

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**EXTRACCIÓN DE CAPSANTINA A PARTIR DE HOJUELAS DE  
PIMENTÓN (*Capsicum annum L.*) Y ESTABILIZACIÓN POR  
MICROENCAPSULACIÓN**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magister en  
Ciencia de los Alimentos**

**MANUEL JESÚS PALMA ASTUDILLO**

Director de Tesis: Dra. Paz Robert Canales

Santiago, Chile

Marzo, 2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:**

**MANUEL JESUS PALMA ASTUDILLO**

**Ha sido aprobado por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencia de los Alimentos, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_**

**Director de Tesis:**

**Dra. Paz Robert Canales** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**M.S.c Nalda Romero Palacios** \_\_\_\_\_

**Dra. Carmen Sáenz Hernández** \_\_\_\_\_

**Dr. Luis Puente Díaz** \_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

**A mi familia y amigos**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco la colaboración en el desarrollo de esta tesis a:

Mi familia, en especial a mi hermana Patricia y Fernando quienes fueron un pilar fundamental en todo este proceso.

A mi profesora guía Sra. Paz Robert Canales por su infinita paciencia y apoyo incondicional.

A la comisión de tesis: Sra. Carmen Sáenz, Sra. Nalda Romero y Sr. Luis Puente.

A mis compañeros de laboratorio y amigos: Paula García, Paula Jiménez, Andrés Bustamante y Juan Carlos Moreno por su constante ayuda y acogida desde el primer día que llegué a trabajar al laboratorio.

Y a todos aquellos que de una u otra forma participaron en el desarrollo de esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDOS

	Página
1. INTRODUCCION	1
CAPÍTULO I	
1.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1.1 Caracterización de los pimentones	3
1.1.2 Consideraciones estructurales de la capsantina	4
1.1.3 Importancia biológica de la capsantina	5
1.1.4 Extracción de capsantina	6
1.1.5 Microencapsulación	6
1.1.5.1 Secado por atomización	7
1.1.5.2 Tipos de encapsulantes utilizados en la microencapsulación a través de secado por atomización	8
1.1.5.3 Microencapsulación de la oleoresina de pimentón	9
1.2 Hipótesis	10
1.3 Objetivos	10
1.3.1 Objetivo General	10
1.3.2 Objetivos Específicos	10
CAPÍTULO II	
2 MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Materiales	
2.1.1 Muestra	11
2.1.2 Materiales	11
2.2 Metodología	
2.2.1 Identificación de pigmentos carotenoides en hojuelas de pimentón peletizado ( <i>Capsicum annum</i> L.) y determinación del contenido de	

capsantina	12
2.2.1.1 Cromatografía en placa	12
2.2.1.2 Columna abierta	12
2.2.1.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	12
2.2.1.4 Solución estándar de capsantina	13
2.2.2 Preparación de un extracto de hojuelas de pimentón peletizado	13
2.2.3 Elaboración de las oleorresinas	14
2.2.4 Caracterización de las oleorresinas	14
2.2.4.1 Contenido de capsantina	14
2.2.4.2 Perfil de tocoferoles	14
2.2.5 Microencapsulación	15
2.2.5.1 Preparación de las dispersiones	15
2.2.5.2 Secado por atomización	15
2.2.5.3 Diseño estadístico	15
2.2.5.4 Caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas	16
2.2.6 Estudio de estabilidad de capsantina	17
2.2.6.1 Análisis cinético	17
2.2.7 Análisis estadístico	18

### CAPÍTULO III

## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación de pigmentos carotenoides en hojuelas de pimentón ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	19
3.2 Extracto de hoja de pimentón	22
3.3 Caracterización de las oleorresinas	24
3.4 Microencapsulación de las oleorresinas	25
3.5 Micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas	28

3.6	Estudio de estabilidad de capsantina	34
CAPÍTULO IV		
4	CONCLUSIONES	40
CAPÍTULO V		
5	BIBLIOGRAFIA	41
CAPÍTULO VI		
6	ANEXOS	48

## INDICE DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Estructura de la capsantina	4
FIGURA 2	Secador spray	8
FIGURA 3	Perfil de pigmentos carotenoides por HPLC en las hojuelas de pimentón ( <i>Capsicum annuum L.</i> )	21
FIGURA 4	Cinética de extracción de capsantina desde hojuelas de pimentón ( <i>Capsicum annuum L.</i> ) por el método de extracción y saponificación simultánea	22
FIGURA 5	Contenido de capsantina aplicando el método de extracción y saponificación simultánea con distintos solventes (300 minutos) y el método convencional	24
FIGURA 6	Gráfico de Superficie Respuesta estimada para el diseño composito central centrado en la cara para el sistema OS-C	29
FIGURA 7	Gráfico de Superficie Respuesta estimada para el diseño composito central centrado en la cara para el sistema OSS-C.	29
FIGURA 8	Distribución de tamaño de partícula para las micropartículas de los sistemas OC-C (A), OS-C (B) y OSS-C (C) obtenidas bajo condiciones óptimas	32
FIGURA 9	Microfotografías SEM para las micropartículas de los sistemas OC-C (A); OS-C (B) y OSS-C (C), obtenidas bajo condiciones óptimas (Mag. 300 Kx).	33
FIGURA 10	Cinética de degradación de capsantina para las macropartículas de los sistemas OC-C (A), OS-C (B), OSS-C (C) obtenidas bajo condiciones óptimas	35
FIGURA 11	Línea isocinética para degradación de capsantina	39



## INDICE DE TABLAS

		Página
TABLA 1	Composición de los principales ácidos grasos del aceite de girasol utilizado en la elaboración de las oleorresinas	14
TABLA 2	Niveles para las variables independientes usadas en el diseño experimental para la encapsulación de los sistemas oleorresina saponificada (OS) y oleorresina sin saponificar (OSS).	16
TABLA 3	Separación por columna abierta e identificación de pigmentos carotenoides en hojuelas de pimentón ( <i>Capsicum annuum L.</i> ) por HPLC y TLC.	19
TABLA 4	Contenido de capsantina y $\alpha$ -tocoferol en las oleorresinas de hojuelas de pimentón.	25
TABLA 5	Eficiencia de encapsulación de capsantina de acuerdo al diseño composito central centrado en la cara para oleorresina de extracto de hojuelas de pimentón saponificado con Capsul® (OS-C).	26
TABLA 6	Eficiencia de encapsulación de capsantina de acuerdo al diseño composito central centrado en la cara para oleorresina de extracto de hojuelas de pimentón sin saponificar con Capsul® (OSS-C).	26
TABLA 7	Condiciones y caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas OS-C, OSS-C y OC-C..	30
TABLA 8	Contenido de humedad y tamaño de las micropartículas de los sistemas OC-OS-C y OSS-C, obtenidas bajo condiciones óptimas	30
TABLA 9	Constantes de velocidad de degradación ( $k$ ) de capsantina en las micropartículas de los sistemas OSS-C, OS-C, OC-C obtenidas bajo condiciones óptimas, almacenadas a 40, 50 y 70° C.	36
TABLA 10	Parámetros de Arrhenius, vida media, y parámetros termodinámicos de Capsantina en las micropartículas de los sistemas OSS-C, OS-C y OC-C, obtenidas bajo condiciones óptimas.	38

## INDICE DE ANEXOS

		Página
ANEXO 1	Preparación de extractos de capsantina a partir de hojuelas de pimentón peletizado	48
ANEXO 2	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	50
ANEXO 3	Separación de capsantina columna abierta y preparación de estándar	52
ANEXO 4	Caracterización de los aceites por cromatografía de gases	53
ANEXO 5	Determinación de tocoferoles por HPLC	54
ANEXO 6	Preparación de las dispersiones para microencapsulación	55
ANEXO 7	Caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas	56
ANEXO 8	Concentración de capsantina saponificada durante el procedimiento de extracción y saponificación simultánea	57
ANEXO 9	Análisis estadístico	58
ANEXO 9.1	Diseño de microencapsulación por secado por atomización de oleorresina de pimentón saponificada ( <i>Capsicum annuum L.</i> ) utilizando Capsul® como agente encapsulante.	58
ANEXO 9.2	Diseño de microencapsulación por secado por atomización de oleorresina de pimentón sin saponificar ( <i>Capsicum annuum L.</i> ) utilizando Capsul® como agente encapsulante.	59
ANEXO 9.3	Análisis estadístico de la extracción y saponificación simultánea de capsantina utilizando distintos solventes de extracción.	60
ANEXO 9.4	Análisis estadístico para comparar el contenido de humedad en las micropartículas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C obtenidas bajo condiciones óptimas.	61
ANEXO 9.5	Análisis estadístico de superficiales, eficiencia de encapsulación y recuperación de capsantina de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.	62
ANEXO 9.6	Análisis estadístico para el estudio de estabilidad de capsantina a 40, 50 Y 70° C.	63

ANEXO 9.7	Análisis estadístico para el contenido de tocoferoles en la oleorresina de pimentón saponificada, sin saponificar y capsantina aislada.	64
-----------	---	----

## RESUMEN

El pigmento carotenoide capsantina presente en el pimentón (*Capsicum annuum L.*) se encuentra parcial y/o totalmente esterificada con ácidos grasos, sin embargo, es susceptible a degradación frente a condiciones medioambientales, por este motivo, la tecnología de microencapsulación se presenta como una herramienta para su protección. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la esterificación de la capsantina sobre la interacción oleorresina-agente encapsulante y estabilidad durante el almacenamiento.

