



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

Facultad de Ciencias de la Vida.

"DESARROLLO DE UN MICROENCAPSULADO NUTRACÉUTICO CON
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A BASE DE EXTRACTOS DE *Ilex guayusa*,
Vernonanthura patens Y CASCARILLA DE CACAO"

Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de Magister En Biociencias
Aplicadas Con Mención En Biodescubrimiento

Presentado por
María Fernanda Quijano Avilés

Guayaquil – Ecuador

2019

AGRADECIMIENTO

Este trabajo ha sido auspiciado por la Escuela Superior Politécnica del Litoral mediante financiamiento de la Red Ecuatoriana de Universidades y Escuelas Politécnicas para el Desarrollo de la Investigación y el Posgrado - REDU (No. PREDU-2016-002) y por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (No. SENESCYT-SDFC-DSEFC-2017-3526-O). Además, esta investigación ha recibido el apoyo de la RED VLIR NETWORK ECUADOR como parte de un acuerdo interinstitucional. Agradezco al Ministerio del Ambiente por autorizar esta investigación científica (No. 013-2017-IC-FLO-DNB / MAE) y al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, en especial a la Dra. Daynet Sosa y Dra. Patricia Manzano por confiarme la realización de este trabajo.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Patricia Manzano Santana, Ph.D.

Tutor

Johana Ortiz, Ph.D.

Cotutor

Andrea Orellana, Ph.D.

Evaluador

Iván Chóez Guaranda, M.Sc.

Evaluador

Julia Nieto Wigby, Ph.D.

Decana de FCV

Presidente

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

RESUMEN

El síndrome metabólico agrupa la asociación de factores genéticos, ambientales, malos hábitos alimenticios y falta de ejercicio, que aumentan el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. Las tendencias actuales apuntan al uso de extractos botánicos para el desarrollo de productos que ayuden a mejorar la calidad de vida de las personas. No obstante, existe una resistencia por parte del consumidor de ingerir productos a base de plantas debido al sabor amargo y astringente que presentan. El objetivo de este estudio fue diseñar una formulación de extractos de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y cascarilla de cacao mediante la optimización de sus propiedades antioxidantes y sensoriales para el desarrollo de microcápsulas nutraceuticas. La formulación de las bebidas se realizó mediante el empleo de un diseño de mezclas simplex centroide y se determinó el efecto de la mezcla de las materias primas sobre el perfil de metabolitos, actividad antioxidante y perfil sensorial de las formulaciones, para consecutivamente optimizar estos parámetros mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta. A partir de la formulación óptima se elaboraron microencapsulados usando maltodextrina como agente encapsulante y se evaluaron dos métodos de encapsulación: secado por aspersión y liofilización, midiendo propiedades físicas, antioxidantes y de estabilidad gastrointestinal *in vitro* de los productos. Los principales compuestos bioactivos que se identificaron en las formulaciones fueron el ácido cafeico, quercetina y ácido hidroxibenzoico. Además, la formulación óptima presentó buenas características sensoriales y un alto contenido de polifenoles totales ($187,15 \pm 37,56$ mg EAG/g), flavonoides totales ($17,88 \pm 0,85$ mg EQ/g), actividad antioxidante ($1050,70 \pm 19,00$ mg EAA/g y $CI_{50} 380 \pm 20,00$) y ácido clorogénico ($17,43 \pm 1,38$ mg/g). El mejor método de encapsulación fue el secado por liofilización ya que presenta una mayor actividad antioxidante, mejor liberación de ácido clorogénico y una mejor estabilidad a las condiciones gastrointestinales permitiendo una mayor disponibilidad del compuesto bioactivo para la fermentación colónica. Estos resultados comprueban que la mezcla de plantas permite desarrollar productos con características sensoriales mejoradas conservando una alta actividad biológica.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción y objetivos	
1.1 Antecedentes y justificación	4
1.2 Objetivo general	5
1.3 Objetivos específicos	5
2. Marco Teórico	6
2.1 Síndrome metabólico	6
2.2 Nutraceuticos	6
2.3 Microencapsulación	8
3. Metodología	8
3.1 Materia prima y reactivos	9
3.2 Diseño experimental y preparación de infusiones	10
3.3 Perfil de metabolitos por CG-EM y procesamiento de datos	10
3.4 Determinación de polifenoles y flavonoides totales	11
3.5 Determinación de actividad antioxidante	11
3.6 Cuantificación de ácido clorogénico	11
3.7 Análisis sensorial	12
3.8 Optimización de formulaciones	12
3.9 Microencapsulación	13
3.10 Propiedades físicas de los microencapsulados	13
3.11 Modelo gastrointestinal in vitro con fermentación colónica	13
4. Resultados y discusión	14

<i>4.1 Perfil de metabolitos por CG-EM</i>	14
<i>4.2 Correlación entre la actividad antioxidante y los metabolitos de las infusiones</i>	17
<i>4.3 Análisis sensorial y actividad antioxidante de las infusiones</i>	19
<i>4.4 Optimización de formulaciones</i>	21
<i>4.5 Propiedades físicas y antioxidantes de los microencapsulados</i>	22
<i>4.4 Estabilidad gastrointestinal in vitro y fermentación colónica de los microencapsulados</i>	24
<i>5. Conclusiones</i>	25
<i>6. Bibliografía</i>	26

1. Introducción y objetivos

1.1 Antecedentes y justificación

El síndrome metabólico es un problema mundial de salud pública que afecta al 25% de la población adulta y es un poderoso determinante para la aparición de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, patologías que figuran entre las principales causas de muerte en el mundo (Patnaik Kuppili, Vengadavaradan, &Bharadwaj, 2019). La inactividad física y una dieta inapropiada contribuyen a la aparición del síndrome, por lo que se recomiendan cambios saludables en el estilo de vida para mitigar los efectos asociados al síndrome metabólico (Martin, Kane, Miles, Aiello, &Harris, 2019). Adicional a las intervenciones en el estilo de vida, productos como los nutracéuticos son utilizados como complementos que ayudan al tratamiento de uno o más componentes del síndrome metabólico (Cicero, Derosa, Parini, Baronio, &Borghini, 2014). Las investigaciones sugieren combatir el síndrome mediante la combinación de compuestos bioactivos debido a la naturaleza multifactorial de la enfermedad (Santana-Gálvez, Cisneros-Zevallos, &Jacobo-Velázquez, 2019).

En los últimos años, se ha evidenciado un incremento en la producción científica de estudios que apuntan al uso de extractos botánicos para la obtención de ingredientes nutracéuticos que posean una amplia gama de compuestos activos que contribuyan con nuevos sabores y funcionalidades al producto (Gruenwald, 2009). En este contexto, se reportan investigaciones sobre el efecto sinérgico observado con el empleo de mezclas de plantas para incrementar la eficacia de sus propiedades terapéuticas y proporcionar nuevos perfiles sensoriales al producto final (Ahmad et al., 2016; Komes et al., 2014; Skąpska, Marszałek, Woźniak, Zawada, &Wawer, 2016; Williamson, 2001).

Los ingredientes más utilizados para la elaboración de alimentos funcionales y nutracéuticos son los compuestos fenólicos derivados de plantas (Galland, 2013). Sin embargo, las industrias de alimentos se enfrentan a un dilema sobre las exigencias de gustos y salud por parte de los consumidores. Por otro lado, el excesivo sabor amargo y astringente que caracteriza a gran parte de los fitonutrientes constituye una barrera importante para el consumo de alimentos funcionales y nutracéuticos (Drewnowski

&Gomez-Carneros, 2000). Por lo tanto, las investigaciones que se llevan a cabo en este tipo de productos se enfocan en aspectos nutricionales y mecanismos de prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer e hipertensión, por lo que es imprescindible realizar estudios sobre los aspectos sensoriales y funcionales de este tipo de alimentos (Ahmad et al., 2016; Pandey & Rizvi, 2009; Skąpska et al., 2016).

A partir de las investigaciones previas realizadas y considerando las características de las plantas del presente estudio se planteó la hipótesis de que una formulación óptima de *I. guayusa*, *V. patens* y cascarilla de cacao posee un buen perfil sensorial y una alta actividad antioxidante ya que la mezcla de los extractos disminuye la astringencia y amargo de las infusiones y aumenta el contenido de polifenoles totales.

1.2 Objetivo general

Diseñar una formulación de extractos de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y cascarilla de cacao mediante la optimización de sus propiedades antioxidantes y sensoriales para el desarrollo de microcápsulas nutraceuticas.

1.3 Objetivos específicos

Determinar el efecto de las mezclas de las plantas *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y cascarilla de cacao sobre los cambios del perfil de metabolitos de las formulaciones usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG – EM) y análisis estadístico multivariado.

Identificar los metabolitos relacionados con la actividad antioxidante de las formulaciones mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Optimizar las características sensoriales y actividad antioxidante de las formulaciones utilizando la metodología de superficie de respuesta.

Desarrollar microcápsulas nutraceuticas a partir de la fórmula óptima caracterizando las propiedades físicas, químicas y de estabilidad *in vitro* mediante ensayos de simulación gastro-intestinal.

2. Marco Teórico

2.1 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un término empleado para describir la agrupación de marcadores de riesgo clínicos y metabólicos altamente asociados con la aparición de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (Kumari, Kumar, & Kant, 2019). Además, estudios recientes indican que el síndrome metabólico promueve el estrés oxidativo en el tejido adiposo, debido a la activación de la producción de especies de oxígeno reactivo y a la reducción de la protección antioxidante de las células adiposas (Maslov et al., 2019).

El Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol y Panel de Tratamiento de Adultos III (NCEP-ATP III) define al síndrome metabólico como la prevalencia de al menos tres de los siguientes cinco criterios: (i) obesidad visceral evaluada mediante la medición de la circunferencia de la cintura de más de 102 y 88 centímetros en hombres y mujeres respectivamente; (ii) glucemia en ayunas mayor o igual a 100 mg/dl; (iii) triglicéridos séricos mayor o igual a 150 mg/dl; (iv) colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) de menos de 40 mg/dl y 50 mg/dl en hombres y mujeres respectivamente; y (v) presión arterial sistólica y diastólica superiores a 130 mmHg y 85 mmHg respectivamente (Shayo, 2019).

2.2 Nutracéuticos

El término nutracéutico surgió con el propósito de denominar los productos que se encuentran entre las categorías de alimentos y medicamentos (DeFelice, 1995). En la actualidad, se definen como sustancias que pueden ser alimentos o parte de un alimento que proporcionan beneficios para la salud (Rajput, Wairkar, & Gaud, 2018; Tur & Bibiloni, 2016). Químicamente se clasifican en derivados isoprenoides (terpenoides, carotenoides, saponinas, terpenos, tocoferoles), polifenoles, derivados de carbohidratos (vitamina C, oligosacáridos, polisacáridos sin almidón), ácidos grasos, derivados de aminoácidos, microbios y minerales (Singh & Shukla, 2015).

Las ventajas que presentan los nutracéuticos frente a otros tratamientos con medicamentos, es que son naturales, menos costosos y no exhiben efectos adversos a largo plazo. No obstante, entre las desventajas se destaca que estos compuestos se encuentran normalmente en bajas concentraciones en los alimentos lo que implica el consumo de

cantidades exageradas o poco realistas del alimento. Además, muchos de los nutraceuticos al ser administrados por vía oral son ampliamente metabolizados por el cuerpo lo que puede reducir o hasta inhibir su actividad (Santana-Gálvez et al., 2019).

Ilex guayusa

Ilex guayusa es una planta medicinal que representa una fuente importante de polifenoles como el ácido clorogénico y quercetin-3-O-hexosa, además presenta un alto contenido de cafeína que le confiere un sabor amargo característico (Manzano Santana et al., 2018; Villacís-Chiriboga et al., 2018). Estudios recientes han reportado que el ácido clorogénico atenúa el síndrome metabólico mediante la modulación de la microbiota intestinal, disminución de la resistencia a la insulina y modulación de la captación de glucosa en líneas celulares de cáncer de hígado (HepG2) (Bhandarkar, Brown, & Panchal, 2019; Chen, Teng, & Cao, 2019). Además, reporta un potencial efecto anti obesidad mejorando la distribución de la grasa corporal (Cho et al., 2010).

Vernonanthura patens

Vernonanthura patens es una planta medicinal de uso popular que actualmente no es comercializada pero que exhibe un alto contenido de polifenoles, actividad antioxidante y propiedades antiinflamatorias (Chóez-Guaranda, Ruíz-Barzola, Ruales, & Manzano, 2018; P. I. Manzano, Miranda, Quijano, & Monzote, 2015). Los compuestos que exhiben alta actividad antioxidante son de gran interés ya que son capaces de estabilizar el estrés oxidativo de la célula, retrasando el proceso de oxidación por medio de la quelación del hierro y la extinción del oxígeno triplete (Smilin Bell Aseervatham, Arul Ananth, & Sivasudha, 2018). No obstante, los polifenoles son compuestos que además de actuar como antioxidantes pueden ser prooxidantes, según la concentración y la naturaleza del entorno celular en el que actúan (Fernando, Rupasinghe, & Hoskin, 2019).

Cascarilla de cacao

La cascarilla de cacao es uno de los principales subproductos del procesamiento de los granos de cacao y contiene cantidades apreciables de compuestos bioactivos como los polifenoles en especial los flavonoides (P. Manzano et al., 2017; Quijano-Aviles, Franco-Agurto, Surez-Quirumbay, Barragan-Lucas, & Manzano-Santana, 2016). Los flavonoides presentes en el cacao son capaces de reducir el riesgo cardiovascular al mejorar la función endotelial y disminuir la presión arterial (Grassi, Desideri, & Ferri,

2010).

2.3 Microencapsulación

La microencapsulación es una tecnología empleada para el envasado de compuestos bioactivos en cápsulas elaboradas a partir de azúcares, gomas, proteínas, polisacáridos (naturales y modificados), lípidos y polímeros sintéticos (Castro-Rosas et al., 2017). Este proceso permite proteger al compuesto de interés de la degradación ocasionada por el medioambiente, así como controlar la liberación en sitios específicos, preservando la estabilidad, incrementando la biodisponibilidad y manteniendo la funcionalidad del compuesto bioactivo (Aguiar, Estevinho, & Santos, 2016). Las técnicas de microencapsulación se clasifican en tres grupos: (i) métodos físicos (secado por aspersión, liofilización, fluidos supercríticos y evaporación); (ii) métodos fisicoquímicos; y, (iii) métodos químicos (Ozkan, Franco, DeMarco, Xiao, & Capanoglu, 2019).

Dentro de los métodos físicos, los más empleados son el secado por aspersión y liofilización. El secado por aspersión transforma las sustancias líquidas en polvo mediante: (i) la homogenización del líquido por medio de un atomizador, (ii) evaporación del solvente utilizando una corriente de gas caliente y (iii) colección de las partículas de polvo secas a través de un ciclón o filtros (Schafroth, Arpagaus, Jadhav, Makne, & Douroumis, 2012). Las principales ventajas de este método es la alta rentabilidad y flexibilidad de proceso (Martín, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2015). Por otro lado, la liofilización es un método de secado de múltiples etapas, donde la muestra debe ser previamente congelada para el posterior secado primario mediante sublimación, seguido de un proceso de desorción (secado secundario) (Ozkan et al., 2019). La principal ventaja de esta tecnología es el empleo de bajas temperaturas que evita la degradación de compuestos termo sensibles y la eliminación de oxígeno lo que ayuda a minimizar la oxidación del producto (Kaushik, Dowling, Barrow, & Adhikari, 2015).

3. Metodología

El esquema de trabajo empleado para la realización del trabajo de investigación se encuentra resumido en la Fig. 1.

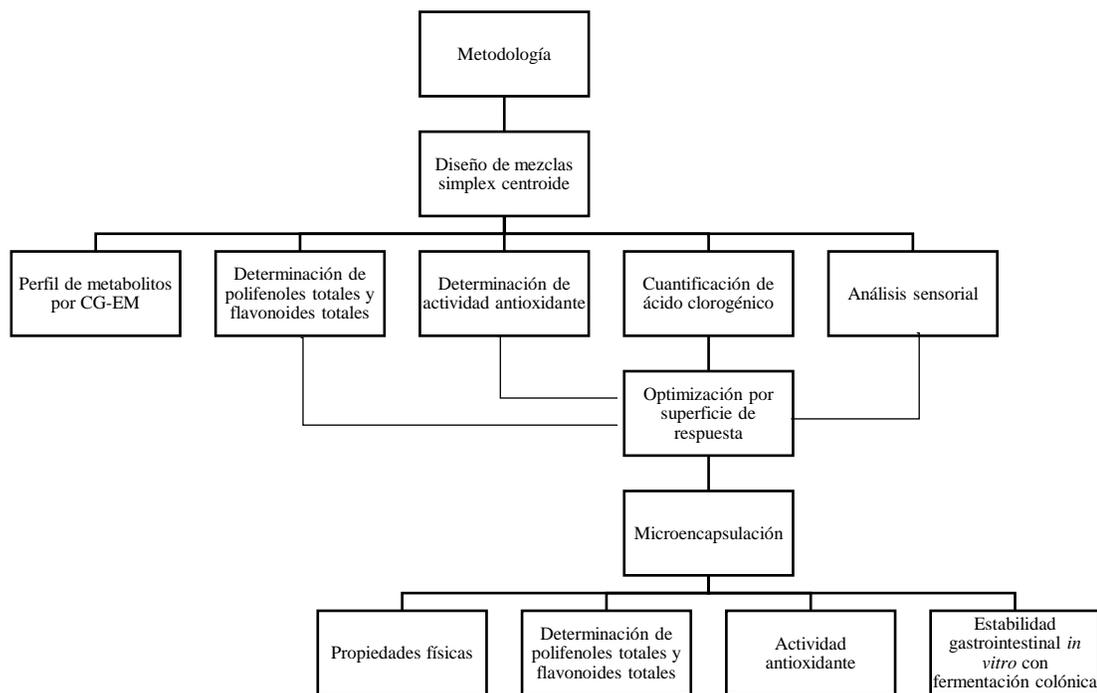


Fig. 1. Esquema del diseño experimental

3.1 Materia prima y reactivos

Las hojas frescas de *I. guayusa* y *V. patens* fueron adquiridas de los cantones Taisha–Morona Santiago y Marcabell–El Oro, respectivamente; la cascarilla de cacao fue proporcionada por Maquita Cushunchic (MCCH), Guayaquil–Guayas. Los reactivos de fenol de Folin - Ciocalteu 2 N, 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), 2,4,6 - Tris (2-piridil) -s-triazina (TPTZ), estándares de alcano C7 - C30, cloruro de aluminio hexahidratado (AlCl₃), N, O Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA), quercetina, ácido gálico, ácido clorogénico, nitrito de sodio, ácido tánico y metanol se adquirieron de la casa Sigma - Aldrich (St . Louis, MO, EE. UU.). El ácido ascórbico, el hidróxido de sodio, el ácido clorhídrico, la cafeína y el etanol se obtuvieron de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EE. UU.). El carbonato de sodio (Na₂CO₃) de la empresa Fisher Scientific (Lisboa, Portugal), el ácido acético de Panreac (Barcelona, España) y el cloruro férrico (FeCl₃) de Mallinckrodt (Nueva York, NY, EE. UU.). El agua se purificó en un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.).

