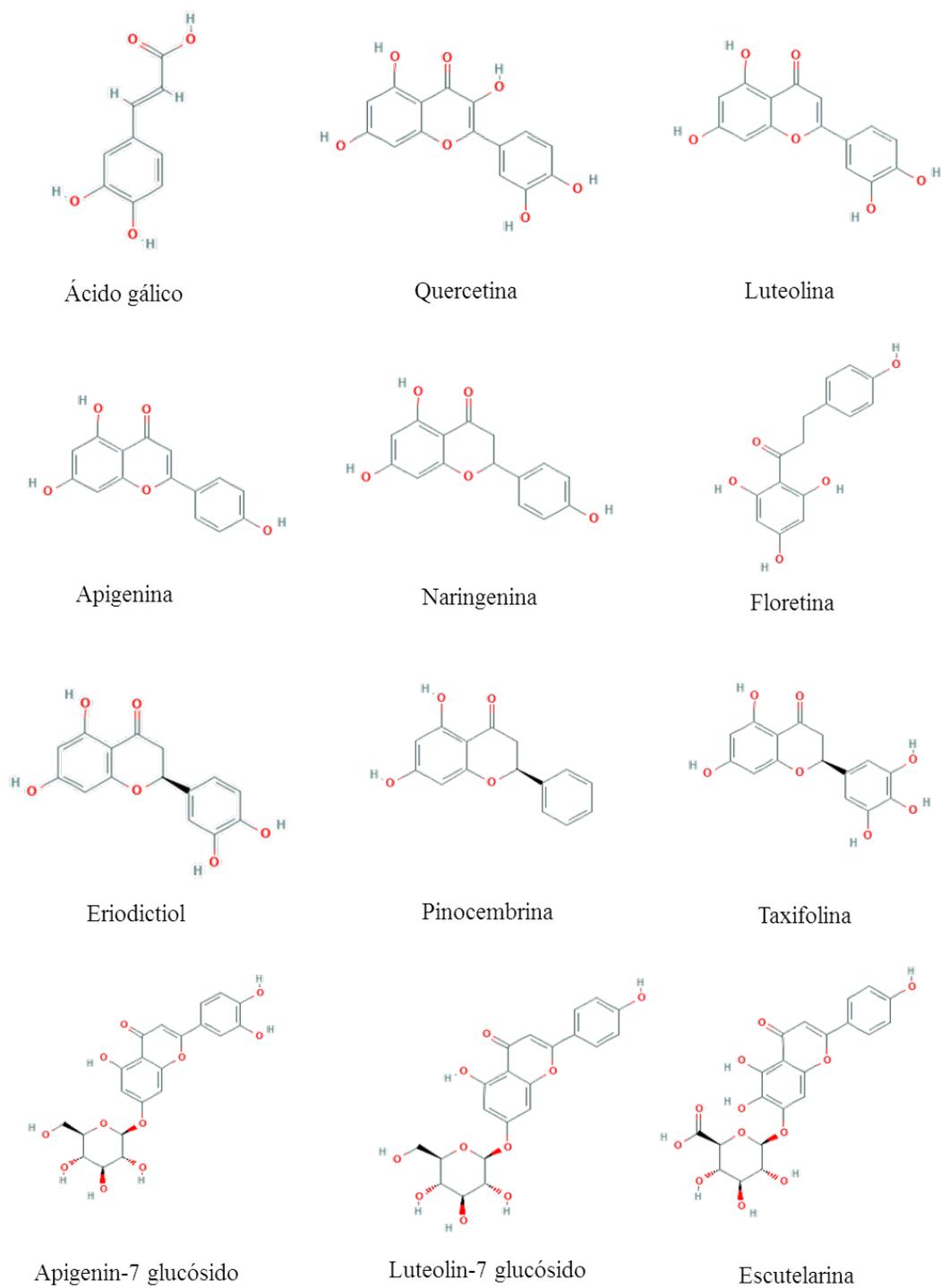
**Cuadro 8.** Capacidad antioxidante de extractos fenólicos de orégano microencapsulados

Muestra	Capacidad DPPH	Capacidad ABTS
Polvo óptimo	50.83 ± 0.25	85.17 ± 2.07

Los resultados se expresan en  $\mu$ moles equivalentes de Trolox por gramo de polvo ( $\mu$ mol ET/g). Datos mostrados como medias  $\pm$  desviación estándar de tres replicas.

