UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de las condiciones de microencapsulación mediante secado por aspersión de antioxidantes de polen apícola

Ibeth Rodríguez González

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2016

Evaluación de las condiciones de microencapsulación mediante secado por aspersión de antioxidantes de polen apícola

Ibeth Rodríguez González

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Directora:

Ingeniera de alimentos, Ph.D., Amanda Consuelo Díaz Moreno

Línea de Investigación:

Caracterización y generación de valor de productos apícolas

Grupo de Investigación:

Aseguramiento de la Calidad de Alimentos y Desarrollo de Nuevos Productos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2016

A mis padres por el esfuerzo que han hecho diariamente para apoyarme

No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer.

Goethe (1749-1832)

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA - y todos sus funcionarios.

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional - DIB - sede Bogotá por el estímulo recibido a través del "*Programa nacional de apoyo a estudiantes de posgrado para el fortalecimiento de la investigación, creación e innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015*".

A Colciencias por la financiación del proyecto "*Establecimiento de procesos de conservación y transformación de polen apícola para la obtención de alimentos con características funcionales*".

Al Jardín botánico de Bogotá José Celestino Mutis por el apoyo recibido con el "*Programa Thomas van der Hammen"*

A los profesores del ICTA por su apoyo académico en el proyecto.

A mi padre por su apoyo intelectual, moral, y económico.

A mis compañeros de laboratorio con los que trabajamos en conjunto y nos apoyamos en diferentes aspectos, principalmente a Elkin Acosta, Lizeth Castro y Andrea Mojica.

A mis compañeros de Maestría Mónica Ospina y Zain Sánchez por su apoyo académico y moral.

Resumen

El estudio de las condiciones de microencapsulación de extractos hidroetanólicos de polen apícola ricos en compuestos fenólicos mediante secado por aspersión, es de interés para constituir una nueva forma de ingrediente natural. El proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión de extractos de polen apícola fue evaluado mediante dos factores: temperaturas de secado (130°C, 160ºC y 190°C) y el contenido de maltodextrina (1:1 y 1:0.5 extracto/maltodextrina p/p) para ver la influencia en las características antioxidantes, sensoriales y físicas de los microencapsulados. Se encontró mayor influencia del contenido de maltodextrina en el contenido de fenoles totales (CFT) medido por Folin Ciocalteu y en la actividad antioxidante (AAO) medida por TEAC y FRAP. Se encapsularon de 3.0 a 5.9 mg de ácido gálico equiv./g de microencapsulado (Folin Ciocalteu), con rendimientos de secado entre 36.52 ± 4.36 y 63.96 ± 8.80% y algunas propiedades físicas (densidad aparente y morfología) variaron con las temperaturas de secado. Se realizó un ensayo de utilización de los microencapsulados en néctar de maracuyá, para evaluar la aceptación sensorial y el aporte en antioxidantes, 60 consumidores aceptaron las bebidas con inclusiones de 3, 5 y 7% mediante una evaluación sensorial afectiva y se incrementó la AAO y el CFT de esta matriz.

Palabras clave: Antioxidantes, polen apícola, compuestos fenólicos, secado por aspersión, extracción.

Abstract

The study of micro-encapsulation conditions of bee pollen hydro-ethanolic extracts rich in phenolics compounds by means of spray drying, is significant to develop a new form of natural ingredient. The micro-encapsulation process was evaluated regarding two factors: drying temperatures (130°C, 160°C and 190°C) and maltodextrin content (1:1 and 1:0.5 extract/maltodextrin w/w) to see the influence on antioxidant, sensory and physical characteristics. Finding an effect over phenols content total (CFT) by Folin Ciocalteu and the antioxidant activity (AAO) by TEAC y FRAP radical scavenging assays of the microencapsulated compounds caused by the maltodextrin content. Samples from 3.0 to 5.9 mg of gallic acid equiv./g of dry powder (Folin Ciocalteu) were encapsulated, with production yields from 36.52 ± 4.36% to 63.96 ± 8.80%, the variations of some physical properties (bulk density, solubility and morphology) due to drying temperatures. Assay using microencapsulated in passion fruit nectar was performed to evaluate the sensory acceptance and contribution in antioxidants. Getting the acceptance of 60 consumers for nectars containing 3, 5 and 7% of microencapsulated compound by consumer sensory evaluation, the AAO and CFT of the nectars increased in this matrix.

Keywords: *Antioxidant, bee pollen, phenolics compounds, Spray dry, extraction.*

Contenido

Resumen ..... **V**

Abstract ..... **VI**

Lista de figuras ..... **IX**

Lista de tablas ..... **X**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XII**

Introducción **1**

Objetivos **5**

1 Polen apícola, composición y características bioactivas **7**

1.1 Polen apícola 7
1.2 Estructura del grano de polen 8
1.3 Producción y manejo 9
1.4 Composición 10
1.4.1 Humedad 10
1.4.2 Proteína 11
1.4.3 Carbohidratos 12
1.4.4 Lípidos 13
1.4.5 Minerales y vitaminas 14
1.5 Características bioactivas 14
1.5.1 Antioxidantes 15
1.5.2 Compuestos fenólicos en el polen 20
1.5.3 Otros compuestos bioactivos 22
1.6 Polen apícola como suplemento nutricional 22

2 Evaluación de las condiciones de microencapsulación mediante secado por aspersión de extractos etanólicos de polen apícola **25**

2.1 Introducción 25
2.2 Microencapsulación mediante secado por aspersión 26

2.3 Materiales y métodos 29
2.3.1 Polen apícola 29
2.3.2 Preparación del extracto 31
2.3.3 Rendimiento de los extractos 32
2.3.4 Características fisicoquímicas de los extractos 32
2.3.5 Secado por aspersión 32
2.3.6 Rendimiento y recuperación de fenoles en el proceso de secado por aspersión 33
2.3.7 Propiedades físicas y sensoriales de los microencapsulados 34
2.3.8 Actividad Antioxidante (AAO) de los microencapsulados 36
2.3.9 Análisis estadístico 37
2.4 Resultados y análisis de resultados 38
2.4.1 Características fisicoquímicas de los extractos de polen 38
2.4.2 Rendimiento y recuperación de fenoles en el proceso de secado 40
2.4.3 Propiedades físicas y sensoriales de los microencapsulados 43
2.4.4 Actividad antioxidante de los microencapsulados 52
2.4.5 Conclusiones de la evaluación de microencapsulación de compuestos fenólicos de polen 54

3 Aplicación del microencapsulado de extracto etanólico de antioxidantes de polen en un néctar de maracuyá 57

3.1 Introducción 57
3.2 Materiales y métodos 58
3.2.1 Elaboración de néctares de maracuyá 58
3.2.2 Pruebas afectivas a consumidores 59
3.2.3 Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante por FRAP y TEAC de los néctar de maracuyá 59
3.2.4 Análisis estadístico 59
3.3 Resultados 60
3.3.1 Pruebas sensoriales a consumidores 60
3.3.2 Contenido de Fenoles Totales y Actividad Antioxidante del néctar de maracuyá 64
3.3.3 Conclusiones sobre la inclusión del microencapsulado de extractos de polen en un néctar de maracuyá 66

4 Conclusiones y recomendaciones 67

4.1 Conclusiones 67
4.2 Recomendaciones 68

Bibliografía 71

Anexo A: Análisis estadístico 87

Anexo B: Puntajes de las pruebas a consumidores 101

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Morfología grano de polen..... 8
Figura 1-2: Estructura química de los flavonoides 17
Figura 1-3: Características estructurales en relación con el potencial antioxidante 18
Figura 2-1: Esquema de un *Secador por aspersión,* modelo *mini spray dryer BUCHI B-290* 27
Figura 2-2: Representación del espacio CIE-L* a* b* 36
Figura 2-3: Extracto etanólico y extracto hidroetanólico de polen 38
Figura 2-4: Isoterma de adsorción en el proceso de microencapsulación..... 44
Figura 2-5: Micrografías de barrido electrónico de microencapsulados a diferentes condiciones de secado por aspersión..... 45
Figura 2-6: Tamaño de microcápsulas a diferentes temperaturas de secado y composición de la mezcla de alimentación..... 48
Figura 2-7: Porcentaje de solubilidad a diferentes condiciones de secado por aspersión 49
Figura 2-8: Densidad aparente de los microencapsulados 49
Figura 2-9: Parámetros L*a*b* instrumentales de los microencapsulados..... 51
Figura 3-1: Comparación de medianas en muestras de néctar con microencapsulado en la prueba afectiva en escala hedónica..... 61
Figura 3-2: Nivel de significancia de la aceptación de los consumidores..... 62
Figura 3-3: Comparación de medianas en la prueba de preferencia del néctar de maracuyá 63

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Alimentos fuente de proteína comparados con el polen apícola**.** 11
Tabla 1-2: Fuentes naturales de fibra dietaria comparadas con polen apícola 13
Tabla 1-3: Ácidos grasos poliinsaturados en algunos alimentos comparados con polen apícola. 13
Tabla 1-4: Contenido de vitaminas en frutas comparado con el polen apícola 14
Tabla 1-5: Fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante por DPPH y ABTS del polen apícola de diferentes orígenes. 21
Tabla 1-6: Principales compuestos bioactivos encontrados en el polen apícola. 22
Tabla 2-1: Influencia de los parámetros del *Secador* en la temperatura de salida, rendimiento y humedad del producto. 27
Tabla 2-2: Condiciones de microencapsulación de extractos de compuestos fenólicos mediante secado por aspersión 29
Tabla 2-3: Composición polen apícola seco proveniente de Viracachá, Boyacá..... 31
Tabla 2-4: Condiciones de operación del secador por aspersión..... 33
Tabla 2-5: Diseño experimental para la evaluación de la microencapsulación de extractos etanólicos de polen apícola. 37
Tabla 2-6: Contenido de fenoles totales y rendimiento de los extractos hidroetanólicos (30 g de polen / 200 mL). 39
Tabla 2-7: Características fisicoquímicas de los extractos. 39
Tabla 2-8 : Resultados de rendimiento, encapsulación y recuperación de fenoles 40
Tabla 2-9: a_w y humedad de los microencapsulados a diferentes condiciones de secado 43
Tabla 2-10: Parámetros instrumentales L*a*b* de los microencapsulados y croma a diferentes temperaturas y porcentajes de maltodextrina. 50
Tabla 2-11: Actividad antioxidante de los microencapsulados 52
Tabla 2-12: Correlación entre contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de los microencapsulados 53
Tabla 3-1: Escala hedónica empleada en la prueba afectiva a consumidores 59
Tabla 3-2: Comparación de medianas y significancia mediante Friedman de la prueba afectiva realizada a consumidores en escala hedónica. 61

Tabla 3-3: Comparación de medianas mediante Friedman de la prueba de preferencia realizada a los consumidores 62
Tabla 3-4: Observaciones de los consumidores..... 64
Tabla 3-5: Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de néctar de maracuyá con inclusiones de polen y microencapsulado 65
Tabla 4-1: Puntuación asignada por los consumidores a néctares de maracuyá con adición de microencapsulados de extractos de polen en escala hedónica. 101
Tabla 4-2: Asignación de puntaje por panelista de acuerdo a su preferencia.....102

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
a_w	actividad de agua	mg	
EC_{50}	Cantidad de antioxidante necesaria para la desaparición del 50% del DPPH		
CFT	contenido de fenoles	mg/g	
E	Extracto	g	
M	microencapsulado	g	
MD	maltodextrina	g	
p	polen	g	
V	volumen	mL	
W	peso	g	

Subíndices

Subíndice	Término
s	fracción sólidos
m	microencapsulado

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AAO	Actividad antioxidante
ABTS	Radical Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenztiazolina-6-sulfonico
ANCOVA	Análisis de covarianza
ANOVA	Análisis de varianza
CFT	Contenido de Fenoles totales
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
E	Extracto
Equiv.	Equivalente

EXP	Experimento
FRAP	Poder reductor antioxidante de Hierro
GAE	Acido gálico equivalente
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MD	Maltodextrina
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
pH	Potencial de hidrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Sin datos
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEAC	Actividad antioxidante equivalente a trolox
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-*s*-triazine
UPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución

Introducción

A nivel mundial se ha incrementado el consumo de alimentos de alto valor nutricional con propiedades funcionales para la prevención de diversas enfermedades degenerativas. El desarrollo y consumo de alimentos funcionales es una tendencia con potencial en la comercialización de alimentos (Bigliardi & Galati, 2013).

La apicultura es la ciencia que estudia la cría de las abejas (*Apis Mellifera*) y el aprovechamiento de los productos generados en la colmena. Los productos apícolas tienen características funcionales y además generan un beneficio importante al medio ambiente ya que las abejas cumplen el papel de agentes polinizadores en la naturaleza, siendo responsables de mantener la biodiversidad y mejorar la calidad de los frutos (Laverde, Egea, Rodríguez, & Peña, 2010).

La apicultura en Colombia es una actividad productiva en crecimiento; el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia junto con otras entidades entre los años 2006 y 2010 realizaron estudios sobre la actividad apícola en el país buscando fortalecer e incentivar su desarrollo tecnológico (Laverde et al., 2010; Martínez, 2006) y en el año 2012 la actividad apícola fue reconocida como una cadena productiva.

El polen es uno de los principales productos de la colmena. Se produce en pocos países, en Europa el principal productor es España; en América se produce en Estados Unidos, Argentina y Chile; en el continente asiático China produce hasta 3000 toneladas anualmente y es el principal exportador a nivel mundial. En Colombia la producción de polen es potencial ya que se ve favorecida por las condiciones climáticas y geográficas (Laverde et al., 2010).

El polen es el gametofito masculino de las flores. Este es transferido al estigma de una flor (estructura reproductora femenina) por el viento o por los insectos en un proceso llamado polinización. El polen apícola es el resultado de la aglutinación de los granos de polen floral mezclado con néctar y sustancias salivares de las abejas, que contienen enzimas como amilasas y catalasas, y es la fuente de proteína para el desarrollo de la colmena. Las abejas del género *Apis mellifera* lo transportan en los espacios ubicados en las patas traseras, conocidos como corbículas de ahí el nombre de “polen corbícular” (Bogdanov, 2011).

Los grupos de células en el polen están rodeadas por una pared rica en celulosa llamada intina y una cubierta resistente compuesta principalmente por esporopolenina llamada exina (Bogdanov, 2011). El polen apícola es de formas variables, principalmente esféricas, con tamaños entre 6 – 200 µm de diámetro, tiene contenidos nutricionales importantes que dependen de la fuente botánica (Almeida-Muradian, Pamplona, Coimbra, & Barth, 2005; Campos, Frigerio, Lopes, & Bogdanov, 2010). En polen apícola obtenido del altiplano Cundiboyacense de Colombia se reportó presencia de sodio, potasio, magnesio, zinc, hierro, contenidos altos de proteína (alrededor del 24%) y fibra (alrededor del 14%), azúcares reductores, ácidos grasos insaturados y saturados con contenidos de ácido α-linoleico (Fuenmayor et al., 2014).

El polen apícola ha sido ampliamente estudiado por sus beneficios a la salud humana (características antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas) generalmente asociadas a su contenido en flavonoides y fitoesteroles (Campos et al., 2010). Se ha reportado correlación positiva entre el contenido de flavonoides totales y la actividad antioxidante medida por los métodos TEAC con el radical ABTS y FRAP en polen colombiano secado a diferentes temperaturas (Zuluaga, Quicazán, & Serrato, 2014). También Salazar, (2014) reportó contenido de fenoles totales de 16.28 ± 2.2 mg de GAE/g de polen, carotenoides totales de 2149 ± 122 mg β-caroteno/kg de polen y vitamina E de 119 ± 12 µg de α-tocoferol/g polen, en estudios realizados a polen proveniente del altiplano Cundiboyacense, encontrando que estos contenidos son superiores a los reportados en otros países. El polen proveniente de España, Portugal y África contiene carotenoides totales de 1.22 a 20.4 mg/kg y fenoles totales de 5.6 a 8.5 mg de GAE/g (Domínguez-Valhondo, Bohoyo Gil, Hernández, & González-Gómez,

2011), y el polen proveniente de Brasil contiene vitamina E de 13.5 a 42.5 µg de α-tocoferol/g polen (Oliveira et al., 2009).

Debido a las características nutricionales del polen, se considera un aditivo alimentario en algunos países -Brasil, Suiza y Argentina- (Almeida-Muradian et al., 2005). Se han realizado estudios de inclusión en yogurt, masmelos y galletas (Khider, Elbanna, Mahmoud, & Owayss, 2013; Ungure, Straumīte, Muižniece-Brasava, & Dukaļska, 2013; Solgajová, Nôžková, & Kadáková, 2014) y estudios de extracción de antioxidantes por diversos métodos (Marinova & Tchorbanov, 2011; LeBlanc, Davis, Boue, DeLucca, & Deeby, 2009; Leja, Mareczek, Wyżgolik, Klepacz-Baniak, & Czekońska, 2007). Sin embargo, el contenido alto en flavonoides confiere diferentes pigmentos y sabor astringente y amargo (Rosales, Brown, & Ross, 2012), por ésta razón también se ha propuesto utilizar extractos de polen para enriquecimiento de otras matrices alimentarias (Kroyer & Hegedus, 2001).

La microencapsulación es una tecnología de interés en la industria para conservar biomoléculas como polifenoles, bacterias, enzimas y aditivos volátiles, evita la pérdida de compuestos bioactivos y nutrientes ya que los protege de la luz, la humedad y el oxígeno, permite una liberación controlada de los compuestos funcionales, genera ventajas en cuanto al transporte, almacenamiento y es un mecanismo para enmascarar sabores y olores indeseables (Nazzaro, Orlando, Fratianni, & Coppola, 2012; Fang & Bhandari, 2010). El secado por aspersión es una técnica utilizada para microencapsular debido a su flexibilidad, economía y operación continua. Es usada en la industria para producir alimentos secos, aditivos alimenticios y sabores (Fang & Bhandari, 2010; Ubbink & Krüger, 2006). Por esta razón se han realizado diferentes estudios de microencapsulación mediante secado por aspersión de fenoles donde se ha buscado disminuir el impacto sensorial y conservar los compuestos bioactivos de matrices como los propóleos, extractos de piel y semillas de uva, entre otros (Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2011; da Silva et al., 2013; Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, 2011).

La Universidad Nacional de Colombia con la financiación de Colciencias ha realizado varios proyectos encaminados a fortalecer la actividad apícola mediante el estudio de las condiciones de producción, calidad y transformación de los productos, generando

diferentes propuestas para el desarrollo tecnológico del sector. Estas iniciativas hacen parte de los objetivos planteados en el Plan Nacional de Desarrollo 2014-2018 en cuanto al fortalecimiento de actividades sostenibles "crecimiento verde" y la transformación y comercialización de la producción agropecuaria. Esta tesis se encuentra enmarcada dentro del proyecto **"Establecimiento de procesos de conservación y transformación de polen apícola para la obtención de alimentos con características funcionales"** que hace parte del "*Programa estratégico en alternativas para la generación de valor en productos apícolas en Colombia a través de la innovación y el desarrollo tecnológico*" financiado por COLCIENCIAS y ejecutado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos-ICTA-.

Este trabajo estudia el proceso de microencapsulación de antioxidantes de polen apícola, para generar una alternativa de aprovechamiento del mismo y extender la vida útil de los compuestos bioactivos extraídos. Se establecieron las condiciones para obtener un extracto concentrado y posteriormente secarlo mediante un secador por aspersión, utilizando maltodextrina como material de pared, se evaluaron diferentes condiciones de secado variando la temperatura de entrada y el porcentaje de maltodextrina, obteniendo diferentes contenidos de compuestos fenólicos totales medidos por el método *Folin Ciocalteu* y actividad antioxidante medida por los métodos *TEAC* y *FRAP*.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión de extractos etanólicos de polen apícola.

Objetivos específicos

1. Estudiar la influencia de las variables del proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión de extractos etanólicos de polen apícola.
2. Analizar las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del producto microencapsulado.

1 Polen apícola, composición y características bioactivas.

1.1 Polen apícola

El polen floral es el órgano reproductor masculino de las flores o gametofitos de las anteras de las flores de las plantas superiores. El polen es transferido al pistilo de las flores por un proceso denominado polinización gracias al viento y/o los insectos. La información genética y los nutrientes que tiene el grano de polen son transportados al ovario de la flor mediante la generación del tubo polínico donde se divide en varias células generando la fertilización (Durán, 2014; Bogdanov, 2011; Almeida-Muradian et al., 2005).

Cuando las abejas visitan las flores, su cuerpo con vellosidades se llena de polvo de polen, ellas juntan los granos de polen utilizando sustancias salivares con enzimas como amilasas, β-glucosidasas, catalasas y néctar. Las abejas aglomeran estos granos en "*pellets*" que almacenan en la corbícula de las patas traseras para poder transportarlo a la colmena, donde lo depositan en una celda con néctar y maduran convirtiéndolo en pan de abejas. El polen es una fuente de proteína, energía, minerales y grasas. Una abeja puede llegar a recolectar polen de 200 flores en un viaje (Durán, 2014; Bogdanov, 2011; Almeida-Muradian et al., 2005).

El polen apícola lleva la información genética y compuestos nutricionales relacionados con la planta de origen, por lo tanto, los *pellets* varían en su forma, tamaño y color; pueden ser esféricos o irregulares, de 6 a 200 µm y de colores blanco crema a café

oscuro, amarillo, naranja, gris, rojo y verde. También tiene las propiedades organolépticas y bioquímicas de la planta y su estudio se denomina palinología (Durán, 2014; Bogdanov, 2011; Almeida-Muradian et al., 2005).

1.2 Estructura del grano de polen

Como se observa en la Figura 1-1 las células del grano de polen - una célula vegetativa y otra generativa con dos núcleos - están protegidas por dos capas, una pared celular rica en celulosa, hemicelulosa y pectina llamada intina, y otra pared celular externa llamada exina compuesta principalmente por un politerpeno impermeable llamado esporopolenina. Algunos análisis químicos de esta capa han revelado la existencia de una mezcla de biopolímeros, conteniendo principalmente cadenas largas de ácidos grasos, fenilpropanoides, fenoles y trazas de carotenoides, los lípidos evitan la desecación y muerte de la célula viva y los antioxidantes evitan la oxidación de algunos componentes del grano (Salazar, 2014; Durán, 2014; Bogdanov, 2011).

Figura 1-1: Morfología grano de polen

(A) Exina, (B) Intina, (C) Retículo endoplasmático, (D) Apertura, (E) núcleo vegetativo, (F) Núcleo de células generativas.

Fuente: Zuluaga, Serrato, & Quicazán, 2014

1.3 Producción y manejo

Los apicultores recolectan el polen apícola por medio de trampas ubicadas en la entrada de las colmenas. Existe una gran variedad de trampas, redes que retienen los *pellets* de polen que las abejas desean ingresar a la colmena. El polen cae sobre un bastidor que periódicamente es removido por el apicultor. La cantidad de polen recolectada en el altiplano Cundiboyacense (Colombia) es alrededor de 200 g por colmena al día (Durán, 2014).

El polen apícola fresco contiene de 20 a 30 % de agua, esta alta humedad y valor nutricional lo hacen susceptible a contaminación con microorganismos. Se utilizan diferentes métodos para conservar las características nutricionales y prevenir contaminación microbiológica en el polen apícola; por ejemplo, la congelación no produce cambios significativos, por eso es la técnica recomendada para mantenerlo en buenas condiciones antes del secado (Bogdanov, 2011). Después se debe deshidratar hasta obtener una humedad entre 6 y 8%, las impurezas deben ser removidas con tamices o preferiblemente con filtros tipo ciclón para finalmente almacenarse en un lugar fresco, seco y en recipientes cerrados (Campos et al., 2008).

De acuerdo al estudio realizado por Durán, (2014) en un apiario en el Departamento de Boyacá -municipio de Viracachá-, el beneficio del polen presenta varias deficiencias e incumplimientos con la normatividad (Resolución 2674 de 2013, INVIMA). En la cosecha, durante los procesos de limpieza y en el almacenamiento hay diversos factores que generan contaminación cruzada, después de la cosecha, el polen apícola no es congelado o sometido a tratamiento térmico inmediatamente, contribuyendo a la proliferación de microorganismos, y en el secado las temperaturas no superan los 40ºC lo que favorece la contaminación del polen (Durán, 2014).