3.2 Diseño experimental y preparación de infusiones

Se empleó un diseño de mezcla simplex centroide con tres componentes y diez formulaciones (Tabla 1). Las infusiones se prepararon vertiendo 200 ml de agua destilada hervida sobre 2 g de materia prima y se dejó en reposo sin agitación durante 5 minutos, seguido de un filtrado a través de papel Whatman # 1 y se almacenaron a -17°C hasta su uso.

Tabla 1. Valores codificados de las formulaciones herbarias preparadas con *I. guayusa*, *V. patens* y cascarilla de cacao

Formulación	<i>I. guayusa</i> (%)	<i>V. patens</i> (%)	Cascarilla (%)
F1	0,33	0,33	0,33
F2	1	0	0
F3	0	1	0
F4	0,667	0,167	0,167
F5	0,5	0,5	0
F6	0,5	0	0,5
F7	0	0,5	0,5
F8	0,167	0,167	0,667
F9	0	0	1
F10	0,167	0,667	0,167

3.3 Perfil de metabolitos por CG-EM y procesamiento de datos

La determinación del perfil del metabolitos de las infusiones se realizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG - EM) (sistema GC 7890A de Agilent Technologies y 5975C inerte XL MSD con detector de triple eje), utilizando una columna capilar DB-5MS (30 m de longitud x 0.25 mm di x 0.25 µm de espesor de película, Agilent Technologies, Inc.) y helio como gas portador a un caudal de 0,6 ml / min. Para el análisis, las infusiones fueron previamente liofilizadas y derivatizadas con 200 µl de BSTFA a 5 mg de extracto seco, y se colocó en baño María a 70 °C durante 2 horas. Se inyectaron 2 µl de muestra y se analizaron utilizando tres réplicas biológicas de cada muestra. (Saitta, Curto, Salvo, Bella, & Dugo, 2002).

Posterior a la inyección de muestras, los datos fueron exportados en formato NetCDF / AIA (* .cdf) utilizando el software de análisis de datos ChemStation GC / MSD (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.). Se empleó el programa MzMine 2 (versión 2.29) (Pluskal, Castillo, Villar-Briones, & Orešič, 2010) para la detección de los espectros de masas, la construcción cromatográfica, la deconvolución y alineación. Los datos resultantes se importaron a MetaboAnalyst 3.0 (Xia & Wishart, 2011) para el análisis estadístico multivariante. Los compuestos se identificaron de forma tentativa al hacer coincidir los espectros de masas con la información disponible en la base de datos NIST 11 y Wiley 9 y mediante comparación con el índice de retención utilizando una serie de alcanos.

3.4 Determinación de polifenoles y flavonoides totales

El contenido de polifenoles totales (CPT) y de flavonoides totales (CFT) se midieron mediante espectrofotometría UV-VIS según lo descrito por (Waterhouse, 2003) y (Min, Gu, McClung, Bergman, & Chen, 2012), respectivamente. El CPT se expresó como mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de peso seco de masa herbal (mg EAG / g) y el CFT como mg de equivalente de quercetina (EQ) por g de peso seco de masa herbal (mg EQ / g).

3.5 Determinación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó en función de la estabilidad del radical DPPH en las infusiones de hierbas (Ebada, Edrada, Lin, & Proksch, 2008) y mediante la evaluación del poder reductor del complejo férrico-tripiridil-triazina ($\text{Fe}^{3+} + \text{-TPTZ}$) a la forma ferrosa (Fe^{2+}) (FRAP) y los resultados se expresaron como un equivalente de mM Trolox (TEAC). Adicional, los resultados de la formulación óptima se expresaron como la capacidad para reducir el 50% del DPPH (CI_{50}) calculada por el programa estadístico GraphPad Prism® versión 5.01 (San Diego, CA), y los resultados del ensayo FRAP se expresaron como mg de ácido ascórbico (EAA) por g de peso seco de masa herbal (mg EAA / g).

3.6 Cuantificación de ácido clorogénico

El ácido clorogénico se cuantificó mediante electroforesis capilar (EC) utilizando un sistema Agilent Technologies 7100 (Alemania) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD). La separación se llevó a cabo en un capilar de sílice fundido no recubierto,

con una longitud efectiva de 72 cm (50 μ m de diámetro interno) adquirido de Agilent Technologies (Alemania). El procedimiento se realizó según lo descrito por Ballus, Meinhart, de Souza Campos, Bruns, & Godoy (2014) con algunas modificaciones. El electrolito de corrida consistió en 50 mM de tampón borato (pH 10.15) y la separación se realizó a 25 ° C. Las muestras se inyectaron a una presión de 50 mbar durante 5 s y los datos se registraron a 210 nm. El capilar se pre acondicionó con NaOH 0,1 M durante 2 min, luego se enjuagó con agua ultrapura durante 3 min y se siguió con electrolito (5 min). Se utilizó el software Agilent ChemStation® para calcular la integración de los picos.

3.7 Análisis sensorial

El panel sensorial se realizó con la colaboración de 7 personas, a las que se les solicitó su consentimiento para participar en la evaluación. Los panelistas fueron semi-entrenados empleando un método de análisis descriptivo híbrido (Francisco & Resurreccion, 2012). En los ensayos se emplearon cabinas individuales, controlando la iluminación y la temperatura ambiente. Las infusiones fueron evaluadas de acuerdo a los atributos de aroma (cacao y hierbas); sabor (amargor, dulce y ácido) y factor de sensación (astringencia) usando una hoja de puntuación para escalar la intensidad en una escala de línea de 150 mm.

3.8 Optimización de formulaciones

Los análisis se desarrollaron por triplicado ($n = 3$ extracciones independientes), con la excepción de la evaluación sensorial, y los datos se expresaron como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre las formulaciones se evaluaron mediante ANOVA de una vía después de la verificación de la homoscedasticidad mediante la prueba de Brown-Forsythe. La prueba de Tukey se utilizó para determinar diferencias significativas a un nivel de 0.05. La correlación se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson; y, los efectos de las diferentes mezclas de materias primas en las respuestas, se calcularon mediante regresión lineal múltiple basada en la metodología de superficie de respuesta. La calidad del modelo se evaluó mediante el coeficiente de regresión (R^2), el R^2 ajustado y la significancia del modelo (Granato, de Araújo Calado, & Jarvis, 2014).

La formulación de hierbas se optimizó utilizando la función de deseabilidad propuesta por Derringer & Suich (1980) para maximizar el contenido de polifenoles y flavonoides, la actividad antioxidante (FRAP), el ácido clorogénico, el sabor dulce, el aroma de cacao y para minimizar la CI_{50} , el aroma de hierbas, el amargor, los sabores ácidos y la astringencia. Los análisis estadísticos se realizarán utilizando el software Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics Corporation, Rockville, USA).

3.9 Microencapsulación

A partir de la formulación óptima se procedió a elaborar los microencapsulados, para lo cual se adicionó maltodextrina (100 g L^{-1}) a la infusión recién preparada y se homogenizó a 300 rpm durante 1 hora a 25°C (Santiago-Adame et al., 2015). La microencapsulación se realizó mediante dos métodos de secado: liofilización y secado por aspersión. Las condiciones del liofilizador (Labconco Freeze Dryer 4.5, EE.UU.) se establecieron a -40°C durante 72 h; y, las del secado por aspersión (Armfield FT30 MK III, Inglaterra) se programaron con un flujo de alimentación de 3.5 ml.min^{-1} , suministro de aire comprimido de 50 ml.min^{-1} a 4 bares y temperatura de entrada del aire a 120°C .

3.10 Propiedades físicas de los microencapsulados

A los microencapsulados se les determinó el contenido de humedad, solubilidad (Cano-Chauca, Stringheta, Ramos, & Cal-Vidal, 2005), humectabilidad del polvo (Quek, Chok, & Swedlund, 2007), densidad aparente (Aulton & Cooper, 1988), densidad compacta (Jimenez, Garcia, & Beristain, 2010), fluidez, compresibilidad y morfología mediante microscopio electrónico de barrido (Shah, Tawakkul, & Khan, 2008).

3.11 Modelo gastrointestinal in vitro con fermentación colónica

El ensayo se realizó según lo descrito por Tavares et al., (2012) con algunas modificaciones. Los microencapsulados (3.5g) se disolvieron en agua destilada (65 ml) y se añadió 10 ml de solución gástrica a pH 4 ($\text{NaCl } 16.5 \text{ g L}^{-1}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 2.1 \text{ g L}^{-1}$, $\text{KCl } 4.92 \text{ g L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O } 2.4 \text{ g L}^{-1}$, urea 0.54 g L^{-1} y pepsina 6 g L^{-1}), luego se incubaron a 37°C por 2 horas con agitación de 100 rpm. Se tomaron alícuotas de 15 ml y se almacenaron a -18°C . La solución de la digestión gástrica se mezcló con 30 ml de solución duodenal a pH 7 ($\text{NaCl } 7.01 \text{ g L}^{-1}$, $\text{KCl } 0.56 \text{ g L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O } 0.2 \text{ g L}^{-1}$, $\text{NaHCO}_3 5.61 \text{ g L}^{-1}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.08 \text{ g L}^{-1}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O } 0.5 \text{ g L}^{-1}$, urea 0.1 g L^{-1} , pancreatina 3 g L^{-1} y

lipasa 0.5 g L⁻¹) y 15 ml de medio de bilis de pH 8 (NaCl 5.26 g L⁻¹, KCl 0.38 g L⁻¹ , CaCl₂.H₂O 0.22 g L⁻¹ , NaHCO₃ 5.79 g L⁻¹ , urea 0.1 g L⁻¹ y bilis 6 g L⁻¹) y se incubó a 37 °C a 100 rpm durante 4 horas. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 15 ml y se almacenaron a -18 °C.