### 10.3 Identificación de Compuestos Fenólicos por Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución/Espectrometría de Masas (UPLC-MS)

Los compuestos fenólicos microencapsulados fueron identificados comparando los fragmentos obtenidos en cada espectro de la muestra con los espectros proporcionados por la base de datos MassBank of North America (MoNA). Se identificaron 12 compuestos (Figura 4) de los cuales 11 son del grupo de los flavonoides y solo un ácido fenólico. Respecto a los flavonoides encontrados, 5 pertenecen al grupo de las flavonas luteolina-7-glucósido, escutelarina, apigenina-7-glucósido, luteolina y apigenina), 4 flavanonas (taxifolina, eriodictiol, naringenina y pinocembrina), un flavonol (quercetina) y una dihidrochalcona (floretilina) (Cuadro 9). Como se puede observar el mayor número de compuestos fenólicos identificados pertenecen al grupo de las flavonas, esto concuerda con los resultados de otros autores como Lin et al., (2007), Criollo-Mendoza (2018) y Picos-Salas (2018) quienes reportaron la identificación de la mayoría de estos compuestos obtenidos de orégano *Lippia graveolens*. Respecto a los ácidos fenólicos microencapsulados solo se identificó ácido cafeico, cabe resaltar que en un extracto sin microencapsular se lograron identificar además de ácido cafeico otros dos compuestos (ácido gálico y ácido vanílico), esto nos indica que durante el proceso de secado los ácidos fenólicos se degradaron, esto por su estructura simple y la alta temperatura.



**Figura 4.** Estructuras químicas de compuestos fenólicos identificados en los extractos de orégano *Lippia graveolens* microencapsulados.

**Cuadro 9.** Compuestos fenólicos identificados y cuantificados por UPLC-MS en los extractos de orégano microencapsulados mediante secado por aspersión.

tR (min)	MS <sup>2</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> (m/z)	Identificación	Tipo de compuesto	Cuantificación
4.15	180.04	179.03	134.03, 135.04, 179.03	Ácido cafeico	Ácido fenólico	147.55 ± 6.92 <sup>a</sup>
5.41	448.10	447.09	284.03, 285.03, 447.09	Luteolin-7-glucósido	Flavona	130.11 ± 14.40 <sup>e</sup>
5.49	462.08	461.07	164.98, 285.04, 461.07	Escutelarina	Flavona	3.51 ± 0.15 <sup>e</sup>
5.65	304.05	303.05	125.02, 285.03, 303.04	Taxifolina	Flavanona	249.06 ± 31.01 <sup>e</sup>
6.08	432.10	431.09	268.03, 269.04, 431.09	Apigenin-7-glucósido	Flavona	20.09 ± 2.09 <sup>e</sup>
7.30	288.06	287.05	135.04, 151.00, 287.05	Eriodictiol	Flavanona	112.44 ± 9.54 <sup>e</sup>
7.36	286.04	285.03	133.02, 151.00, 285.03	Luteolina	Flavona	96.93 ± 4.61 <sup>b</sup>
7.38	302.04	301.03	151.00, 178.99, 301.03	Quercetina	Flavonol	18.87 ± 1.99 <sup>c</sup>
7.95	270.05	269.04	117.03, 151.00, 269.04	Apigenina	Flavona	28.75 ± 2.51 <sup>e</sup>
7.97	272.06	271.06	119.04, 151.00, 271.06	Naringenina	Flavanona	204.65 ± 17.39 <sup>e</sup>
8.01	274.08	273.07	123.04, 167.03, 273.07	Floretina	Dihidrochalcona	21.35 ± 1.43 <sup>d</sup>
9.45	256.07	255.06	151.00, 213.05, 255.06	Pinocembrina	Flavanona	28.20 ± 1.70 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> μg Acido Cafeico /g de microencapsulado

<sup>b</sup> μg Luteolina /g de microencapsulado

<sup>c</sup> μg Quercetina /g de microencapsulado

<sup>d</sup> μg Floretina /g de microencapsulado

<sup>e</sup> μg Equivalentes de Quercetina /g de microencapsulado

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar de tres réplicas

La cuantificación se realizó basándonos en los estándares comerciales disponibles (Cuadro 9). Los compuestos fenólicos que predominan en mayor concentración pertenecen al grupo de las flavanonas. Este perfil fue similar en estudios realizados por Leyva-López (2017) y Lin et al., (2007) a pesar de que el método de extracción fue con agua al 100%. Cabe mencionar que en este estudio uno de los flavonoides encontrados en mayor concentración fue naringenina, el cual ya ha sido reportado como predominante en extractos metanólicos de la especie *L. graveolens* (Picos-Salas, 2018) (Bower et al. 2014).