Se elaboraron extractos de hojuelas de pimentón saponificado y sin saponificar y se aisló capsantina por columna abierta. Cada extracto se adicionó a un aceite vegetal, obteniéndose tres oleorresinas: oleorresina de extracto de pimentón sin saponificar (OSS), oleorresina de extracto de pimentón saponificado (OS) y oleorresina de capsantina aislada (OC). Se prepararon micropartículas por secado por atomización para los sistemas OS-C y OSS-C, utilizando un diseño composito central, centrado en la cara, con un total de 10 experimentos para cada uno. La temperatura del aire de entrada al secador (150-200°C) y la relación oleorresina/Capsul (1:1-1:3) fueron las variables independientes y la eficiencia de encapsulación correspondió a la variable dependiente. Para optimizar la variable respuesta en cada sistema, se utilizó Metodología de Superficie Respuesta. Las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas (1:3 y 200°C) para los sistemas OS-C, OSS-C y OC-C), mostraron que la esterificación de capsantina (OSS-C) aumentó significativamente la eficiencia de encapsulación respecto a los sistemas OC-C y OS-C, porque los ácidos grasos que esterifican a la capsantina podrían interactuar con los sitios hidrofóbicos del Capsul.

Las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas se almacenaron a 40, 50 y 70 ± 1° C en una estufa con control de temperatura y ausencia de luz. La degradación de capsantina en los tres sistemas siguió una cinética de primer orden a las tres temperaturas estudiadas. No se observaron diferencias significativas en la velocidad de degradación, energía de activación, entalpía de activación ( $\Delta H^\ddagger$ ) y entropía de activación ( $\Delta S^\ddagger$ ) entre las micropartículas de los sistemas OC-C, OS-C y OSS-C. Se obtuvo una relación lineal en el gráfico de  $\Delta H^\ddagger$  vs  $\Delta S^\ddagger$  ( $r^2= 0,99$ ), éste efecto de compensación sugiere que independiente de la forma en que se encuentre la capsantina, ésta

se degrada por un mecanismo similar y la esterificación no tuvo efecto sobre los parámetros termodinámicos.

## SUMMARY

The capsanthin carotenoid pigment present in paprika (*Capsicum annuum L.*) is partially and/or fully esterified with fatty acids, however, it is susceptible to degradation by environmental conditions. For this reason, microencapsulation technology is presented as a tool for protection. The aim of this work was to study the effect of the esterification of capsanthin on the oleoresin/encapsulant interaction and the stability during storage. Saponified and unsaponified extracts from paprika flakes were prepared and capsanthin was isolated by open column. Each extract was added to vegetable oil, obtaining this way three different kinds of oleoresin: unsaponified extract paprika oleoresin (OSS), saponified extract paprika oleoresin (OS) and isolated capsanthin oleoresin (OC). Microparticles were prepared by spray drying for systems OSS-C and OS-C, using a central composite design, centered on the face, with a total of 10 experiments for each. The inlet air temperature to the dryer (150-200 ° C) and the relation oleoresin/Capsul (1:1-1:3) were the independent variables and the encapsulation efficiency was the dependent one. To optimize the variable response in each system, we used Response Surface Methodology. The microparticles obtained under optimum conditions (1:3 and 200 ° C) for OS-C, OSS-C and OC-C systems, showed that the esterification of capsanthin (OSS-C) significantly increased the encapsulation efficiency over OC-C and OS-C system, since the fatty acids esterified to the capsanthin might interact with the hydrophobic sites of Capsul. The microparticles obtained under optimal conditions were stored at 40, 50 and 70 ± 1 ° C in an oven with temperature control and the absence of light. The degradation of the capsanthin in all three systems followed first order kinetics at the three studied temperatures. No significant differences in the degradation rate, activation energy, activation enthalpy ( $\Delta H^\ddagger$ ) and activation entropy ( $\Delta S^\ddagger$ ) between the microparticles of OC-C, OS-C and OSS-C systems were observed. A linear relation was obtained in the graph  $\Delta H^\ddagger$  vs  $\Delta S^\ddagger$  ( $r^2 = 0.99$ ), this compensatory effect suggests that, independent from the form in which capsanthin is presented, it is degraded by a similar mechanism and the esterification had no effect on thermodynamic parameters.

## 1. INTRODUCCION

En los últimos años ha aumentado el interés en elaborar alimentos o suplementos alimenticios en base a ingredientes funcionales de origen natural que entreguen beneficios tanto desde el punto de vista de salud humana como animal. Entre estos ingredientes, se encuentra la capsantina extraída desde el pimentón rojo (*Capsicum annuum L.*).

Las especies de *Capsicum* son originarias de América Central y del Sur desde donde se introdujeron a Europa, siendo las primeras hortalizas empleadas como condimentos ocupando el segundo lugar tanto económica como productivamente en el comercio mundial de condimentos (Rodríguez *et al.*, 2007).

El pimentón se utiliza tradicionalmente en forma de polvo (paprika) obtenido a partir de la molienda de los frutos secos ó como oleorresina concentrada (extracto líquido del pimentón) obtenida mediante extracción con solventes, la cual por su intenso color rojo se ha utilizado como colorante y/o antioxidante en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética, sustituyendo a otros aditivos sintéticos (Hornero-Méndez *et al.*, 2000; Restrepo, 2006).

En la industria de alimentos, la oleorresina de pimentón se utiliza como agente colorante en carnes, salchichas, encurtidos y otros alimentos procesados (Shin *et al.*, 2001). La principal ventaja de la oleorresina de pimentón con respecto al producto en polvo es que se puede estandarizar el contenido de carotenoides. Sin embargo, los carotenoides en la oleorresina pueden degradarse y perder su estabilidad por factores como la temperatura, el oxígeno y la luz (Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2001; Burns *et al.*, 2003; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004). Además, la estabilidad de la oleorresina de pimentón puede verse afectada por el grado de esterificación de las xantofilas, el procesamiento para su obtención y el posterior almacenamiento (Biacs *et al.*, 1989; Govindarajan, 1986; Biacs *et al.*, 1992; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2002b).

Existen escasos estudios donde se evalúe la estabilidad de la oleorresina de pimentón en aceites comestibles, en emulsiones y en forma encapsulada. En este contexto, sólo se ha establecido que el tipo de aceite, temperatura de almacenamiento y el tipo de agente encapsulante influirían significativamente en la estabilidad de la oleorresina (Beatus *et al.*, 1985, Biacs *et al.*, 1992; Pérez-Gálvez *et al.*, 2000; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera 2002b; Rascón *et al.*, 2011).

Uno de los mecanismos utilizados para estabilizar la capsantina es la microencapsulación, la cual permite la incorporación de sustancias dentro de una matriz o sistema pared con el objeto de proteger estos compuestos, impidiendo que sufran reacciones debido a la luz, humedad y/o al oxígeno e interacciones no deseables con otros componentes (Biacs *et al.*, 1992; Ramesh *et al.*, 2001; Pedroza, 2002). Sin embargo, no existen estudios que evalúen el efecto de la esterificación de la capsantina sobre la eficiencia de encapsulación y estabilidad de la capsantina encapsulada.

## 1.1 Revisión bibliográfica

### 1.1.1 Caracterización de los pimentones

Los pimentones se caracterizan por poseer una amplia gama de carotenoides, llegando a identificarse hasta 30 de ellos en el extracto sin saponificar (Schweiggert *et al.*, 2005). En estado verde poseen diferentes carotenoides, tales como: violaxantina, neoxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno, este último con función de provitamina A (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994a; Matsufuji *et al.*, 1998; Landrun y Bone, 2001). Durante la maduración del pimentón rojo se producen una serie de cambios como: transformación de cloroplastos en cromoplastos, biosíntesis de carotenoides que no estaban presentes en los frutos verdes, desaparición de pigmentos como luteína y neoxantina y un incremento en la concentración de  $\beta$ -caroteno, violaxantina, capsantina y capsorrubina (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994b). La síntesis y/o transformación de los pigmentos carotenoides asociado con la maduración del pimentón rojo llevan a su esterificación y acumulación en los plastoglobulos (Matus *et al.*, 1991; Márkus *et al.*, 1999; Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera 2000; Marín *et al.*, 2004).

Los pimientos rojos en estado fresco tienen un alto contenido de vitamina C (Marín *et al.*, 2004), poseen una baja cantidad de  $\gamma$ -tocoferol, pero altos niveles de  $\alpha$ -tocoferol (Matsufuji *et al.*, 2007), son una rica fuente de flavonoides y otros componentes fenólicos (Czinkotai *et al.*, 1989; Márkus *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2002). Los polifenoles presentes corresponden a luteolina y quercetina (Hasler, 1998; Sun *et al.*, 2007), que no tienen afinidad alguna con los solventes orgánicos hidrofóbicos y se excluye su evaluación en los métodos convencionales (Marín *et al.*, 2004).

El intenso color rojo del pimentón se debe a los pigmentos capsantina y capsorrubina, que están presentes exclusivamente en el género *Capsicum*, siendo sus precursores los pigmentos de color amarillo zeaxantina, violaxantina, anteraxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno y capsoluteína. Según el estado de madurez la capsantina corresponde a cerca del 30 – 60% de los carotenoides totales en frutos completamente maduros (Bekker *et al.*, 2001; Deli *et al.*, 2001). Ittah *et al.* (1993) estimaron que capsantina y capsorrubina comprenden entre el 70-80% del contenido total de carotenoides en el pimentón en polvo o paprika.



### 1.1.2 Consideraciones estructurales de la capsantina

Los carotenoides son tetraterpenos naturales derivados de la unión de 8 unidades de isopreno, que originan un esqueleto de 40 átomos de carbono. En general los carotenoides se clasifican en dos grandes grupos: carotenoides y xantófilas, los primeros están compuestos sólo de carbono e hidrógeno y las xantófilas además contienen oxígeno (Rodríguez, 1999). Los carotenoides pueden presentar una estructura acíclica o cíclica de cinco o seis carbonos en uno o ambos extremos de la molécula. Dado el gran número de dobles enlaces de la cadena central, los carotenoides pueden existir en conformaciones cis/trans, aunque la más estable y por tanto presente en la naturaleza es la conformación trans (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2006).