La simulación de la fase colónica se realizó tomando alícuotas de 50 ml de la fase de la simulación gastrointestinal y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 10 °C; el pellet se mezcló con 20 ml de agua destilada y 30 ml de solución fecal. Las muestras se colocaron en envases ámbar, aireadas con nitrógeno, cerradas herméticamente y se incubaron a 37 °C a 200 rpm durante 24 horas. Luego del tiempo de incubación, se colectó 15 ml de muestra y se almacena a -18 °C. A la muestra remante, se añadió 5 ml de agua destilada y fue se puso a incubación (37 °C a 200 rpm) durante 24 horas y se tomó alícuotas de 15 ml para los análisis posteriores (Ceuppens et al., 2010).

La extracción de polifenoles se realizó empleando una solución acuosa de metanol (50:50 v/v), agitación en vortex durante 5 min, baño de ultrasonido durante 60 min y centrifugación a 5000 rpm por 15 min a 4° C. Las muestras fueron secadas con corriente de nitrógeno y reconstituidas en metanol para ser analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Saquicela Carpio, 2018).

4. Resultados y discusión

4.1 Perfil de metabolitos por CG-EM

La variabilidad del perfil de metabolitos de las infusiones fue explicada en un 72.40% mediante el análisis de componentes principales (PCA). El componente principal 1 (62.40%) separa las formulaciones F6 y F9, caracterizadas por estar preparadas a partir de cascarilla de cacao, de las formulaciones F1, F2, F3, F4, F5, F7, F8 y F10 que contenían muy poca o nula cantidad de cascarilla de cacao. No obstante, las formulaciones F7 y F8 que presentan igual o mayor contenido de cascarilla de cacao que la formulación F6, no fueron separadas dada la presencia de *V. patens*. Por otro lado, el componente principal 2 (10%) separó las formulaciones que contenían altas cantidades de *I. guayusa* y *V. patens* (F1, F2 y F3) de las que tenían cascarilla de cacao (F4, F5, F7 y F8), lo que indica que las plantas herbales empleadas en este estudio presentan un perfil químico similar, y que contrasta con la cascarilla de cacao (Fig. 2). Dicha similitud, sugiere que estas plantas pueden compartir algunas de sus propiedades biológicas

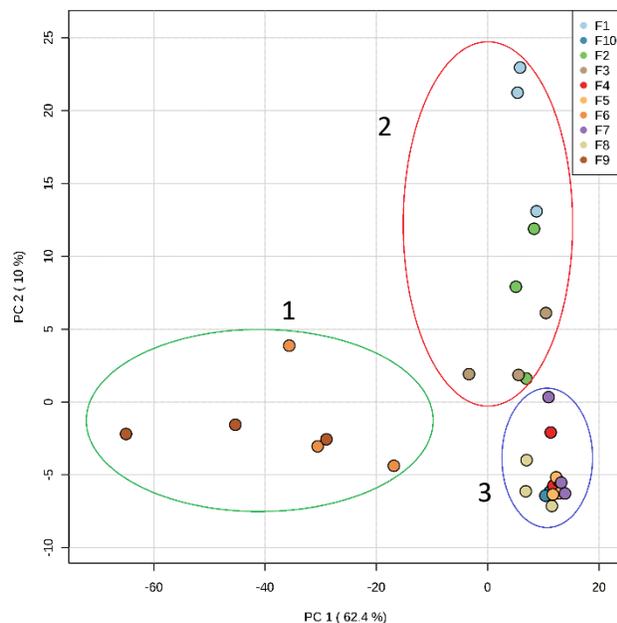


Fig. 2. Análisis de componentes principales (PCA) de infusiones de hierbas preparadas con *I. guayusa*, *V. patens* y cascarilla de cacao, a partir de los datos de CG-EM. Grupo 1 (F6 y F9), grupo 2 (F1, F2, F3) y grupo 3 (F4, F5, F7, F8 y F10)

En el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), se seleccionaron un total de veintidós metabolitos en base a la variable de importancia en la proyección (VIP) > 2 y valor $p < 0.05$. Según el mapa de calor (Fig. 3), los ácidos carboxílicos y sus derivados fueron predominantes en las formulaciones que contienen *V. patens* como materia prima principal (F3, F10 y F5) (ácido mirístico, 1-monopalmitina, 1-monolinoleína y 1-monoestearina). Los polifenoles fueron más abundantes en las formulaciones que contienen cascarilla de cacao (ácido cafeico, ácido hidroxibenzoico y pirocatecol), que representa que se encuentren mayor compuestos fenólicos, seguido de la formulación con *I. guayusa* (F2) (quercetina 7,3', 4'- trimetil éter) y *V. patens* (F3) (hidroquinona). Los azúcares y sus derivados se encontraron mayoritariamente en las formulaciones con mayor contenido de cascarilla de cacao (F9, F8, F6).

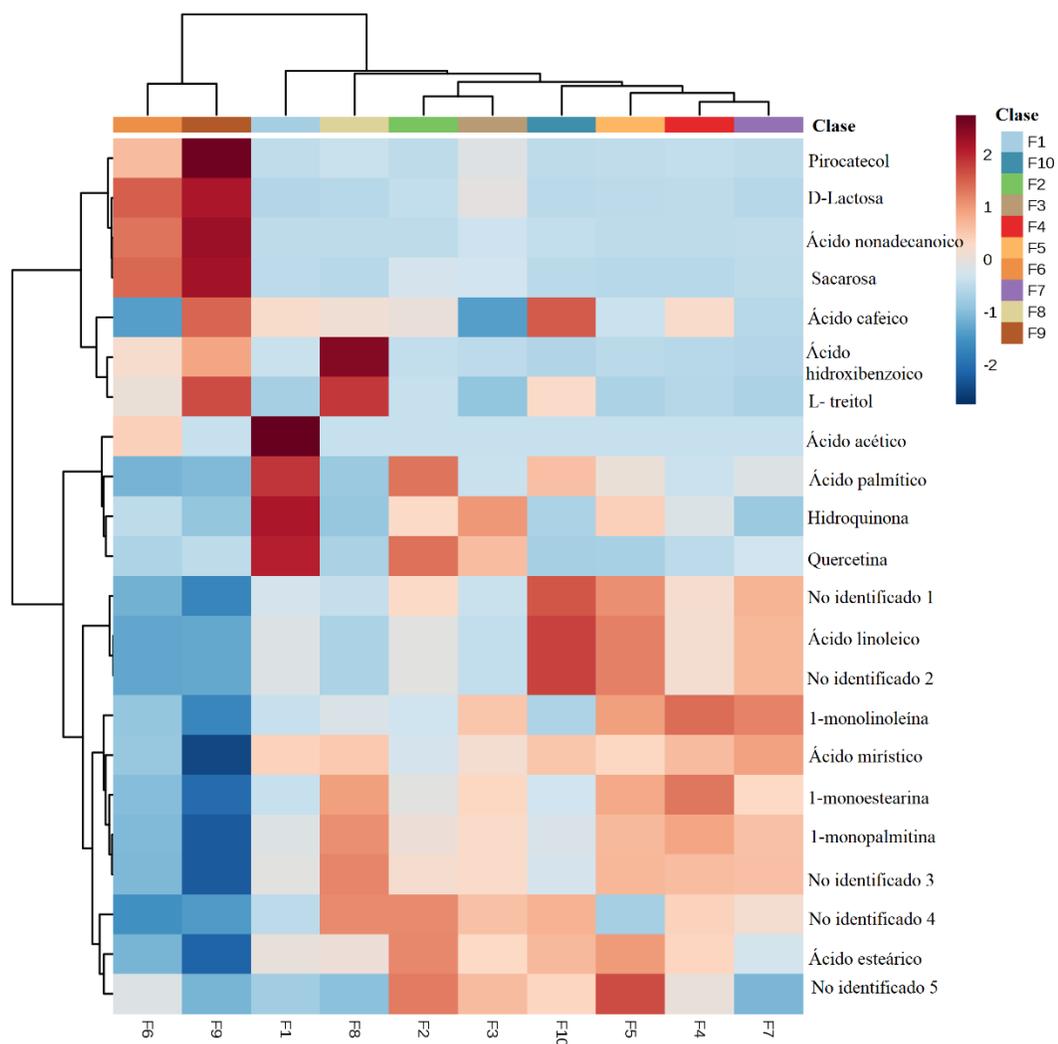


Fig. 3. Representación de mapa de calor de correlaciones de metabolitos en infusiones de hierbas. Los coeficientes de correlación se calcularon con base en la correlación de Pearson.

De los compuestos identificados por CG-EM en las diferentes formulaciones destacan las características nutraceuticas del ácido cafeico y quercetina 7, 3', 4'-trimetil éter, compuestos que reportan un posible efecto beneficioso sobre el síndrome metabólico. En el caso del ácido cafeico se conoce que actúa sinérgicamente con el ácido clorogénico, atenuando la resistencia a la insulina y mejoran la absorción de glucosa en células HepG2 (Chen et al., 2019). En cambio, los estudios recientes sobre el síndrome metabólico en

modelos animales, han encontrado que la quercetina 7, 3', 4'-trimetil éter mejora el nivel de citocinas antiinflamatorias y la sensibilidad a la insulina (Abdelkarem & Fadda, 2017).