## 10.4 Caracterización Física del Microencapsulado Óptimo

En el Cuadro 9, se muestra la caracterización física de las microcápsulas de los compuestos fenólicos del orégano con un rendimiento del proceso de microencapsulación de 77.42 %. Durante el proceso de secado, la maltodextrina forma una película en la cámara de secado, disminuyendo la tasa de recuperación de micropartículas al final del proceso, estas pérdidas se pueden evitar incrementando la cantidad de sólidos. En este tipo de tecnología, rendimientos superiores al 50% se consideran como eficientes, por lo que se puede asegurar que se logró un eficiente proceso de encapsulación.

El porcentaje de rendimiento en este estudio fue superior a lo reportado por Canizales et al. (2015) quien utilizó maltodextrina al 10 % a una temperatura de 150 °C obteniendo 70 % de rendimiento, así como a lo reportado por Tolun et al., (2016) y Cam et al., (2013), quienes encapsularon fenólicos de uva y granada respectivamente, obteniendo 57.2 y 59.22%, utilizando maltodextrina y temperaturas de 140 y 150 °C. El obtener un rendimiento superior a lo reportado, puede ser atribuido a que el porcentaje de sólidos que se utilizó fue de 16%, es decir mayores a los utilizados por los autores citados (menores a 10% de sólidos).

En el proceso de secado uno de los objetivos primordiales es obtener productos con bajo contenido de humedad. Los microencapsulados presentaron un porcentaje de humedad de 3.55 %, este valor resulta de importancia, ya que es inferior a lo reportado por otros autores como Canizales (2015) con 5.67%, y por Tolun et al., (2016) con un 10.7%. De igual forma, también se apega a la NOM-183-SCFI-2012 para leche en polvo elaborada mediante el proceso de secado por aspersion, ya que especifica un límite permisible de 4 % de humedad, siendo este producto uno de los de menor porcentaje de humedad. El bajo porcentaje de humedad se debe a que, en el proceso de secado, la muestra entra en contacto con una corriente de aire caliente evaporando el agua presente, valores bajos de humedad son deseables ya que se promueve la interacción compuestos fenólicos-maltodextrina, además que evita la oxidación de los fenólicos, así como la proliferación de microorganismos.

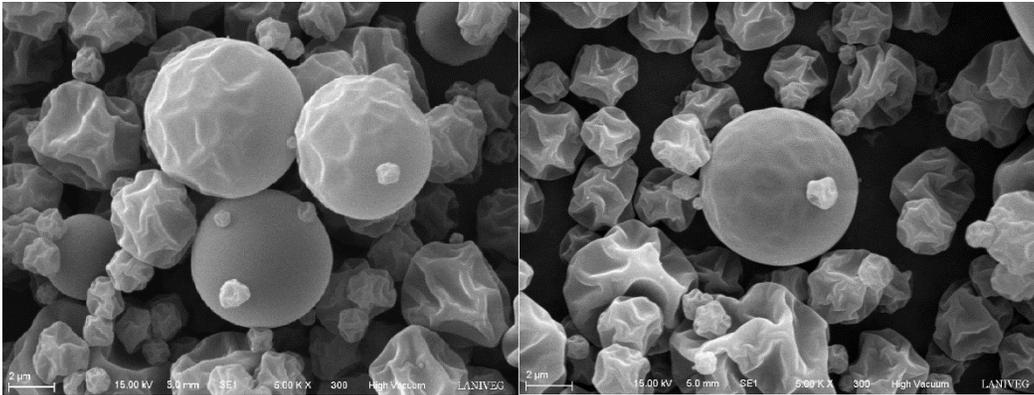
**Cuadro 10.** Caracterización física de los microencapsulados óptimos producidos con maltodextrina 10 DE, mediante secado por aspersión.