En Colombia no se ha establecido aún normatividad para la cosecha y beneficio del polen apícola; en el estudio realizado por (Durán, 2014), se definió que la temperatura más adecuada para la disminución de la carga microbiológica, la actividad de agua y el mantenimiento de las características bioactivas durante el secado es 60°C. Además se obtuvo una mejora notoria en la calidad del producto cuando se realizaron las siguientes modificaciones en la cosecha y producción: se ampliaron las perforaciones de las

trampas ubicadas en la colmena para disminuir la contaminación por mutilaciones de las abejas, se elevó la colmena del suelo para aumentar la ventilación y evitar contacto con la vegetación, se instalaron sensores de humedad y temperatura en la colmena, se mejoró la eficiencia del equipo de secado utilizando bandejas perforadas en acero inoxidable, modificaciones en la distribución del calor (instalación de ventilador) e instalación de una salida de humedad, y para las últimas etapas de proceso se implementó un sistema de limpieza con un tamiz y posterior separación de impurezas con ciclón.

1.4 Composición

La composición del polen apícola está influenciada por las condiciones ambientales y el origen botánico (LeBlanc et al., 2009; Mărghitaş et al., 2009; Pascoal, Rodrigues, Teixeira, Feás, & Estevinho, 2014).

1.4.1 Humedad

La humedad es un parámetro importante en el almacenamiento del polen. Una vez recolectado, el polen debe ser sometido a procesos de secado ya que con la humedad presente entre 9.7 – 34% pueden proliferar microorganismos, hongos y levaduras (Díaz, Zuluaga, Fuenmayor, & Martínez, 2009; Campos et al., 2008; Sattler et al., 2015). Las variaciones en el contenido de humedad en el polen se deben también a que las condiciones ambientales afectan el polen que es altamente higroscópico (Moreti, 2006) citado por: Sattler et al., (2015). En algunos países donde existe normatividad para el polen, se han establecido límites en esta característica para su comercialización: Brazil 4%, Suiza 6%, Uruguay 8% y Bulgaria 10% (Campos et al., 2008). En un estudio realizado a 196 muestras de polen apícola proveniente del altiplano Cundiboyacense se reportó un rango de humedad de 1.8 a 11.8 % (Fuenmayor et al., 2014), donde varias muestras incumplieron con las normatividades internacionales debido a la falta de los instrumentos y procesos adecuados para el secado en algunos apiarios de esta región de Colombia (Durán, 2014).

1.4.2 Proteína

El polen apícola es una fuente de proteína vegetal importante, por esta razón diferentes autores han estudiado este componente. El polen seco proveniente del altiplano Cundiboyacense tiene contenidos entre 16.7 y 29.5% de proteína (Díaz et al., 2009; Zuluaga, Moreno & Quicazán, 2011; Fuenmayor et al., 2014), estos valores son superiores a los reportados por otros países como la Patagonia, Argentina, entre 13.25 y 24.43% (Forcone, Aloisi, Ruppel, & Muñoz, 2011), Tailandia, 19.12% (Chantarudee et al., 2012) y Bulgaria, entre 22.71 y 24.2% (Marinova & Tchorbanov, 2011).

El polen apícola tiene todos los aminoácidos esenciales por eso se considera un alimento natural completo (Bogdanov, 2011), el contenido de proteína es comparable al de otros alimentos que son fuentes importantes de proteína animal como la carne, el queso y los huevos (ver Tabla 1-1). Sin embargo, debido a los polisacáridos que tiene el polen (esporopolenina) con alta resistencia a la degradación, no se conoce con exactitud si la proteína es biodisponible en su totalidad; algunos autores han reportado una digestión parcial en estudios de simulación de la digestión humana *in vitro* (Bogdanov, 2011).

Tabla 1-1: Alimentos fuente de proteína comparados con el polen apícola**.**

Alimento	Proteína (%)
Carne de pollo cruda	17.44
Carne de cerdo cruda	17.99
Carne de res cruda	21.23
Harina de Soya	37.81
Quinua	14.12
Queso Mozarella	22.17
Huevo entero cocinado	13.61
Polen apícola	16.7- 29.5

Fuente: USDA, 2015; Díaz et al., 2009; Zuluaga et al., 2011; Fuenmayor et al., 2014

Se han realizado estudios del contenido de proteína en polen hidrolizado enzimáticamente, donde la capa esporopolenina ha sufrido una degradación parcial; en Bulgaria se obtuvieron contenidos entre 22.71 y 24.2 % de proteína con extractos de polen hidrolizado con enzimas naturales (Marinova & Tchorbanov, 2011) y en Colombia

se ha reportado entre 34.27 y 37.93% de proteína en polen hidrolizado (Castro, Zuluaga, Quicazán, Pastrana & de Paula, 2014).

Además de la proteína, el porcentaje de nitrógeno en el polen apícola corresponde a amilasas, invertasas, algunas fosfatasas y transferasas; así como cofactores enzimáticos, entre los que están la biotina, el glutatión, el NAD y algunos nucleótidos (Human & Nicolson, 2006) citado por: Fuenmayor, (2009).

1.4.3 Carbohidratos

Los carbohidratos del polen apícola corresponden a azúcares reductores, no reductores, polisacáridos y fibra dietaria, los azúcares reductores provienen del néctar adicionado por las abejas, principalmente fructosa y glucosa y los no reductores incluyen di y trisacáridos (Salazar, 2014, Serra Bonvehí & Escolà Jordà, 1997). Las variaciones en el contenido de azúcares reductores pueden deberse a las condiciones climáticas (Odoux et al., 2012). En polen apícola de la región de Boyacá, reportaron 19.5% de fructosa, 13.6 % de glucosa y 6.7% de sacarosa (Fuenmayor et al., 2014). En Tailandia se ha reportado 7.16% de fructosa, 6.42 % de glucosa y 0.6% de sacarosa (Chantarudee et al., 2012).

Los polisacáridos encontrados en el polen apícola son celulosa, hemicelulosa, almidón y lignina (Serra Bonvehí & Escolà Jordà, 1997, Salazar, 2014). En Colombia encontraron 14.5% de fibra dietaria total en 196 muestras de polen proveniente del altiplano Cundiboyacense, donde 2.7% correspondían a fibra dietaria soluble, 11.7% a fibra dietaria insoluble (Fuenmayor et al., 2014). En otras 50 muestras de polen proveniente de zonas del altiplano Cundiboyacense y región del medio chicamocha en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, se encontraron contenidos de fibra dietara total promedio de 12.8%, de los cuales 10.6 % es fibra dietara insoluble y 2.2% de fibra dietara soluble (Díaz, Zuluaga, Morales & Quicazán, 2012), valores similares y superiores en algunos casos a frutas, hortalizas y nueces (ver Tabla 1-2).

Tabla 1-2: Fuentes naturales de fibra dietaria comparadas con polen apícola

Alimentos	Fibra Dietaria (%)
Almendra	12.5
Aguacate	6.8
Brócoli	2.4
Zanahoria	2.8
Kiwi	3.4
Lechuga	2.1
Maní	8.5
Ciruela pasa	7.1
Uvas pasas	3.7
Espinaca	2.2
Polen apícola	12.8

Fuente: USDA, 2015; Campos et al., 2008

1.4.4 Lípidos

Los lípidos en el polen dependen del origen botánico y de la cantidad de ácidos grasos, carotenos y vitaminas. También puede contener pigmentos, ceras, esteroles, alcoholes pesados e hidrocarburos (Human & Nicolson, 2006; Fuenmayor et al., 2014). En los análisis del polen proveniente del altiplano Cundiboyacense, el contenido osciló entre 2.8 y 9.7 %, donde el 63.3% del total de lípidos fueron ácidos grasos poliinsaturados con un 39.2 % de ácido α-linolénico (Fuenmayor et al., 2014), cantidades similares se encontraron en otros estudios; el polen de *Lotus* tiene un 22% de ácidos grasos insaturados (Xu, Dong, Mu, & Sun, 2011). El contenido de ácidos grasos polinsaturados es comparable a otras fuentes (Ver Tabla 1-3).

Tabla 1-3: Ácidos grasos poliinsaturados en algunos alimentos comparados con polen apícola.

Fuente	Porcentaje
Aceite de oliva	10.5
Aceite de canola	28.1
Aguacate	1.8
Polen apícola (Colombia)	4.4

Fuente: USDA, 2015, Fuenmayor et al., 2014

1.4.5 Minerales y vitaminas

Se han reportado minerales, principalmente potasio entre 4000 y 20000 mg/kg (Campos et al., 2008). En Colombia se ha reportado entre 3058 a 7616 mg/kg de polen (Fuenmayor et al., 2014). El polen tiene un contenido de vitaminas similar o superior en algunos casos a frutas como la manzana, cereza y guayaba a excepción de la vitamina C (ver Tabla 1-4).

Tabla 1-4: Contenido de vitaminas en frutas comparado con el polen apícola

Alimento	A β- Caroteno (mg/Kg)	B1 Tiamina (mg/Kg)	B2 Ribofla-vina (mg/Kg)	B3 Niacina (mg/Kg)	B6 Piridoxina (mg/Kg)	C Ácido ascórbico (mg/Kg)	B9 Ácido fólico (mg/Kg)	E Tocoferol (mg/Kg)
Manzana	0.03	0.17	0.26	0.91	0.41	46	0.03	18
Cerezas	1.41	0.58	1.01	8.67	1.01	193	0.11	1.7
Uvas Pasas	0.02	0.4	0.5	1	0.7	410	0.08	10
Guayaba	0.31	0.67	0.4	10.84	1.1	2283	0.49	7.3
Zanahoria	8.35	0.66	0.58	9.83	1.38	59	0.19	6.6
Polen Apícola	10-200	6-13	6-20	40-110	2 -7	70 - 560	3 - 10	40 - 320

Fuente: USDA, 2015; Campos et al., 2008

1.5 Características bioactivas

Además de las propiedades nutricionales, se han estudiado propiedades antioxidantes *in vivo* e *in vitro,* actividades antimicrobianas, antimutagénicas, antiestrogénicas, quimiprotectoras, anti-inflamatorias y para la prevención de numerosas enfermedades principalmente las asociadas al estrés oxidativo (Cabrera & Montenegro, 2013; Campos et al., 2010; Carpes, Mourao, De Alencar, & Masson, 2009; Chantarudee et al., 2012; Eraslan et al., 2009; Feás, Vázquez-Tato, Estevinho, Seijas, & Iglesias, 2012; Khider et al., 2013; LeBlanc et al., 2009; Mărghitaş et al., 2009; Marinova & Tchorbanov, 2011; Nogueira, Iglesias, & Estevinho, 2012; Pascoal et al., 2014; Pinto et al., 2010; Šarić et al., 2009). Todos los efectos terapéuticos y efectos protectores del polen apícola se han

asociado con el contenido de compuestos antioxidantes (Almeida-Muradian et al., 2005) principalmente los compuestos fenólicos.

1.5.1 Antioxidantes

El daño oxidativo se debe a un desequilibrio de compuestos oxidantes como los radicales libres (compuestos desapareados) y las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS) que no siempre son radicales libres. Estos son diferentes compuestos oxigenados como el oxígeno singlete, el hidroperóxido, el superóxido y el radical hidroxilo (Asada, 1999) citado por: Vicente, Manganaris, Sozzi, & Crisosto, (2009). Algunos radicales libres son formados naturalmente en las células y otros a través de factores externos como la contaminación, el humo del cigarrillo y la luz solar (Dean, Fu, Stocker, & Davies, 1997) citado por: Blasa, Gennari, Angelino, & Ninfali, (2010). Las ROS y los radicales libres pueden dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos lo cual genera enfermedades y puede conducir a una carcinogénesis (Ames, Shigenaga, & Hagen, 1993; Waris & Ahsan, 2006).

En la naturaleza existen varios grupos de compuestos que tienen actividad antioxidante porque inhiben la formación de ROS y radicales libres, inhiben la iniciación de reacciones en cadena, reparan y eliminan los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos dañados (Honglian et al., 2001). En las plantas hay numerosos metabolitos secundarios que son sintetizados como mecanismos de protección contra patógenos, contra el estrés ambiental y para atraer a los agentes polinizadores.

Los metabolitos en las plantas que cumplen funciones antioxidantes son los tocoferoles, los carotenoides (Smirnoff, 2005), y los compuestos fenólicos (Honglian et al., 2001). En el polen se acumulan y sintetizan ácidos fenólicos y flavonoides.

- **Compuestos fenólicos**

Son metabolitos ampliamente distribuidos en las plantas poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo; tienen diferentes funciones, como dar color, influir en la calidad organoléptica y como mecanismo de defensa en las plantas (Blasa et al., 2010; Cavalcanti et al., 2013). Estos compuestos se metabolizan a partir de fenilpropanoides y la síntesis es inducida en las plantas por diferentes factores ambientales de estrés como la luz intensa, los rayos UV, las bajas temperaturas, las

infecciones y el ozono (Grace, 2005). Pueden ser divididos en diferentes grupos dependiendo de su estructura química que básicamente incluye ácidos fenólicos (fenoles simples) y polifenoles (fenoles complejos) dependiendo el número de subunidades fenólicas unidas (Cavalcanti et al., 2013).

Los ácidos fenólicos son los compuestos fenólicos más simples, con un solo anillo aromático; se dividen en dos grupos principales derivados de ácido dihidroxibenzoico y de ácido dihidroxicinámico (Calvanti et al., 2013; Blasa et al., 2010).

Los polifenoles poseen dos o más subunidades fenólicas incluyendo intermediarios (flavonoides) o compuestos de alto peso molecular (taninos hidrolizados o condensados, estilbenos y lignanos).

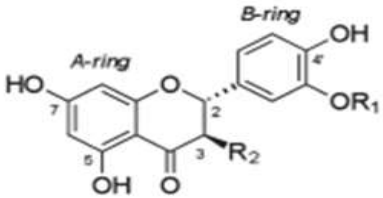
Los flavonoides están formados por dos anillos aromáticos A y B unidos a través de un anillo C de pirano heterocíclico (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002). Basado en la estructura del anillo C, así como en sus estados de oxidación y grupos funcionales, los flavonoides son clasificados como flavanos, flavonoles, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianinas e isoflavonas (ver Figura 1-2).

- **Propiedades de los compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes porque donan electrones de sus grupos hidroxilo para estabilizar los radicales libres y formar radicales fenoxilo que son menos reactivos, eliminan ROS y atrapan iones metálicos (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997; Bors, Michel, & Saran, 1994). Los compuestos fenólicos son ampliamente estudiados debido a que tienen mayor capacidad antioxidante en comparación con otros antioxidantes naturales, dan protección biológica al ADN y lípidos contra los daños causados por los ROS, retardan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y se han asociado con la disminución de enfermedades crónicas generadas por estrés oxidativo (Grace, Logan, & Adams, 1998; Fukumoto & Mazza, 2000; Laranjinha, Almeida, & Madeira, 1994; Castelluccio et al., 1995; Nardini et al., 1995; Salah et al., 1995; Moon & Terao, 1998; Cavalcanti et al., 2013; Blasa et al., 2010).

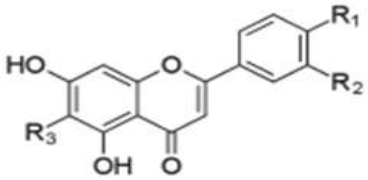
Figura 1-2: Estructura química de los flavonoides

Flavanonas



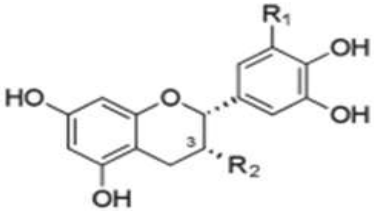
Naringina: R_1= H; R_2= H
Erodictyol: R_1= OH; R_2= H
Taxifolina: R_1= OH; R_2= OH
Hesperidina:R_1= OCH_3; R_2= OH

Flavonas



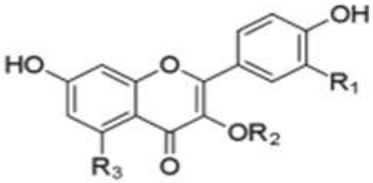
Crisina: R_1= H; R_2= H; R_3=H
Apigenina: R_1= OH; R_2= H; R_3=H
Luteolina: R_1= OH; R_2= OH; R_3=H
Baicaleína:R_1= H; R_2= H; R_3=OH

Flavan-3 ols



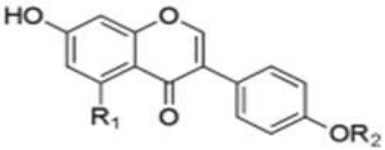
Epicatequina: R_1= H; R_2= OH
EGC: R_1= OH; R_2= OH
ECG: R_1= H; R_2= galato
EGCG:R_1= OH; R_2= galato

Flavon-3-ols



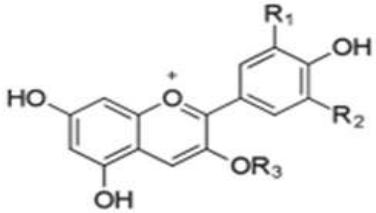
Kaempferol: R_1= H; R_2= H; R_3=OH
Fisetina: R_1= OH; R_2= H; R_3=H
Quercetina: R_1= OH; R_2= H; R_3=OH
Rutina:R_1= OH; R_2= rutinosa; R_3=OH

Isoflavonas



Daidzeina: R_1= H; R_2= H;
Genisteína: R_1= OH; R_2= H
Formononetina: R_1= H; R_2= CH_3
Biochanina:R_1= OH; R_2= CH_3

Antocianinas



Pelargonidina: R_1= H; R_2= H; R_3=H
Cianidina: R_1= OH; R_2= H; R_3=H
Delfinidina: R_1= OH; R_2= H; R_3=H
Malvidina:R_1= OCH_3; R_2= OCH_3; R_3=H

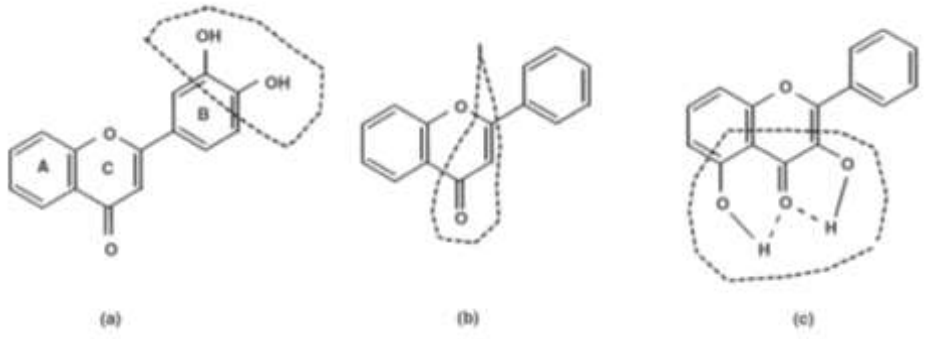
Fuente: Huvaere & Skibsted, 2015

La actividad antioxidante de los flavonoides depende de algunos factores, si los flavonoides tienen las siguientes características en su estructura, poseen alta actividad antioxidante (Honglian et al., 2001; Aluko, 2012) (ver Figura 1-3):

- Un grupo catecol en el anillo B
- Una función 4-*oxo* (C=O) en conjugación y un doble enlace en la posición 2,3 del anillo C
- Presencia de grupos OH en las posiciones 3 y 5

Por esta razón la quercetina es uno de los flavonoides con mayor actividad antioxidante. Entre otros factores, los flavonoides unidos a un azúcar tienen muy baja actividad antioxidante, las agliconas son las que poseen actividad antioxidante. También al encontrarse en conjunto con otros polifenoles se crea una sinergia, por ejemplo, el consumo de un jugo con mezclas de diferentes bayas tiene una actividad antioxidante 400% y 700% más alta que las antocianinas y la catequina respectivamente (Aluko, 2012).

Figura 1-3: Características estructurales en relación con el potencial antioxidante



Fuente: Honglian et al., 2001

- **Métodos de medición de capacidad antioxidante *in vitro***

Numerosos métodos de evaluación de actividad antioxidante se han creado debido a la variedad de compuestos de diferente naturaleza con esta propiedad. Algunos métodos comunes para la medición del potencial antioxidante de los flavonoides se mencionan a continuación: TEAC, actividad antioxidante equivalente en Trolox (antioxidante análogo a

la Vitamina E) es un método que monitorea la disminución de la absorbancia generada por la reacción del radical ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenztiazolina-6-sulfonico) con un antioxidante; el método ORAC utiliza diferentes generadores de radicales libres (superoxidos, hidroxilos, entre otros) y mide la caída de fluorescencia de la fluoreceína y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) otro radical sintetizado que se usa para evaluar la capacidad antioxidante, mediante la disminución de la absorbancia a 515 nm que ocurre por la acción de un antioxidante sobre el radical (Honglian et al., 2001; Schaich, Tian, & Xie, 2015).

Diferentes estudios han comparado los datos obtenidos entre los métodos de análisis de capacidad antioxidante, algunas veces se ha encontrado una correlación significativa y otras veces no (Prior, Wu, & Schaich, 2005). La capacidad antioxidante de un compuesto específico puede presentar resultados diferentes en cada método de medición, en dos estudios independientes, utilizando el método ORAC, se encontró que la miricetina era mas potente que la quercetina (Cao, Sofic, & Prior, 1997), pero mediante TEAC el resultado fue contrario (Rice- Evans et al., 1997) citado por : Honglian et al., (2001).

Los diferentes métodos de capacidad antioxidante han sido ampliamente revisados y análizados, encontrando ventajas y desventajas; el método TEAC básicamente es una medida estequiométrica que evalúa el periodo de inhibición de la oxidación, pero no el grado de actividad antioxidante. Adicionalmente en este método hay factores que influyen en la reacción, por ejemplo, algunos estudios revelan que los anillos -OH de los fenoles bloquean el radical ABTS+. Igualmente el método DPPH presenta limitaciones, puede ser rápido con algunos fenoles pero con otros compuestos puede ser demasiado lento y no estabilizarse por horas. El método ORAC presenta ventajas con respecto a los metodos anteriores ya que además de medir el periodo de inhibición de la oxidación, mide el grado de actividad antioxidante y se usan radicales más comunes en alimentos (Honglian et al., 2001; Schaich et al., 2015).

La velocidad de reacción y la cinética del patrón en estas metodologías, no deben ser ignoradas. Además, la efectividad de los antioxidantes en un alimento debe ser evaluada con otros métodos ya que dependen de muchos factores como la solubilidad y la polaridad (Honglian et al., 2001). Otro aspecto importante es que los datos de actividad *in vitro* no deben ser extrapolados a la actividad *in vivo,* ya que los tiempos de vida de los

radicales *in vivo* son diferentes a los *in vitro* y los antioxidantes interactúan con otros compuestos (Schaich et al., 2015).

Otros métodos comunes en la evaluación de capacidad antioxidante son los que se basan en el monitoreo de productos de oxidación en aceites, bajo condiciones controladas. Por ejemplo los hidroperóxidos y el malonaldehido. La formación de hidroperóxidos a partir de ácidos grasos poliinsaturados, produce estructuras de dienos conjugados que pueden ser monitoreados a 234 nm, el malonaldehido puede cuantificarse mediante la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) que absorbe de 532-535 nm (Young, Tsao, & Mine, 2011).

1.5.2 Compuestos fenólicos en el polen

Los compuestos fenólicos son los principales antioxidantes y pigmentos del polen. La variación en el contenido de compuestos fenólicos se debe al origen geográfico, botánico, la exposición a la luz ultravioleta y los tratamientos de secado (Campos, Markham, Mitchell, & da Cunha, 1997; Chantarudee et al., 2012) además los perfiles de flavonoides en el polen son considerados marcadores taxonómicos de las diferentes especies de plantas (Almaraz-Abarca et al., 2008). En la Tabla 1-5 se muestran reportes de cuantificación de fenoles totales, flavonoides, y actividad antioxidante para polen proveniente de diferentes países.

La mayoría compuestos fenólicos se presentan como flavonoles glicosilados, derivados de ácido hidroxicinámico, flavonoides esterificados, formas libres o en combinación con otros compuestos del polen, antocianinas, chalconas y dihidroflavonoides (Campos et al., 1997.; Wiermann & Vieth, 1983; Negri et al., 2011; Almaraz-Abarca et al., 2007).

Tabla 1-5: Fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante por DPPH y ABTS del polen apícola de diferentes orígenes.