4.2 Correlación entre la actividad antioxidante y los metabolitos de las infusiones

Se realizó un mapa de correlación entre la actividad antioxidante (DPPH, FRAP), CPT, CFT y el perfil de metabolitos para determinar los compuestos potenciales que están relacionados con la actividad biológica de las infusiones. De acuerdo con la Fig. 4, catorce compuestos que incluyen al ácido linoleico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, 1-monopalmitina, 1-monolinoleína, 1-monoestearina, hidroquinona, quercetina 7,3', 4'-trimetiléter y cinco compuestos no identificados mostraron una correlación positiva con la actividad antioxidante, CPT y CFT. Por otro lado, ocho compuestos identificados como ácido nonadecanoico, ácido hidroxibenzoico, pirocatecol, ácido cafeico, d-lactosa, sacarosa, l-treitol y ácido acético se correlacionaron negativamente con la actividad antioxidante, CPT y CFT. Además, se observa una fuerte correlación positiva entre la actividad antioxidante y CPT y CFT.

Los compuestos que contribuyeron principalmente a la actividad antioxidante de las infusiones fueron los ácidos carboxílicos y derivados. Los ácidos grasos han sido reportados como sustancias bioactivas en la medicina herbaria (Karimi, Jaafar, Ghasemzadeh, & Ebrahimi, 2015). Los ácidos linoleico, mirístico y palmítico han mostrado actividad antioxidante mediante el análisis del modelo de oxidación de liposomas (Henry, Momin, Nair, & Dewitt, 2002). Sin embargo, el ácido linoleico no ha mostrado actividad antioxidante contra el radical DPPH (Fagali & Catalá, 2008).

Estudios anteriores realizados en el ácido esteárico reportan que no posee actividad antioxidante (Henry et al., 2002). Por otro lado, los compuestos fenólicos también han sido descrito como antioxidantes (Lesjak et al., 2018). Sin embargo, fue inesperado que el ácido cafeico no mostrara una correlación positiva con la actividad antioxidante ya que este compuesto ha exhibido actividad biológica relevante como antioxidante y antiinflamatorio (Shiozawa, Inoue, Murata, & Kanamoto, 2018).

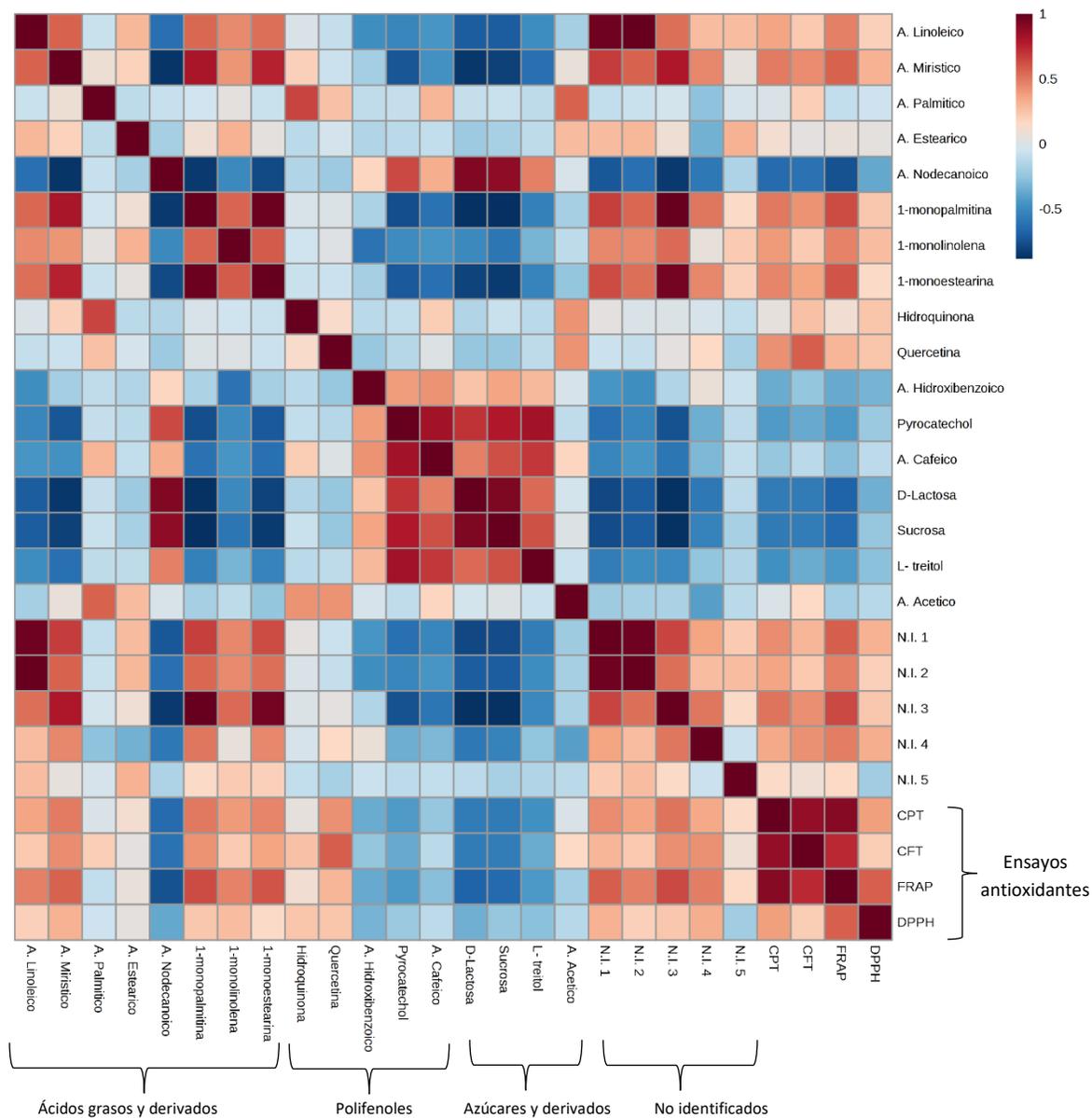


Fig. 4. Patrones de correlación entre metabolitos y actividad antioxidante (DPPH, FRAP, CPT y CFT). Cada cuadrado indica el coeficiente de correlación de Pearson de un par de metabolitos y actividad antioxidante. El color rojo representa correlación positiva ($0 < r < 1$) y el color azul representa correlación negativa ($-1 < r < 0$).

4.3 Análisis sensorial y actividad antioxidante de las infusiones

Las infusiones preparadas con *I. guayusa* se caracterizaron por mostrar un alto sabor amargo, las preparadas con *V. patens* una alta astringencia, mientras que las que contenían mayoritariamente cascarilla de cacao mostraron un perfil sensorial con alto aroma a cacao, dulzor y amargor (Fig. 5). Adicionalmente, se evidencia que la adición de cascarilla de cacao permitió enmascarar el sabor astringente de *V. patens*. No obstante, la actividad antioxidante (DPPH, FRAP) disminuyó (Fig. 6).

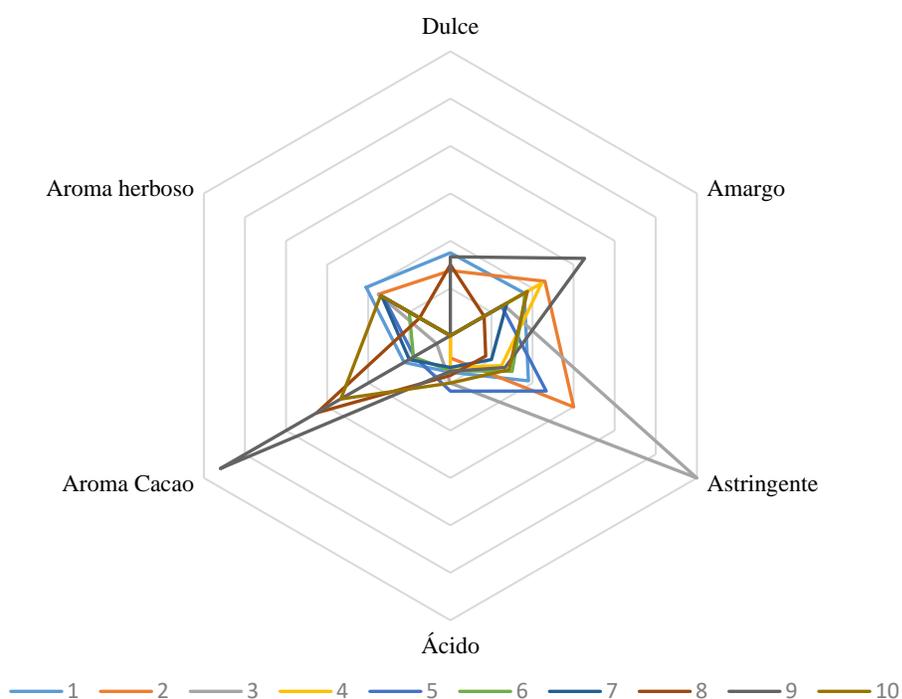


Fig. 5. Perfil de atributos sensoriales de las formulaciones

La actividad antioxidante (DPPH, FRAP), CPT y CFT de las diez formulaciones de infusiones de hierbas se muestran en la Fig. 6. La actividad antioxidante varía de 8,74 (F3) a 1,41 (F1) mM TEAC para el ensayo DPPH y de 16,21 (F3) a 3,12 (F1) mM TEAC para el ensayo FRAP. Se observaron valores más altos de CPT y CFT en F3 (3306,04 mg GAE

/ L y 388,19 mg QE / L) y se registraron valores más bajos en F9 (428,18 mg GAE / L y 42,64 mg QE / L).