Muestra	%R	%H
Polvo óptimo	<b>77.42 ± 0.14</b>	<b>3.551 ± 0.03</b>

%R=porcentaje de rendimiento; %H= porcentaje de humedad; DE= equivalente de dextrosa  
Datos mostrados como medias ± desviación estándar de tres réplicas

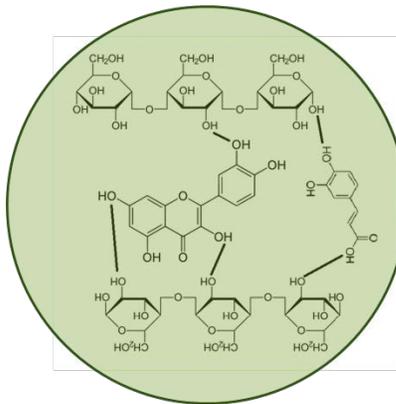
Una de las características esenciales a considerar en un microencapsulado es definir su tamaño y forma. La técnica de microscopía electrónica para los microencapsulados de polifenoles de orégano permitió observar un tamaño de partículas entre 2 y 12 micras, una forma esférica con depresiones (Figura 5). En este sentido la variabilidad mínima respecto al tamaño es deseable para no afectar las propiedades sensoriales del producto final en donde se aplique. La forma esférica con contracciones es una característica típica de la encapsulación en secador por aspersión debido a la alta velocidad de evaporación del agua al momento de ser asperjada la muestra, además que puede influir la presión del aire de atomización y el grado de hidrólisis de la maltodextrina, es decir, a mayor DE (equivalentes de dextrosa) la superficie de las micropartículas son más lisas. Sin embargo, se utilizó maltodextrina con bajo grado de hidrólisis, esto debido a que proporciona otras ventajas como lo es una mayor vida de anaquel, ya que a menor DE es mayor la temperatura de transición vítrea, y esto está muy relacionado con la vida útil de los productos.

Respecto a los datos observados en las micrografías, estos coinciden con los reportados por Canizales et al. (2018), quien utilizando maltodextrina como agente encapsulante para polifenoles de maíz azul y obtuvo micropartículas de 1 a 10  $\mu\text{m}$ , forma esférica y con marcadas depresiones, esto bajo condiciones similares de proceso. De igual forma Cam (2013), analizó la estructura de microencapsulados producidos con maltodextrina y goma arábiga para fenólicos de cáscara de granada, observando tamaños promedio de 10  $\mu\text{m}$  y forma esférica.



**Figura 5.** Micrografías de la estructura de las micropartículas producidas con maltodextrina 10 DE como agente encapsulante de compuestos fenólicos de orégano mexicano mediante secado por aspersión.

La forma esférica de las microcápsulas se atribuye a la interacción entre moléculas de maltodextrina como agente encapsulante (formada por 10 unidades de glucosa unidas mediante enlaces  $\alpha$ -1,4) con los fenólicos extraídos del orégano, mediante puentes de hidrógeno y fuerzas electrostáticas (Figura 6).