País	Contenido de Fenoles totales (mg GAE/g polen)	Contenido de Flavonoides Totales (mg de Quercetina Equiv. /g polen)	Capacidad Antioxidante DPPH EC_{50}* (µg de polen / mL)	Capacidad antioxidante TEAC (mmol Trolox/g
Portugal y Nueva Zelanda [1]	1.0 - 32.5	1.1 - 24	8 - 500	
Estados Unidos [2]	15.9 - 34.8	2.6 - 5.4	20 - 150	
Polonia [3]	3.0 - 23.0	1.7 - 13.4		
Rumania [4]	4.4 - 15.2	0.6 - 13.6		0.5 - 6.8
Portugal [5]	12.9 - 19.8		2000 - 4300	
Portugal [6]	10.5 - 16.8		2.2 - 5.9	
Brasil [7]	19.2 - 48.9	2.1 - 28.3	810 - 4690	
España [8]	18.5 - 32.1		2980 - 6690	
Colombia [9]	18.1			0.1
Colombia [10]		4.4 - 7.5		0.053 – 0.082
Colombia [11]	13.8	4.3		0.1

[1] Campos, Webby, Markham, Mitchell, & Da Cunha, 2003; [2]LeBlanc et al., 2009; [3]Leja et al., 2007; [4]Mărghitaş et al., 2009; [5]Feás et al., 2012; [6]Morais, Moreira, Feás, & Estevinho, 2011; [7]Carpes et al., 2009; [8]Pascoal et al., 2014; [9]Salazar, Céspedes, & Díaz, 2013; [10]Zuluaga et al., 2014; [11]Castro et al., 2014.

En diferentes estudios de polen proveniente de Brasil, España, Portugal y África se han encontrado principalmente flavonoles glicosilados derivados de Kaempferol, quercetina, isoharmetina, cianidina y derivados de ácido hidroxicinámico (Negri et al., 2011; Domínguez-Valhondo et al., 2011). En otro estudio de polen seco e hidrolizado encontraron pequeñas cantidades de crisina, y se detectaron pinocembrina, kaempferol y ácido cafeico (Šarić et al., 2009) y también se estudió el perfil fenólico de 45 muestras de diferentes zonas de México y encontraron 16 derivados de kaempferol, 7 derivados de quercetina, 3 derivados de herbacetina, 11 derivados de ácidos fenólicos y algunos compuestos fenólicos y flavonoides que no se identificaron (Almaraz-Abarca et al., 2008). Aunque se encontró variabilidad, se identificaron perfiles fenólicos similares en polen proveniente de cada especie de planta. En la Tabla 1-6 se muestran los compuestos fenólicos identificados por varios autores.

Tabla 1-6: Principales compuestos bioactivos encontrados en el polen apícola.

Compuesto	Cantidad
Ácidos fenólicos totales (mg A. cafeíco Equiv. /g de polen)[1]	0.02-7.91
Flavanonas totales (mg Naringina Equiv. /g de polen) [2]	19.94-27.48
Ácido ferúlico (mg/g) [3]	0.149
Ácido cinámico (mg/g) [3]	0.023
Hesperidina (mg/g) [3]	0.003
Pinocembrina (µmol/g)[4]	1.418
Crisina (µmol/g)[4]	0.786 - 1.351
Galangina (µmol/g)[4]	0.859
Naringina (mg/g) [2, 3]	0.0013 - 20.86
Quercetina (mg/g) [3, 4, 5]	0.0363-0.10
Kaempferol (mg/g) [3, 4, 5]	0.0071-0.45
Ácido cumárico(mg/g) [3, 5]	0.0067-0.1247
Isorhamentina (mg/g) [3, 5]	0.0064 - 2.12
Rutina(mg/g) [5]	0.2116-0.4445
Miricetina (mg/g) [5]	0.0087 - 0.1364

[1] Campos et al., 2003; [2] LeBlanc et al., 2009; [3] Fanali, Dugo, & Rocco, 2013;[4] Šarić et al., 2009; [5] Serra Bonvehí, Soliva Torrentó, & Centelles Lorente, 2001; [6] Serra Bonvehí et al., 2001.

1.5.3 Otros compuestos bioactivos

El polen apícola contiene esteroles de 0.1 a 0.4 %, con propiedades biológicas como el β-estradiol, β-sitosterol, estigmasterol y fucosterol (Stanley & Linskens, 1974), citado por: (Bogdanov, 2011) y se han identificado carotenoides como la luteína, zeaxantina y β-caroteno (Domínguez-Valhondo et al., 2011).

1.6 Polen apícola como suplemento nutricional

El polen apícola ha sido utilizado desde la antigüedad como suplemento dietario debido al conocimiento de sus propiedades medicinales. Algunos autores sugieren que se deben consumir 15 g al día para suplementar la dieta (Campos et al., 2008; Almeida-Muradian et al., 2005). En países como Brasil, Bulgaria, Polonia y Suiza el polen es considerado un alimento y tienen normas que regulan su producción.

Debido a que la exina se considera la principal barrera para acceder a los nutrientes del polen (Nicolson, 2011; Bogdanov, 2011), algunos autores han estudiado formas de romper las capas resistentes del polen apícola por medio de mecanismos como la extracción supercrítica con CO_2 (Xu et al., 2011); el ultrasonido (Liu, Zhang, Zhou, Shan, & Chen, 2015); la hidrolisis enzimática (Gao, Zhang, & Dong, 2011; Ren, Zhang, Dong, Li, & Zhao, 2009); ultrasonido con hidrolisis enzimática (Dong, Gao, Wang, Xu, & Zhang, 2015) y fermentaciones (Vamanu, Vamanu, Drugulescu, Popa, & Câmpeanu, 2006; Fuenmayor, 2009; Salazar, 2014). Con los métodos enzimáticos no se logra romper totalmente la exina porque ésta es resistente a la hidrólisis, pero en un estudio realizaron un tratamiento de 6 horas con enzimas proteolíticas y ultrasonido y se rompieron totalmente las capas intina y exina (Dong et al., 2015).

2 Evaluación de las condiciones de microencapsulación mediante secado por aspersión de extractos etanólicos de polen apícola

2.1 Introducción

En busca de la conservación de compuestos fenólicos, la microencapsulación mediante secado por aspersión es una tecnología ampliamente estudiada (Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, 2011; da Silva et al., 2013; Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2011).

La microencapsulación es una tecnología utilizada para proteger compuestos bioactivos entre otros y lograr que no se degraden antes de cumplir su función en el organismo humano (Betoret, Betoret, Vidal, & Fito, 2011; Fang & Bhandari, 2010). Para lograr la microencapsulación se requieren agentes encapsulantes como proteínas, carbohidratos, lípidos o ceras (Smith & Charter, 2011).

El proceso de secado por aspersión consiste en alimentar una mezcla de los compuestos objetivo con el material de pared a una cámara de secado con un flujo de aire u otro gas caliente donde la mezcla se convierte en pequeñas gotas y se seca rápidamente formando capsulas microscópicas (Brennan & Grandison, 2012; Fang & Bhandari, 2010).

En el presente trabajo no se encontraron reportes de microencapsulación de compuestos fenólicos de polen apícola mediante secado por aspersión y es una alternativa novedosa para generar valor en este producto. Esta tesis estudió diferentes condiciones de secado por aspersión (temperatura de entrada y contenido de material encapsulante), utilizando

maltodextrina como material de pared y evaluó los compuestos fenólicos microencapsulados mediante la medición del contenido de fenoles totales (método Folin Ciocalteu) y la actividad antioxidante (TEAC con el radical ABTS y FRAP). También se estudiaron algunas características fisicoquímicas de los microencapsulados.

2.2 Microencapsulación mediante secado por aspersión

La microencapsulación es una tecnología utilizada para envolver a pequeñas partículas sólidas, gotas o gases en materiales poliméricos y lograr que su liberación sea dada en unas condiciones específicas (Betoret et al., 2011; Fang & Bhandari, 2010). Los materiales que se utilizan son llamados materiales de pared y pueden ser proteínas, carbohidratos, lípidos o ceras (Smith & Charter, 2011). El proceso de microencapsulación se utiliza para proteger vitaminas y minerales, ácidos grasos funcionales y antioxidantes o para mejorar su disposición biológica (Smith & Charter, 2011; Fang & Bhandari, 2010).

Algunos procesos de microencapsulación son la extrusión, coacervación, emulsificación, secado por aspersión y liofilización (Ubbink & Krüger, 2006). El secado por aspersión es uno de los procesos más utilizados a nivel industrial por su economía, operación en continuo y eficiencia (Brennan & Grandison, 2012; Fang & Bhandari, 2010). El proceso de secado por aspersión (*Spray Dry*) consiste en mezclar el material de pared previamente hidratado con el compuesto objetivo, homogenizarlo y alimentarlo a una cámara de secado en donde un flujo de aire u otro gas caliente dispersa la solución alimentada en pequeñas gotas (10 a 200 micras) aumentando el área superficial y permitiendo que se liberé rápidamente la humedad (1 a 20 s), lo que permite obtener a través de un ciclón el producto seco encapsulado con tamaños alrededor de 10 a 100 µm. En la figura 2-1 se puede observar el secador por aspersión utilizado en este estudio.

El secado por aspersión no afecta los compuestos termolábiles ya que el tiempo de contacto con el aire caliente es mínimo, sin embargo, la eficiencia de encapsulación depende de muchos factores como la temperatura de entrada, la velocidad de alimentación, la composición de la mezcla de alimentación, las características

fisicoquímicas de la mezcla a secar, entre otros. En la Tabla 2-1 se presenta la influencia de los parámetros del equipo en la eficiencia del proceso.

Figura 2-1: Esquema de un *Secador por aspersión,* modelo *mini spray dryer BUCHI B-290*

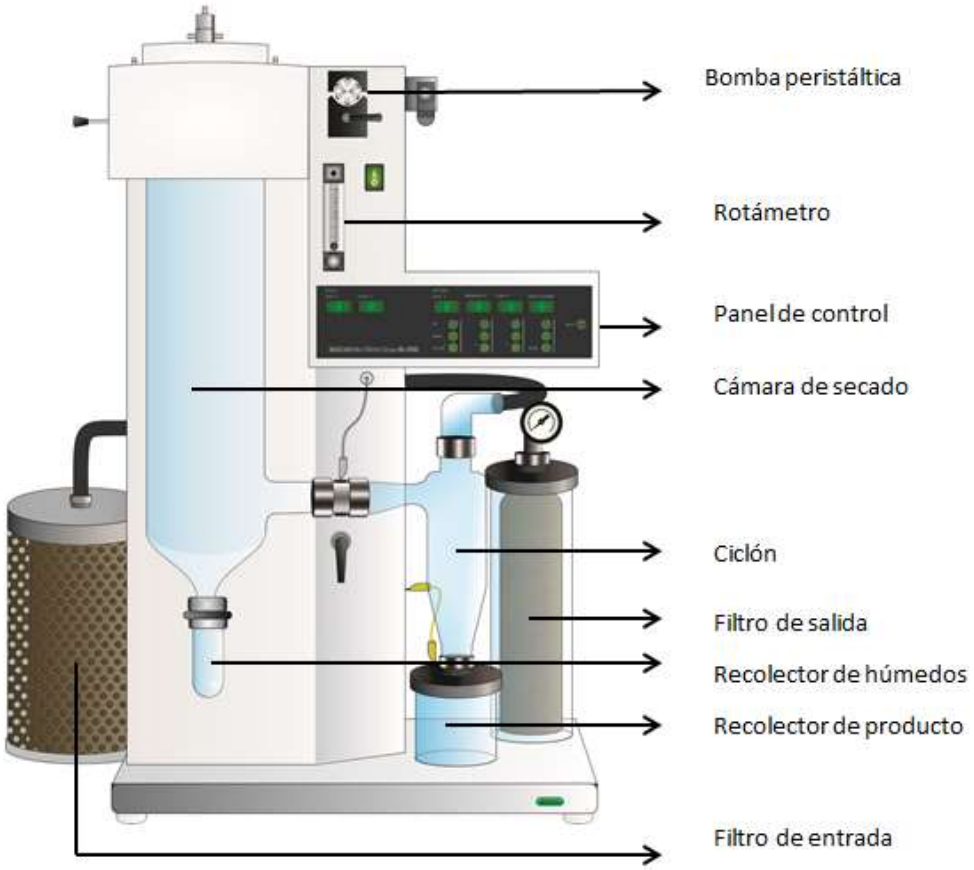


Tabla 2-1: Influencia de los parámetros del *Secador* en la temperatura de salida, rendimiento y humedad del producto.

	Parámetros			
Variable dependiente	**Humedad alta en aire de entrada**	**Velocidad de alimentación alta**	**Aspiración alta (caudal de aire alto)**	**Temperatura de entrada alta**
Temperatura de salida	Mayor debido a la alta energía de la humedad almacenada	Disminuye debido a que se debe evaporar mas solución	Mayor debido a menos pérdidas de calor	Alta, directamente proporcional

Tabla 2-1: (Continuación)

Variable dependiente	Humedad alta en aire de entrada	Velocidad de alimentación alta	Aspiración alta (caudal de aire alto)	Temperatura de entrada alta
Rendimiento en peso	Bajo, puede dejar el producto húmedo	Bajo, disminución del tiempo de contacto de la solución con el aire caliente	Alto, mejor separación en el ciclón	Eventualmente previene que el producto quede pegajoso
Humedad del microencapsulado	Alta	Alta, más humedad debe ser retirada en menor tiempo	Alta, alta humedad del aire	Baja, baja humedad del aire

Fuente: Manual BÜCHI Labortechnik AG 093004 es

Se han realizado numerosos estudios sobre la microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos fenólicos, en donde se han evaluado diferentes factores del proceso (Ver Tabla 2-2). Se ha reportado que a mayor temperatura de secado mayor rendimiento, sin embargo, a una temperatura de 180°C pueden degradarse ácidos fenólicos como el ácido rosmarínico y el eupatorin debido a que tienen mayor cantidad de grupos hidroxilo (Pang, Yusoff, & Gimbun, 2014); también se ha encontrado disminución de los compuestos fenólicos medidos por Folin Ciocalteu con el incremento de la temperatura (Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2011). Otros autores no han encontrado diferencias significativas en el contenido de fenoles totales medido por Folin Ciocalteu y por UPLC (cromatografía líquida ultrarápida) al incrementar las temperaturas de secado de 130 a 190°C (Çam, İçyer, & Erdoğan, 2014).

El incremento de maltodextrina disminuye la concentración de compuestos fenólicos en la superficie de las microcápsulas, aumentando así la eficiencia de encapsulación y dando mayor estabilidad de los compuestos fenólicos en el tiempo (Çam et al., 2014; Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2011; Vidović, Vladić, Vaštag, Zeković, & Popović, 2014; Saikia, Mahnot, & Mahanta, 2015). Además de maltodextrina se ha utilizado inulina y pectina para encapsular polifenoles con resultados aceptables principalmente de la pectina (Bakowska-Barczak, & Kolodziejczyk, 2011; Sansone et al., 2011).

Tabla 2-2: Condiciones de microencapsulación de extractos de compuestos fenólicos mediante secado por aspersión

Tipo de extracto	Encapsulante	°T entrada (°C)	Referencia
Extractos de *Orthosiphon stamineus*	Proteína aislada de suero y maltodextrina	180	Pang et al., 2014
Extracto piel de granada en agua	Maltodextrina	130 a 190	Çam et al., 2014
Extractos en agua de bioactivos	Fibra de caña de azúcar	70-150	Premarajah & Langrish, 2009
Extractos de semillas de uva	Maltodextrina, goma mesquite, zein	130	Davidov-Pardo, Arozarena, & Marín-Arroyo, 2013
Extracto etanólico de *S. montana*	Maltodextrina	135-140	Vidović et al., 2014
Extracto de subproducto de vino	Aerosil-200–maltodextrina	128	Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2011
Extracto de propóleos	Goma arábiga y almidón OSA	120	Da Silva et al., 2013
Extracto de propóleos	Solución gelatina	140-160	Bruschi, Cardoso, Lucchesi, & Gremião, 2003
Extracto de higos	Maltodextrina e inulina	120-160	Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009

2.3 Materiales y métodos

Se obtuvieron extractos de polen mediante extracción asistida por ultrasonido, posteriormente los extractos fueron sometidos a secado por aspersión a diferentes condiciones de temperatura de secado y contenido de maltodextrina como material de pared. Finalmente el proceso fue evaluado mediante el análisis de rendimiento, contenido de fenoles totales (CFT), recuperación de fenoles, y características fisicoquímicas de los polvos (humedad, actividad de agua, morfología, tamaño de partícula, densidad aparente, solubilidad, color y actividad antioxidante).

2.3.1 Polen apícola

El polen apícola fue obtenido seco del apiario “Los cerezos” en Julio de 2014 en el municipio de Viracachá, departamento de Boyacá ubicado en la zona del Altiplano Cundiboyacense. Este polen es polifloral de acuerdo a estudios anteriores (Nates-Parra et al., 2010).

La caracterización fisicoquímica se obtuvo del estudio de Durán, (2014) realizado a polen del mismo origen, el contenido de humedad fue analizado mediante el método gravimétrico de secado a 70°C, método referencia AOAC 925.10 (AOAC, 2000) y la actividad antioxidante de acuerdo a los métodos que se describen a continuación:

- **Actividad antioxidante – TEAC**

El radical catiónico ABTS•+ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (Sigma Aldrich) con persulfato de potasio (Re et al., 1999). En la evaluación se utilizan 10 µL de extracto y 1 mL de la solución de ABTS•+. A los 6 min de reacción en oscuridad, se lee el cambio en la absorbancia respecto a la solución sin reaccionar a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro UV visible. La cuantificación se obtiene mediante una curva de calibración usando como antioxidante Trolox. Los resultados se expresan como mmol Trolox/g polen.

- **Actividad antioxidante - FRAP (poder antioxidante reductor de hierro)**

La metodología se realiza mediante el principio de reducción del complejo férrico-2, 4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Sigma Aldrich) incoloro al complejo ferroso coloreado (Benzie & Strain., 1999). Para la medición se toman 20 µL del extracto, 450 µL de reactivo de FRAP y 735 µL de agua destilada, a los 30 minutos de reacción en oscuridad se realiza la medida en un espectrofotómetro UV visible, a 593 nm. Los resultados se obtienen mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante Trolox. Los resultados son expresados en mmol Trolox/g polen.

- **Contenido de Fenoles totales**

Los compuestos fenólicos reducen el complejo fosfowolframato-fosfomolibdato del reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac), en sales de molibdeno de color azul, cuantificables por espectrofotometría (Slinkard & Singleton, 1977). En la evaluación se utilizan 500 µL del extracto se mezclan con 22 mL de agua destilada, 2 mL de carbonato de sodio al 10%, después de un reposo de 2 minutos, se adicionan 500 µL del reactivo de Folin Ciocalteu, a las 2 horas de reacción en oscuridad, se realiza la lectura a 765 nm en un espectrofotómetro UV visible, utilizando como blanco agua destilada. La cuantificación se obtiene mediante una curva de calibración con ácido gálico, se utilizó un

espectrofotómetro UV Visible Thermo Scientific Genesys 10S (USA). Los resultados son expresados como mg de GAE/g de mezcla en base seca.

En la Tabla 2-3 se describen los resultados de la caracterización fisicoquímica y la actividad antioxidante del polen utilizado.

Tabla 2-3: Composición polen apícola seco proveniente de Viracachá, Boyacá

Componente	Unidad	valor
Humedad	%	3.68
Proteína	%	22.65
Fibra cruda	%	4.63
Grasa	%	11.51
Cenizas	%	2.90
Carbohidratos	%	48.03
Fenoles totales	mg de GAE/g	33.04
TEAC	mmoles trolox/g	0.098
FRAP	mmoles trolox/g	0.093

Valores en base seca, valores de actividad antioxidante se presenta como el promedio de 3 medidas.

Fuente: Durán, 2014

2.3.2 Preparación del extracto

Se realizaron 30 extracciones independientes de 1 g de polen apícola cada una utilizando ultrasonido de acuerdo al método validado en el laboratorio; 1 g de polen con 10 mL de etanol grado alimenticio como solvente obtenido de la Empresa de Licores de Cundinamarca, se sometió a ultrasonido por 15 min con un baño de ultrasonido LC 30H ELMA de 35 kHz de frecuencia y 250 vatios (W) (Alemania) y centrifugó, el sobrenadante fue filtrado en papel filtro Whatman de 8 a 10 micrómetros de poro. Esta operación se realizó 3 veces sobre el sólido, y en el último lavado se agitó en vortex por 1 min y se filtró.

Los extractos por gramo de polen fueron mezclados, filtrados y almacenados en frascos ámbar de 700 mL, posteriormente la mezcla se concentró hasta aproximadamente un volumen de 100 mL utilizando un rotavaporador IKA HB 05.06 CN a 50ºC y se llevó a un volumen de 200 mL con agua destilada para aumentar la solubilidad de la maltodextrina

(48% de etanol) a 40ºC. Las unidades experimentales fueron de 60 mL de extracto, por lo tanto, fue necesario preparar 9 extractos de 30 g de polen / 200 mL de etanol al 48%.

2.3.3 Rendimiento de los extractos

Basada en la metodología de determinación de rendimiento de extracción en el estudio de Li, Skouroumounis, Elsey, & Taylor, (2011) con algunas modificaciones; en una cápsula se pesaron 3 mL de cada extracto hidroetanólico homogenizado en un Ultra-turrax® T 18 IKA y se secaron a 70ºC por 24 horas, con el peso seco del extracto se determinó el contenido de solidos solubles y el rendimiento de las extracciones de acuerdo a la ecuación **Ecuación 1**:

$$\mathbf{Rendimiento} = \frac{\mathbf{Es\ x\ V}}{\mathbf{P}}\ \mathbf{x\ 100} \quad \text{Ecuación 1}$$

Es= fracción de solidos solubles en el Extracto

P=peso inicial del polen (g)

V= volumen del extracto (mL)

2.3.4 Características fisicoquímicas de los extractos

- **ºBrix:** se determinaron mediante un refractómetro Abbe Atago 8682 (Japón) de acuerdo a la metodología referencia AOAC 932.12 (AOAC, 2000).
- **pH:** método potenciométrico AOAC 981.12, (AOAC, 2000).

2.3.5 Secado por aspersión

- **Preparación de las mezclas de alimentación**

Los extractos de 30 g de polen / 200 mL de etanol al 48% se mezclaron con maltodextrina y agua destilada en dos proporciones (1:1:1, 1:0.5:0.5 extracto: maltodextrina: agua destilada p/p/p) utilizando un Ultra-turrax y manteniendo una temperatura de 40ºC. Como control se preparó una solución sin extracto de polen

apícola. Para asegurar homogeneidad en la composición de las mezclas de alimentación en cada lote se midieron los sólidos solubles con un refractómetro.

- **Microencapsulación mediante secado por aspersión**

Las soluciones de extracto-maltodextrina-agua se sometieron a secado utilizando un *mini spray dryer* BUCHI B 290 (Suiza). La velocidad de alimentación, el porcentaje de aspiración y el flujo de aire se establecieron de acuerdo a la literatura (Fang & Bhandari, 2011) (ver Tabla 2-4), con variaciones en la temperatura de entrada (130, 160 y 190ºC).

Tabla 2-4: Condiciones de operación del secador por aspersión

Parámetros	
Flujo de aire	30 mm altura , 357 L/h
Bomba peristáltica	10%, aproximadamente 3.5 mL/min
Velocidad de aspiración	80%, 32.5 m^3/h

2.3.6 Rendimiento y recuperación de fenoles en el proceso de secado por aspersión

Rendimiento de secado: Fue calculado mediante la Ecuación 3

$$\textbf{Rendimiento secado} = \frac{\mathbf{M \times Ms}}{(\mathbf{E \times Es}) + \mathbf{MD}} \times 100 \quad \textbf{Ecuación 2}$$

M= microencapsulado obtenido (g)

Ms=fracción de materia seca del microencapsulado

E= extracto (g)

Es= fracción de extracto seco

MD= maltodextrina (g)

- **Cuantificación de fenoles totales en la mezcla de alimentación**

Se tomó una alícuota de 2.0 mL y se llevó a 10 mL con agua destilada y se siguió la metodología del método de Folin Ciocalteu descrita en el numeral 2.3.1.

- **Cuantificación de fenoles totales de las microcápsulas**

100 mg de las microcápsulas relación 1:1 extracto: maltodextrina p/p y 50 mg de las microcápsulas relación 1:0.5 extracto: maltodextrina p/p fueron utilizados para la medición de fenoles totales siguiendo la metodología de Folin Ciocalteau mencionada en el numeral 2.3.1. Los resultados son expresados como mg de GAE/g de microencapsulado en base seca.