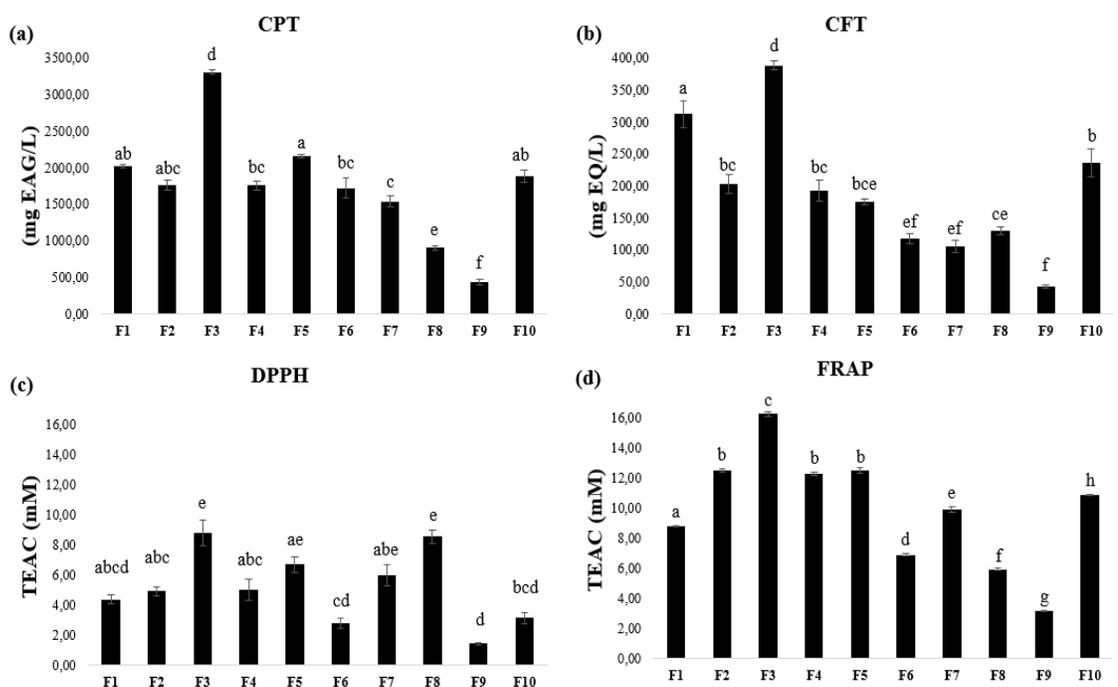


Fig. 6. Contenido de polifenoles, flavonoides totales y actividad antioxidante de las infusiones estudiadas. Cada punto representa el valor promedio de tres determinaciones. Los valores sin letras comunes son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0.05$).

Según el estudio de (Jiménez-Zamora, Delgado-Andrade, & Rufián-Henares, 2016), las actividades de DPPH informadas para la infusión de manzanilla ($0,90 \pm 0,02$ mM TEAC) son inferiores a los valores encontrados para todas las formulaciones de este estudio. La infusión de hierbabuena ($3,33 \pm 0,11$ mM TEAC) reporta una mayor actividad antioxidante que las infusiones F9 y F10 pero menor que las otras formulaciones. La infusión de té negro presenta una actividad menor ($5,13 \pm 0,08$ mM TEAC) que las infusiones F3, F5, F7 y F8, mientras que ninguna de las formulaciones de este estudio presenta una mayor actividad antioxidante que la infusión de té verde ($24,62 \pm 0,49$ mM TEAC). En el caso de la actividad FRAP, la infusión de manzanilla presenta una actividad antioxidante más baja ($1,03 \pm 0,14$ mM TEAC) que las muestras de esta investigación. Solo la formulación F9 mostró un valor FRAP más bajo que la menta verde ($5,33 \pm 0,09$ mM TEAC) y la infusión de té negro ($3,38 \pm 0,01$ mM TEAC). La infusión de té verde

tiene un valor FRAP más alto ($24,98 \pm 0,41$ mM TEAC) que las formulaciones de esta investigación.

La infusión F9 presenta un CPT más alto que otras infusiones reportadas anteriormente preparadas a partir de *Sideritis syriaca* (infusión de té griego de montaña) (Atoui et al., 2005), *Moringa oleifera* (Coz-Bolaños et al., 2018) e infusiones de *Matricaria chamomilla* (Kogiannou, Kalogeropoulos, Kefalas, Polissiou, & Kaliora, 2013). Sin embargo, CPT se redujo mediante la adición de la cascarilla de cacao en infusiones de *V. patens* e *I. guayusa*. El CPT de todas las formulaciones, con la excepción de F9, es más alto que los valores informados para *Mentha piperita*, *Eucalyptus globules* y *Salvia fruticose*, pero son más bajos que el té negro y verde (Atoui, Mansouri, Boskou, & Kefalas, 2005).

4.4 Optimización de formulaciones

A partir de los resultados obtenidos se obtuvo una infusión con óptimas propiedades sensoriales y antioxidantes (Tabla 2) cuyo detalle de formulación se encuentra registrado como secreto comercial 11591SECRETOCIBE1.

Tabla 2. Parámetros antioxidantes y sensoriales optimizados

Parámetros	Predicción	Experimental*
Polifenoles totales (mg EAG/g)	178,50	$187,15 \pm 37,56$
Flavonoides totales (mg EQ/g)	21,90	$17,88 \pm 0,85$
FRAP (mg EAA/g)	1080,04	$1050,70 \pm 19,00$
DPPH (CI ₅₀)	362,87	$380,00 \pm 20,00$
Ácido clorogénico (mg/g)	17,94	$17,43 \pm 1,38$
Acidez	7,88	10,00
Astringencia	16,45	$8,75 \pm 2,50$
Aroma a cacao	5,33	$7,50 \pm 2,00$
Aroma herbal	15,33	$15,00 \pm 5,77$

*Valores expresados como media \pm desviación estándar (n = 3)

Los valores de polifenoles totales de la fórmula óptima son superiores a los reportados para la Horchata, una bebida ecuatoriana que consiste en una mezcla de 16 a 32 plantas medicinales (Guevara et al., 2019). Así mismo, estos valores son mayores a los reportados

para *Chrysophyllum boivinianum*, cuyas hojas se utilizan para preparar infusiones con fines medicinales en Madagascar (Rakotoniaina et al., 2018). En cuanto al contenido de ácido clorogénico, se reportan valores superiores a los indicados para el café (*Coffea canephora*) y el té verde (*Camellia sinensis*) (Meinhart et al., 2017). Estos resultados son de gran relevancia ya que se evidencia que el modelo de optimización por superficie de respuesta permite realizar mezclas de ingredientes vegetales para obtener un producto final con mejores atributos sensoriales, conservando las altas propiedades funcionales de las materias primas empleadas en este estudio.

4.5 Propiedades físicas y antioxidantes de los microencapsulados

El proceso de microencapsulación de la formulación óptima se realizó mediante secado por aspersión y liofilización. El secado por aspersión permitió obtener microcápsulas con mejores propiedades físicas, que empleando la liofilización (Tabla 3). Las microcápsulas que se obtuvieron por liofilización presentaron un flujo "muy pobre", mientras que las propiedades de flujo se mejoraron mediante el secado por pulverización al producir microcápsulas con un "flujo regular" (Quispe-Condori, Saldaña, & Temelli, 2011). Además, el secado por aspersión mejoró la humectabilidad de las microcápsulas aproximadamente 4 veces. Por otro lado, el método empleado para microencapsular no tuvo un efecto significativo sobre la solubilidad de los polvos. En cuanto a la morfología, la forma y tamaño característico de las microcápsulas, se vieron afectados por el método de encapsulación (Fig. 6). Las microcápsulas obtenidas por aspersión fueron más pequeñas y esféricas con una superficie menos lisa con algunas grietas y concavidades en la pared, causadas por la rápida evaporación del agua durante el proceso (Hu, Li, Zhang, Kou, & Zhou, 2018). Por otro lado, las microcápsulas liofilizadas presentaron una forma de aserrín con una superficie más lisa en la pared.

Tabla 3. Propiedades físicas de los microencapsulados

Parámetro	Secado por aspersión	Liofilización
Humedad (g/100g)	4,25 ± 0,42	4,50 ± 0,92
Humectabilidad (s)*	14,37 ± 1,53	55,33 ± 13,43
Solubilidad (%)	97,73 ± 1,91	96,85 ± 1,51
Densidad aparente (kg/m ³)	340,00 ± 60,00	256,67 ± 25,72
Densidad compacta (kg/m ³)	430,00 ± 45,83	380,00 ± 37,85
Índice de Hausner*	1,27 ± 0,12	1,48 ± 0,05
Índice de Carr's*	21,00 ± 7,00	32,00 ± 2,65

Valores expresados como media ± desviación estándar; (*) indica una diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$).

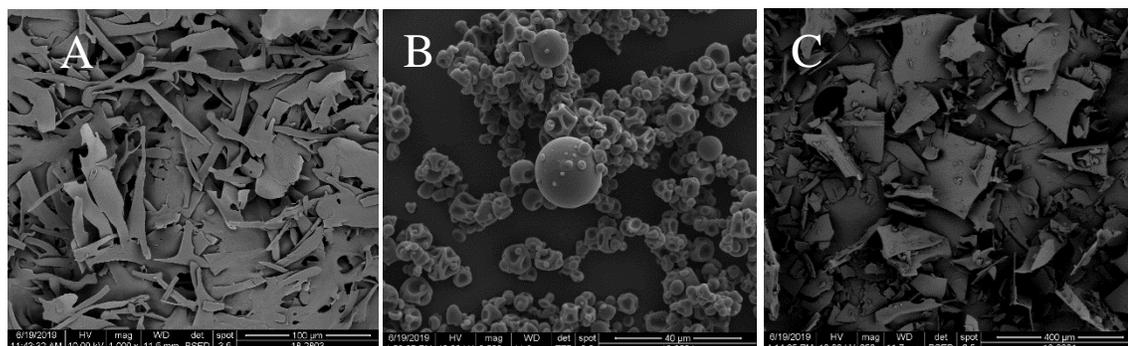


Fig. 6. Micrografías de microscopio electrónico de barrido para los diferentes sistemas estudiados (A) secado por aspersión, (B) liofilización.