La capsantina, que contiene 11 dobles enlaces, un grupo ceto conjugado y un anillo ciclopentano (Fig. 1), se encuentra esterificada parcial y/o totalmente con ácidos grasos según el estado de maduración. Los ácidos grasos que esterifican a la capsantina son principalmente los ácidos láurico (12:0), mirístico (14:0) y palmítico (16:0) (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994b). La capsantina esterificada se acumula con mayor facilidad en los glóbulos lipofílicos de los cromoplastos del pimentón, aunque no está clara aún la real significancia de las formas esterificadas frente a la luz y lipooxigenasas (Biacs *et al.* 1989; Goda *et al.* 1997; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2002a). Las xantófilas actúan como antioxidantes (Hirayama *et al.*, 1994) y se sugiere que la capsantina esterificada presenta una mayor acción antioxidante para atrapar radicales libres con respecto al  $\beta$ -caroteno debido al grupo ceto conjugado de la cadena poliénica en la molécula (Matsufuji *et al.*, 1998).

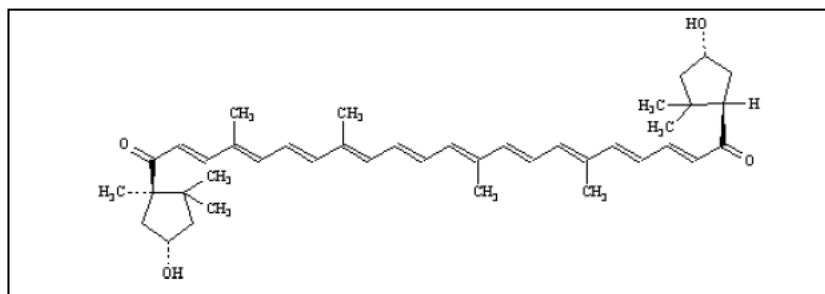
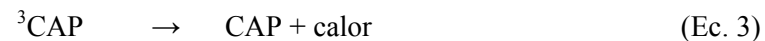
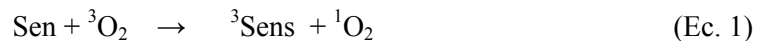


Fig. 1. Estructura de capsantina.

### 1.1.3 Importancia biológica de la capsantina

La capsantina es un antioxidante biológico que inactiva a los radicales libres producidos en la auto-oxidación de lípidos y/o atrapa oxígeno singlete en la foto-oxidación de lípidos. La actividad antioxidante de los carotenoides se relaciona con su estructura, debido a la presencia del amplio sistema de dobles enlaces conjugados (Nachtigal, 2007). Los carotenoides que tienen 9 o más dobles enlaces otorgan la máxima protección (Rodríguez, 1999).

La capsantina puede actuar como atrapador de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) en la foto-oxidación de materias grasas. El  $^1\text{O}_2$  se forma por el traspaso de energía de un sensibilizador (Sen) excitado como la clorofila, al oxígeno triplete ( $^3\text{O}_2$ ) (Ec. 1). El  $^1\text{O}_2$  es atrapado posteriormente al transferir su energía a los carotenoides, sin producción de compuestos de oxidación (Ec. 2). La capsantina triplete retorna a su estado basal por la disipación de energía en forma de calor, de acuerdo con la ecuación 3 (Nachtigall, 2007).



Las reacciones en cadena que dan origen a la formación de hidroperóxidos durante la auto-oxidación de lípidos, pueden ser interrumpidas por los carotenoides a través de tres posibles mecanismos: transferencia de electrones, donación de hidrógeno o por adición, como se muestra en las ecuaciones 4,5 y 6, respectivamente.



La protección de los pigmentos carotenoides frente al cáncer y a otras enfermedades crónicas, se debería además de sus propiedades antioxidantes a su capacidad de filtrar la luz UV y a su participación en la diferenciación de células epiteliales (Stahl y Sies, 2003) ya sea mediante la inhibición de la proliferación de células, mejoramiento de la diferenciación celular y estimulación de la comunicación intercelular (Meléndez *et al.*, 2004). Junto a las propiedades

anteriores, Aizawa y Inakuma, (2009) demostraron que la ingesta de capsantina incrementa de forma significativa los niveles de colesterol HDL en ratas de forma dosis dependiente.

#### **1.1.4 Extracción de capsantina**

Los métodos tradicionales para la extracción de componentes bioactivos desde plantas son la destilación por vapor y la extracción con solventes orgánicos (maceración o técnica Soxhlet).

Específicamente, los pigmentos carotenoides son compuestos liposolubles que normalmente se extraen con solventes orgánicos tales como: acetona, éter de petróleo, benceno, hexano, éter dietílico, cloroformo, etanol y metanol (Park *et al.*, 2007). Sin embargo, el uso de solventes presentan algunas desventajas como: la degradación y pérdida de los componentes bioactivos, utilización de grandes volúmenes de solventes, el tiempo requerido, el alto costo de los insumos y la mano de obra (Sovová *et al.*, 2004). Además, es frecuente encontrar residuos de solventes en los extractos. El interés en alternativas a la extracción con solventes convencionales, tales como el dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) es cada vez mayor, ya que el CO<sub>2</sub> no es inflamable y no ocasiona daño al medio ambiente (Gao *et al.*, 2009).

Los principales parámetros para la selección de una tecnología de extracción son: las características bioquímicas de las moléculas extraídas, la rapidez, la limitación del uso de solventes, reproducibilidad, rendimiento de la extracción, la selectividad, la protección de las moléculas extraídas para que no sufran transformaciones químicas y costo (Pasquet *et al.*, 2010).

#### **1.1.5 Microencapsulación**

La microencapsulación es una técnica mediante la cual agentes activos (sólidos, líquidos ó gaseosos) se introducen en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica (agente encapsulante). En el ámbito alimentario, la microencapsulación permite proteger los compuestos bioactivos desde factores del medio ambiente (oxígeno, luz y humedad entre otros) y controlar la liberación del activo (Gibbs *et al.*, 1999; Desai y Park, 2005; Mozafari *et al.*, 2008).

La microencapsulación tiene aplicaciones importantes en la industria alimentaria para proteger materiales sensibles como son los compuestos volátiles, aceites esenciales y oleorresinas, mejorando su estabilidad. Las micropartículas formadas tienen un amplio rango

de tamaño que va de 0,2 a 5000  $\mu\text{m}$ , con múltiples formas dependiendo del material y métodos utilizados para su preparación (Shaikh *et al.*, 2006).

Las técnicas de encapsulación incluyen: secado por atomización, extrusión, coacervación, gelificación iónica, liposomas, liofilización, cocristalización y emulsión, entre otros (Gibbs *et al.*, 1999; Desai y Park, 2005; Agustín y Hemar, 2009).

#### **1.1.5.1 Secado por atomización**

Entre los métodos de encapsulación existentes, el secado por atomización es el método más antiguo y utilizado para encapsular ingredientes alimenticios sensibles al calor (aromas, lípidos, carotenoides), de una manera económica, simple y continua (Ré, 1998). En este método, el compuesto activo se homogeneizó con el material encapsulante, usualmente en agua. Luego, el fluido resultante que puede ser una solución, suspensión o una emulsión es alimentada a un secador spray (Fig. 2) y atomizada mediante un disco rotatorio o una boquilla de pulverización formando pequeñas gotas. El contacto entre la gota y el aire caliente permite una rápida evaporación del solvente y la formación de una película (costra) sobre la superficie de las partículas obteniéndose instantáneamente un producto en polvo (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Flores-Martínez *et al.*, 2004). La formación de esta película es más rápida a medida que aumenta la concentración de sólidos disueltos, debido a la menor evaporación de agua desde el sistema. De esta forma es posible obtener altas eficiencias de encapsulación, ya que la costra o película sobre la gota permite selectivamente la difusión del agua pero retiene el compuesto activo (Schwartz M., 1989). Una vez secas las micropartículas se trasladan a un separador de ciclón para ser recolectadas y el polvo obtenido debe reunir algunas características de calidad, tales como: densidad, color apropiado, facilidad de reconstitución, degradación mínima de los constituyentes, sabor y aroma, entre otros (Gibbs *et al.*, 1999).

Los principales factores a ser optimizados en el secado por atomización son la temperatura de alimentación, temperatura del aire de entrada y salida, la concentración de sólidos y la viscosidad (Schwartz, 1989; Gharsallaoui *et al.*, 2007).



**Fig. 2. Secador spray.**

#### **1.1.5.2 Tipos de encapsulantes utilizados en la microencapsulación a través de secado por atomización**

Dependiendo del compuesto a encapsular se pueden seleccionar materiales encapsulantes naturales y sintéticos. Éstos deben tener una buena solubilidad, buenas propiedades emulsificantes, además de poseer baja viscosidad en soluciones concentradas. Se han utilizado diferentes agentes encapsulantes para la microencapsulación por secado por atomización, estos incluyen polisacáridos (almidón, maltodextrinas de diferente equivalente de dextrosa (DE), jarabes de maíz), gomas (goma arábiga), lípidos (ácido esteárico, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, caseína, suero de leche, soya y trigo), siendo las maltodextrinas las más utilizadas (Krishnan *et al.*, 2005a b; Loksuan, 2007; Saénz *et al.*, 2009). Las maltodextrinas permiten obtener una buena retención y estabilidad oxidativa de los aceites, pero tienen escasa capacidad emulsificante (Gharsallaoui *et al.*, 2007), por lo cual usualmente se mezclan con proteínas y gomas.

El almidón es un biopolímero sintetizado por las plantas, compuesto por dos unidades (amilosa y amilopectina), es de bajo costo, de gran disponibilidad y resiste el procesamiento térmico

(Kaplan, 1998). Algunos estudios han utilizado almidón modificado (octenil succinato) como alternativa para reemplazar total o parcialmente la goma arábica que tiene un costo mayor (Trubiano y Lacourse, 1988; Soottitantawat *et al.*, 2005; Shaikh *et al.*, 2006; Kanakdande *et al.*, 2007). Capsul® es un almidón modificado químicamente, derivado de maíz ceroso, que incorpora en su estructura un componente lipofílico. Presenta propiedades emulsificantes, por lo cual es útil para obtener emulsiones del tipo aceite en agua de alta estabilidad (Reineccius, 1991; Shahidi *et al.*, 1993; Marchal *et al.*, 1999; Finotelli y Rocha, 2005). Su baja viscosidad permite la preparación de emulsiones con alto contenido en sólidos, obteniéndose micropartículas con alta retención del compuesto activo (Kolanowski *et al.*, 2004; Jonsdottir *et al.*, 2005). El Capsul se ha utilizado principalmente en la encapsulación de sabores, aromas, vitaminas y especias.