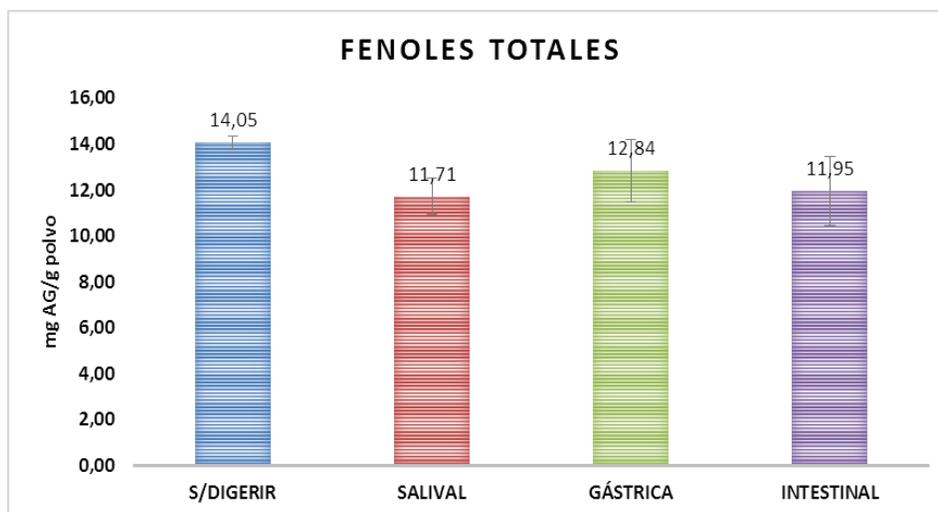


**Figura 6.** Interacción entre maltodextrina y compuestos fenólicos  
Adaptada de Alcaraz (2013) y Canizales (2015).

## 10.5 Bioaccesibilidad de los Compuestos Fenólicos Microencapsulados

Para la determinación del porcentaje de bioaccesibilidad se cuantificaron los compuestos fenólicos totales al finalizar cada fase digestiva utilizando como control una muestra de microencapsulado sin digerir (Figura 7). Los resultados mostraron una liberación de fenólicos en la etapa salival del 83.34%, mientras que en la fase gástrica hubo un aumento presentándose un 91.38% y finalmente en la etapa intestinal se presentó una ligera disminución encontrando una bioaccesibilidad de 85.05%. No se presentaron diferencias significativas entre las 3 fases de bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y el control, con esto puede indicar que no existió degradación significativa de los compuestos fenólicos y con ello asumir que la utilización del proceso de microencapsulación fue efectiva en la protección de estos. Cabe señalar que estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo, Gutiérrez-Grijalva et al. (2019) evaluaron la bioaccesibilidad de fenólicos en extracto de orégano sin encapsular encontrando una bioaccesibilidad en la etapa intestinal de 7.46%, ellos mencionaban que las condiciones de pH son uno de los principales factores que afectan la estabilidad de los fenólicos. Comparando con este resultado, los valores encontrados en nuestro estudio son de gran relevancia ya que se logró una bioaccesibilidad del 80% aproximadamente muy superior respecto al extracto en fresco, lo que sugiere que la tecnología de microencapsulación con maltodextrina es una buena alternativa para la protección de compuestos fenólicos.

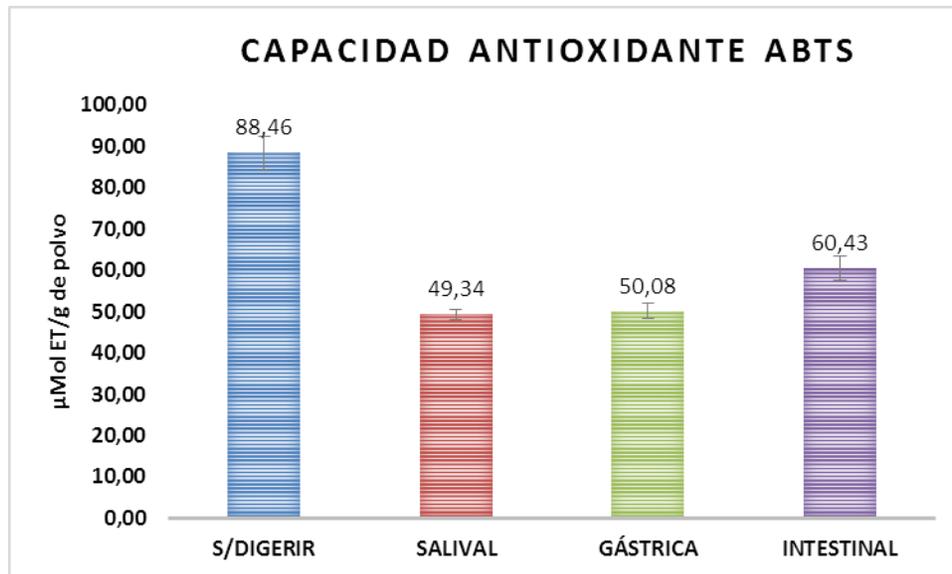
Resultados similares fueron obtenidos por Canizales (2015) quien evaluó la liberación de fenólicos de maíz azul microencapsulados con maltodextrina 30 DE. En donde se determinó una liberación en la etapa gástrica de 98% mientras que en la fase intestinal un 88%. Este autor también menciona que en condiciones gástricas puede presentarse una solubilización e hidrólisis ácida de la matriz polimérica (maltodextrina) y en condiciones intestinales una hidrólisis enzimática, así como también mencionan que se pueden presentar interferencias en el ensayo de Folin-Ciocalteu por presencia de azúcares reductores como la glucosa, potente azúcar reductor que conforma las moléculas de maltodextrina.