La actividad antioxidante fue mayor en las microcápsulas obtenidas por liofilización (Tabla 4). Este resultado concuerda con las características morfológicas de las microcápsulas, según el método empleado. La degradación de la actividad antioxidante en las microcápsulas secadas por aspersión se explica por el tamaño más pequeño de la microcápsula que conlleva a un área de superficie más grande promoviendo el deterioro de los compuestos bioactivos que se encuentran en la superficie (Ballesteros, Ramirez,

Orrego, Teixeira, & Mussatto, 2017). Además, las altas temperaturas empleadas durante el secado por aspersión pueden causar la degradación de los compuestos activos, como los polifenoles, que se describen como compuestos sensibles al calor (Sablania & Bosco, 2018).

Tabla 4. Propiedades antioxidantes de los microencapsulados

Parámetro	Secado por aspersión	Liofilización
Polifenoles totales (mg EAG/g)*	36,51 ± 1,95	51,72 ± 2,23
Flavonoides totales (mg EQ/g)*	11,59 ± 1,59	31,34 ± 4,61
DPPH (mmol Trolox/g)*	0,17 ± 0,03	0,26 ± 0,05
FRAP (mmol Trolox/g)	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,01

Valores expresados como media ± desviación estándar; (*) indica una diferencia significativa entre las muestras (p <0.05).

4.4 Estabilidad gastrointestinal in vitro y fermentación colónica de los microencapsulados

El método de encapsulación tuvo un efecto significativo sobre la liberación y la estabilidad del ácido clorogénico. Las microcápsulas que se secaron por pulverización mostraron un mayor porcentaje de liberación durante la digestión gástrica y fueron más inestables cuando llegaron a la fase intestinal. Este resultado es desfavorable dado que el ácido clorogénico se absorbe e hidroliza en el intestino delgado (Lafay, Morand, Manach, Besson, & Scalbert, 2006). La liberación rápida del ácido clorogénico durante la etapa gástrica puede ser explicada por la presencia de las grietas formadas durante el secado por pulverización, que favorecen la liberación del núcleo, y provoca una degradación del ácido clorogénico debido al pH alcalino de la fase intestinal (Narita & Inouye, 2013). Por otro lado, la liberación del ácido clorogénico aumentó durante la fase intestinal cuando las microcápsulas se obtuvieron por liofilización. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos, que indican que las condiciones intestinales favorecen la liberación de ácido clorogénico (Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán, & García-Conesa, 2007). Además, se evidencia que la liberación máxima de ácido clorogénico se produce durante la fermentación colónica *in vitro*. Este resultado es de gran interés ya que el efecto del ácido

clorogénico sobre la obesidad, la salud intestinal y el metabolismo de los aminoácidos está relacionado con la regulación de la microbiota intestinal (Hagl et al., 2011; Wang et al., 2019; Zhang, Jiao, Wang, Lin, & You, 2019). Adicionalmente, se observa una reducción de ácido clorogénico en todas las muestras después de 24 horas de fermentación colónica, lo que puede explicarse por el catabolismo de este metabolito en ácido hidrocafeico y ácido dihidroferúlico (Mills et al., 2015).

Tabla 5. Contenido de ácido clorogénico (mg/kg) durante los ensayos de estabilidad

Parámetro	Secado por aspersión	Liofilización
Muestra no digerida*	75,97 ± 4,68	14,53 ± 2,69
Fase gástrica*	137,14 ± 14,86	21,19 ± 6,45
Fase intestinal	76,14 ± 3,66	82,92 ± 5,60
Fermentación colónica 24 horas	271,52 ± 32,59	251,89 ± 60,39
Fermentación colónica 48 horas	188,16 ± 7,59	212,34 ± 24,67

Valores expresados como media ± desviación estándar; (*) indica una diferencia significativa entre las muestras (p <0.05).

5. Conclusiones

En este estudio se evaluaron los beneficios de la adición de cascarilla de cacao a las infusiones de *I. guayusa* y *V. patens* que, entre otros, diversifica la variedad de compuestos fenólicos relacionados con la prevención y disminución de riesgo de aparición del síndrome metabólico.

La metodología de la superficie de respuesta permitió formular una infusión con una elevada actividad antioxidante, alto contenido de ácido clorogénico, disminuyendo los atributos de astringencia del producto, correlacionada principalmente a la presencia de *V. patens*. Además, la microencapsulación por liofilización resultó ser el proceso más eficiente dado que las características morfológicas del producto conservan mejor la actividad antioxidante y retarda la liberación de ácido clorogénico durante la simulación gástrica.

El elevado poder antioxidante de las infusiones se correlaciona principalmente a la

presencia de ácidos grasos, además de otros compuestos que no pudieron ser identificados en esta etapa del estudio y que se encuentran en mayor abundancia en las infusiones elaboradas con *V. patens* .

Recomendaciones

Dado que una gran parte de los compuestos correlacionados con la actividad antioxidante no lograron ser identificados por CG-EM se recomienda emplear otra técnica para la identificación, como cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas – masas.

La actividad biológica de los compuestos nutracéuticos del producto microencapsulado debe ser corroborada mediante estudios preclínicos empleando ensayos *in vivo* con ratones.

6. Bibliografía

- Abdelkarem, H. M., &Fadda, L. H. (2017). Flaxseed and quercetin improve anti-inflammatory cytokine level and insulin sensitivity in animal model of metabolic syndrome, the fructose-fed rats. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*, S3015–S3020. <http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.11.042>
- Aguiar, J., Estevinho, B. N., &Santos, L. (2016, December 1). Microencapsulation of natural antioxidants for food application – The specific case of coffee antioxidants – A review. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.012>
- Ahmad, M., Khan, M. P. Z., Mukhtar, A., Zafar, M., Sultana, S., &Jahan, S. (2016). Ethnopharmacological survey on medicinal plants used in herbal drinks among the traditional communities of Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, *184*, 154–186. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.039>
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., &Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, *89*(1), 27–36. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.075>
- Aulton, M. E., &Cooper, J. W. (John W. (1988). *Pharmaceutics : the science of dosage form design*. Churchill Livingstone. Retrieved from https://books.google.com.ec/books/about/Pharmaceutics.html?id=36kePwAACAAJ&redir_esc=y

- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237, 623–631. <http://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.05.142>
- Bermúdez-Soto, M.-J., Tomás-Barberán, F.-A., & García-Conesa, M.-T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865–874. <http://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.06.025>
- Bhandarkar, N. S., Brown, L., & Panchal, S. K. (2019). Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats. *Nutrition Research*, 62, 78–88. <http://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2018.11.002>
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., & Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 420–428. <http://doi.org/10.1016/J.IFSET.2005.05.003>
- Castro-Rosas, J., Ferreira-Grosso, C. R., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Rodríguez-Marín, M. L., Guzmán-Ortiz, F. A., & Falfán-Cortés, R. N. (2017). Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. *Food Research International*, 102, 575–587. <http://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.09.054>
- Ceuppens, S., Boon, N., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Van deWiele, T., & Uyttendaele, M. (2010). Quantification methods for *Bacillus cereus* vegetative cells and spores in the gastrointestinal environment. *Journal of Microbiological Methods*, 83(2), 202–210. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.09.009>
- Chen, L., Teng, H., & Cao, H. (2019). Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 127, 182–187. <http://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.03.038>
- Cho, A.-S., Jeon, S.-M., Kim, M.-J., Yeo, J., Seo, K.-I., Choi, M.-S., & Lee, M.-K. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 937–943. <http://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.01.003>
- Chóez-Guaranda, I., Ruíz-Barzola, O., Ruales, J., & Manzano, P. (2018). Antioxidant activity optimization and GC-MS profile of aqueous extracts of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. leaves. *Natural Product Research*, 1–5.

<http://doi.org/10.1080/14786419.2018.1539978>

- Cicero, A. F. G., Derosa, G., Parini, A., Baronio, C., & Borghi, C. (2014). Factors associated with 2-year persistence in fully non reimbursed lipid-lowering treatments. *Atherosclerosis*, 235(1), 81–83. <http://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2014.04.016>
- DeFelice, S. L. (1995). The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science & Technology*, 6(2), 59–61. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88944-X](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88944-X)
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214–219. <http://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Drewnowski, A., & Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(6), 1424–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101467>
- Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., & Proksch, P. (2008). Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*, 3(12), 1820–1831. <http://doi.org/10.1038/nprot.2008.182>
- Fernando, W., Rupasinghe, H. P. V., & Hoskin, D. W. (2019). Dietary phytochemicals with anti-oxidant and pro-oxidant activities: A double-edged sword in relation to adjuvant chemotherapy and radiotherapy? *Cancer Letters*, 452, 168–177. <http://doi.org/10.1016/J.CANLET.2019.03.022>
- Francisco, M. L. dL., & Resurreccion, A. V. A. (2012). Antioxidant capacity and sensory profiles of peanut skin infusions. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 189–198. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.008>
- Galland, L. (2013). Functional Foods: Health Effects and Clinical Applications. In *Encyclopedia of Human Nutrition* (pp. 366–371). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00130-6>
- Granato, D., de Araújo Calado, V. Ô. M., & Jarvis, B. (2014, January). Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International*. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.024>
- Grassi, D., Desideri, G., & Ferri, C. (2010). Blood pressure and cardiovascular risk: What about cocoa and chocolate? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 112–