#### **1.1.5.3 Microencapsulación de la oleorresina de pimentón**

La encapsulación de oleorresina de *Capsicum annum L.* se ha realizado utilizando diferentes técnicas, entre ellas: secado por atomización utilizando agentes encapsulantes como gelatina, goma arábica, caseinato de sodio, almidón modificado, mezclas de maltosa-dextrina y almidón de arroz-gelatina (Beatus *et al.*, 1985; Xiang *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2005); coacervación utilizando alginato de calcio y una barrera intermedia compuesta de aislado proteico de suero (Rosenberg y Lee, 2004) y “spray cooling” con aceite de canola (Meunier *et al.*, 2007). En estos estudios los objetivos se han enfocado principalmente en evaluar: las pérdidas de color de la oleorresina bajo diferentes condiciones de luz, temperatura y humedad (Beatus *et al.*, 1985), la eficiencia de encapsulación y porcentaje de recuperación de la oleorresina (Xiang *et al.*, 1997), morfología y tamaño de partícula (Santos *et al.* 2005), solubilidad de las micropartículas con distintos solventes (Jung y Sung, 2000), estabilidad oxidativa de la oleorresina encapsulada (Rosenberg y Lee, 2004) y la cinética de liberación en el intestino delgado de cerdos (Meunier *et al.*, 2007).

Considerando los antecedentes anteriores, esta tesis se enfoca en la encapsulación de una oleorresina de pimentón saponificado y sin saponificar utilizando Capsul como agente encapsulante y secado por atomización como método de encapsulación, para evaluar el efecto de la esterificación de la capsantina sobre la eficiencia de encapsulación y su estabilidad durante el almacenamiento a distintas temperaturas.

## **1.2 Hipótesis**

La estabilidad de la capsantina en las micropartículas de oleorresina de pimentón esterificada será mayor en relación a las micropartículas de oleorresina sin esterificar y a la capsantina aislada.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general**

Estudiar el efecto de la esterificación de la oleorresina de pimentón y de la capsantina aislada sobre la interacción oleorresina-agente encapsulante y en la estabilidad durante el almacenamiento.

### **1.3.2 Objetivo específicos**

- 1.- Identificar y cuantificar los principales pigmentos carotenoides presentes en las hojuelas de pimentón (*Capsicum annuum L.*) por HPLC.
- 2.- Extraer los pigmentos de pimentón por diferentes metodologías y aislar la capsantina por columna abierta.
- 3.- Estudiar la razón oleorresina/agente encapsulante y temperatura de secado (variables independientes) sobre la eficiencia de encapsulación de capsantina (variable dependiente).
- 4.- Estudiar la estabilidad de la capsantina en micropartículas de oleoresina esterificada, sin esterificar y capsantina aislada a tres temperaturas (40, 50 y 70° C).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Muestra

- Hojuelas de pimentón peletizado (*Capsicum annuum L.*) con un 6% de humedad, proporcionadas por la Universidad Católica de Chile (obtenidas de Invertec Foods, Rengo, Chile).

#### 2.1.2 Materiales

- Capsul®, adquirido en National Starch, USA.
- Aceite de girasol (*Helianthus annuus*) (AG), refinado, sin antioxidantes sintéticos, Natura®
- Acetona, etanol, éter de petróleo, éter dietílico, metanol y hexano grado p.a.
- Acetona y agua grado HPLC.
- Nitrógeno ultra puro, AGA, Santiago, Chile.
- Sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) p.a., Merck Darmstadt, Alemania.
- Celite 545, Merck, Darmstadt, Alemania.
- Óxido de Magnesio, Merck, Darmstadt, Alemania.
- Placa de sílica gel 20 x20 cm, 0,5 mm de espesor (Merck).
- Estándares de tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) Merck, Darmstadt, Alemania.



## **2.2 Metodología**

### **2.2.1 Identificación de pigmentos carotenoides en hojuelas de pimentón peletizado (*Capsicum annuum L.*) y determinación del contenido de capsantina.**

La extracción de los pigmentos carotenoides desde las hojuelas de pimentón se realizó de acuerdo al método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993) (Anexo 1).

La identificación de los carotenoides de las hojuelas de pimentón se realizó por cromatografía en placa (TLC), columna abierta (CA) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

#### **2.2.1.1 Cromatografía en placa**

El extracto saponificado de hojuelas de pimentón se aplicó sobre una placa de sílica gel de 20 x 20 cm y 0,5 mm de espesor (Merck). Como fase móvil se utilizó: éter de petróleo:acetona (10,5:4,5). Los pigmentos obtenidos se cromatografiaron por HPLC según el método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993). Los carotenoides se identificaron en base a su valor Rf.

#### **2.2.1.2 Columna abierta**

Los pigmentos carotenoides del extracto saponificado de hojuelas de pimentón obtenido según el método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993) se separaron utilizando una columna de vidrio de 25 cm de largo y 3 cm de diámetro. Como fase estacionaria se utilizó óxido de magnesio-celite (1:1) y como fase móvil de polaridad creciente se utilizó éter etílico, éter de petróleo y acetona los que fueron mezclados en distintas proporciones (Rodríguez, 1999) (Anexo 3). Cada fracción obtenida se inyectó al HPLC.

#### **2.2.1.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

El análisis de los carotenoides se llevó a cabo por HPLC, empleando un equipo Merck Hitachi D-600, con bomba L-6200 Intelligent Pump, detector de arreglo de diodo (Waters 996), conectado al software Empower Pro (Waters). Se utilizó una columna C-18 (3 µm tamaño de partícula, 4,6 d.i. x 15 cm, Atlantis, Waters). Como fase móvil se utilizó acetona: agua en distintas proporciones, flujo de 1 mL/min y volumen de inyección de 20 µl (Anexo 2). Los pigmentos carotenoides se detectaron a 450 nm. La capsantina se identificó comparando los

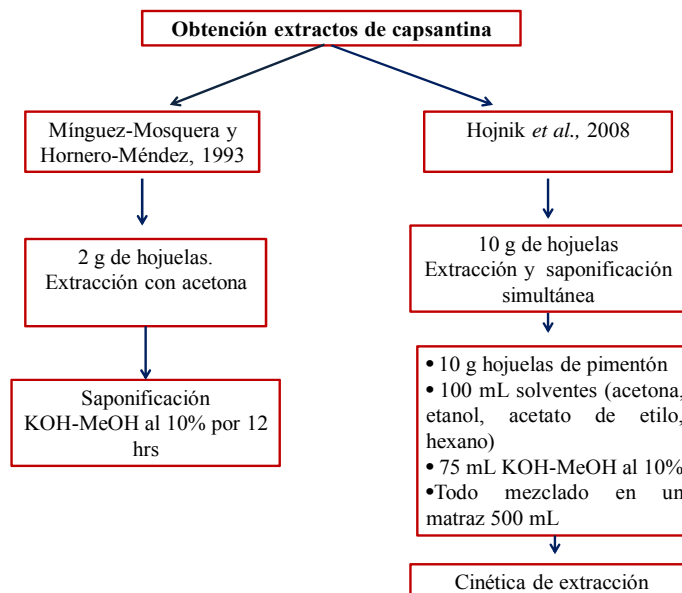
tiempos de retención con los de un estándar y la cuantificación se realizó de acuerdo a una curva de calibración de capsantina (1,04 – 3,48  $\mu\text{g/mL}$ ,  $R^2$  0,9956).

#### 2.2.1.4 Solución estándar de capsantina

La capsantina se obtuvo desde las hojuelas de pimentón. El pigmento se purificó por cromatografía en columna abierta con fase estacionaria MgO: Celite (1:1), de acuerdo al método descrito por Rodríguez-Amaya *et al.*, (1999). La concentración de capsantina se determinó por espectrofotometría en un equipo Unicam UV-3 a 460 nm, utilizando el coeficiente de extinción en acetona ( $E^{1\%} = 2300$ ) (Rodríguez, 1999; Uquiche *et al.*, 2004).

#### 2.2.2 Preparación de un extracto de hojuelas de pimentón peletizado

La extracción de los pigmentos carotenoides desde las hojuelas de pimentón se realizó por dos métodos: A) extracción con acetona y posterior saponificación, de acuerdo al método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993) y B) extracción con saponificación simultánea de acuerdo al método descrito por Hojnik *et al.* (2008). Con el método B (Anexo 1) además se confeccionó una cinética de extracción.



### 2.2.3 Elaboración de las oleorresinas

Se utilizó el método A de Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993) para la obtención de los extractos de carotenoides de hojuelas de pimentón saponificados y sin saponificar. La capsantina aislada se obtuvo por columna abierta. Cada extracto se adicionó en forma independiente a aceite de girasol (AG), obteniéndose las oleorresinas con extracto saponificado (OS), extracto sin saponificar (OSS) y capsantina aislada (OC). En la Tabla 1 se presentan los principales ácidos grasos del aceite de girasol, utilizado para la preparación de las oleorresinas (El método de determinación se presenta en el Anexo 4).

**Tabla 1. Composición de los principales ácidos grasos del aceite de girasol utilizado en la elaboración de las oleorresinas**

Ácidos grasos	Nombre	% Ésteres metílicos $\pm$ DS
C16:0	Ác. Palmítico	6,5 $\pm$ 0,1
C18:0	Ác. Esteárico	3,9 $\pm$ 0,01
C18:1 w9 cis	Ác. Oleico	26,2 $\pm$ 0,1
C18:2 w6	Ác. Linoleico	57,1 $\pm$ 0,3
TOTAL SATURADOS		11,9 $\pm$ 0,02
TOTAL MONOINSATURADOS		28,4 $\pm$ 0,03
TOTAL POLIINSATURADOS		59,8 $\pm$ 0,08

### 2.2.4 Caracterización de las oleorresinas

#### 2.2.4.1 Contenido de capsantina

El contenido de capsantina para las oleorresinas con extracto saponificado (OS), extracto sin saponificar (OSS) y capsantina aislada (OC), se determinó por HPLC.