- **Porcentaje de recuperación (R)**:

Fue calculado de acuerdo a la ecuación 3:

$$\textbf{Recuperación} = \frac{\textbf{CFT m}}{\textbf{CFT mezcla}} \textbf{ x 100}$$ **Ecuación 3**

CFTm= es el contenido de fenoles totales del microencapsulado (mg/g)

CFTmezcla= es el contenido de fenoles totales de la mezcla inicial en base seca antes del secado (mg/g)

2.3.7 Propiedades físicas y sensoriales de los microencapsulados

- **Humedad:**

Se determinó con una balanza de humedad OHAUS modelo MB 200.

- **Actividad de agua (a_w):**

Se determinó a temperatura ambiente con un medidor de la actividad de agua (GBX. FAst-Lab®, Francia), calibrado previamente con soluciones salinas de a_w conocida.

- **Isotermas de sorción de humedad:**

Se realizaron mediciones en simultaneo de a_w y humedad a microencapsulados obtenidos a diferentes temperaturas de secado, tiempos de almacenamiento y con

adición de agua para construir una curva de humedad versus a_w en un rango de 3 a 14% de humedad.

- **Morfología:**

La morfología de las microcápsulas se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido para ver la estructura de las microcápsulas y evaluar el tamaño de partícula. La muestra se montó en un *Stup* de aluminio en cinta de carbono, se recubrió con oro y se utilizó un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 a modo vacío, 30.0 Kv y con electrones secundarios en el laboratorio de microscopía electrónica de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

- **Tamaño de cápsulas:**

Se realizó un conteo de 100 cápsulas en las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido a 800x mediante cuadrantes y se clasificaron en rangos de 1 a 51 µm utilizando una escala de 200 µm.

- **Medición de la densidad aparente:**

Se pesaron 3 gramos aproximadamente del polvo y se midieron en una probeta de 100 mL, la densidad aparente es igual a la masa sobre el volumen (Goula & Adamopoulos, 2005).

- **Medición de solubilidad:**

De acuerdo a la metodología de Vidović et al., (2014); se pesaron 2.5 g aproximadamente del microencapsulado, la muestra se diluyó en 30 mL de agua destilada utilizando un vortex, después de completa disolución se llevó a un baño maría a 30ºC durante media hora, se centrifugó y el sobrenadante fue secado a 70ºC durante una noche. De acuerdo a la diferencia de pesos se calculó el porcentaje de solubilidad aplicando la ecuación 4:

$$\mathbf{Solubilidad} = \frac{\boldsymbol{Wseco}}{\mathbf{Wm}} \mathbf{x\ 100} \quad \textbf{Ecuación 4}$$

W seco=peso seco del microencapsulado diluído en agua (g)

Wm= peso inicial del microencapsulado (g)

- **Medición instrumental de color:**

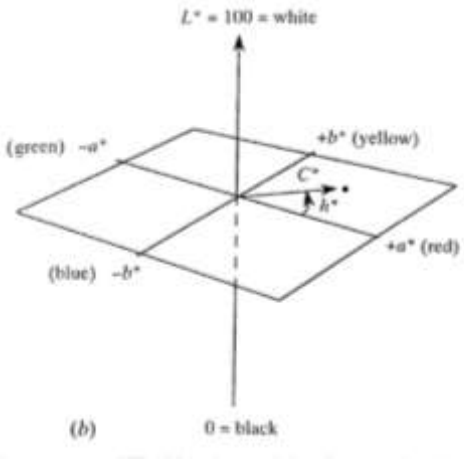
El color fue medido mediante un colorímetro Color Quest XE marca HunterLab (Virgina, U.S) mediante el Software Easy Match QC ver. 4.6 iluminante D65 ángulo 10 escala CIE L*a*b*, que emplea las coordenadas L* con valores entre 0 y 100, (negro – blanco), a* con valores <0 y >0 (verde – rojo), b* con valores <0 y >0 (azul – amarillo).

Con los parámetros L*a*b*, se determina el tono (h*) que define la intensidad, h*=hº donde 0º es rojo-morado, 90º amarillo, 180º verde-azulado, 270º azul y se calcula mediante las siguientes ecuaciones: Si a* y b* son >0, $h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$, si a*<0, $h^* = 180º + \tan^{-1}(b^*/a^*)$, si a*>0 y b*<0, $h^* = 360º + \tan^{-1}(b^*/a^*)$.

El croma que define la saturación de 0 a 100, se determina mediante la ecuación $C^* = (a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$ y la diferencia de color mediante la ecuación ($\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{½}$) que mide la diferencia en comparación a un blanco o un patrón (MacDougall, 2002).

En la Figura 2-2 se muestra la representación del espacio CIE L*a*b*.

Figura 2-2: Representación del espacio CIE-L* a* b*



Fuente: MacDougall, 2002

2.3.8 Actividad Antioxidante (AAO) de los microencapsulados

Se realizaron extractos en etanol; se pesaron 300 mg del microencapsulado y se diluyeron en 3 mL de agua hasta total solubilización, posteriormente se llevaron a 10 mL

con etanol industrial al 96%, se filtraron en papel Whatman de 8 a 10 micrómetros de poro y se siguieron los métodos TEAC y FRAP descitos en el numeral 2.3.1.

2.3.9 Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos en el proceso de microencapsulación (Fenoles totales, actividad antioxidante TEAC y FRAP, porcentaje de recuperación, rendimiento, densidad aparente, solubilidad, actividad acuosa y humedad) se analizaron utilizando un ANCOVA y un diseño factorial completamente al azar, cada tratamiento se realizó por triplicado y las mediciones se realizaron por triplicado (Tabla 2-5).

Tabla 2-5: Diseño experimental para la evaluación de la microencapsulación de extractos etanólicos de polen apícola.

Tratamiento	Temperatura(°C)	Extracto/ Maltodextrina (E/MD)	Recuperación %	Rendimiento %	Fenoles totales (mg GAE/g)	Capacidad antioxidante
1	190	1:0.5	y1	Z1	F1	A1
2	190	1:1	y2	Z2	F2	A2
3	160	1:0.5	y3	Z3	F3	A3
4	160	1:1	y4	Z4	F4	A4
5	130	1:0.5	y5	Z5	F5	A5
6	130	1:1	y6	Z6	F6	A6

Las covariables para rendimiento, humedad y actividad acuosa fueron la temperatura ambiente y la humedad relativa durante el secado. Para Fenoles totales, TEAC, FRAP y porcentaje de recuperación, fueron la concentración inicial del extracto.

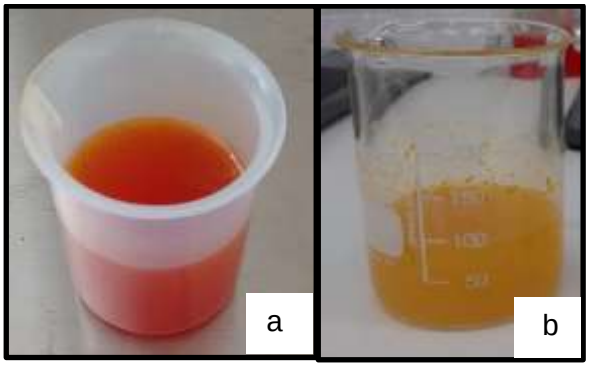
Para comprobar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de rangos múltiples Bonferroni. Para verificar correlación entre las variables se aplicó la prueba de Pearson. Se empleó el paquete estadístico (STATGRAPHICS XVII, 2015).

2.4 Resultados y análisis de resultados

2.4.1 Características fisicoquímicas de los extractos de polen

Los extractos concentrados fueron de color naranja y presentaron partículas blancas que se identificaron visualmente como ceras o grasas. En la Figura 2-3 se muestran imágenes del extracto concentrado sin agua destilada (30 g en 100 mL de etanol) y con el agua destilada (30 g /200 mL de solución hidroetanolica).

Figura 2-3: Extracto etanólico y extracto hidroetanólico de polen



a) Extracto etanólico de polen 30 g/ 100mL, b) extracto hidroetanólico de polen 30 g/ 200 mL

En la Tabla 2-6 se observa el CFT de cada uno de los extractos de 30 g de polen; el promedio fue solamente 1.6 a 2 veces más alto que el determinado en los extractos de 1 g de polen, posiblemente al adicionar el agua al extracto etanólico concentrado se generan interacciones de los compuestos fenólicos con el agua y no hay homogeneidad en el extracto. Para recuperar el contenido de fenoles totales del polen en el extracto de 30 g se deben evaluar otras metodologías de extracción que permitan obtener un extracto homogéneo (extracción mediante fluidos supercríticos para separar las grasas y ceras del polen) o utilizar solventes diferentes.

En cuanto al rendimiento, éste presentó una varianza que posiblemente se debe a las condiciones de preparación de cada extracto, pero, son rendimientos similares a los obtenidos con extractos de 1 g de polen.

Tabla 2-6: Contenido de fenoles totales y rendimiento de los extractos hidroetanólicos (30 g de polen / 200 mL).

Extracto	Fenoles totales (mg GAE/g)	Rendimiento (%)
1	44.31 ± 0.53	35.44
2	41.29 ± 0.42	33.78
3	41.92 ± 0.21	36.41
4	42.42 ± 0.32	36.11
5	39.95 ± 0.68	34.61
6	38.65 ± 0.74	35.36
7	48.17 ± 0.53	44.72
8	40.54 ± 1.04	44.48
9	42.76 ± 0.59	43.87

Valores en base seca presentados como promedio ± la desviación estándar, medidas por triplicado para el contenido de fenoles totales.

Las características de pH, contenido de fenoles totales, rendimiento y ºBrix se comparan con los extractos obtenidos de 1 g de polen en 50 mL en la Tabla 2-7. Se encuentran diferencias significativas en los ºBrix debido a la concentración; mientras que no se observan diferencias grandes entre los valores de pH debido posiblemente a la naturaleza ácida de los compuestos fenólicos del polen.

Tabla 2-7: Características fisicoquímicas de los extractos.

	Extracto 30 g / 200 mL	Extracto 1 g / 50 mL
ºBrix	20 ± 0.50	4.63 ± 0.03
Fenoles totales (mg de GAE/g de extracto)	42.42±2.74	23.54 ± 0.49
pH	4.45 ± 0.06	5.17± 0.02
Rendimiento (%)	39.26± 4.84	41.16 ± 3.18

Valores en base seca presentados como promedio ± la desviación estándar, n=9 con medidas por triplicado para el extracto 30 g /200 mL y n=3 con medidas por triplicado para el extracto 1 g /50 mL

La estabilidad y actividad antioxidante de los compuestos de origen fenólico dependen de diferentes factores, entre éstos el pH. Los pH alcalinos degradan los polifenoles (Friedman & Jürgens, 2000) citado por: Hintz, Matthews, & Di, (2015), pueden convertirlos en prooxidantes (Aluko, 2012), y facilitan su oxidación (Ruenroengklin et al.,

2008); sin embargo, los polifenoles dependiendo del grado de hidroxilación que tengan son más o menos resistentes a los cambios de pH (Hintz et al., 2015). Un estudio sobre la extracción etanólica de polifenoles de lichi reportó rendimientos y AAO altos con valores de pH entre 2 y 5 (Ruenroengklin et al., 2008) y en otro estudio sobre extractos metanólicos de cáscara de maní, encontraron que la AAO se veía disminuida con el incremento del pH de 3 a 9 (Yen & Duh, 1993), citado por: (Hall III, 2001). Por lo tanto, un pH ideal para asegurar la estabilidad de los polifenoles debe estar entre 2 y 5. En la Tabla 2-7 se observa que los extractos obtenidos tienen un pH aproximado de 5, lo que nos indica que la mayoría de fenoles se encuentran estables.

2.4.2 Rendimiento y recuperación de fenoles en el proceso de secado

En la Tabla 2-8 se muestran las condiciones de secado y los resultados de rendimiento y recuperación de fenoles para cada tratamiento. Las temperaturas de secado fueron seleccionadas porque son las más comunes en procesos de secado por aspersión con maltodextrina (Çam et al., 2014). Las variaciones en la temperatura de salida a una misma temperatura de entrada se deben posiblemente a los cambios de la humedad relativa, una variable no controlada.

Tabla 2-8 : Resultados de rendimiento, encapsulación y recuperación de fenoles

Exp	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)	Sólidos solubles (°Brix)	CFT (mg de GAE/g)	Recuperación* (%)	Rendimiento* (%)
1	191±1.6	90.6±12.8	35.7±0.9	5.60 ± 0.06 a	116.4 ± 3.1	53.9±4.9
2	190.1±1.3	99.1±3.6	39.9±0.2	3.10 ± 0.13 b	124.3 ± 4.5	57.8±4.7
3	160.8±0.7	86.7±10.6	34.6±0.8	5.68 ± 0.10 a	140.4 ± 3.9	64±8.8
4	160.7±0.7	88.0±9.3	40.0±0.5	3.10 ± 0.09 b	113.4 ± 2.6	52.3±2.3
5	130.2±0.4	67.1±8.1	35.2±0.6	5.92 ± 0.09 c	115.6 ± 8.9	36.5±4.4
6	129.9±0.2	68.8±3.3	40.5±2.1	3.42 ± 0,01d	97.5 ± 7.2	50.7±1.8

EXP= experimento, CFT = contenido de fenoles totales. Valores presentados como promedio± desviación estándar, n=3, letras diferentes corresponden a diferencias significativas en un 95% de confianza.

* diferencias significativas con interacción de los factores.

La evaluación del material de pared es un factor importante en la microencapsulación de polifenoles mediante secado por aspersión (Fang & Bhandari, 2010), se escogió la maltodextrina como material de pared porque es económica, soluble en agua, de baja viscosidad y es la más utilizada y reportada en la literatura (Pang et al., 2014; Çam et al., 2014; Davidov-Pardo et al., 2013; Vidović et al., 2014).

Los rendimientos del proceso de secado por aspersión obtenidos a diferentes condiciones de secado presentaron diferencias significativas (p valor < 0.05). El rendimiento disminuye con una relación p/p 1:0.5 E/MD y una temperatura de entrada de 130ºC; probablemente esta temperatura no logró la evaporación completa de los líquidos o la remoción de los mismos fue muy lenta. Si la temperatura de secado es baja, aumenta la densidad y la humedad de las partículas por eso hay poca fluidez y facilidad de aglomeración (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007) que provoca acumulación en las paredes de la cámara de secado. Los rendimientos a 160 y 190ºC fueron mayores al 50%, por lo tanto, fueron efectivos (Bhandari, Datta, Crooks, Howes, & Rigby, 1997).

Hay una influencia positiva del contenido de maltodextrina en el rendimiento obtenido de la muestra secada a 130ºC y un efecto contrario en la muestra secada a 160ºC. En otro estudio, también el autor encontró diferencias cambiando la composición de la mezcla de alimentación: en extractos vegetales con 10% de maltodextrina se generaron bajos rendimientos y acumulación del polvo en las paredes (Sansone et al., 2011). Mientras que resultados contrarios fueron observados en la microencapsulación de extractos etanólicos de *Satureja montana*, donde no hubo diferencias significativas, para 10, 30 y 50% de maltodextrina los rendimientos en peso fueron 66, 67 y 68% respectivamente (Vidović et al., 2014).

Los resultados de contenido de fenoles totales (CFT) de los microencapsulados de extractos de polen secados a 130ºC con una relación 1:0.5 E/MD es mayor que todos los demás tratamientos. Es posible que a las temperaturas de 160 y 190ºC se degraden algunos flavonoides.

La adición de maltodextrina genera una disminución en el CFT y consecuentemente en la AAO por el efecto de dilución, resultados similares fueron obtenidos en otros estudios:

por ejemplo, el CFT con 10% de maltodextrina fue mayor que con 50% en microencapsulados de extractos de *Satureja montana* (Vidović et al., 2014); los materiales encapsulantes aumentaron el rendimiento y diluyeron el CFT en la encapsulación de extractos etanolicos de residuos de vino (Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2011).

En un estudio sobre la optimización de la microencapsulación de polifenoles de nopal con maltodextrina e inulina mediante secado por aspersión, reportaron un rango muy amplio en los rendimientos de polifenoles (23 – 81%), principalmente por las diferencias en el contenido del agente encapsulante (Saénz et al., 2009). Estos autores mencionan que el porcentaje de sólidos en la mezcla parece ser el aspecto mas importante ya que debe haber interacción entre los compuestos bioactivos y el agente encapsulante.

El CFT de los extractos de polen iniciales antes de la preparación de la mezcla de alimentación fue tomado como una covariable (Tabla 2-6) en el análisis de CFT de los microencapsulados debido a la preparación independiente de los extractos, encontrando un efecto menor (p valor =0.009) a las variables independientes (p valor <0.0001); esto quiere decir que los cambios en el CFT se deben principalmente a las condiciones de secado y que hay un efecto leve del CFT incial en el extracto.

Los porcentajes de recuperación de fenoles son mayores al 100%, esto mismo fue encontrado por (Saénz et al., 2009), quienes reportaron recuperaciones de un 112% en la microencapsulación de extractos etanólicos de *Satureja montana* con maltodextrina. Los autores afirman que el incremento puede deberse a la hidrólisis de algunos polifenoles conjugados durante la preparación de la mezcla de alimentación o durante el proceso de secado.

Las condiciones evaluadas permitieron encapsular de 3.1 a 5.9 mg de GAE/g de microencapsulado, contenido similar a microencapsulados de otros trabajos de secado; por ejemplo, se lograron encapsular 5.3 a 8.2 mg GAE/g de extractos etanólicos de carambola (Saikia et al., 2015). Estos microencapsulados de antioxidantes de naturaleza fenólica podrán ser utilizados para enriquecer y mejorar las características funcionales de diferentes matrices alimentarias.

2.4.3 Propiedades físicas y sensoriales de los microencapsulados

Se obtuvieron contenidos de humedad por debajo del 6% (4.6 a 5.3 %) y actividad acuosa entre 0.24 y 0.27 (ver Tabla 2-9). Los bajos contenidos de humedad aseguran la estabilidad microbiológica, reológica y física del producto (Vidović, et al., 2014; Pang et al., 2014). Otros autores reportan contenidos mas bajos, por ejemplo, se encontraron contenidos de humedad de 2.8 a 4.9 % en microencapsulados de extractos de pulpa de carambolo con maltodextrina (Saikia et al., 2015) y de 1.8 a 3.6 % en microencapsulados de extractos etanólicos de casis con maltodextrina (Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, 2011); las diferencias se deben probablemente a las diferencias en el contenido de material encapsulante.

Tabla 2-9: a_w y humedad de los microencapsulados a diferentes condiciones de secado

Tratamiento	a_W	Humedad
1	0.238±0.007 a	4.720±0.128 a
2	0.253±0.029 a	5.013±0.559 a
3	0.240±0.015 a	4.758±0.298 a
4	0.244±0.017 a	4.830±0.327 a
5	0.251±0.013 a	4.972±0.247 a
6	0.268±0.038 a	5.295±0.741 a

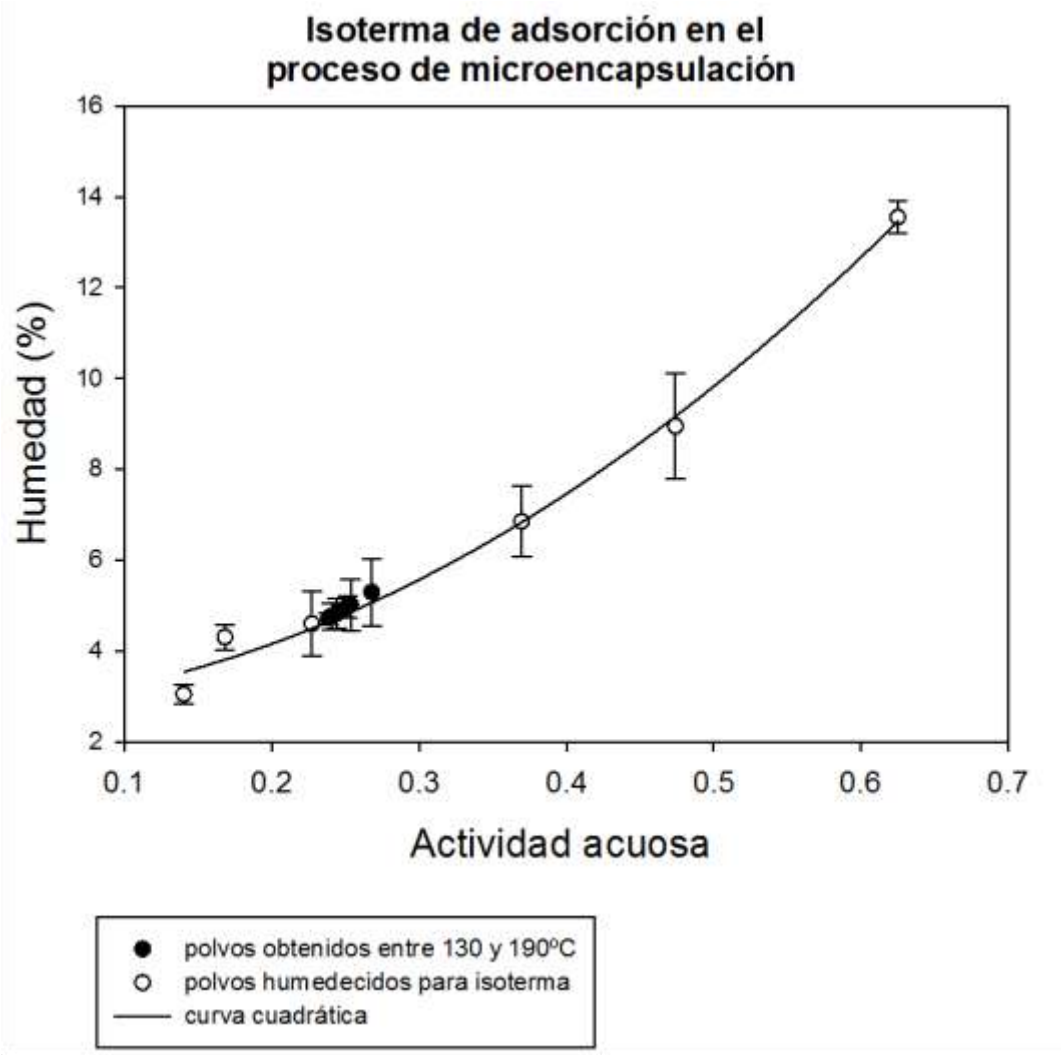
Valores presentados como promedio ± desviación estándar, n=3, medición por triplicado, letras diferentes significan diferencias significativas.

No se observan diferencias significativas en la humedad y a_w (p valor > 0.05) y tampoco influencia de la covariable humedad relativa. Los mismos resultados se obtuvieron en un estudió de diferentes concentraciones de proteína aislada de suero y maltodextrina para encapsular compuesto fenólicos de *Orthosiphon stamineus* mediante secado por aspersión; no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El autor afirma que posiblemente se logra la evaporación total de la humedad a todas las temperaturas evaluadas (Pang et al., 2014).

En la isoterma de adsorción (Figura 2-4) se observa que el microencapsulado se forma cuando la humedad está por debajo del 10% y que la humedad del ambiente es un parámetro importante en la conservación de los compuestos bioactivos

microencapsulados, porque pequeños cambios de humedad generan cambios altos en la actividad acuosa afectando la estructura del microencapsulado (Revelo, 2014).