**Figura 7.** Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos durante el proceso de digestión *in vitro*

En otro estudio, Martínez-Cifuentes et al. (2017), sometieron a digestión *in vitro* extractos liofilizados de taxo (*Passiflora mollissima*), mora (*Rubus glaucus* Benth) y mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) así como también extractos microencapsulados de cada fruto con maltodextrina y mezcla de maltodextrina-goma arábiga. El contenido de compuestos fenólicos en los extractos liofilizados disminuyó de forma drástica después de la fase gástrica obteniendo al final del proceso de digestión 30, 57 y 50 % de fenólicos, respectivamente. Lo contrario ocurrió con los microencapsulados ya que al estar cubiertos con un material encapsulante no se encuentran expuestos directamente a cambios de pH, medios ácidos o alcalinos como los medios generados en el estómago e intestino delgado en la digestión *in vitro*, obteniendo una bioaccesibilidad de 72%, 83% y 80%, para taxo, mora y mortiño, respectivamente.

Respecto a la capacidad antioxidante (Figura 8), esta se evaluó mediante el ensayo ABTS determinando concentraciones para la fase salival de 49.34  $\mu\text{mol ET/g}$ , fase gástrica 50.08  $\mu\text{mol ET/g}$  y fase intestinal 60.33  $\mu\text{mol ET/g}$ , lo que equivalen respecto al control a 55, 57% y 68 %, respectivamente.



**Figura 8.** Capacidad antioxidante de extractos microencapsulados durante el proceso de digestión *in vitro*.

En el estudio realizado por Canizales et al. (2018), ellos obtuvieron un porcentaje de capacidad antioxidante en la etapa intestinal del 60% respecto a su control, similar a lo encontrado en nuestro estudio. Sin embargo, en otro estudio realizado por Martínez-Cifuentes et al. (2017), determinaron un porcentaje de capacidad antioxidante en microencapsulados de taxo y mora de 133 y 166%, respectivamente, en la fase intestinal; ellos discuten que el aumento o decremento se debe a que la capacidad antioxidante depende del tipo y concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos microencapsulados, ya que existen una diversidad de estructuras químicas las cuales al interactuar con el agente encapsulante pueden o no soportar las condiciones gástricas.

## 11. CONCLUSIONES

El orégano es una fuente potencial de compuestos fenólicos con alta capacidad antioxidante. Se optimizó la temperatura de entrada (145 °C) y el porcentaje de agente encapsulante (16 %) para el proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión de extractos fenólicos de orégano.

El microencapsulado optimizado posee un alto contenido de compuestos fenólicos principalmente flavonoides como flavonas y flavanonas.

El microencapsulado optimizado con maltodextrina 10 DE presentó morfología y tamaños típicos, así como una humedad óptima para evitar la degradación de los compuestos fenólicos.

La bioaccesibilidad de compuestos fenólicos al final del proceso de digestión fue del 85%, concluyendo en la posible protección del agente encapsulante sobre los fenólicos.

## 12. RECOMENDACIONES

Identificar y cuantificar mediante UPLC-MS-QToF los compuestos fenólicos microencapsulados sometidos al proceso de digestión *in vitro*.

Evaluar la absorción de compuestos fenólicos por difusión pasiva *in vitro* en la última fase de digestión.

Determinar la vida de anaquel del microencapsulado en función del contenido de fenólicos y capacidad antioxidante.

Evaluar actividad antiproliferativa de fenólicos microencapsulados sobre líneas celulares de cáncer.

### 13. REFERENCIAS

- Alcaraz, S. V. (2013). Microencapsulación de compuestos bioactivos de maíz híbrido azul mediante liofilización. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., 24.
- Almajano, M. P. (2009). Determinación de la actividad antioxidante de las bayas de Goji. *Consejo Escola Industrial de Barcelona*, 6:12.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125, 989-1009.
- Bhandari, Z. F. (2017). Spray Drying of Bioactives. En Y. H. Roos, & Y. D. Livney, *Engineering foods for bioactives stability and delivery* (pág. 420). Washington State University, USA: Food Engineering Series.
- Bower, A. M., Hernandez, L. M., Berhow, M. A., & Mejia, E. G. (2014). Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (26): 6147-6158.
- Çam, M., Cihat, N., & İçyer, F. E. (2013). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, 1-7.
- Canizales, J. R. (2015). Microencapsulación de polifenoles de maíz híbrido azul y su liberación en un modelo de digestión in vitro. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, 57.
- Canizales, J. R., Heredia, J. B., Avila, J. A., Santana, T. J., Ochoa, M. A., Sánchez, R. M., & Aguilar, G. A. (2018). Microencapsulation of blue maize (*Zea mays* L.) polyphenols in two matrices: their stability during storage and in vitro digestion release. *Journal of Food Measurement and Characterization*.
- Chang, C., Yang, H., J.C., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10:178-182.
- Chen, J. (2009). Food oral processing – A review. *Food Hydrocolloids*, 23, 1–25.
- Christine Wandrey, A. B. (2010). Materials for encapsulation. En N. J. Nedovic, *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (págs. 31-109). Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
- 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. *Eur Food Res Technol*, 235:587–596.
- CONAFOR, C. N. (2003). Paquete Tecnológico: *Lippia graveolens* Kunth. Sistema de Información Forestal.
- Criollo-Mendoza, M. S. (2018). Actividad antiproliferativa de extractos hidroalcohólicos de tres especies de orégano sobre una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., 45.

- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4): 1321–1342.
- Ebrahimzadeh, M., Ghasemi, K., & Ghasemi, Y. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22:227-281.
- Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Pegg, R. B., & Kong, F. (2014). Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 153 272–278.
- Fraga, C. G. (2010). Dietary flavonoids and phenolic compounds. *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. John Wiley and sons, INC Publication, 1-50
- Frontela, C., Ros, G., Martínez, C., Sánchez-Siles, L., Canali, R., & Virgili, F. (2011). Stability of Pycnogenol® as an ingredient in fruit juices subjected to in vitro gastrointestinal digestion. *Science of Food and Agriculture*, 91: 286-292.
- Ginsburg, I., R. Kohen, M. S., Varon, D., Shai, E., & Koren, E. (2013). The oxidant-scavenging abilities in the oral cavity may be regulated by a collaboration among antioxidants in saliva, microorganisms, blood cells and polyphenols: A chemiluminescence-based study. *Open Access Journal- PLOS ONE*, 8(5): e63062.
- Gomez, H. S. (2014). Medida de los fenoles totales y de la capacidad antioxidante y antirradicalaria de los hongos comestibles *marasmius oreades*, *lactarius deliciosus* y *macrolepiota procera* y su degradación a diferentes tiempos y temperaturas. Valladolid, España: Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina, 15-17.
- Gutiérrez, J. V. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2):126-33.
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Angulo-Escalante, M. A., León-Félix, J., & Heredia, J. B. (2017). Effect of In Vitro Digestion on the Total Antioxidant Capacity and Phenolic Content of 3 Species of Oregano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*). *Journal of Food Science*, Vol. 82, Nr. 12 2832-2839.
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Antunes-Ricardo, M., Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Heredia, J. B. (2019). Cellular antioxidant activity and in vitro inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International* 116: 676–686.
- Gutiérrez-Grijalva, E., Ambriz-Perez, D., Leyva-López, N., Castillo-López, R., & Heredia, J. (2016). Review: Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(2): 87-100.
- Hernández, O. D. (2010). Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersion. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(3)381-389.
- Huang, D., Ou, B., & Hampsch-Woodill. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with the

- microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50:4437-4444.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 1841-1856.
- Huertas, R. A. (2011). Food Microencapsulation: A Review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2):5669-568.
- Hur, S., Lim, B., Decker, E., & McClements, D. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125 1-12.
- Jacobson, J. D. (2001). Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology*, 209-228.
- Juániz, I. A.-P. (2017). Bioaccessibility of (poly)phenolic compounds of raw and cooked cardoon (*Cynara cardunculus* L.) after simulated gastrointestinal digestion and fermentation by human colonic microbiota. *Journal of Functional Foods*, 195–207.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2:41-60.
- Kintzios, S. (2012). 21- Oregano. En *Handbook of herbs and spices (Second edition)* (págs. 417-436). Woodhead Publishing.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2012). Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chemical Engineering Research and Design*, 90(5), 622-632.
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A., Manach, C., Morand, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006). Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *The Journal of Nutrition*, 136(5):1192-7.
- Leyva-López, N. (2017). Potencial antiinflamatorio de tres especies de orégano: *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* y *Hedeoma patens*. *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo*, AC, 18.
- Lin, L. Z., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. J., & Harnly, J. M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 361–369.
- Livney, Y., & Roos, Y. D. (2017). *Engineering Foods for Bioactives Stability and Delivery*. (G. V. Barbosa-Cánovas, Ed.) New York, NY: Springer Science+Business Media.
- Martínez, S. A. (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. *Universidad Complutense de Madrid- Facultad de farmacia Departamento de Bromatología II*, 177:6.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, (6) 271-278.
- Martínez-Ramírez, E., Reyes-Munguía, A., Campos-Montiel, R., Hernández-Fuentes, A. D., & Pimentel-González, D. (2015). Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos encapsulados provenientes del xoconostle. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 1(2).