#### 2.2.4.2 Perfil de tocoferoles

La determinación de los tocoferoles presentes en el aceite y en las oleorresinas (OS, OSS y OC) se realizó de acuerdo al método oficial AOCS Ce 8-89 (AOCS, 1993), utilizando un equipo HPLC compuesto de una bomba Merck-Hitachi L-6200 A, detector de fluorescencia Merck-Hitachi F-1050 acoplado a un computador con software Clarity (versión 2.4.1.43, Merck, Darmstadt, Alemania). Se utilizó una columna LiChrocart Superspher Si-60 (5  $\mu$ m x 4 d.i. x 250 mm, Merck). La fase móvil correspondió a 2 propanol:hexano (0,5:99,5 v/v) con un flujo de 1

mL/min. La identificación y cuantificación se realizó por comparación con estándares de tocoferoles (Calbiochem) (Anexo 5).

## **2.2.5 Microencapsulación**

### **2.2.5.1 Preparación de las dispersiones**

Se prepararon emulsiones que contenían Capsul®, agua y oleorresina. Se utilizaron relaciones oleorresina/agente encapsulante 1:1 (10% de oleorresina, 10% de Capsul® y 80% de agua); 1:2 (10% de oleorresina, 20% de Capsul® y 70% de agua) y 1:3 (10% de oleorresina, 30% de Capsul® y 60% de agua), correspondiente a un contenido teórico de un 50%, 33% y 25% de oleorresina en el polvo obtenido, respectivamente.

El Capsul® se disolvió en agua a 70° C, con agitación constante. Luego se dejó enfriar a 30°C y se adicionó la oleorresina. La emulsión resultante se homogeneizó en un homogenizador Polytron PT 2100 (Kinematica AG) y posteriormente se alimentó a un secador spray para obtener las micropartículas (Anexo 6).

### **2.2.5.2 Secado por atomización**

Se utilizó un secador mini Spray-Dryer B-290 (Büchi) con alimentación y flujo de aire de secado en paralelo. El equipo operó a una temperatura de ingreso del aire que fluctuó entre 150°C - 200 °C. El flujo de aire, la velocidad de alimentación y la presión de atomización correspondieron a 600 L/h, 5 mL/min, y 5 bar, respectivamente. Las micropartículas resultantes se almacenaron en bolsas de polipropileno a -20° C hasta el momento de su utilización.

### **2.2.5.3 Diseño estadístico**

Se empleó un diseño composito central centrado en la cara ( $2^2$ ), con un total de 10 experimentos para cada sistema (oleorresina de extracto sin saponificar-Capsul® (OSS-C) y oleorresina de extracto saponificado-Capsul® (OS-C). La relación oleorresina/Capsul® y la temperatura del aire de entrada al secador se evaluaron como variables independientes. La variable de respuesta o dependiente correspondió a la eficiencia de encapsulación de capsantina. A partir de las condiciones óptimas obtenidas para OSS-C y OS-C se prepararon las micropartículas de

oleorresina de capsantina aislada-Capsul (OC-C). En la Tabla 2 se presentan los niveles para las variables independientes utilizadas en el diseño experimental.

**Tabla 2. Niveles para las variables independientes usadas en el diseño experimental para la encapsulación de los sistemas oleorresina saponificada (OS) y oleorresina sin saponificar (OSS).**

VARIABLES	NIVELES	
	-1	1
Oleorresina/Capsul®	1:1	1:3
Temperatura (°C)	150	200

#### 2.2.5.4 Caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas

Las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas OS-C y OSS-C y las micropartículas de OC-C se caracterizaron de acuerdo a su contenido de capsantina total, capsantina superficial, eficiencia de encapsulación, morfología y contenido de humedad (Anexo7).

- **Contenido de capsantina superficial:** Se pesaron 100 mg de micropartículas en un tubo a los que se agregó 3 mL de hexano:éter etílico (relación 50:50 v/v), se agitó manualmente por 30 segundos y se retiró el sobrenadante. El sobrenadante se saponificó con KOH al 10% en metanol durante 12 h y el contenido de capsantina superficial se determinó mediante HPLC.

- **Contenido de capsantina total:** Se pesaron 100 mg de micropartículas en un tubo a los que se agregó 1 mL de agua bidestilada y se homogeneizaron en un Vortex por 1 minuto. Posteriormente se utilizó como solvente de extracción (10 mL) una mezcla de acetato de etilo: etanol:hexano:agua bidestilada (1:1:1:1 v/v), se agitaron en un vortex y se centrifugó a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y se repitió esta operación hasta que no se observó presencia de color en la porción residual de los tubos. El sobrenadante recolectado se saponificó con KOH al 10% en metanol durante 12 h y el contenido de capsantina se determinó mediante HPLC.

- **Eficiencia de encapsulación (EEC):** Se determinó según la ecuación 7:

$$EEC = \frac{\text{Capsantina total} - \text{Capsantina superficial}}{\text{Capsantina total}} \times 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

- **Morfología:** La estructura de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas se estudió por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se recubrieron con oro/paladio utilizando un evaporador al vacío Varian PS 10E y analizaron usando un microscopio JEOL JSM 25-SII (Jeol, Tokio, Japón) operado a 30 kV. Las imágenes se obtuvieron con una cámara Mamiya Roll Film Holder (Modelo 2) acoplada al microscopio, usando una película Kodak T-Max ISO 100.

- **Contenido de humedad:** Se determinó en una estufa a 105° C según el método AOCS (Ai 2-75, 1993).

### 2.2.6 Estudio de estabilidad de capsantina

Las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C se almacenaron a 40, 50 y 70 ± 1° C en una estufa (Memmert BE 500, Alemania) con control de temperatura y ausencia de luz. Se colocaron 50 mg de polvo en tubos de vidrio de 20 mm de largo, sin tapa. Los tubos se removieron a intervalos de tiempo específicos, de tal forma de obtener 7 puntos para la construcción de la curva de degradación de capsantina. Los ensayos se realizaron por duplicado y el contenido de capsantina total se determinó por HPLC, de acuerdo al método descrito en el punto 2.2.1.3.

#### 2.2.6.1 Análisis cinético

El orden de degradación se obtuvo por el ajuste de correlación, para cinéticas de primer orden (ecuación 8).

$$[C] = [C]_0 e^{-kt} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde, C es la concentración a tiempo t, C<sub>0</sub> es la concentración inicial, t tiempo y k la constante de velocidad.

La energía de activación (E<sub>a</sub>) y factor de frecuencia (A) se determinaron a partir de la ecuación de Arrhenius (ecuación 9).

$$k = A e^{-(E_a/R)/T} \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde R es la constante de los gases y T es la temperatura en grados Kelvin.

La entalpía de activación ( $\Delta H^\ddagger$ ) y la entropía de activación ( $\Delta S^\ddagger$ ) se obtuvieron de la ecuación de Eyring (ecuación 10).

$$\ln(k/T) = \ln(k_B/h) + \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/RT \quad (\text{Ec. 10})$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $h$  es la constante de Planck.

### **2.2.7 Análisis estadístico**

Las condiciones óptimas para cada sistema se obtuvieron mediante Metodología de Superficie Respuesta (MSR). Para determinar las constantes de velocidad de degradación de capsantina se empleó regresión lineal. Para determinar diferencias estadísticas entre los sistemas estudiados para constantes de velocidad de degradación, energía de activación, entalpía de activación, entropía de activación, porcentaje de superficiales, eficiencia de encapsulación, porcentaje de recuperación de capsantina y contenido de  $\alpha$ -tocoferol se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de rango múltiple de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics versión 7.0 (Manugistics Inc., Statistical Graphics Corporation, Rockville, MA).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Identificación de pigmentos carotenoides en hojuelas de pimentón (*Capsicum annuum* L.)

En la Tabla 3 se presenta la identificación de los pigmentos carotenoides en las hojuelas de pimentón (*Capsicum annuum* L.) de acuerdo a los métodos de columna abierta, HPLC ( $t_R$ ) y TLC ( $R_f$ ).

**Tabla 3. Separación por columna abierta e identificación de pigmentos carotenoides en hojuelas de pimentón (*Capsicum annuum* L.) por HPLC y TLC.**

Pigmentos	Columna abierta solvente de elución	HPLC $t_R$ (min)	TLC $R_f$
Capsorrubina	5% Agua en Acetona	4,574	0,21
Violaxantina	5% Agua en Acetona	4,831	0,27
Capsantina	100% Acetona	6,757	0,32
Capsantina 5,6 epóxido	70% Acetona/EP	7,957	0,27
<i>cis</i> -capsantina	100% Acetona	9,549	0,27
Anteraxantina	50% Acetona/EP	10,215	
Capsoluteína	30% Acetona/EP	10,927	0,45
Zeaxantina	20% Acetona/EP	11,548	0,58
<i>cis</i> - Zeaxantina	30% Acetona/EP	12,280	
Criptocapsina	30% Acetona/EP	14,378	0,72
$\beta$ -Criptoxantina	10% Acetona EP	15,112	0,77
<i>cis</i> - $\beta$ -Caroteno	5% ET/EP	17,788	
$\beta$ -Caroteno	100% EP	17,888	0,87

EP: éter de petróleo; ET: éter etílico;  $t_R$ : Tiempo de retención;  
 $R_f$ : Distancia recorrida por el compuesto

Los pigmentos carotenoides capsoluteína, *cis*-zeaxantina y criptocapsina presentan la misma polaridad y se separan con 30% de acetona en EP al utilizar la técnica de separación por columna abierta. El mismo comportamiento se observó para capsantina y *cis*-capsantina que eluyeron juntos con 100% de acetona. La capsantina comenzó a eluir cuando se utilizó la relación 70% acetona en EP pero en baja cantidad, siendo eluida completamente con 100% de acetona. Para la separación de capsorrubina y violaxantina es necesario aumentar la polaridad por lo que se agrega agua a la acetona. Algunos autores discuten que la aparición de *cis*-zeaxantina, *cis*-capsoluteína y *cis*-capsantina se debería a procesos de degradación de los