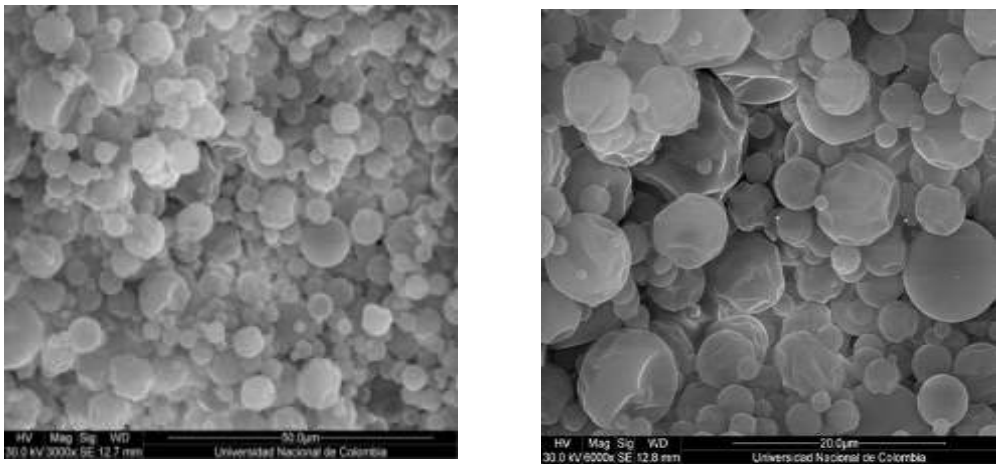
Figura 2-4: Isoterma de adsorción en el proceso de microencapsulación



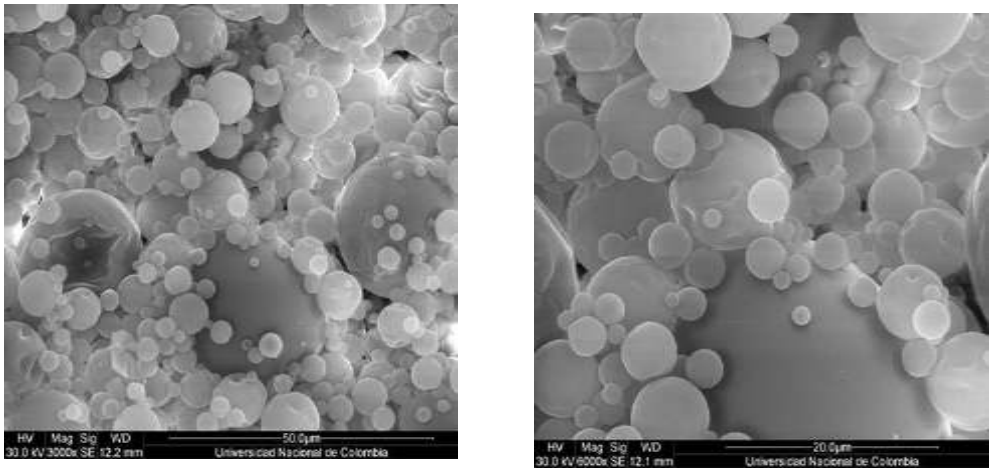
Valores presentados como promedio y desviación estándar, n=3, medidas realizadas por triplicado

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido se presentan en la Figura 2-5. En estas micrografías se observa la morfología y el tamaño de las microcápsulas a diferentes temperaturas de secado. Las cápsulas sufren diferentes cambios durante el proceso, algunas cápsulas chocan y colapsan en el momento del secado y otras se secan más rápido (Gharsallaoui et al., 2007) lo que permite una variabilidad en el tamaño y las formas de las microcápsulas.

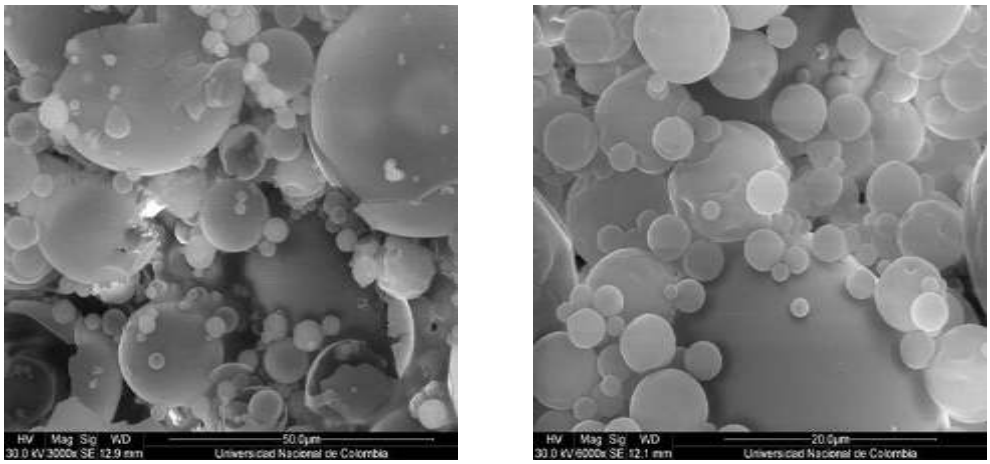
Figura 2-5: Micrografías de barrido electrónico de microencapsulados a diferentes condiciones de secado por aspersión



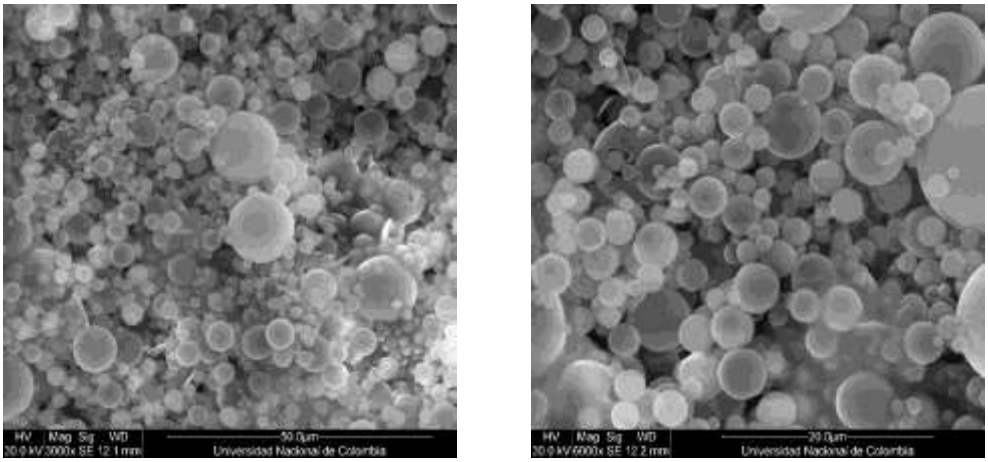
130°C-1:0.5 E/MD



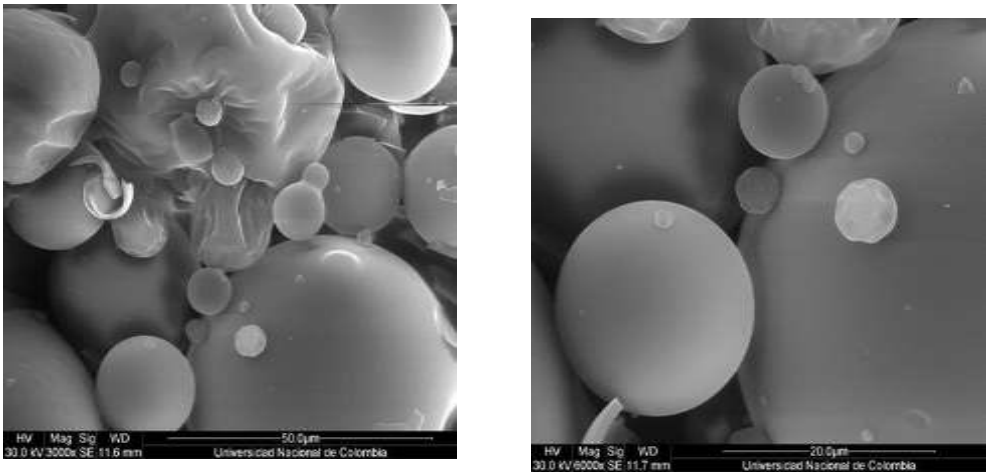
130°C - 1:1 E/ MD



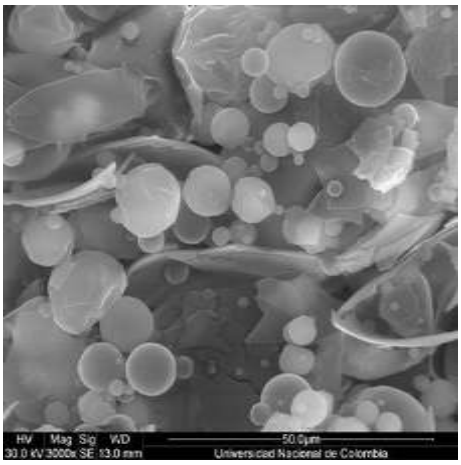
160°C-1:0.5 E/MD

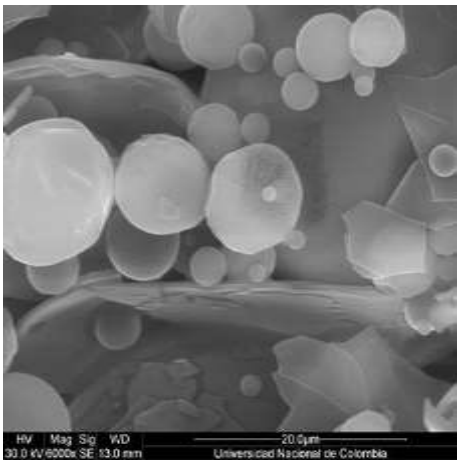


160°C-1:1 E/MD



190°C-1:0.5 E/MD





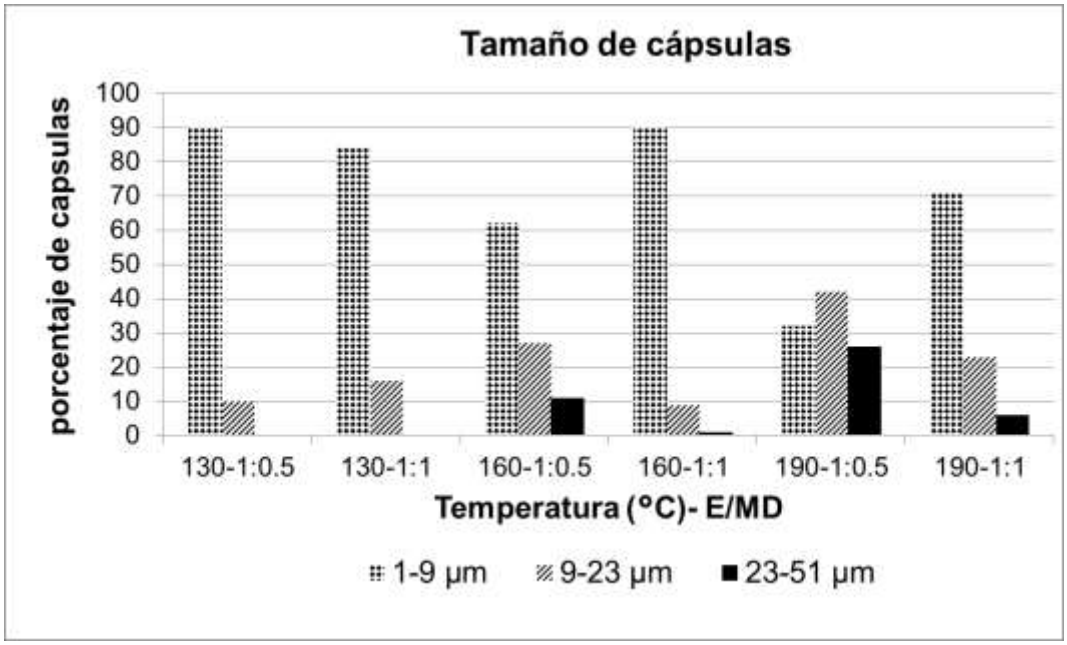
190°C-1:1 E/MD

E/MD= Extracto/maltodextrina p/p

Con una temperatura de secado alta, la velocidad de evaporación del líquido en las gotas es más rápida; instantáneamente se forma la costra del material encapsulante y predominan capsulas amorfas, después de formado el recubrimiento el incremento en la temperatura genera diferentes cambios estructurales, haciéndolo más débil y poroso (Goula & Adamopoulos, 2005; Cheuyglintase, 2009; Gharsallaoui et al., 2007). Estas características son observadas en las micrografías de los microencapsulados secados a 190ºC.

En las micrografías también se observaron diferentes tamaños de partícula que se describen en la Figura 2-6, el tamaño es una medida importante que estima el comportamiento de los polvos al momento de la aplicación en una matriz, a medida que aumenta la temperatura de entrada hay una tendencia a aumentar el tamaño de partícula, debido a la evaporación rápida de los líquidos, mientras a 130ºC el 90 y 84% de las cápsulas tienen un diámetro entre 1 y 9 µm, a 190ºC este rango disminuye a 32 y 71%. También hay una influencia de la cantidad de maltodextrina, a mayor contenido de maltodextrina menor tamaño de partícula; como se observa en los tratamientos a 160ºC y 190ºC. El contenido alto de sólidos posiblemente genera un secado más lento formando capsulas esféricas pequeñas.

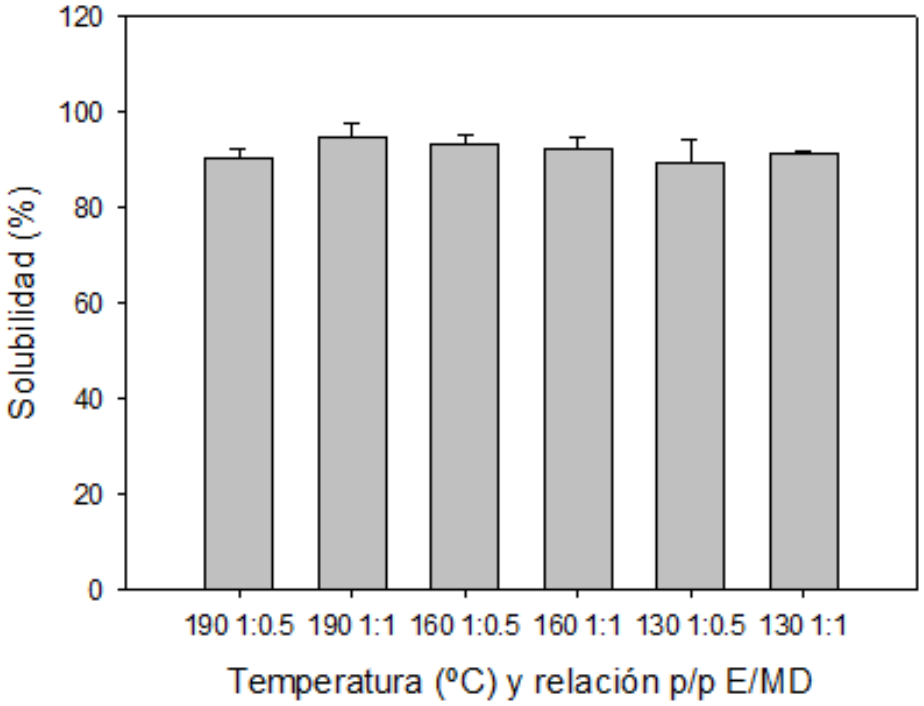
Figura 2-6: Tamaño de microcápsulas a diferentes temperaturas de secado y composición de la mezcla de alimentación



Medición por conteo de 100 cápsulas en micrografías SEM a 800x en una escala de 200 µm

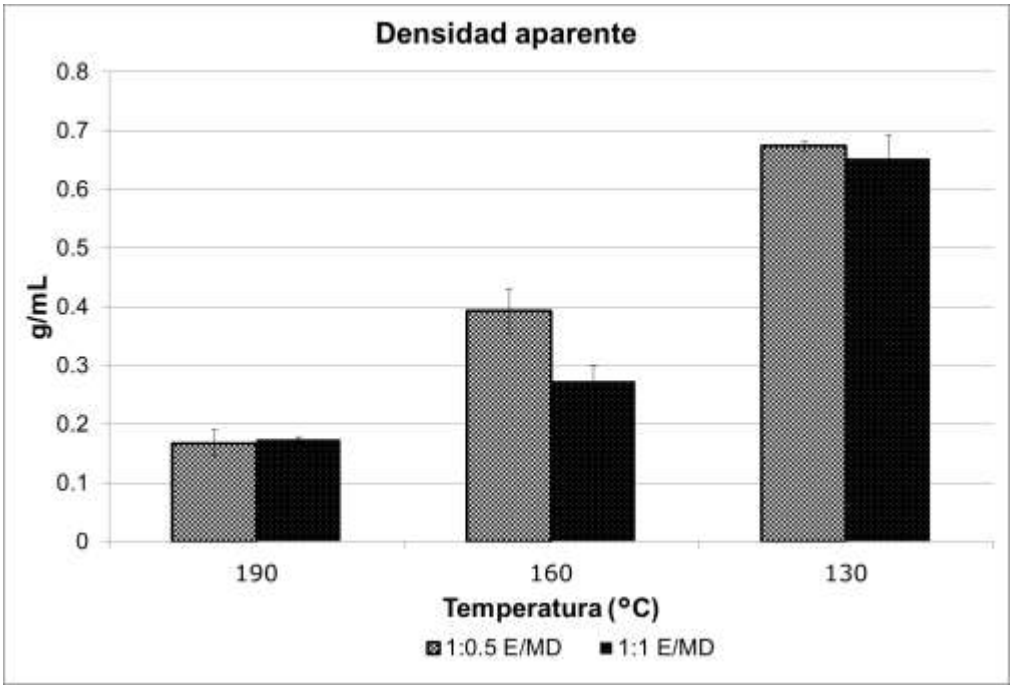
La humedad y el tamaño de partícula afectan la densidad de los microencapsulados y por lo tanto su solubilidad y comportamiento. Los valores altos de solubilidad que se observan en la Figura 2-7 se deben a la capacidad hidrofílica de la maltodextrina, sin embargo, en los resultados de densidad aparente en la Figura 2-8 se observan diferencias; entre más grandes las cápsulas (tratamiento a 190ºC) menor la densidad y más fácil la disolución en medio líquido. Las densidades bajas generan polvos difíciles de manejar debido a su capacidad de dispersarse en el aire. Con los resultados presentados un polvo de fácil disolución y manejo se obtiene con temperaturas de 160ºC y una relación menor de maltodextrina.

Figura 2-7: Porcentaje de solubilidad a diferentes condiciones de secado por aspersión



E=extracto; MD= maltodextrina. Valores presentados como promedio ± desviación estándar, n=3, medido por triplicado.

Figura 2-8: Densidad aparente de los microencapsulados



E = extracto, MD= maltodextrina. Valores presentados como promedio y desviación estándar, n=3, medidos por triplicado.

El análisis instrumental de color a diferentes condiciones de secado se realizó para evaluar la influencia de la maltodextrina en el color de los polvos; el valor L* Luminosidad es principalmente afectado por la temperatura de secado (p valor < 0.05) y los parámetros a*, b* y croma son influenciados por los dos factores evaluados (p valor < 0.05). Como se observa en la Tabla 2-10 el parámetro b* es el de mayor variabilidad, la escala de b* cambia de azul (<0) a amarillo (>0), medidas entre 7.4 y 18.7 nos revelan un varianza en el color amarillo debido al contenido de flavonoides y maltodextrina. En otro estudio de microencapsulación de extractos acuosos de polifenoles de granada con maltodextrina, se obtuvieron resultados similares, la adición del agente encapsulante y el aumento de la temperatura produjeron efectos leves en los parámetros luminosidad L*, y más significativos en el parámetro b* (Çam et al., 2014).

Los parámetros b* y croma de la muestra secada a 130ºC con una relación 1:0.5 E/MD presentan diferencias significativas con respecto a todas las demás, los parámetros son más altos, porque en el polvo se resalta más el color amarillo, adicionalmente esta muestra tuvo mayor CFT (5.92 ± 0.09 mg de GAE / g). Resultados similares encontraron Çam et al., (2014) en la microencapsulación de extractos acuosos de cáscara de granada con maltodextrina, la muestra con mayor CFT (287.3 ± 6.3 mg de GAE/g) tuvo el parámetro b* más alto (32.3) cuando se varió el contenido de maltodextrina.

Tabla 2-10: Parámetros instrumentales L*a*b* de los microencapsulados y croma a diferentes temperaturas y porcentajes de maltodextrina.

EXP	L*	a*	b*	Croma	h° *	ΔE*
1	97.13±0.43 b	-0.87±0.04 a	11.24±0.21 a	11.27±0.21 a	94.4	10.83
2	97.87±0.09 b	-0.78±0.02 b	7.41±0.03 b	7.45±0.03 b	95.98	6.87
3	97.39±0.54 b	-0.79±0.03 b	9.35±0.10 c	9.38±0.10 c	94.8	7.83
4	96.23±1.32 ab	-0.51±0.03 c	8.35±0.06 d	8.36±0.06 d	93.51	7.03
5	94.33±1.10 a	0.33±0.01 d	18.79±0.06 e	18.79±0.06 e	88.98	18.2
6	95.41±2.01 ab	-0.79±0.05 b	7.79±0.14 f	7.83±0.14 f	95.77	7.21

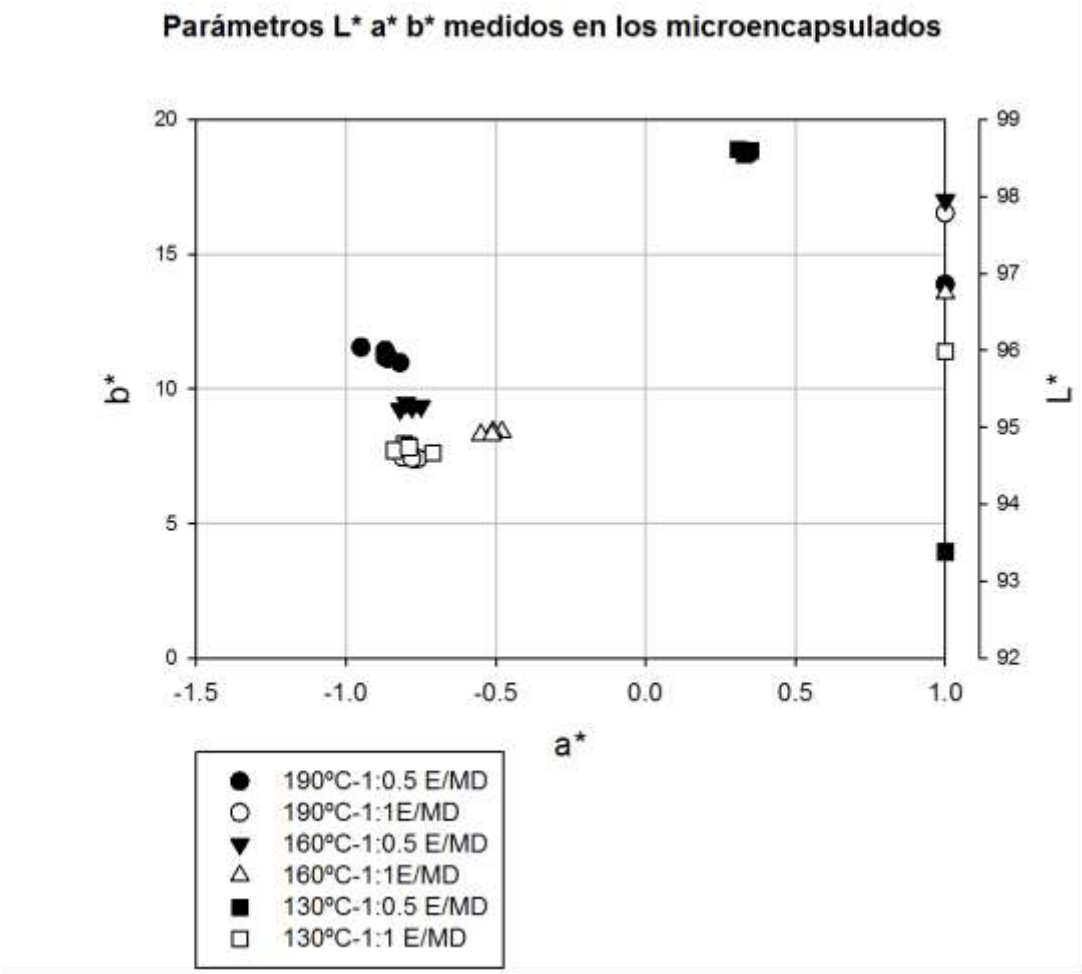
Valores presentados como promedio ± la desviación estándar, letras diferentes corresponden a diferencias significativas, n=6, p valor <0.05, análisis ANOVA.

* Valores presentados como la mediana, n=3, medidas por triplicado, p valor < 0.05, análisis Kruskal Wallis.

La diferencia de color ΔE fue calculada con respecto a las muestras control (sin extracto de polen). A una temperatura de entrada de 130ºC y una relación 1:0.5 E/MD se generaron diferencias significativas en este parámetro con respecto a los demás tratamientos; igualmente el ángulo ºh que define la intensidad de color, fue diferente para las mismas condiciones de secado, ya que tiene el valor más cercano a 90º (Amarillo).