- McClements, D., Decker, E., Park, Y., & Weiss, J. (2008). Designing food structure to control stability, digestion, release and absorption of lipophilic food components. *Food Biophysics*, 3:219-228.
- Mercado, G. M. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en Mexico. *Nutricion Hospitalaria*, 28(1):36-46.
- Mishra, P., Mishra, S., & Mahanta, C. L. (2014). Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food & Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers Part C*, 92(3): 252-258.
- Moyano, G. P. (2012). Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus Vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en el municipio de Sucre (SANTANDER). *Universidad Industrial de Santander- Facultad de Ciencias- Escuela de Química*, 202:31.
- Paini, B. A., Lagazzo, A., Botter, R., & Perego, P. (2015). Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: A study of operative parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 1-10.
- Palafox-Carlos, H., & González-Aguilar, J. A.-Z. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal Food Science*, 76(1):R6-R15.
- Panchawat, S. (2011). In vitro free radical scavenging activity of leaves extracts of *Withania somnifera*. *Recent Research in Science and Technology*, 3(11): 40-43.
- Peng, Z., Li, J., Guan, Y. and Zhao, G. (2013). Effect of carriers on physicochemical properties, antioxidant activities and biological components of spray-dried purple sweet potato flours. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 348-355.
- Picos-Salas, M. A. (2018). Optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos en orégano mexicano (*Lippia graveolens*) mediante CO<sub>2</sub> supercrítico. *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.*, 55-59.
- Porrini M, R. P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: a critical appraisal. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(10):647-50.
- Quiñones, M. M. (2011). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables. *Nutricion Hospitalaria*, 27:76-89.
- Rio, D. D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14): 1818-1892.
- Rosas, E. L. (2016). Caracterización y microencapsulación de compuestos bioactivos de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) variedad gigante anaranjada. *Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias; Universidad de las Américas Quito*.
- Ruíz, J. C. (2015). Microencapsulación de polifenoles de maíz híbrido azul y su liberación en un modelo de digestión in vitro. *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo*, 15-16.

- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 616–622.
- SAGARPA. (2013). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Obtenido de Boletín: Crea INIFAP nueva tecnología para la producción de orégano resistente a fenómenos climáticos: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2013B033.aspx>
- Sanguansri, M. A. (2017). Microencapsulation Technologies. En Y. H. Roos, & Y. D. Livney, *Engineering Foods for Bioactives Stability and Delivery* (págs. (420) 124-125). Washington State University, USA: Food Engineering Series.
- Silva, B. V., Barreira, J., & Oliveira, M. (2016). Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods : Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 50: 144-158.
- Singh, G. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
- Singh, S., & Singh, R. (2008). In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Reviews International*, 24(4): 392-415.
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299:152-178.
- Swain, T., & Hillis, W. (1959). The phenolics constituents of *Pronus domestica* l. The quantitative analysis of phenolics constituents. *Journal Science Food Agriculture*, 10:63-68.
- Tao, D. Y., Feng, X. P., & Shu, C. (2006). The effect of chewing gum containing tea polyphenol on salivary flow rate and pH. *Shanghai Journal of Stomatology*, 15- 360.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevalos, L., & Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 669-675.
- Ting, Y., Jiang, Y., Ho, C., & Huang, Q. (2014). Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. *Journal of Functional Foods*, 112-128.
- 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.
- Valverde, I. M., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(1): 5-18.
- Vega-Gaxiola, D. (2014). Farmacognosia. Caracterización fitoquímica y funcional de aceite esencial de orégano silvestre (*Hedeoma patens* J). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC, 8.
- Velderrain-Rodríguez, Palafox-Carlos, H.; Wall-Medrano, A.; Ayala-Zavala, J. F.; Chen, C-Y. O.; Robles-Sánchez, M.; Astiazaran-García, H.; Parrillab, E. Alvarez; González-Aguilar, G. A. (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & Fuction*, 5, 189–197.

- Ydjedd, S., Bouriche, S., López-Nicolás, R., Sánchez-Moya, T., Frontela-Saseta, C., & Kati, G. R.-B. (2017). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on encapsulated and nonencapsulated phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp extracts and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 827-835.
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. En N. J. Zuidam, & V. A. Nedovic, *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (págs. 3-30). LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA: Springer Science+Business Media.