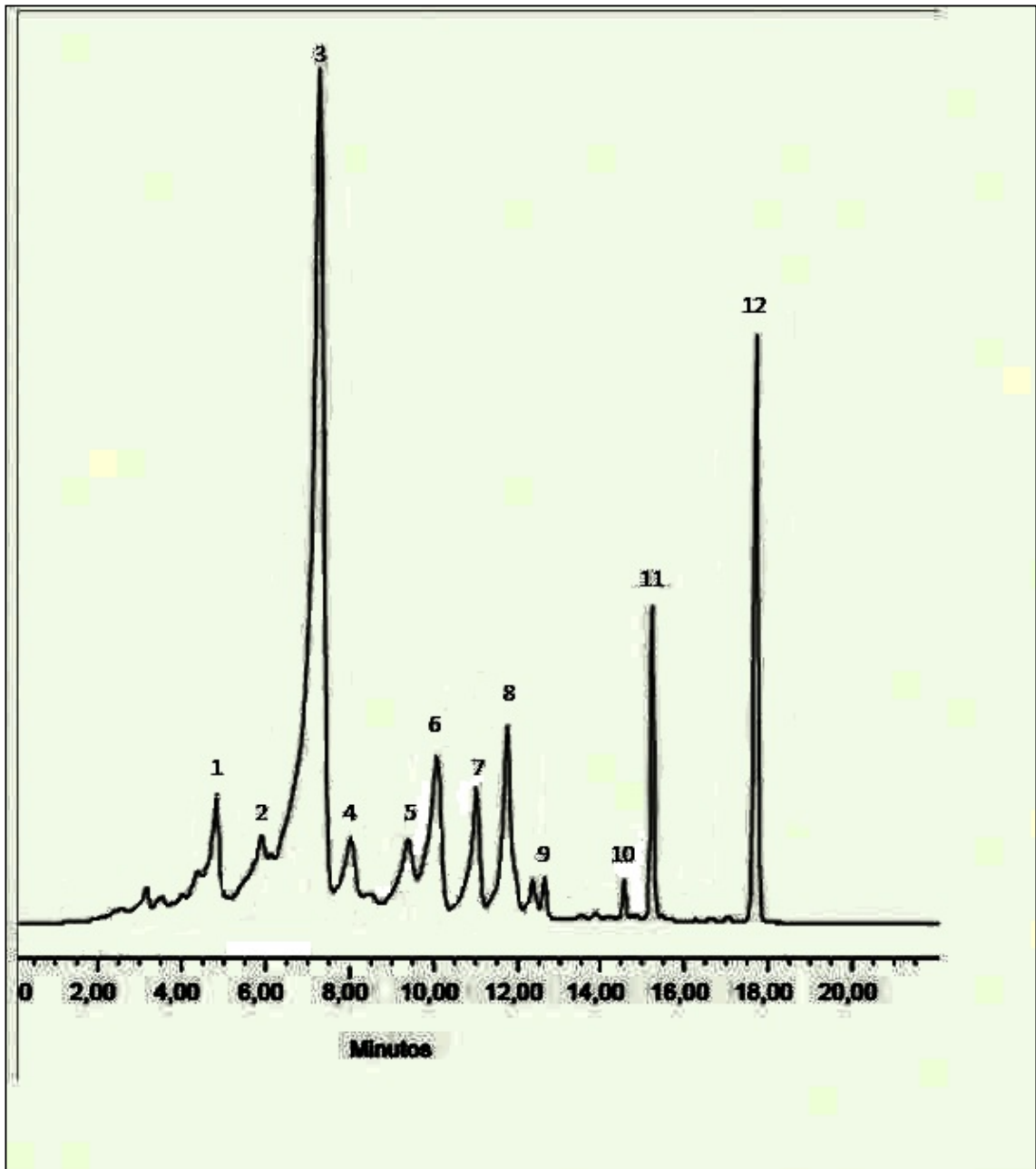


pigmentos carotenoides que se producen por efecto de los solventes y la exposición a condiciones ambientales (Márkus *et al.*, 1999; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2004; Pérez-Gálvez *et al.*, 2005).

Los pigmentos carotenoides identificados corresponden a los encontrados por otros autores (Almela *et al.*, 1991; Mínguez-Mosquera y Hornero Méndez, 1993; Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994a y b; Markús *et al.*, 1999), indicando que la variación en los pigmentos carotenoides en las hojuelas de pimentón (*Capsicum annuum L.*) se da principalmente en el contenido de ellos y no en el tipo de pigmentos, independiente de las condiciones de cultivo y zona geográfica (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1994a; Pérez-Gálvez *et al.*, 2007). No se detectó la presencia de luteína y neoxantina, ya que éstos desaparecen durante el proceso de maduración del pimentón y por el contrario aumenta el contenido de violaxantina y  $\beta$ -caroteno y son biosintetizados zeaxantina, capsantina, capsorrubina,  $\beta$ -criptoxantina y capsoluteína (Márkus *et al.*, 1999; Deli *et al.*, 2001).

La capsantina en la placa de TLC se presenta como una banda de gran tamaño de color rojo intenso fácilmente identificable con un  $R_f$  de 0,27, el cual fue menor al obtenido por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993) con un  $R_f$  de 0,37, debido a diferencias en la fase de elución. El valor  $R_f$  varía de acuerdo al solvente de elución utilizado, fase estacionaria, espesor de la placa y al grado de esterificación de los carotenoides (Biacs *et al.*, 1989; Matsufuji *et al.*, 1998).

En la Figura 3 se muestra el cromatograma obtenido por HPLC para los pigmentos carotenoides de las hojuelas de pimentón (*Capsicum annuum L.*). Los pigmentos identificados fueron: capsorrubina, violaxantina, capsantina, capsantina-5,6-epóxido, anteraxantina, *ciscapsantina*, capsoluteína, zeaxantina, *cis*-zeaxantina, criptocapsina,  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -caroteno.



**Figura 3. Perfil de pigmentos carotenoides por HPLC en las hojas de pimentón (*Capsicum annuum* L.)**

- (1) capsorrubina; (2) violaxantina; (3) capsantina; (4) capsantina 5,6 epóxido; (5) anteraxantina; (6) *cis*-capsantina; (7) capsoluteína; (8) zeaxantina; (9) *cis*-zeaxantina; (10) criptocapsina; (11)  $\beta$ -criptoxantina; (12)  $\beta$ -caroteno.

### 3.2 Extracto de hojuelas de pimentón

La obtención de extractos de hojuelas de pimentón se realizó por dos métodos (A) extracción con acetona y posterior saponificación (Rodríguez-Amaya, 1999) y (B) extracción con saponificación simultánea utilizando acetona, acetato de etilo, etanol y hexano (Hojnik *et al.*, 2008).

Se estudió la influencia del tipo de solvente en la extracción y saponificación simultánea (método B) manteniendo constantes el volumen, concentración de la solución de álcali y la temperatura de extracción (40° C). El contenido de capsantina extraída se expresó como  $\mu\text{g}$  de capsantina/g de hoja de pimentón. Los resultados se presentan en la Figura 4.