Los parámetros de color L*a*b* de todas las muestras se observan en la Figura 2-9. Las muestras de cada tratamiento son homogéneas en el color; se encontró una separación debido a las diferencias en el parámetro b*; también se observa que la luminosidad de las muestras secadas a 130ºC es levemente menor a las muestras secadas a 160 y 190ºC.

Figura 2-9: Parámetros L*a*b* instrumentales de los microencapsulados



E= extracto, MD= maltodextrina. Valores presentados como mediciones por triplicado de 3 muestras de cada tratamiento.

2.4.4 Actividad antioxidante de los microencapsulados

Las variables actividad antioxidante (AAO) TEAC y FRAP dependen de la interacción entre la temperatura de entrada y la relación E/MD en el proceso de secado (p valor < 0,05) (ver Tabla 2-11). Con la relación 1:0.5 E/MD y a 160ºC se logra la mayor AAO TEAC y a 130ºC con la relación 1:0.5 E/MD se obtienen los mejores resultados en la AAO medida por FRAP. Los resultados muestran correlación con el CFT.

Tabla 2-11: Actividad antioxidante de los microencapsulados

EXP	TEAC mmoles de trolox/g	FRAP mmoles de trolox/g
1	0.0127±0.0004	0.0144±0.0002
2	0.0099±0.0002	0.0089±0.0002
3	0.0144±0.0002	0.0153±0.0005
4	0.0054±0.0001	0.0081±0.0001
5	0.0135±0.0003	0.0159±0.0005
6	0.0081±0.0002	0.0103±0.0002

Valores presentados como promedio ± la desviación estándar, n=3, mediciones por triplicado. Diferencias significativas con interacción entre los factores.

En otros estudios se obtuvo mayor AAO de microencapsulados de extractos etanólicos de varias matrices, por ejemplo, en microencapsulados de extractos hidroetanólicos de casis con maltodextrina, la AAO TEAC estuvo en un rango de 0.07 a 0.09 mmoles de trolox/g (Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, 2011); en la microencapsulación de polifenoles de jugo de granada con maltodextrina a las condiciones seleccionadas se obtuvo una AAO TEAC de 0.024 mmoles de trolox /g (Miravet, Alacid, Obón, & Fernández-López, 2015).

El polen contiene varios pellets de polen floral que tienen compuestos fenólicos específicos - ácidos fenólicos, fenilpropanoides y flavonoles- que pueden tener alto o bajo potencial antioxidante. Se han realizado estudios donde se analiza la AAO de polen proveniente de una sola especie botánica e identifican los perfiles fenólicos de cada especie floral, encontrando que no es la cantidad de fenoles la que define la capacidad

antioxidante sino la calidad o la estructura de los compuestos (Ulusoy & Kolayli, 2014; Mărghitaş et al., 2009, Campos et al., 2003). Por lo tanto hay varias posibles razones para obtener baja actividad antioxidante, el extracto concentrado no era homogéneo, los compuestos fenólicos encapsulados no poseen una AAO alta o la metodología utilizada no fue suficiente para extraer la totalidad de compuestos fenólicos encapsulados.

Sin embargo, son necesarios otros métodos de medición de AAO para identificar las propiedades bioactivas de los microencapsulados ya que estos métodos se ven influenciados por varios factores. Los métodos de medición de AAO mediante reacciones de oxidación de matrices alimentarias como aceites o compuestos como azúcares, permiten aproximaciones más precisas del comportamiento de los antioxidantes (Leja et al., 2007).

Para verificar que la AAO es proporcional al CFT se aplicó una prueba correlación que se observa en la Tabla 2-12, hay una correlación más alta del CFT con la AAO medida por FRAP (r= 0.9), que con la AAO medida por TEAC (r=0.8).

Tabla 2-12: Correlación entre contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de los microencapsulados

	Actividad Antioxidante ABTS	**Actividad Antioxidante FRAP**	**Contenido de Fenoles Totales**
Actividad Antioxidante ABTS	1		
Actividad Antioxidante FRAP	0.9231	1	
p valor	0		
Contenido de Fenoles Totales	0.8871	0.9772	1
p valor	0	0	

Valores entre -1 y +1 demuestran correlación positiva o negativa, p valor < 0.05 demuestra correlación significativa, prueba de Pearson.

La AAO de los microencapsulados por TEAC fue de 0.0054 ± 0.0001 a 0.0144 ± 0.0002 y por FRAP fue de 0.0081 ± 0.0001 a 0.0159 ± 0.0005 mmoles de trolox/g. La AAO del polen medida por TEAC es de 0.098 ± 0.002 mmoles de trolox/g y medida por FRAP es

de 0.093 ± 0.002 mmoles de trolox/g. El CFT en el microencapsulado fue de 3.10 ± 0.01 a 5.92 ± 0.09 mg de GAE/g y en el polen es de 33.04 ± 0.82 mg de GAE/g. El contenido de antioxidantes del microencapsulado tiene diferencias significativas con respecto al polen y se deben a las diluciones durante el proceso de microencapsulación, sin embargo, la transformación de los extractos etanólicos de polen tienen como fin principal disminuir el impacto sensorial del polen y proteger de la temperatura y la luz a los compuestos antioxidantes extraídos del mismo.

De acuerdo a los resultados anteriores, se seleccionó el tratamiento a 160ºC de temperatura de entrada con una relación 1:0.5 E/MD, ya que éste tratamiento permite la obtención de un CFT alto y la mayor AAO medida por TEAC.

2.4.5 Conclusiones de la evaluación de microencapsulación de compuestos fenólicos de polen

- Los extractos preparados con 30 g de polen, tuvieron un contenido de fenoles totales entre 38.65 y 48.18 mg de GAE/g con rendimientos entre 33.78 y 44.72 %. El CFT en los extractos concentrados fue solamente de 0.6 a 2 veces mayor al obtenido con 1 g de polen, posiblemente debido a falta de homogeneidad en los extractos. Las características de pH (4.5) y rendimiento en el extracto más concentrado fueron similares a las obtenidas en los extractos de 1 g de polen y los ºBrix aumentaron significativamente en el extracto más concentrado.

- La variación de la temperatura de entrada y el contenido de maltodextrina en el proceso de secado por aspersión de extractos hidroetanólicos de polen influyen en el rendimiento del proceso. Con temperaturas bajas (130ºC) se disminuye el rendimiento debido a que el secado es más lento, generando aglomeración de las partículas y los contenidos altos de maltodextrina generan mayor rendimiento a temperaturas bajas (130 y 160ºC). Los rendimientos obtenidos con temperaturas de 160 y 190ºC fueron mayores al 50%.

- Los factores evaluados en el proceso de secado por aspersión afectan el CFT microencapsulados; con una temperatura de 130ºC y una relación E/MD de 1:0.5, se obtuvo el mayor CFT (5.92 ± 0.09 mg de GAE/g). Esta variable se ve afectada principalmente de forma negativa por el contenido de maltodextrina ya que genera dilución de los compuestos. Los porcentajes de recuperación de fenoles fueron mayores al 100 % lo que indica un efecto muy leve de las temperaturas de secado sobre el CFT.

- Se obtuvieron contenidos de humedad por debajo del 6% (4.6 a 5.3 %) y actividad acuosa entre 0.24 y 0.27 en los microencapsulados, lo que revela estabilidad y eficiencia en el proceso de secado.

- La microscopía electrónica de barrido permitió identificar que la forma y el tamaño de las partículas de los microencapsulados se ven afectadas por las condiciones de secado por aspersión. Cuando las temperaturas de secado son altas (190ºC) las cápsulas son grandes y amorfas y a temperaturas más bajas las partículas son más esféricas y pequeñas, por lo tanto, la densidad aparente se ve afectada, las mejores condiciones para obtener polvos con características de densidad aparente ideales son temperaturas de secado a 160ºC.

- El color instrumental de los microencapsulados es amarillo debido al color del extracto y fue influenciado por la adición de maltodextrina. Se encontró varianza del parámetro b* (amarillo) principalmente. Una temperatura de 130ºC y una relación 1:0.5 E/MD generan polvos con un color más amarillo que todos los demás tratamientos, característica generada porque este tratamiento aumenta la cantidad de fenoles y porque las partículas se encuentran aglomeradas.

- La actividad antioxidante medida por TEAC y por FRAP demostró correlación con el CFT, sin embargo, los valores fueron bajos posiblemente debido a las condiciones de extracción y la dilución de los compuestos en el proceso de secado por aspersión.

3 Aplicación del microencapsulado de extracto etanólico de antioxidantes de polen en un néctar de maracuyá

3.1 Introducción

La utilización de polifenoles de polen como un ingrediente, puede dar un valor agregado a diferentes productos alimenticios (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Uribe, & Serna-Saldívar, 2014). Varios autores han estudiado la inclusión de polifenoles en diferentes matrices. Por ejemplo: Hoye & Ross, (2011) estudiaron las características sensoriales y bioactivas de pan con harina de semillas de uva rica en polifenoles; Rosales et al., (2012) evaluaron la inclusión de harina de semillas de uva en pasta, barras de cereal y *pancakes*; Tseng & Zhao, (2013) evaluaron la adición de extractos líquidos, microencapsulados y polvos de orujo de uva de vino en yogurt y aderezos para ensaladas.

Las frutas son una buena selección a la hora de desarrollar un alimento con caracterísiticas funcionales, debido a su contenido nutricional y bioactivo. El maracuyá (*Passiflora edulis*) es una fruta tropical reconocida por su aroma característica y es un ingrediente importante en la preparación de bebidas, contiene antioxidantes principalmente carotenoides y ácido ascórbico y no se han realizado muchos estudios sobre su contenido en polifenoles (Talcott, Percival, Pittet-Moore, & Celoria, 2003). Por otro lado, es uno de las frutas clasificadas con baja AAO (Vasco, Ruales, & Kamal-Eldin, 2008; Martínez et al., 2012).

El objetivo del presente trabajo fue incluir microencapsulados de extractos de polen en néctares de maracuyá, evaluar su aporte en características funcionales y realizar un análisis sensorial mediante pruebas a consumidores.

3.2 Materiales y métodos

Se prepararon 3 extractos de polen de 200 mL como se describe en la sección 2.3.2 en condiciones inocuas y se sometieron a secado por aspersión con las condiciones seleccionadas en el capítulo anterior (temperatura de entrada 160ºC y relación 1:0.5 E/MD) y los parámetros descritos en la misma sección.

Posteriormente se prepararon néctares de maracuyá con diferentes porcentajes de inclusión de los microencapsulados. Los néctares se evaluaron sensorialmente con 60 consumidores; se midió la AAO *in vitro* y se comparó con la AAO de néctares con diferentes porcentajes de inclusión de polen apícola seco.

3.2.1 Elaboración de néctares de maracuyá

Se realizó un néctar de maracuyá siguiendo la norma NTC 5468, el polvo adicionado corresponde al microencapsulado obtenido a 160°C de secado y relación E/MD 1:0.5. No se pasteurizó para no afectar los compuestos termolábiles y se utilizó al siguiente día en las pruebas sensoriales. El mismo procedimiento se utilizó para néctares con inclusión de polen apícola en porcentajes del 2 y 5 %.

Las frutas fueron compradas en un supermercado de Bogotá, se seleccionaron visualmente con el mismo grado de madurez, se limpiaron y desinfectaron (150 ppm, 5 a 10 min), se realizó despulpado y la pulpa fue caracterizada (ºBrix). Posteriormente se realizaron las formulaciones para obtener néctares con 15 ºBrix, 30 % de pulpa y 3, 5 y 7% de microencapsulados, finalmente se empacaron y almacenaron a 4ºC.

3.2.2 Pruebas afectivas a consumidores

De acuerdo a las metodologías de evaluación sensorial a consumidores (Bower, 2009) se aplicó una prueba afectiva hedónica utilizando una escala de 5 categorías descriptivas que se presentan en la Tabla 3-1, con un panel de 60 consumidores (no entrenados). Se aplicó una segunda prueba de preferencia y aceptación donde el consumidor respondía si compraría las muestras y en qué orden las prefería.

Tabla 3-1: Escala hedónica empleada en la prueba afectiva a consumidores

Escala	Puntaje
Me gusta mucho	5
Me gusta	4
Ni me gusta ni me disgusta	3
Me disgusta	2
Me disgusta mucho	1

3.2.3 Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante por FRAP y TEAC de los néctar de maracuyá

Se siguió la metodología descrita por Bernal, (2012) con algunas modificaciones en las cantidades. Se pesaron 10 g de néctar, se diluyeron en 10 mL de etanol industrial al 96%, se homogenizaron mediante un vortex y sonicaron con un baño de ultrasonido. Cada extracto se centrifugó y filtró en papel Whatman de 8 a 10 micrómetros de poro, se repite el mismo proceso 3 veces.

Los extractos se llevaron a un volumen de 50 mL y se siguieron los métodos descritos en los numerales 2.3.1. Las extracciones y mediciones se realizaron por triplicado.

3.2.4 Análisis estadístico

Para las variables CFT, AAO FRAP y TEAC del néctar de maracuyá adicionado con el microencapsulado se realizó un ANOVA y para comprobar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de rangos múltiples Bonferroni.

El análisis estadístico de la prueba sensorial hedónica y la prueba de preferencia se realizó aplicando puntajes y éstos fueron analizados mediante la prueba de Friedman; la prueba de aceptación fue analizada mediante el número de aceptaciones en la totalidad de consumidores. Se utilizó el paquete estadístico (STATGRAPHICS XVII, 2015).

3.3 Resultados

3.3.1 Pruebas sensoriales a consumidores

El análisis sensorial de una matriz con inclusión del microencapsulado es importante para hacer una aproximación de la viabilidad del microencapsulado como ingrediente que aporta características funcionales. El maracuyá es compatible sensorialmente con el polen debido a sus características de color y acidez, por esta razón se seleccionó esta fruta.

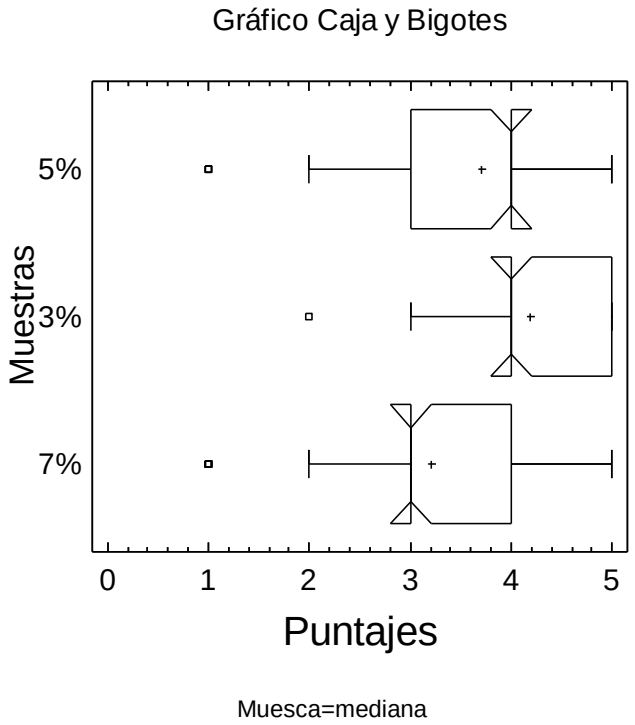
Se realizaron pruebas sensoriales afectivas de un néctar de maracuyá con inclusión del microencapsulado en 3 concentraciones: 3, 5 y 7% con los códigos aleatorios 575, 742 y 776 respectivamente, a 60 consumidores, 10 de los panelistas conocían las características sensoriales del polen apícola (miembros del grupo de investigación).

Los puntajes asignados por los consumidores en la escala de 5 niveles transformada a números ordinales de 1 a 5 (me disgusta mucho - me gusta mucho) se presentan en el Anexo B; el análisis de varianza de las medianas obtenidas se muestra en la Tabla 3-2; se puede observar que las muestras con 3 y 5% de inclusión no tienen diferencias significativas en la mediana que fue 4 “me gusta” y las muestras con inclusión del 7% presentaron una mediana de 3 “ni me gusta, ni me disgusta” (Figura 3-1). Como los consumidores tuvieron la misma apreciación de las muestras con 3 y 5% de inclusión, de acuerdo a estos resultados, posiblemente los evaluadores no detectaron sensorialmente el incremento de inclusión, lo que es un resultado satisfactorio.

Tabla 3-2: Comparación de medianas y significancia mediante Friedman de la prueba afectiva realizada a consumidores en escala hedónica.

Muestra	n	Rango Promedio	Mediana	Mínimo-Máximo	p-valor
575 (3% de inclusión)	60	2.425	4	2-5	
742 (5% de inclusión)	60	2.05833	4	1-5	4.61E-08
776 (7% de inclusión)	60	1.51667	3	1-5	

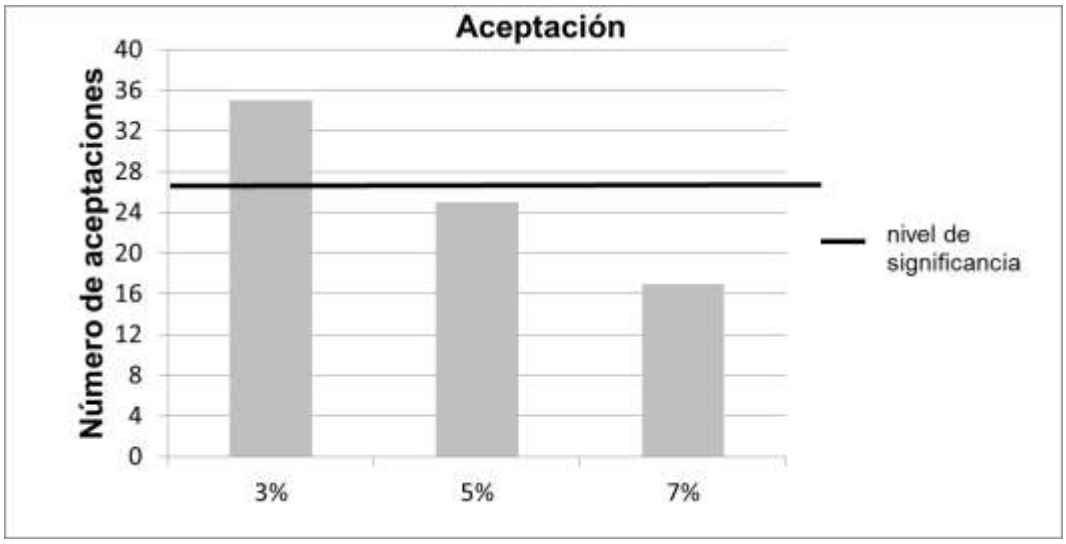
Figura 3-1: Comparación de medianas en muestras de néctar con microencapsulado en la prueba afectiva en escala hedónica.



En la Figura 3-2 se muestra la comparación de las medianas del número de aceptaciones de cada muestra correspondiente a la pregunta “lo compraría?”, la línea corresponde al valor estadístico mínimo para que el número de evaluaciones sea significativo (27) en una población de 42 consumidores, ya que 20 no respondieron. La muestra 575 (con 3% de inclusión) fue aceptada por los consumidores significativamente

(# de aceptaciones > 27); mientras las muestras 742 (5 % de inclusión) y 776 (7 % de inclusión) fueron menos aceptadas (# de aceptaciones < 27).

Figura 3-2: Nivel de significancia de la aceptación de los consumidores



El nivel de significancia se obtuvo mediante la tabla estadística de niveles de probabilidad, 42 ensayos, a 2 colas, probabilidad 0.05%.

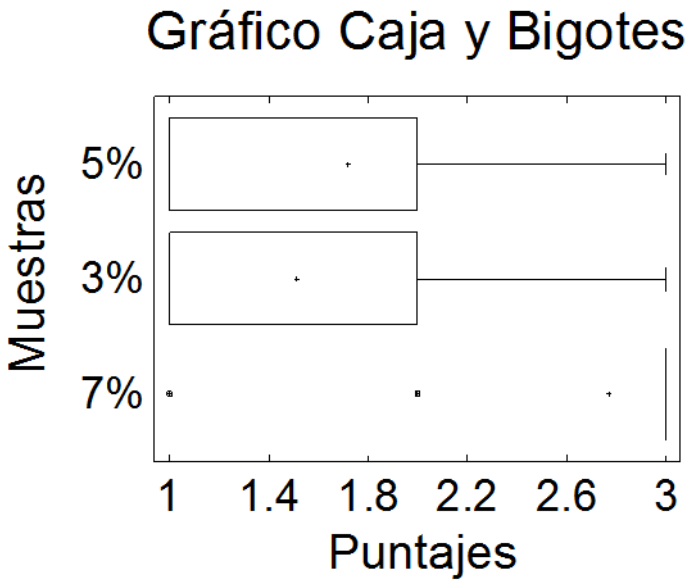
Tabla 3-3: Comparación de medianas mediante Friedman de la prueba de preferencia realizada a los consumidores

Muestra	n	Rango Promedio	Mediana	Mínimo-Máximo	p-valor
575 (3% de inclusión)	61	2.425	1	1-3	0.0
742 (5% de inclusión)	61	2.058	2	1-3	
776 (7% de inclusión)	61	1.517	3	1-3	

En la prueba de preferencia los puntajes asignados fueron de 1 a 3, donde 1 significa que el consumidor la prefiere antes que las demás muestras (Anexo B). Se encontraron diferencias significativas en las medianas de las muestras, los néctares con 7% de inclusión tuvieron una mediana de 3 (Tabla 3-3), es decir que los consumidores la prefirieron menos. Los néctares con 3 % y 5 % tuvieron una mediana de 1 y 2 respectivamente y se observó una dispersión alta en la muestra con un 3 %, esto indica

que los consumidores tuvieron dudas en la decisión de preferencia de esta muestra (ver Figura 3-3).

Figura 3-3: Comparación de medianas en la prueba de preferencia del néctar de maracuyá



En cuanto a las observaciones de los consumidores (Tabla 3-4) en la mayoría de los comentarios se encuentra una descripción favorable para los néctares con 3 y 5 % del microencapsulado. El néctar con 7 % de inclusión es percibido como no natural y con presencia de sabores extraños.

Los consumidores asocian las diferencias entre las muestras con una percepción diferente de la acidez a pesar de que todas las muestras fueron preparadas con 30% de pulpa en las mismas condiciones y 15 ºBrix. Otros consumidores asocian las diferencias en la matriz con el sabor amargo.

Entre los consumidores que conocen las características sensoriales del polen, 7 reconocieron el sabor a polen en las muestras con 5 y 7 % de inclusión, pero no les pareció desagradable en la muestra con 5 %. Los comentarios generales son de agrado.

Tabla 3-4: Observaciones de los consumidores

Muestra	Observaciones
575 (3% de inclusión)	Dulce agradable, un poco ácida, agradable, muy dulce, néctar común, excelente producto, ligero sabor a polen, mayor acidez, sabor más natural, sabor balanceado, no se detectan sabores extraños, menos ácida, mas sabor a fruta, no es tan amarga, muy rico, mejor sabor, no sabe a polen, mejor color, ni olor ni sabor extraño, sabor y aroma agradables.
742 (5% de inclusión)	Muy ácida, agradable, leve amargo, un poco ácida, sabor a polen, presenta diferencia a un néctar común, sabor a polen pero no es desagradable, deja residual, agradable pero ácida, sabor no es natural, sabor más dulce y más concentrado, balanceada, más suave y dulce, menos ácida, acidez agradable, mejor sabor, natural, suave, un sabor diferente que agrada, menos dulce, refrescante, sabor no habitual, me gusta mucho
776 (7% de inclusión)	Muy ácida, hostigante, sabor fuerte, un poco ácida, amarga, leve amargo, sabor a polen, presenta diferencia a un néctar común, se pierde la acidez y sabor de la fruta, amargo más fuerte, más neutro, agradable, sabor levemente acentuado a polen, color blanquecino, olor proteico, turbia, agradable pero ácida, demasiado ácida, sabor no es natural, sabor suave, menor acidez, natural.
Generales	El producto es bueno, no tienen diferencias, néctares agradables

3.3.2 Contenido de Fenoles Totales y Actividad Antioxidante del néctar de maracuyá

En la Tabla 3-5 se muestran los resultados de CFT y AAO del néctar con inclusión de polen seco y del microencapsulado, se encontraron diferencias signifiativas entre todas las muestras. La adición de polen seco al néctar incrementa el CFT 4.5 y 7.5 veces y la AAO TEAC se incrementa 2.7 y 5 veces al 2 y 5% de inclusión respectivamente, sin

embargo, pueden generarse aromas y sabores desagradables, por ejemplo, en la evaluación sensorial de un yogurt con polen el mejor puntaje se obtuvo con 1% de inclusión (Khider et al., 2013).