115. <http://doi.org/10.1016/J.ABB.2010.05.020>

- Gruenwald, J. (2009). Novel botanical ingredients for beverages. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 210–216. <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.11.003>
- Guevara, M., Tejera, E., Iturralde, G. A., Jaramillo-Vivanco, T., Granda-Albuja, M. G., Granja-Albuja, S., ...Álvarez-Suarez, J. M. (2019). Anti-inflammatory effect of the medicinal herbal mixture infusion, Horchata, from southern Ecuador against LPS-induced cytotoxic damage in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 131. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110594>
- Hagl, S., Deusser, H., Soyalan, B., Janzowski, C., Will, F., Dietrich, H., ...Richling, E. (2011). Colonic availability of polyphenols and D-(–)-quinic acid after apple smoothie consumption. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(3), 368–377. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201000252>
- Hu, Y., Li, Y., Zhang, W., Kou, G., &Zhou, Z. (2018). Physical stability and antioxidant activity of citrus flavonoids in arabic gum-stabilized microcapsules: Modulation of whey protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 77, 588–597. <http://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2017.10.037>
- Jiménez-Zamora, A., Delgado-Andrade, C., &Rufián-Henares, J. A. (2016). Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chemistry*, 199, 339–346. <http://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.12.019>
- Jimenez, M., Garcia, H. S., &Beristain, C. I. (2010). Effect of water activity on physical properties of conjugated linoleic acid (cla) microcapsules. *Journal of Food Process Engineering*, 33(3), 434–447. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2008.00283.x>
- Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C. J., &Adhikari, B. (2015, December 1). Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.029>
- Kogiannou, D. A. A., Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M. G., &Kaliora, A. C. (2013). Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 152–159. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.027>
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Ljubičić, I., Durgo, K., Cindrić, I. J., Bušić, A., &Vojvodić, A. (2014). Formulating blackberry leaf mixtures for preparation of infusions with plant derived sources of sweeteners. *Food Chemistry*, 151, 385–393.

<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.087>

- Kumari, R., Kumar, S., & Kant, R. (2019). An update on metabolic syndrome: Metabolic risk markers and adipokines in the development of metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. <http://doi.org/10.1016/J.DSX.2019.06.005>
- Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006). Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *The British Journal of Nutrition*, 96(1), 39–46. <http://doi.org/10.1079/bjn20061714>
- Manzano, P., Hernández, J., Quijano-Avilés, M., Barragán, A., Chóez-Guaranda, I., Viteri, R., & Valle, O. (2017). Polyphenols extracted from *Theobroma cacao* waste and its utility as antioxidant. *Emir. J. Food Agric* •, 29. <http://doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-388>
- Manzano, P. I., Miranda, M., Quijano, M. F., & Monzote, L. (2015). Advances in Studies of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Growing in Ecuador. In *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. InTech. <http://doi.org/10.5772/59866>
- Manzano Santana, P., Quijano-Avilés, M., Chóez-Guaranda, I., Barragán Lucas, A., Viteri Espinoza, R., Martínez, D., ... Miranda Martínez, M. (2018). Effect of drying methods on physical and chemical properties of *Ilex guayusa* leaves. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 71(3), 8617–8622. <http://doi.org/10.15446/rfnam.v71n3.71667>
- Martin, C. L., Kane, J. B., Miles, G. L., Aiello, A. E., & Harris, K. M. (2019). Neighborhood disadvantage across the transition from adolescence to adulthood and risk of metabolic syndrome. *Health & Place*, 57, 131–138. <http://doi.org/10.1016/J.HEALTHPLACE.2019.03.002>
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015, February 1). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>
- Maslov, L. N., Naryzhnaya, N.V., Boshchenko, A. A., Popov, S.V., Ivanov, V.V., & Oeltgen, P. R. (2019). Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 15, 1–5. <http://doi.org/10.1016/J.JCTE.2018.11.001>

- Meinhart, A. D., Damin, F. M., Caldeirão, L., daSilveira, T. F. F., Filho, J. T., & Godoy, H. T. (2017). Chlorogenic acid isomer contents in 100 plants commercialized in Brazil. *Food Research International*, 99, 522–530. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.017>
- Mills, C. E., Tzounis, X., Oruna-Concha, M. J., Mottram, D. S., Gibson, G. R., & Spencer, J. P. E. (2015). In vitro colonic metabolism of coffee and chlorogenic acid results in selective changes in human faecal microbiota growth. *British Journal of Nutrition*. <http://doi.org/10.1017/S0007114514003948>
- Narita, Y., & Inouye, K. (2013). Degradation kinetics of chlorogenic acid at various pH values and effects of ascorbic acid and epigallocatechin gallate on its stability under alkaline conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(4), 966–72. <http://doi.org/10.1021/jf304105w>
- Ozkan, G., Franco, P., DeMarco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, 272, 494–506. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.205>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–8. <http://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Patnaik Kuppili, P., Vengadavaradan, A., & Bharadwaj, B. (2019). Metabolic syndrome and substance use: A narrative review. *Asian Journal of Psychiatry*, 43, 111–120. <http://doi.org/10.1016/J.AJP.2019.05.022>
- Quek, S. Y., Chok, N. K., & Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), 386–392. <http://doi.org/10.1016/J.CEP.2006.06.020>
- Quijano-Aviles, M., Franco-Agurto, G., Surez-Quirumbay, K., Barragan-Lucas, A., & Manzano-Santana, P. (2016). Linear Programming Formulation of a Dairy Drink Made of Cocoa, Coffee and Orange By-Products. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 1. <http://doi.org/10.9755/ejfa.2015-09-750>
- Quispe-Condori, S., Saldaña, M. D. A., & Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1880–1887. <http://doi.org/10.1016/J.LWT.2011.01.005>
- Rajput, R., Wairkar, S., & Gaud, R. (2018). Nutraceuticals for better management of osteoporosis: An overview. *Journal of Functional Foods*, 47, 480–490.

<http://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.06.013>

- Rakotoniaina, E. N., Donno, D., Randriamampionona, D., Harinarivo, H. L., Andriamaniraka, H., Solo, N. R., ...Beccaro, G. L. (2018). Insights into an endemic medicinal plant species of Madagascar and Comoros: The case of Famelona (*Chrysophyllum boivinianum* (Pierre) Baehni, Sapotaceae family). *South African Journal of Botany*, *117*, 110–118. <http://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.05.010>
- Sablania, V., & Bosco, S. J. D. (2018). Optimization of spray drying parameters for *Murraya koenigii* (Linn) leaves extract using response surface methodology. *Powder Technology*, *335*, 35–41. <http://doi.org/10.1016/J.POWTEC.2018.05.009>
- Saitta, M., Curto, S.Lo, Salvo, F., Bella, G.Di, & Dugo, G. (2002). Gas chromatographic–tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Analytica Chimica Acta*, *466*(2), 335–344. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00572-X](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00572-X)
- Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2019). A practical guide for designing effective nutraceutical combinations in the form of foods, beverages, and dietary supplements against chronic degenerative diseases. *Trends in Food Science & Technology*, *88*, 179–193. <http://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.03.026>
- Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J. A., Calderas, F., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., ...Bernad-Bernad, M. J. (2015). Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *LWT - Food Science and Technology*, *64*(2), 571–577. <http://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.06.020>
- Saquicela Carpio, J. E. (2018). Optimización experimental de un método cromatográfico HPLC-DAD para el análisis de polifenoles en frutas.
- Schafroth, N., Arpagaus, C., Jadhav, U. Y., Makne, S., & Douroumis, D. (2012). Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, *90*, 8–15. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.038>
- Shah, R. B., Tawakkul, M. A., & Khan, M. A. (2008). Comparative evaluation of flow for pharmaceutical powders and granules. *AAPS PharmSciTech*, *9*(1), 250–8. <http://doi.org/10.1208/s12249-008-9046-8>
- Shayo, S. C. (2019). Strategies to ameliorate endothelial dysfunction associated with metabolic syndrome, where are we? *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical*

- Research & Reviews*, 13(3), 2164–2169. <http://doi.org/10.1016/J.DSX.2019.05.005>
- Singh, M., & Shukla, Y. (2015). Combinatorial Approaches Utilizing Nutraceuticals in Cancer Chemoprevention and Therapy. In *Genomics, Proteomics and Metabolomics in Nutraceuticals and Functional Foods* (pp. 185–217). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <http://doi.org/10.1002/9781118930458.ch15>
- Skąpska, S., Marszałek, K., Woźniak, Ł., Zawada, K., & Wawer, I. (2016). Aronia dietary drinks fortified with selected herbal extracts preserved by thermal pasteurization and high pressure carbon dioxide. *LWT - Food Science and Technology*. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.001>
- Smilin Bell Aseervatham, G., Arul Ananth, D., & Sivasudha, T. (2018). The Liver: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. *The Liver*, 239–246. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-803951-9.00020-3>
- Tavares, L., Figueira, I., Macedo, D., McDougall, G. J., Leitão, M. C., Vieira, H. L. A., ... Santos, C. N. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 131(4), 1443–1452. <http://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.10.025>
- Tur, J. A., & Bibiloni, M. M. (2016). Functional Foods. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 157–161). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00340-8>
- Villacís-Chiriboga, J., García-Ruiz, A., Baenas, N., Moreno, D. A., Meléndez-Martínez, A. J., Stinco, C. M., ... Ruales, J. (2018). Changes in phytochemical composition, bioactivity and *in vitro* digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1927–1934. <http://doi.org/10.1002/jsfa.8675>
- Wang, Z., Lam, K., Hu, J., Ge, S., Zhou, A., Zheng, B., ... Lin, S. (2019). Chlorogenic acid alleviates obesity and modulates gut microbiota in high-fat-fed mice. *Food Science & Nutrition*, 7(2), 579–588. <http://doi.org/10.1002/fsn3.868>
- Williamson, E. M. (2001, September). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*. <http://doi.org/10.1078/0944-7113-00060>
- Zhang, P., Jiao, H., Wang, C., Lin, Y., & You, S. (2019). Chlorogenic Acid Ameliorates Colitis and Alters Colonic Microbiota in a Mouse Model of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Frontiers in Physiology*, 10, 325. <http://doi.org/10.3389/fphys.2019.00325>