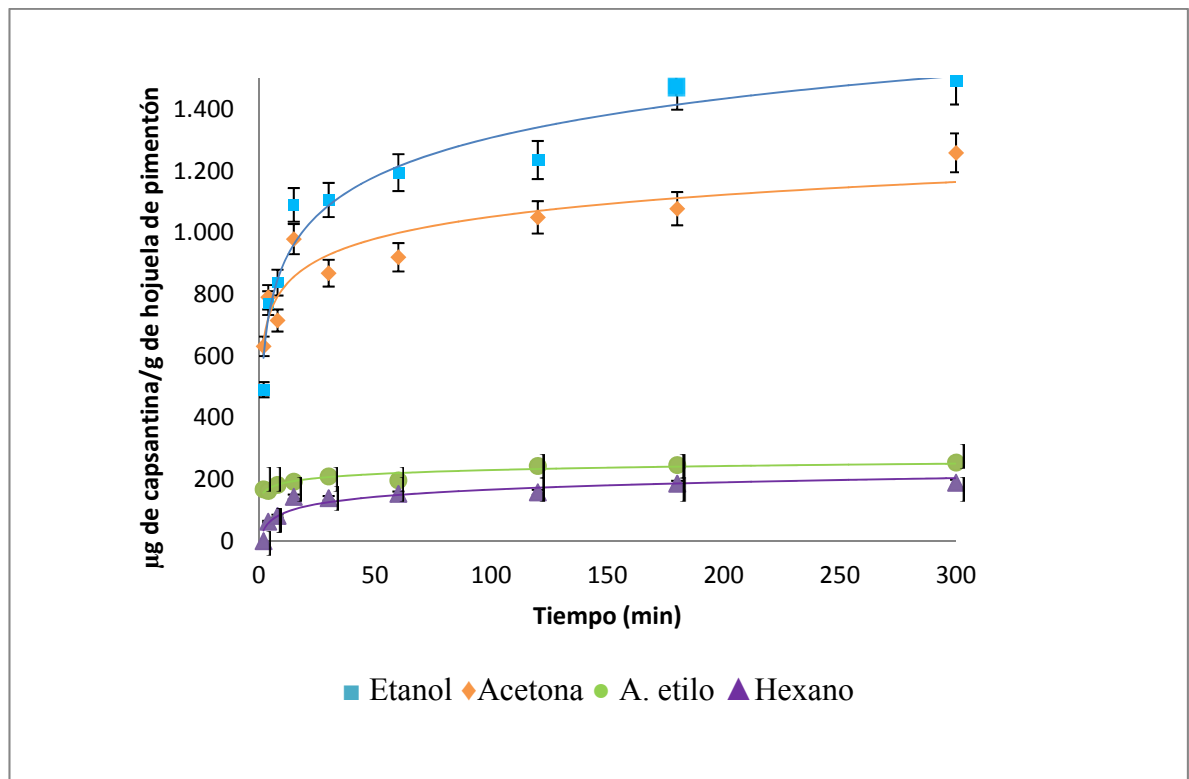


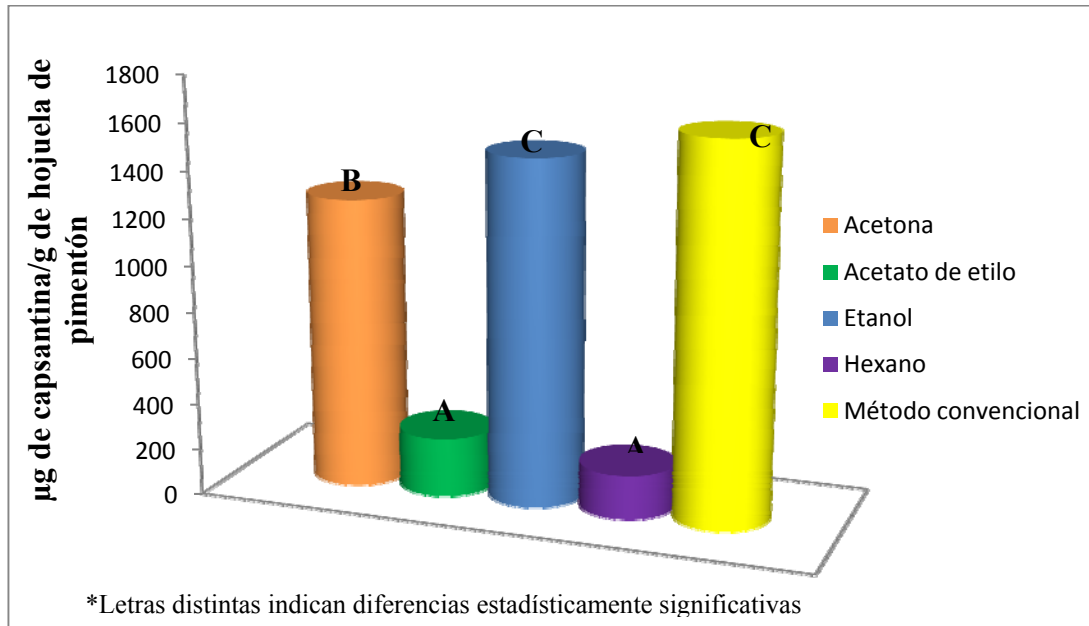
Figura 4. Cinética de extracción de capsantina desde hojuelas de pimentón (*Capsicum annuum L.*) por el método de extracción y saponificación simultánea. Etanol (■), acetona (◆), acetato de etilo (●) y hexano (▲).

El gráfico para la cinética de extracción de capsantina desde hojuelas de pimentón (Fig. 4) muestra un perfil limitante para todos los solventes estudiados. Tanto acetona como etanol son excelentes solventes para la extracción de capsantina, alcanzando valores de  $1259 \pm 57$  y  $1490 \pm 7$   $\mu\text{g/g}$  de hojuela de pimentón a los 300 min, respectivamente. Distinto a lo que ocurre con hexano y acetato de etilo en que el máximo de extracción de capsantina a los 300 minutos fue de  $189 \pm 6$  y  $255 \pm 2$   $\mu\text{g/g}$  de hojuela de pimentón, respectivamente, valores muy inferiores a los alcanzados para acetona y etanol (Anexo 8).

El efecto del solvente sobre la extracción de capsantina desde hojuelas de pimentón se debería a las distintas características físico-químicas de cada solvente utilizado como: peso molecular, viscosidad dinámica, habilidad de mezclarse con el agua y grado de polaridad que a medida que aumenta, también aumenta la cantidad de pigmento extraído (Amaya *et al.*, 1997). La temperatura es otra variable que influye en el proceso de transferencia de los pigmentos al solvente debido a que disminuye la viscosidad del solvente junto a cambios en la estructura celular de la matriz biológica del pimentón. Sin embargo, una temperatura excesiva puede provocar pardeamiento del material. Una temperatura de  $40^\circ\text{C}$  se ha establecido como temperatura óptima para la extracción de los pigmentos presentes en el pimentón (Rafajlovska *et al.*, 2007).

El contenido de capsantina en el extracto de hojuelas de pimentón saponificado utilizando el método convencional (A) fue de  $1620 \pm 85$   $\mu\text{g/g}$  de hojuelas de pimentón, similar al contenido reportado por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1994c) y Pérez-Gálvez *et al.* (2007) en paprika en polvo ( $1590 \pm 61$  y  $1510 \pm 29$   $\mu\text{g/g}$  polvo, respectivamente) y superior al contenido reportado por Mínguez-Mosquera *et al.* (1994a) en pimentón fresco durante la primera cosecha ( $635,78$   $\mu\text{g/g}$  pimentón fresco).

En la Figura 5 se muestra el contenido de capsantina en el extracto de hojuelas de pimentón aplicando el método de extracción y saponificación simultánea (B) comparado con el método de extracción convencional (A). El contenido de capsantina en el extracto de hojuelas de pimentón aplicando el método convencional (A) fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) al método de extracción (B) utilizando acetona, acetato de etilo y hexano. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el método convencional (A) y el método (B) con etanol.



**Figura 5: Contenido de capsantina aplicando el método de extracción y saponificación simultánea con distintos solventes (300 minutos) y el método convencional.**

En acuerdo con este estudio, Rafajlovska *et al.* (2007) y Martín *et al.* (2006), encontraron que la acetona fue un buen solvente de extracción para capsantina sin saponificar desde pimentón seco, debido a su alta capacidad de mezclarse con el agua de la matriz y su baja viscosidad dinámica que facilita la extracción de los pigmentos carotenoides. Sin embargo, Santamaría *et al.* (2000) y Cardona *et al.* (2006), propusieron utilizar etanol para extraer capsaicinoides de ají seco y licopeno en tomate seco, respectivamente, porque el etanol presenta un mayor rendimiento debido a la alta solubilidad de los compuestos grasos y carotenoides, pero se co-extraen otras sustancias diferentes a los carotenoides, conduciendo a un alto rendimiento en la extracción de la oleorresina.

De acuerdo a los resultados, se seleccionó el método convencional (A), que si bien consume tiempo permite realizar la extracción de capsantina desde una mayor cantidad de hojuelas y resulta económico por la menor cantidad de solvente a utilizar durante la extracción.

### 3.3 Caracterización de las oleorresinas

La Tabla 4 muestra el contenido de capsantina y  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH) en las oleorresinas de hojuela de pimentón.

**Tabla 4. Contenido de capsantina y  $\alpha$ -tocoferol en las oleorresinas de hojuelas de pimentón.**

Oleorresina	$\alpha$ -tocoferol (mg/100 g de oleorresina)	Capsantina ( $\mu$ g/g oleorresina)
Aceite de girasol	$46 \pm 0,4^c$	nd
OC	$46 \pm 2,4^c$	$74,6 \pm 0,03^c$
OS	$62 \pm 0,5^a$	$92,9 \pm 0,05^a$
OSS	$54 \pm 0,3^b$	$85,9 \pm 0,04^b$

OS: oleorresina saponificada; OSS: oleorresina sin saponificar; OC: oleorresina de capsantina aislada; nd: no detectado; \*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre oleorresinas.

El contenido de  $\alpha$ -TOH en la oleorresina saponificada (OS) y sin saponificar (OSS) fue significativamente mayor con respecto al aceite de girasol y la oleorresina de extracto de capsantina aislada (OC) (Anexo 9.8). Estos resultados son esperables debido a que en el procedimiento de separación de capsantina por columna abierta se pierde el  $\alpha$ -TOH que está presente en forma natural en el pimentón.

La cantidad de  $\alpha$ -TOH presente en los extractos estudiados de pimentón es superior a lo reportado para espinacas, espárragos, ají rojo (Daood *et al.*, 1996) y pimentón en materia fresca (Kanner *et al.*, 1979; Ching y Mohamed 2001).

### 3.4 Microencapsulación de las oleorresinas

En las Tablas 5 y 6 se observan los resultados del diseño Composito central, centrado en la cara, para la encapsulación de oleorresinas de extracto de hojuelas de pimentón saponificado (OS-C) y sin saponificar (OSS-C) con Capsul<sup>®</sup> por secado por atomización. Los resultados se presentan como porcentaje de capsantina superficial, eficiencia de encapsulación y recuperación de capsantina.

**Tabla 5. Eficiencia de encapsulación de capsantina de acuerdo al diseño composito central centrado en la cara para oleorresina de extracto de hojuelas de pimentón saponificado encapsulado con Capsul® (OS-C).**

Relación Oleorresina/ Capsul®	Temperatura (°C)	Capsantina superficial (% ±DE)	Eficiencia Encapsulación capsantina (% ± DE)	Recuperación capsantina (% ± DE)
1:1	150	57,5 ± 2,6	42,5 ± 2,6	32,7 ± 1,3
1:1	175	64,9 ± 4,4	35,1 ± 4,4	31,9 ± 1,3
1:1	200	59,9 ± 0,4	40,1 ± 0,4	31,9 ± 0,2
1:2	150	33,3 ± 0,4	66,7 ± 0,4	54,6 ± 0,4
1:2	175	32,4 ± 4,9	67,6 ± 4,9	52,6 ± 1,7
1:2	175	33,6 ± 0,2	66,4 ± 0,2	50,2 ± 1,1
1:2	200	26,8 ± 4,7	73,2 ± 4,7	55,9 ± 1,3
1:3	150	16,0 ± 0,9	84,0 ± 0,9	74,5 ± 2,5
1:3	175	14,3 ± 1,5	85,7 ± 1,5	71,1 ± 0,3
1:3	200	16,9 ± 1,5	84,4 ± 3,3	74,5 ± 1,8