Tabla 3-5: Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de néctar de maracuyá con inclusiones de polen y microencapsulado

	Contenido de fenoles totales (mg de GAE/g)	**Actividad antioxidante TEAC (mmoles de trolox/g)**	**Actividad antioxidante FRAP (mmoles de trolox/g)**
muestra			
Néctar de maracuyá	0.29±0.02 **a**	0.0007±0.0000 **a**	sin datos
Néctar de maracuyá + 2% de polen	0.92±0.03 **b**	0.0023±0.0001 **b**	sin datos
Néctar de maracuyá + 5% de polen	1.52±0.05 **c**	0.0039±0.0002 **c**	sin datos
Néctar de maracuyá + 3% de microencapsulado	0.50±0.02 **d**	0.0012±0.0000 **d**	0.0027±0.0001
Néctar de maracuyá + 5% de microencapsulado	0.53±0.01 **de**	0.0018±0.0000 **e**	0.0035±0.0001
Néctar de maracuyá + 7% de microencapsulado	0.59±0.02 **e**	0.0022±0.0001**eb**	0.0036±0.0003

Datos calculados en base húmeda, presentados como promedio ± desviación estándar, n=3 medido por triplicado, letras diferentes corresponden a diferencias significativas estadísticamente, 95% de confianza.

El consumo de frutas, bebidas como el vino, el té y el café generan una dieta rica en compuestos fenólicos que son benéficos para el ser humano; 50-200 mg/comida y 20 mg/día corresponden a flavonoles (Murkovic, 2003); una copa de vino rojo tiene 200 mg de fenoles (Mazza, 2012). Estas cantidades dan una idea de las cantidades de fenoles consumidos, sin embargo, los valores no son comparables ya que el método de Folin Ciocalteu puede tener interferencias de otros compuestos como carotenoides, proteínas, azúcares, y vitamina C y se ha observado sobreestimación (Klimczak, Małecka, Szlachta, & Gliszczyńska-Świgło, 2007). Por el método Folin Ciocalteu se han reportado valores entre 0.25 y 2.28 mg de GAE/mL de vino de diferentes clases, es decir que 100 mL pueden aportar de 25 a 228 mg de fenoles según está metodología (Rebelo, Rego, Ferreira, & Oliveira, 2013).

La incorporación de microencapsulados de extractos de polen al nectar incrementa 1.6, 1.7 y 1.9 veces el CFT del néctar de maracuyá, no se encontraron diferencias

significativas entre los néctares con 5 y 7% de inclusión. En 100 mL de néctar de maracuyá con 5% de microencapsulados de extractos de polen (néctar aceptado sensorialmente) se pueden llegar a consumir 53 mg de GAE. Esta cantidad de fenoles que aporta el nectar enriquecido puede aumentar la ingesta de fenoles.

La AAO TEAC en el néctar enriquecido se incrementa 1.7, 2.5 y 2.8 veces con 3, 5 y 7 % de inclusión respectivamente. La AAO medida por FRAP es similar y baja, posiblemente como se ha mencionado, los compuestos extraídos no tienen alta capacidad antioxidante o son necesarias otras metodologías más selectivas.

3.3.3 Conclusiones sobre la inclusión del microencapsulado de extractos de polen en un néctar de maracuyá

- Los resultados de las pruebas a consumidores muestran la aceptación de inclusiones del 3 y 5% de microencapsulados en los néctares, mediante la evaluación en escala hedónica se observó que no se detecta el incremento de 3 a 5% de inclusión del extracto microencapsulado.

- Con respecto a las observaciones de los consumidores, en general se acepta el producto y se asocian diferencias con cambios en los niveles de acidez.

- La adición de polen apícola a los nectares de maracuyá incrementó significativamente el CFT y la AAO, pero, el impacto sensorial puede ser más alto que el de los microencapsulados. La incorporación de microencapsulados de extractos de polen al nectar incrementa 1.6, 1.7 y 1.9 veces el CFT del néctar de maracuyá con 3, 5 y 7% de microencapsulados respectivamente, 100 mL de nectar de maracuyá enriquecido posiblemente aporta 53 mg GAE y esta cantidad puede aumentar la ingesta de fenoles en la dieta. Con respecto a la AAO TEAC esta se incrementa 1.7, 2.5 y 2.8 veces con 3, 5 y 7% de microencapsulados respectivamente.

4 Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

1. El proceso de secado por aspersión de extractos etanólicos de polen apícola permitió la encapsulación de 3.10 ± 0.09 a 5.92 ± 0.09 mg de GAE/g de microencapsulado, variaciones debidas principalmente al efecto de dilución con la adición de maltodextrina. Los porcentajes de recuperación de fenoles fueron del 97.5% a 140.4% debido posiblemente a hidrolisis de algunos flavonoides glicosilados durante el proceso.

2. Los rendimientos en el secado por aspersión fueron mayores al 50 % cuando se aplicaron temperaturas de secado de 160 y 190ºC. Una temperatura de entrada en el proceso de 160°C y una relación de 1:0.5 extracto/maltodextrina p/p en base húmeda favorecen las propiedades bioactivas y el rendimiento de los microencapsulados.

3. Se encontraron diferencias significativas en algunas propiedades físicas de los microencapsulados a diferentes condiciones de secado; la microscopía electrónica de barrido SEM permitió observar que a 130ºC las cápsulas son de tamaño menor, de forma esférica y alta densidad aparente y a 190ºC las cápsulas son de tamaño mayor, amorfas, de baja densidad aparente y son inestables por sus capas delgadas y quebradizas. Las condiciones en el proceso de secado que permiten obtener características físicas de los microencapsulados ideales para la inclusión en una matriz líquida son el secado a 160ºC con una relación 1:0.5 de E/MD.

4. La actividad antioxidante medida por TEAC con el radical ABTS fue de 0.0054 ± 0.0001 a 0.0144 ± 0.0002 mmoles de trolox/g de microencapsulado y medida por

FRAP fue de 0.0081 ± 0.0001 a 0.0159 ± 0.0005 mmoles de trolox/g de microencapsulado. Los valores de actividad antioxidante son bajos posiblemente porque se degradan algunos flavonoides y compuestos antioxidantes de diferente naturaleza, porque los compuestos extraídos tienen baja actividad antioxidante o porque no se liberaron las cápsulas totalmente durante el proceso de extracción, sin embargo, se correlacionan con el contenido de fenoles totales.

5. La evaluación del color instrumental de los microencapsulados mostró que la maltodextrina influye en el color ya que disminuye la intensidad del amarillo y los colores obtenidos demuestran la presencia de flavonoides, el parámetro b* presenta diferencias significativas entre tratamientos y se observó que la muestra secada a 130ºC con una relación E/MD de 1:0.5 tiene un color amarillo más resaltado.

6. Para evaluar los microencapsulados como un ingrediente que aporta características funcionales, se incluyeron en un néctar de maracuyá (3, 5 y 7% de microencapsulado), los resultados demuestran que los néctares con 3 y 5% de inclusión son aceptados por los consumidores y que la incorporación de microencapsulados de extractos etanólicos de polen apícola al nectar de maracuyá incrementaron 1.6, 1.7 y 1.9 veces el contenido de fenoles totales del néctar de maracuyá y por lo tanto, su actividad antioxidante.

4.2 Recomendaciones

1. Deben ser evaluadas otras metodologías de extracción para disminuir los tiempos de preparación y aumentar el rendimiento.

2. Se debe evaluar la actividad antioxidante con otros métodos *in vitro* mediante reacciones de oxidación de matrices alimentarias como aceites o compuestos como azúcares que se acercan más al comportamiento real de los antioxidantes.

3. Es importante el estudio de identificación de compuestos fenólicos del polen apícola y la medición de la actividad antioxidante de los compuestos por separado para evaluar la calidad de los mismos.

4. Es importante una caracterización completa de los extractos etanólicos de polen apícola en cuanto a aminoácidos, azúcares, fibra y grasas entre otros análisis con el fin de identificar otros compuestos bioactivos y nutricionales del extracto.

5. Otros posibles estudios del producto pueden ser evaluar la vida útil de los antioxidantes encapsulados y la inclusión en otras matrices.

Bibliografía

Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. Food Chemistry, 152, 46-55.

Almaraz-Abarca, N., Campos, M. G., Delgado-Alvarado, E. A., Avila-Reyes, J. A., Herrera-Corral, J., González-Valdez, L. S., . . . Almeida, A. J. (2008). Pollen flavonoid/phenolic acid composition of four species of Cactaceae and its taxonomic significance. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 3(3), 534.

Almaraz-Abarca, N., da Graça Campos, M., Avila-Reyes, J. A., Naranjo-Jimenez, N., Herrera Corral, J., & Gonzalez-Valdez, L. S. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (< i> Prosopis juliflora</i>, Leguminosae). Journal of Food Composition and Analysis, 20(2), 119-124.

Almeida-Muradian, L., Pamplona, L. C., Coimbra, S. l., & Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. Journal of Food Composition and Analysis, 18(1), 105-111.

Aluko, R. E. (2012). Chapter 4: Bioactive Polyphenols and Carotenoids Functional foods and nutraceuticals: Springer.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(17), 7915-7922.

AOAC. (2000). Official methods of analysis (17 th ed.). Arlington, VA (USA): AOAC International.

Arena, E., Fallico, B., & Maccarone, E. (2001). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. Food Chemistry, 74(4), 423-427.

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual review of plant biology, 50(1), 601-639.

Bakowska-Barczak, A. M., & Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. Industrial Crops and Products, 34(2), 1301-1309.

Benzie, I. F., & Strain, J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in enzymology, 299, 15-27.

Bernal, R., Luisa Juana. (2012). Evaluación de las Propiedades Bioactivas de Mora (Rubus glaucus) y Agraz (Vaccinium meridionale Swartz), en Fresco y Durante Procesos de Transformación. Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., & Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. Trends in Food Science & Technology, 22(9), 498-508.

Bhandari, B. R., Datta, N., Crooks, R., Howes, T., & Rigby, S. (1997). A semi-empirical approach to optimise the quantity of drying aids required to spray dry sugar-rich foods. Drying Technology, 15(10), 2509-2525.

Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. Trends in Food Science & Technology, 31(2), 118-129.

Blasa, M., Gennari, L., Angelino, D., & Ninfali, P. (2010). Fruit and vegetable antioxidants in health. Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables, 37-58.

Bogdanov, S. (2011). The Bee Pollen Book. Bulgaria: Bee Product Science.

Bors, W., Michel, C., & Saran, M. (1994). Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. Methods in enzymology (USA), 234, 420-429.

Bower, J. A. (2009). Statistical methods for food science: introductory procedures for the food practitioner: John Wiley & Sons.

Brennan, J. G., & Grandison, A. S. (2012). Food processing handbook: John Wiley & Sons.

Bruschi, M., Cardoso, M., Lucchesi, M., & Gremião, M. (2003). Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. International Journal of Pharmaceutics, 264(1), 45-55.

Cabrera, C., & Montenegro, G. (2013). Pathogen control using a natural Chilean bee pollen extract of known botanical origin. Ciencia e Investigación Agraria, 40(1), 223-230.

Çam, M., İçyer, N. C., & Erdoğan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. LWT - Food Science and Technology, 55(1), 117-123.

Campos, M., Frigerio, C., Lopes, J., & Bogdanov, S. (2010). What is the future of Bee-Pollen. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 2(4), 131-144.

Campos, M., Markham, K. R., Mitchell, K. A., & da Cunha, A. P. (1997). An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. Phytochemical Analysis, 8(4), 181-185.

Campos, M. G., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L. B. d., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. Journal of apicultural research, 47(2), 154.

Campos, M. G., Webby, R. F., Markham, K. R., Mitchell, K. A., & Da Cunha, A. P. (2003). Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(3), 742-745.

Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radical Biology and Medicine, 22(5), 749-760.

Carpes, S., Mourao, G., De Alencar, S., & Masson, M. (2009). Chemical composition and free radical scavenging activity of Apis mellifera bee pollen from Southern Brazil. Brazilian Journal of Food Technology, 12(1/4), 220-229.

Castelluccio, C., Paganga, G., Melikian, N., Bolwell, G. P., Pridham, J., Sampson, J., & Rice-Evans, C. (1995). Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. FEBS letters, 368(1), 188-192.

Castro, L., Zuluaga, C., Quicazán, M., Pastrana, Y., & de Paula, C. (2014). Evaluación de las características nutricionales y bioactivas de hidrolizados enzimáticos de polen apícola. Paper presented at the Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo ENID 2014.

Cavalcanti, R. N., Forster-Carneiro, T., Gomes, M. T. M. S., Rostagno, M. A., Prado, J. M., & Meireles, M. A. A. (2013). Natural Product extraction Principles y Applications (pp. 36-46): Royal Society of Chemistry.

Chantarudee, A., Phuwapraisirisan, P., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., & Chanchao, C. (2012). Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from Apis mellifera hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. BMC complementary and alternative Medicine, 12(1), 45.

Cheuyglintase, K. (2009). Spray Drying of Fruit Juice with Vegetable Fibre as a Carrier: A Thesis Presented in Fulfilment of the Requirements of the Degree of Doctor of Philosophy in Chemical and Process Engineering at the University of Canterbury. University of Canterbury, Christchurch, New Zealand.

da Silva, F. C., da Fonseca, C. R., de Alencar, S. M., Thomazini, M., Balieiro, J. C., Pittia, P., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. Food and Bioproducts Processing, 91(1), 28-36.

Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., & Marín-Arroyo, M. R. (2013). Optimization of a wall material formulation to microencapsulate a grape seed extract using a mixture design of experiments. Food and Bioprocess Technology, 6(4), 941-951.

Dean, R., Fu, S., Stocker, R., & Davies, M. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem. J, 324, 1-18.

Dehghan, G., & Khoshkam, Z. (2012). Tin (II)–quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity. Food Chemistry, 131(2), 422-426.

Díaz, C., Zuluaga, C., Fuenmayor, C., & Martínez, T. (2009). Special features of bee pollen production in Colombia. Paper presented at the 41st World Congress of Apiculture-Apimondia Montpellier, France.

Díaz, C., Zuluaga, C., Morales, C., & Quicazán, M. (2012). Determinación de fibra dietaría en polen apícola colombiano. Vitae, 19(1), S454-S456.

Domínguez-Valhondo, D., Bohoyo Gil, D., Hernández, M. T., & González-Gómez, D. (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. International Journal of Food Science & Technology, 46(10), 2204-2211.

Dong, J., Gao, K., Wang, K., Xu, X., & Zhang, H. (2015). Cell Wall Disruption of Rape Bee Pollen Treated with Combination of Protamex Hydrolysis and Ultrasonication. Food Research International, 75, 123-130.

Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(5), 1768-1774.

Durán, J., Andrés. (2014). Diseño de un sistema de secado y separación de impurezas para polen apícola en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S., Cem Liman, B., Altınordulu, Ş., & Soyer Sarıca, Z. (2009). Evaluation of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat. Ecotoxicology and environmental safety, 72(3), 931-937.

Fanali, C., Dugo, L., & Rocco, A. (2013). Nano-liquid chromatography in nutraceutical analysis: Determination of polyphenols in bee pollen. Journal of Chromatography A, 1313, 270-274.

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols–a review. Trends in Food Science & Technology, 21(10), 510-523.

Feás, X., Vázquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., & Iglesias, A. (2012). Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. Molecules, 17(7), 8359-8377.

Forcone, A., Aloisi, P. V., Ruppel, S., & Munoz, M. (2011). Botanical composition and protein content of pollen collected by Apis mellifera L. in the north-west of Santa Cruz (Argentinean Patagonia). Grana, 50(1), 30-39.

Friedman, M., & Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(6), 2101-2110.

Fuenmayor, C., Zuluaga, C., Díaz, C., Quicazán, M., Cosio, M., & Mannino, S. (2014). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales del polen apícola colombiano. (Spanish). Revista MVZ Córdoba, 19(1), 4003-4014.

Fuenmayor, C. A. (2009). Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para la obtención de un suplemento nutricional proteico. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Fukumoto, L., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(8), 3597-3604.

Gao, K., Zhang, H.-c., & Dong, J. (2011). Protamex Hydrolysis and Cell Wall of Rape Bee Pollen. Food Science, 20, 022.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Food Research International, 40(9), 1107-1121.

Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2005). Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. Journal of Food Engineering, 66(1), 35-42.

Grace, S., Logan, B., & Adams, W. (1998). Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in Mahonia repens. Plant, Cell & Environment, 21(5), 513-521.

Grace, S. C. (2005). Chapter 6 Phenolics as antioxidants Antioxidants and reactive oxygen species in plants (pp. 141). UK: Blackwell.

Gros, E. G., Pomillo, A. B., Seldes, A. M., & Burton, G. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales: OEA.

Hall III, C. (2001). Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources Antioxidants in food: practical applications

Cambridge, England: CRC press.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of nutritional biochemistry, 13(10), 572-584.

Hintz, T., Matthews, K. K., & Di, R. (2015). The use of plant antimicrobial compounds for food preservation. BioMed research international, 2015.

Honglian, S., Noguchi, N., Niki, E., Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). Introducing natural Antioxidants. Antioxidants in food: practical applications, 147-158.

Hoye Jr, C., & Ross, C. F. (2011). Total phenolic content, consumer acceptance, and instrumental analysis of bread made with grape seed flour. Journal of Food Science, 76(7), S428-S436.

Human, H., & Nicolson, S. W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of Aloe greatheadii var. davyana (Asphodelaceae). Phytochemistry, 67(14), 1486-1492.

Huvaere, K., & Skibsted, L. H. (2015). Flavonoids protecting food and beverages against light. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(1), 20-35.

Kaur, R., Kalia, P., Kumar, N. R., & Harjai, K. (2013). Preliminary studies on different extracts of some honey bee products. Journal of Applied and Natural sciences, 5(2), 420-422.

Khider, M., Elbanna, K., Mahmoud, A., & Owayss, A. A. (2013). Egyptian honeybee pollen as antimicrobial, antioxidant agents, and dietary food supplements. Food Science and Biotechnology, 22(5), 1-9.

Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., & Gliszczyńska-Świgło, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. Journal of Food Composition and Analysis, 20(3–4), 313-322.

Kroyer, G., & Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2(3), 171-174.

Laranjinha, J. A., Almeida, L. M., & Madeira, V. M. (1994). Reactivity of dietary phenolic acids with peroxyl radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. Biochemical pharmacology, 48(3), 487-494.

Laverde, J., Egea, L., Rodriguez, D., & Peña, J. (2010). Agenda Prospectiva de Investigación y Desarrollo Tecnológico. La Cadena Productiva de las abejas y la apicultura en Colombia estafa Énfasis en miel de abejas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (1 ed.). Bogotá, Colombia: Giro Editores Ltda.

LeBlanc, B. W., Davis, O. K., Boue, S., DeLucca, A., & Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. Food Chemistry, 115(4), 1299-1305.

Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. Food Chemistry, 100(1), 237-240.

Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., & Taylor, D. K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. Food Chemistry, 129(2), 570-576.

Liu, X.-d., Zhang, F.-b., Zhou, B., Shan, H., & Chen, P.-Y. (2015). Effect of sonication on different quality parameters of Pinus massoniana pollen. Ultrasonics Sonochemistry, 22, 174-181.

MacDougall, D. (2002). Colour measurement of food: principles and practice. In D. MacDougall (Ed.), Colour in food. Improving quality. (pp. 33-63). Boca Raton, USA: Woodhead Publishing Limited and CRC Press.

Mărghitaş, L. A., Stanciu, O. G., Dezmirean, D. S., Bobiş, O., Popescu, O., Bogdanov, S., & Campos, M. G. (2009). < i> In vitro</i> antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. Food Chemistry, 115(3), 878-883.

Marinova, M. D., & Tchorbanov, B. P. (2011). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from honeybee-collected pollen using plant enzymes. Enzyme research, 2010.

Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. Food Chemistry, 135(3), 1520-1526.

Martinez, T. (2006). Diagnóstico de la actividad apícola y de la crianza de abejas en Colombia. (I. I. d. c. p. a. IICA Ed. 1 ed.). Bogotá, Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Mazza, G. (2012). Chapter 7: Wine and Cardiovascular Benefits Functional Foods and Cardiovascular Disease (pp. 141). Boca Raton, FL RCR Press.

Miravet, G., Alacid, M., Obón, J. M., & Fernández-López, J. A. (2015). Spray-drying of pomegranate juice with prebiotic dietary fibre. International Journal of Food Science & Technology.

Moon, J.-H., & Terao, J. (1998). Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(12), 5062-5065.

Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. Food and Chemical Toxicology, 49(5), 1096-1101.

Moreti, A. C. d. C. C. (2006). Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. Ciência Rural, 36(3).

Moss, B. (2002). The chemistry of food colour Colour in Food: Improving Quality (1 ed., pp. 145-178). Cambridge, England: Woodhead publishing Limited and CRC Press.

Murkovic, M. (2003). Phenolic compounds (Vol. 7, pp. 4507-4514): Academic Press: New York.

Nardini, M., D'Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Di Felice, M., & Scaccini, C. (1995). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. Free Radical Biology and Medicine, 19(5), 541-552.

Nates-Parra, G., Montoya, P., Obregón, D., Ramírez, N., Solarte, V., & Chamorro, F. (2010). La melisopalinología como herramienta para la diferenciación por origen botánico de productos de abejas en Colombia. Sincelejo, Colombia: Encuentro Nacional de Apicultura.

Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 23(2), 182-186.

Negri, G., Teixeira, E. W., Florêncio Alves, M. L. T. M., Moreti, A. C. d. C. C., Otsuk, I. P., Borguini, R. G., & Salatino, A. (2011). Hydroxycinnamic acid amide derivatives, phenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from southeast Brazil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(10), 5516-5522.

Nicolson, S. W. (2011). Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two: review article. African Zoology, 46(2), 197-204.

Nogueira, C., Iglesias, A., & Estevinho, L. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. International journal of molecular sciences, 13(9), 11173-11187.

Odoux, J.-F., Feuillet, D., Aupinel, P., Loublier, Y., Tasei, J.-N., & Mateescu, C. (2012). Territorial biodiversity and consequences on physico-chemical characteristics of pollen collected by honey bee colonies. Apidologie, 43(5), 561-575.

Oliveira, K. C., Moriya, M., Azedo, R. A., Almeida-Muradian, L. B. d., Teixeira, E. W., Alves, M. L., & Moreti, A. C. (2009). Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. Química Nova, 32(5), 1099-1102.

Pang, S. F., Yusoff, M. M., & Gimbun, J. (2014). Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of< i> Orthosiphon stamineus</i> extracts. Food Hydrocolloids, 37, 159-165.

Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. Food and Chemical Toxicology, 63, 233-239.

Pérez-Serradilla, J., & Luque de Castro, M. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. Food Chemistry, 124(4), 1652-1659.

Pinto, B., Caciagli, F., Riccio, E., Reali, D., Šarić, A., Balog, T., . . . Scarpato, R. (2010). Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from< i> Cystus incanus</i> and< i> Salix alba</i> as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. European journal of medicinal chemistry, 45(9), 4122-4128.

Premarajah, R., & Langrish, T. (2009). The Effect of Spray Drying Conditions on Yields for Bioactive Extracts. Engineering Our Future: Are We up to the Challenge?: 27-30 September 2009, Burswood Entertainment Complex, 1687.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4290-4302.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9), 1231-1237.

Rebelo, M. J., Rego, R., Ferreira, M., & Oliveira, M. C. (2013). Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods. Food Chemistry, 141(1), 566-573. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.120

Ren, X.-n., Zhang, H.-c., Dong, J., Li, H.-r., & Zhao, L.-l. (2009). Effect of Papain Treatment on Permeability of Cell Wall of Rape Pollen. Food Science, 23, 056.

Revelo, D. A. (2014). Microencapsulación de tomate de árbol rojo (solanum betaceum cav.), mediante spray drying para aplicación en productos lácteos. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Colombia.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in plant science, 2(4), 152-159.

Rodriguez-Amaya, D. (2003). Carotenoids occurrence, properties and determination: Elsevier Ltda.

Rosales, M. U., Brown, K., & Ross, C. F. (2012). Antioxidant activity and consumer acceptance of grape seed flour-containing food products. International Journal of Food Science & Technology, 47(3), 592-602.

Ruenroengklin, N., Zhong, J., Duan, X., Yang, B., Li, J., & Jiang, Y. (2008). Effects of various temperatures and pH values on the extraction yield of phenolics from litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. International journal of molecular sciences, 9(7), 1333-1341.

Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (< i> Opuntia ficus-indica</i>). Food Chemistry, 114(2), 616-622.

Saikia, S., Mahnot, N. K., & Mahanta, C. L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. Food Chemistry, 171(0), 144-152.

Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., & Riceevans, C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Archives of biochemistry and biophysics, 322(2), 339-346.

Salazar, C., Céspedes, C., & Díaz, C. (2013). Propiedades bioactivas y antioxidantes de polen apícola proveniente del bosque alto- andino INDA.

Salazar, G., Claudia. (2014). Características bioactivas y sensoriales en procesos de fermentación en fase sólida de polen apícola Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Sansone, F., Mencherini, T., Picerno, P., d'Amore, M., Aquino, R. P., & Lauro, M. R. (2011). Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. Journal of Food Engineering, 105(3), 468-476.

Šarić, A., Balog, T., Sobočanec, S., Kušić, B., Šverko, V., Rusak, G., . . . Reali, D. (2009). Antioxidant effects of flavonoid from Croatian< i> Cystus incanus</i> L. rich bee pollen. Food and Chemical Toxicology, 47(3), 547-554.

Sattler, J. A. G., de Melo, I. L. P., Granato, D., Araújo, E., de Freitas, A. d. S., Barth, O. M., . . . de Almeida-Muradian, L. B. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. Food Research International, 77, 82-91.

Schaich, K., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. Journal of Functional Foods, 14, 111-125.

Serra Bonvehí, J., & Escolà Jordà, R. (1997). Nutrient Composition and Microbiological Quality of Honeybee-Collected Pollen in Spain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(3), 725-732.

Serra Bonvehí, J., Soliva Torrentó, M., & Centelles Lorente, E. (2001). Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(4), 1848-1853.

Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28(1), 49-55.

Smirnoff, N. (2005). Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions Antioxidants and reactive oxygen species in plants (pp. 53-86). UK: Blackwell publishing Ltd.

Smith, J., & Charter, E. (2011) Functional Food Product Development: John Wiley & Sons.

Solgajová, M., Nôžková, J., & Kadáková, M. (2014). Quality of durable cookies enriched with rape bee pollen. Journal of Central European Agriculture, 15(1).

Stanley, R. G., & Linskens, H. F. (1974). Pollen: biology, biochemistry, management. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Talcott, S. T., Percival, S. S., Pittet-Moore, J., & Celoria, C. (2003). Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (Passiflora edulis). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(4), 935-941.

Tseng, A., & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. Food Chemistry, 138(1), 356-365.

Ubbink, J., & Krüger, J. (2006). Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. Trends in Food Science & Technology, 17(5), 244-254.

Ulusoy, E., & Kolayli, S. (2014). Phenolic composition and antioxidant properties of Anzer bee pollen. Journal of Food Biochemistry, 38(1), 73-82.

Ungure, E., Straumīte, E., Muižniece-Brasava, S., & Dukaļska, L. (2013). Consumer Attitude and Sensory Evaluation of Marshmallow. Paper presented at the Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.

USDA. (2015). Composition of foods, raw, processed, prepared. USDA national nutrient database for standard reference, release 20. USDA-ARS, Beltsville Human Nutrition Research Center, Nutrient Data Laboratory, Beltsville, Maryland. Retrieved Noviembre, 2015, from http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search

Vamanu, A., Vamanu, E., Drugulescu, M., Popa, O., & Câmpeanu, G. (2006). Identification of a Lactic Bacterium Strain Used for Obtaining a Pollen-Based Probiotic Product. Turkish Journal of Biology, 30(2).

Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. Food Chemistry, 111(4), 816-823.

Vicente, A. R., Manganaris, G. A., Sozzi, G. O., & Crisosto, C. H. (2009). Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. In W. J. Florkowski, R. L. Shewfelt, B. Brueckner & S. E. Prussia (Eds.), Postharvest Handling (2 ed., pp. 57-106). San Diego, U.S: Academic Press.

Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P., & Popović, L. M. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in< i> Satureja montana</i> dry powder extract obtained by spray drying technique. Powder Technology, 258, 209-215.

Waris, G., & Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. Journal of carcinogenesis, 5(1), 14.

Wiermann, R., & Vieth, K. (1983). Outer pollen wall, an important accumulation site for flavonoids. Protoplasma, 118(3), 230-233.

Xu, X., Dong, J., Mu, X., & Sun, L. (2011). Supercritical CO< sub> 2</sub> extraction of oil, carotenoids, squalene and sterols from lotus (< i> Nelumbo nucifera</i> Gaertn) bee pollen. Food and Bioproducts Processing, 89(1), 47-52.

Yen, G.-C., & Duh, P.-D. (1993). Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. Journal of the American Oil Chemists' Society, 70(4), 383-386.

Young, D., Tsao, R., & Mine, Y. (2011). Nutraceuticals and antioxidant function. Functional Foods, Nutraceuticals, and Degenerative Disease Prevention, 75-112.

Zuluaga, C. M., Moreno, C. D., & Quicazán, M. C. (2011). Quimiometría aplicada a la diferenciación por origen de productos de las abejas. Alimentos Hoy, 20(24), 23-46.

Zuluaga, C. M., Quicazán, M. C., & Serrato, J. C. (2014). Influencia de tratamientos térmicos sobre el contenido de flavonoides totales y actividad antioxidante en polen apícola. ENID.

Zuluaga, C. M., Serrato, J. C., & Quicazán, M. C. (2014). VALORIZATION ALTERNATIVES OF COLOMBIAN BEE-POLLEN FOR ITS USE AS FOOD RESOURCE–A STRUCTURED REVIEW. Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica, 21(3), 237-247.

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chemistry, 114(1), 310-316.

Anexo A: Análisis estadístico

- ANOVA de la AAO, CFT, porcentaje de recuperación de los microencapsulados a diferentes condiciones

Análisis de Varianza para FRAP - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TEMP	0,00000852029	2	0,00000426015	22,38	0,0000
B:MD	0,000218832	1	0,000218832	1149,62	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,00000709888	2	0,00000354944	18,65	0,0000
RESIDUOS	0,00000361667	19	1,90351E-7		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00026136	24			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Verificación de Varianza de FRAP

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	1,36994	0,279367

Pruebas de Normalidad para residuos de FRAP

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,931606	0,0990603

Análisis de Varianza para TEAC ABTS - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:MD	0,000199443	1	0,000199443	1082,69	0,0000
B:TEMP	0,0000116575	2	0,00000582873	31,64	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0000423545	2	0,0000211772	114,96	0,0000
RESIDUOS	0,0000035	19	1,84211E-7		
TOTAL (CORREGIDO)	0,000282	24			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de TEAC

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,931606	0,0990603

Verificación de Varianza de TEAC

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	0,542857	0,741606

Análisis de Varianza para % Recuperación - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
COVARIABLES					
cv%H	222,739	1	222,739	9,45	0,0058
EFECTOS PRINCIPALES					
A:MD	1269,65	1	1269,65	53,87	0,0000
B:TEMP	1980,22	2	990,11	42,01	0,0000
INTERACCIONES					
AB	677,724	2	338,862	14,38	0,0001
RESIDUOS	494,939	21	23,5685		
TOTAL (CORREGIDO)	4707,67	27			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de % de recuperación

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,968868	0,581245

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	1,04334	0,417482

- Contenido de fenoles totales ANOVA y prueba de rangos múltiples

Análisis de Varianza para CFT - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
COVARIABLES					
cvE	0,051787	1	0,051787	8,32	0,0092
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TEMP	0,447649	2	0,223825	35,97	0,0000
B:MD	33,0831	1	33,0831	5316,81	0,0000
RESIDUOS	0,124447	20	0,00622236		
TOTAL (CORREGIDO)	41,8209	24			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS CFT

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,968766	0,621781

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	0,715258	0,619699

Pruebas de Múltiple Rangos para FT por TRATAMIENTO

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

TRATAMIENTO	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
160-100	5	3,095	X
190-100	4	3,10425	X
130-100	3	3,424	X
190-50	4	5,59925	X
160-50	4	5,682	X
130-50	5	5,9216	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
130-100 - 130-50	*	-2,4976	0,227984
130-100 - 160-100	*	0,329	0,227984
130-100 - 160-50	*	-2,258	0,238431
130-100 - 190-100	*	0,31975	0,238431
130-100 - 190-50	*	-2,17525	0,238431
130-50 - 160-100	*	2,8266	0,19744
130-50 - 160-50	*	0,2396	0,209417
130-50 - 190-100	*	2,81735	0,209417
130-50 - 190-50	*	0,32235	0,209417
160-100 - 160-50	*	-2,587	0,209417
160-100 - 190-100		-0,00925	0,209417
160-100 - 190-50	*	-2,50425	0,209417
160-50 - 190-100	*	2,57775	0,220745
160-50 - 190-50		0,08275	0,220745
190-100 - 190-50	*	-2,495	0,220745

* indica una diferencia significativa.

- Correlación prueba de Pearson

	ABTS	FRAP	FT
ABTS		0,9231	0,8871
		(25)	(25)
		0,0000	0,0000
FRAP	0,9231		0,9772
	(25)		(25)
	0,0000		0,0000
FT	0,8871	0,9772	
	(25)	(25)	

	0,0000	0,0000	

Correlación
(Tamaño de Muestra)
Valor-P

- Análisis de varianza de los datos de rendimiento, actividad acuosa y humedad de los procesos de secado

Análisis de Varianza para rendimiento - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:MD	2,40179	1	2,40179	0,07	0,7972
B:TS	576,998	2	288,499	8,33	0,0063
INTERACCIONES					
AB	446,474	2	223,237	6,44	0,0140
RESIDUOS	381,052	11	34,6411		
TOTAL (CORREGIDO)	1550,76	16			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Verificación de Varianza de rendimiento

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	0,151717	0,860625

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de rendimiento

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,964612	0,698937

Análisis de Varianza para a_w - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:aw y H.MD	0,000278004	1	0,000278004	0,54	0,4774
B:aw y H.TEMP	0,00175434	2	0,00087717	1,69	0,2228
INTERACCIONES					
AB	0,000625341	2	0,00031267	0,60	0,5623
RESIDUOS	0,00675142	13	0,00051934		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00929116	18			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Normalidad para a_w RESIDUOS

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,935675	0,227322

Verificación de Varianza de a_w

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	0,413315	0,831231

Análisis de Varianza para humedad - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:aw y H.MD	0,11056	1	0,11056	0,56	0,4673
B:aw y H.TEMP	0,661068	2	0,330534	1,68	0,2251
INTERACCIONES					
AB	0,236772	2	0,118386	0,60	0,5631
RESIDUOS	2,56331	13	0,197178		
TOTAL (CORREGIDO)	3,52744	18			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Normalidad para Humedad RESIDUOS

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,933958	0,211676

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	0,416293	0,829202

- ANOVA de Solubilidad de los microencapsulados

Análisis de Varianza para solubilidad - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:MD	11,5821	1	11,5821	1,58	0,2284
B:TEMP	23,6773	2	11,8386	1,61	0,2322
RESIDUOS	110,173	15	7,34488		
TOTAL (CORREGIDO)	143,995	18			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de solubilidad

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,964245	0,652535

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	0,6532	0,664568

- ANOVA de los resultados de densidad aparente de los microencapsulados

Análisis de Varianza para densidad aparente - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:MD	0,00949696	1	0,00949696	12,40	0,0038
B:TEMP	0,756216	2	0,378108	493,87	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0141163	2	0,00705814	9,22	0,0032
RESIDUOS	0,00995275	13	0,000765596		
TOTAL (CORREGIDO)	0,785729	18			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Verificación de Varianza de la densidad aparente

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	0,743543	0,604721

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de densidad aparente

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,979289	0,917205

- CFT en el néctar de maracuyá con inclusión del microencapsulado

Tabla ANOVA para Folin

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	3,85691	5	0,771383	941,27	0,0000
Intra grupos	0,0163903	20	0,000819514		
Total (Corr.)	3,8733	25			

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	0,650353	0,664575

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,960295	0,41694

Pruebas de Múltiple Rangos para Folin

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

_1	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
NM	4	0,296736	X
575	4	0,499524	X
742	4	0,526117	XX
776	6	0,583105	X
NM+2	4	0,916146	X
NM+5	4	1,51542	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
575 - 742		-0,0265929	0,0674205
575 - 776	*	-0,0835812	0,0615462

575 - NM	*	0,202788	0,0674205
575 - NM+2	*	-0,416623	0,0674205
575 - NM+5	*	-1,0159	0,0674205
742 - 776		-0,0569884	0,0615462
742 - NM	*	0,229381	0,0674205
742 - NM+2	*	-0,39003	0,0674205
742 - NM+5	*	-0,989306	0,0674205
776 - NM	*	0,286369	0,0615462
776 - NM+2	*	-0,333041	0,0615462
776 - NM+5	*	-0,932318	0,0615462
NM - NM+2	*	-0,619411	0,0674205
NM - NM+5	*	-1,21869	0,0674205
NM+2 - NM+5	*	-0,599277	0,0674205

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de TEAC

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,914838	0,0934984

Verificación de Varianza de TEAC

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	1,6818	0,208137

Pruebas de Múltiple Rangos para TEAC con ABTS por tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

TTo	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
NM	3	0,000695175	X
575	3	0,00123873	X

742	3	0,00192633	X
776	3	0,00226993	XX
NM+2	4	0,002276	X
NM+5	3	0,00389756	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
575 - 742	*	-0,000687598	0,000345692
575 - 776	*	-0,0010312	0,000345692
575 - NM	*	0,000543556	0,000345692
575 - NM+2	*	-0,00103727	0,000323366
575 - NM+5	*	-0,00265883	0,000345692
742 - 776		-0,000343605	0,000345692
742 - NM	*	0,00123115	0,000345692
742 - NM+2	*	-0,000349668	0,000323366
742 - NM+5	*	-0,00197124	0,000345692
776 - NM	*	0,00157476	0,000345692
776 - NM+2		-0,00000606292	0,000323366
776 - NM+5	*	-0,00162763	0,000345692
NM - NM+2	*	-0,00158082	0,000323366
NM - NM+5	*	-0,00320239	0,000345692
NM+2 - NM+5	*	-0,00162157	0,000323366

- ANOVA de los parámetros instrumentales de color de los microencapsulados L*a*b* y los parámetros calculados croma

Parámetro L de color

Análisis de Varianza para L_ - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*

EFECTOS PRINCIPALES					
A:MD	0,821133	1	0,821133	0,58	0,4549
B:TEMP	39,1799	2	19,5899	13,74	0,0001
RESIDUOS	35,6313	25	1,42525		
TOTAL (CORREGIDO)	75,3593	28			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de L*

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,958304	0,334129

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	2,21379	0,0876386

Pruebas de Múltiple Rangos para L*_ por TRATAMIENTO

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

TRATAMIENTO	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
130-50	6	94,325	X
130-100	5	95,406	XX
160-100	4	96,2275	XX
190-50	6	97,1283	X
160-50	4	97,385	X
190-100	4	97,8725	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
130-100 - 130-50		1,081	2,23587
130-100 - 160-100		-0,8215	2,47695
130-100 - 160-50		-1,979	2,47695
130-100 - 190-100		-2,4665	2,47695
130-100 - 190-50		-1,72233	2,23587
130-50 - 160-100		-1,9025	2,38344
130-50 - 160-50	*	-3,06	2,38344
130-50 - 190-100	*	-3,5475	2,38344
130-50 - 190-50	*	-2,80333	2,13182
160-100 - 160-50		-1,1575	2,61093
160-100 - 190-100		-1,645	2,61093
160-100 - 190-50		-0,900833	2,38344
160-50 - 190-100		-0,4875	2,61093
160-50 - 190-50		0,256667	2,38344
190-100 - 190-50		0,744167	2,38344

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza para a* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:MD	0,443685	1	0,443685	395,65	0,0000
B:TEMP	1,94372	2	0,971859	866,63	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2,86062	2	1,43031	1275,45	0,0000
RESIDUOS	0,0257926	23	0,00112142		
TOTAL (CORREGIDO)	6,03825	28			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de a*

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,954958	0,27773

Verificación de Varianza de a*

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	0,519488	0,7589

Pruebas de Múltiple Rangos para a* por TRATAMIENTO

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

TRATAMIENTO	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
190-50	6	-0,871667	X
130-100	5	-0,788	X
160-50	4	-0,7875	X
190-100	4	-0,78	X
160-100	4	-0,51325	X
130-50	6	0,3325	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
130-100 - 130-50	*	-1,1205	0,0663865
130-100 - 160-100	*	-0,27475	0,0735446
130-100 - 160-50		-0,0005	0,0735446
130-100 - 190-100		-0,008	0,0735446
130-100 - 190-50	*	0,0836667	0,0663865
130-50 - 160-100	*	0,84575	0,0707683
130-50 - 160-50	*	1,12	0,0707683
130-50 - 190-100	*	1,1125	0,0707683
130-50 - 190-50	*	1,20417	0,0632971
160-100 - 160-50	*	0,27425	0,0775228
160-100 - 190-100	*	0,26675	0,0775228
160-100 - 190-50	*	0,358417	0,0707683
160-50 - 190-100		-0,0075	0,0775228
160-50 - 190-50	*	0,0841667	0,0707683
190-100 - 190-50	*	0,0916667	0,0707683

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza para b* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:MD	195,256	1	195,256	12533,40	0,0000
B:TEMP	118,744	2	59,3719	3811,06	0,0000
INTERACCIONES					
AB	128,889	2	64,4446	4136,68	0,0000
RESIDUOS	0,358313	23	0,0155788		
TOTAL (CORREGIDO)	506,582	28			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de b*

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,970329	0,605615

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	1,98044	0,119752

Pruebas de Múltiple Rangos para b* por TRATAMIENTO

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

TRATAMIENTO	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
190-100	4	7,41	X
130-100	5	7,792	X
160-100	4	8,345	X
160-50	4	9,35	X
190-50	6	11,24	X
130-50	6	18,7867	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
130-100 - 130-50	*	-10,9947	0,247437
130-100 - 160-100	*	-0,553	0,274116
130-100 - 160-50	*	-1,558	0,274116
130-100 - 190-100	*	0,382	0,274116
130-100 - 190-50	*	-3,448	0,247437
130-50 - 160-100	*	10,4417	0,263768
130-50 - 160-50	*	9,43667	0,263768
130-50 - 190-100	*	11,3767	0,263768
130-50 - 190-50	*	7,54667	0,235922
160-100 - 160-50	*	-1,005	0,288944
160-100 - 190-100	*	0,935	0,288944
160-100 - 190-50	*	-2,895	0,263768
160-50 - 190-100	*	1,94	0,288944
160-50 - 190-50	*	-1,89	0,263768
190-100 - 190-50	*	-3,83	0,263768

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza para C - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:MD	197,626	1	197,626	1876,23	0,0000
B:TEMP	115,645	2	57,8223	548,96	0,0000
INTERACCIONES					
AB	131,073	2	65,5367	622,20	0,0000
RESIDUOS	2,42262	23	0,105331		
TOTAL (CORREGIDO)	510,669	28			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,966658	0,5126

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	1,93981	0,126473

Pruebas de Múltiple Rangos para C por TRATAMIENTO

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

TRATAMIENTO	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
190-100	4	7,45096	X
130-100	5	7,83177	X
160-100	4	8,36082	X
160-50	4	9,38315	X
190-50	6	11,2738	X
130-50	6	18,7896	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
130-100 - 130-50	*	-10,9578	0,249574
130-100 - 160-100	*	-0,52905	0,276484
130-100 - 160-50	*	-1,55138	0,276484
130-100 - 190-100	*	0,38081	0,276484
130-100 - 190-50	*	-3,44201	0,249574
130-50 - 160-100	*	10,4288	0,266047
130-50 - 160-50	*	9,40647	0,266047
130-50 - 190-100	*	11,3387	0,266047
130-50 - 190-50	*	7,51583	0,237959
160-100 - 160-50	*	-1,02233	0,291439
160-100 - 190-100	*	0,909861	0,291439
160-100 - 190-50	*	-2,91296	0,266047
160-50 - 190-100	*	1,93219	0,291439
160-50 - 190-50	*	-1,89063	0,266047

190-100 - 190-50	*	-3,82282	0,266047

* indica una diferencia significativa.

- Analisis de Kruskal Wallis para parámetros calculados de color Hº y ΔE

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de Hº

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,874259	0,00221684

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	0,872079	0,514941

Prueba de Kruskal-Wallis para hº por TRATAMIENTO

TRATAMIENTO	*Tamaño Muestra*	*Rango Promedio*
130-100	5	23,8
130-50	6	3,5
160-100	4	8,5
160-50	4	18,25
190-100	4	26,5
190-50	6	13,6667

Estadístico = 26,643 Valor-P = 0,0000669385

Pruebas de Normalidad para RESIDUOS de ΔE

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,909882	0,0183142

Verificación de Varianza de ΔE

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	1,34696	0,280398

Prueba de Kruskal-Wallis para ΔE **por TRATAMIENTO**

TRATAMIENTO	*Tamaño Muestra*	*Rango Promedio*
130-100	5	11,6
130-50	6	26,5
160-100	4	7,75
160-50	4	12,5
190-100	4	3,5
190-50	6	20,5

Estadístico = 24,7869 Valor-P = 0,000153175

Anexo B: Puntajes de las pruebas a consumidores

Tabla 4-1: Puntuación asignada por los consumidores a néctares de maracuyá con adición de microencapsulados de extractos de polen en escala hedónica.

	muestras				**muestras**				**muestras**		
panelista	**575**	**742**	**776**	**panelista**	**575**	**742**	**776**	**panelista**	**575**	**742**	**776**
1	5	4	1	22	5	4	3	43	4	5	4
2	4	4	3	23	4	1	1	44	4	3	2
3	4	4	3	24	4	4	3	45	4	3	2
4		4	5	25	4	5	4	46	4	4	4
5	5	4	3	26	4	3	3	47	4	5	4
6	4	4	3	27	4	4	3	48	4	3	2
7	4	4	3	28	3	4	3	49	4	5	4
8	4	3	4	29	4	5	5	50	4	3	3
9	4	3	3	30	5	3	3	51	4	5	4
10	4	3	3	31	4	4	3	52	5	5	5
11	4	4	1	32	5	1	1	53	5	3	4
12	3	4	3	33	4	4	4	54	5	4	4
13	5	3	4	34	4	4	4	55	4	3	4
14	4	1	4	35	4	5	3	56	4	4	1
15	3	4	4	36	4	3	2	57	2	2	3
16	4	3	1	37	5	4	3	58	3	4	4
17	3	4	3	38	4			59	5	4	3
18	5	4	4	39	5	5	4	60	5	5	4
19	4	4	4	40	5	4	4	61	4	3	3
20	5	3	3	41	5	5	3	62	5	3	5
21	4	4	3	42	4	3	4	**Total**	**255**	**226**	**197**

Tabla 4-2: Asignación de puntaje por panelista de acuerdo a su preferencia

	Preferencia				Preferencia		
Panelista	**575**	**742**	**776**	**Panelista**	**575**	**742**	**776**
1	1	2	3	32	1	2	3
2	2	1	3	33	3	2	1
3	2	1	3	34	2	1	3
4	3	2	1	35	2	1	3
5	1	2	3	36	1	2	3
6	1	2	3	37	1	2	3
7	1	2	3	38	1	2	3
8	1	2	3	39	2	1	3
9	1	2	3	40	2	1	3
10	2	1	3	41			
11	1	2	3	42	3	2	1
12	2	1	3	43	2	1	3
13	1	2	3	44	1	2	3
14	3	2	1	45	1	2	3
15	2	1	3	46	3	2	1
16	1	2	3	47	2	1	3
17	2	1	3	48	1	2	3
18	1	2	3	49	1	2	3
19	1	2	3	50	1	2	3
20	1	2	3	51	2	1	3
21	2	1	3	52	1	2	3
22	1	2	3	53	1	3	2
23	1	2	3	54	1	2	3
24	1	2	3	55	1	3	2
25	1	2	3	56	1	2	3
26	1	2	3	57	1	2	3
27	1	2	3	58	2	1	3
28	2	1	3	59	1	2	3
29	3	2	1	60	2	1	3
30	1	2	3	61	1	2	3
31	2	1	3	62	2	1	3