DE: desviación estándar

**Tabla 6. Eficiencia de encapsulación de capsantina de acuerdo al diseño composito central centrado en la cara para oleorresina de extracto de hojuelas de pimentón sin saponificar encapsulado con Capsul® (OSS-C).**

Relación Oleorresina/ Capsul®	Temperatura (°C)	Capsantina superficial (% ±DE)	Eficiencia Encapsulación capsantina (% ± DE)	Recuperación capsantina (% ± DE)
1:1	150	47,0 ± 0,7	53,0 ± 0,7	28,6 ± 0,6
1:1	175	52,6 ± 2,8	47,4 ± 2,8	28,0 ± 0,5
1:1	200	61,9 ± 0,3	38,1 ± 0,3	29,6 ± 2,0
1:2	150	42,4 ± 0,6	57,6 ± 0,6	55,9 ± 0,1
1:2	175	32,3 ± 0,3	67,7 ± 0,3	54,6 ± 0,5
1:2	175	32,7 ± 1,2	67,3 ± 1,2	57,7 ± 2,5
1:2	200	30,5 ± 1,2	69,5 ± 1,2	58,4 ± 1,2
1:3	150	9,3 ± 0,3	90,7 ± 0,3	65,1 ± 2,5
1:3	175	10,7 ± 2,4	89,3 ± 2,4	69,6 ± 1,1
1:3	200	8,4 ± 0,4	91,6 ± 0,4	69,9 ± 2,5

DE: desviación estándar

En los sistemas OS-C, OSS-C el contenido de capsantina superficial varió entre 14,3%-64,9% y 8,4%-61,9%, respectivamente; la eficiencia de encapsulación de capsantina varió entre 35,1%-

85,7% y 38,1%-91,6%, respectivamente y la recuperación de capsantina entre 31,9%-74,5% y 28,0%-69,9%, respectivamente.

En los sistemas OS-C y OSS-C a medida que se incrementó el contenido de agente encapsulante disminuyó el porcentaje de capsantina superficial, mejorando en forma sustancial la eficiencia de encapsulación y la recuperación de capsantina. El mayor contenido de material encapsulante incrementa la velocidad de formación de una costra sobre la superficie de las gotas lo que permite la difusión de agua desde el interior de las micropartículas y aumenta la retención de los pigmentos carotenoides (Soottitantawat *et al.*, 2005). Capsul<sup>®</sup> es un almidón modificado que posee baja viscosidad, lo que permite una alta incorporación de sólidos en la solución a secar, lo que explicaría una mejor retención del compuesto encapsulado (Reineccius, 1991).

Al utilizar secado por atomización se encuentran resultados variables de eficiencia de encapsulación de pigmentos carotenoides dependiendo del agente encapsulante empleado. Se han reportado valores de eficiencia de encapsulación sobre un 90% para licopeno con goma arábica y sacarosa (Larroza y Mercandante, 2007) y para  $\beta$ -caroteno con copolímero de  $\beta$  y  $\kappa$  carragenato (Laos *et al.*, 2007), mientras que, valores inferiores a los obtenidos en este estudio se han reportado para licopeno con gelatina y sacarosa (Shu *et al.*, 2006) y para  $\beta$ -caroteno con maltodextrina (DE 25) (Desobri *et al.*, 1997).

La recuperación de capsantina después del proceso de secado alcanzó valores de 31,9-74,5% y 28,0-69,9% en los sistemas OS-C y OSS-C, respectivamente. La temperatura de secado y la velocidad de formación de la costra son los principales factores que afectan la recuperación de pigmentos carotenoides durante el proceso de secado (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Por otro lado, Capsul es un almidón modificado que puede crear una red continua unida por enlaces de hidrógeno, lo que resulta en la formación de un gel que atrapa los carotenoides (Loksuwan, 2007). Recuperaciones similares a la de este estudio obtuvieron Robert *et al.* (2003) al encapsular mediante secado por atomización una oleorresina de rosa mosqueta utilizando almidón de papa como agente encapsulante, con valores de 71%, 54% y 57% de recuperación para  $\beta$ -caroteno, licopeno y rubixantina, respectivamente. Una recuperación mayor al máximo de este estudio se obtuvo al encapsular  $\beta$ -caroteno mediante secado por atomización con almidón modificado de tapioca (82,2%) (Loksuwan, 2007).



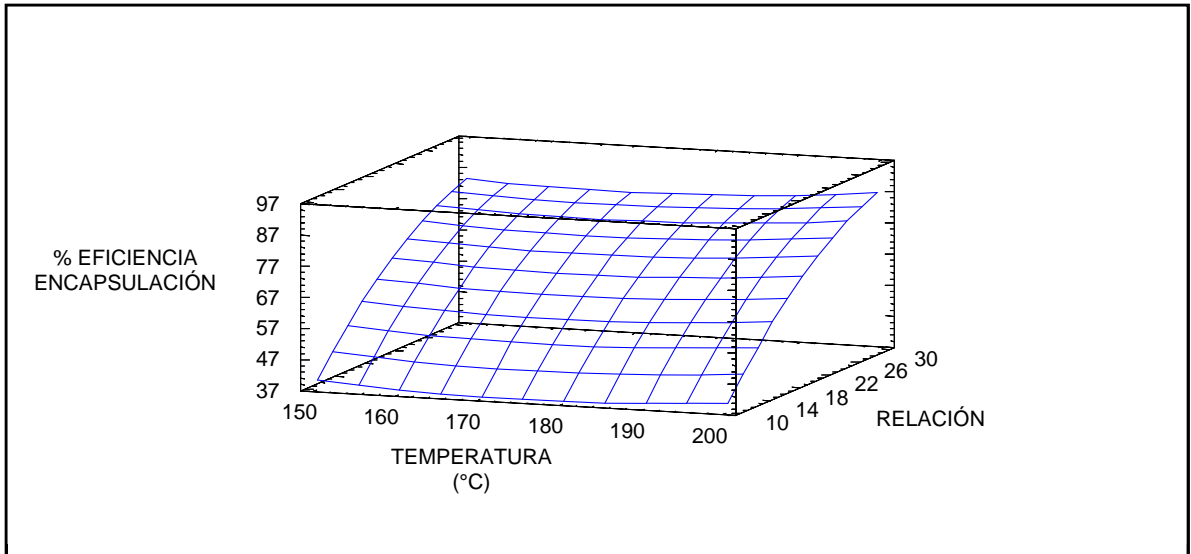
### 3.5 Micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas

La metodología de Superficie Respuesta se aplicó para optimizar la eficiencia de encapsulación de capsantina para los sistemas OS-C y OSS-C, considerando las formas lineales, cuadráticas e interacción de las variables independientes (temperatura y relación oleorresina/ Capsul<sup>®</sup>) para cada sistema estudiado.

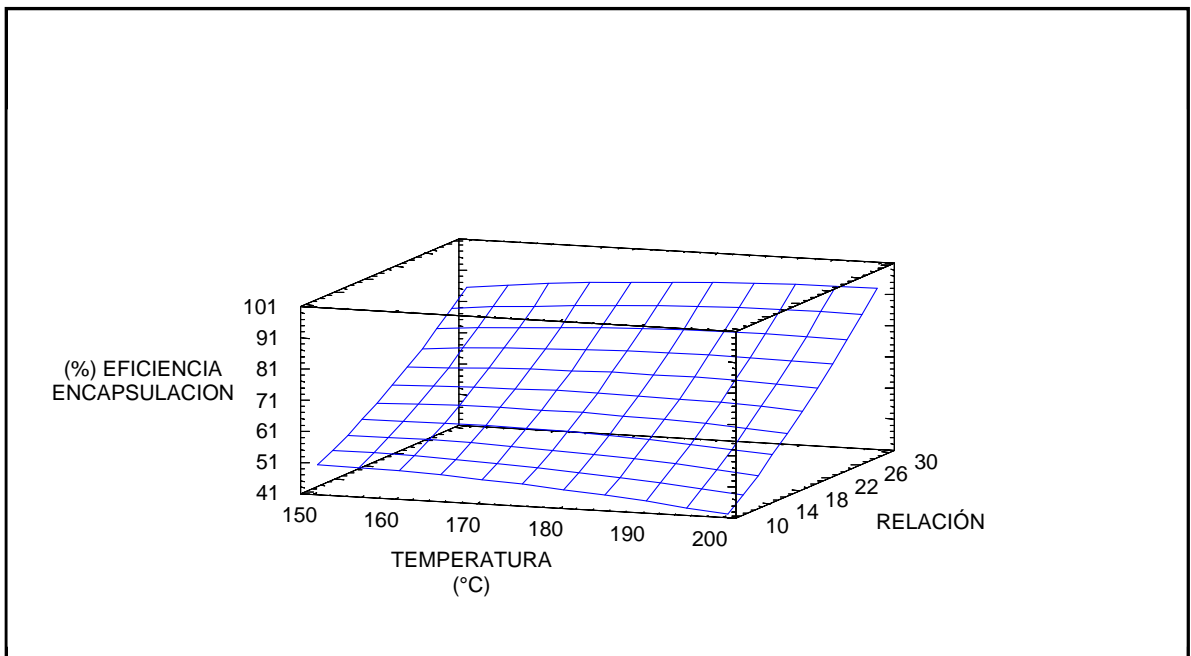
La degradación de capsantina se ha asociado con reacciones de oxidación y/o degradación inducidas por la temperatura, sin embargo, la temperatura de entrada al secador en su forma lineal, cuadrática y su interacción con la relación oleorresina/Capsul<sup>®</sup> no presentaron un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación de capsantina ( $p > 0,05$ ) para los dos sistemas estudiados (OS-C y OSS-C) (Anexo 9.1 y 9.2).

Por otro lado, la variable relación oleorresina/Capsul<sup>®</sup> en su forma lineal presentó un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación de capsantina ( $p < 0,05$ ) para los sistemas OS-C y OSS-C (Anexo 9.1 y 9.2). Al analizar el gráfico de Pareto se observa que hay un efecto positivo de la relación oleorresina/Capsul<sup>®</sup> sobre la eficiencia de encapsulación. El componente cuadrático de la relación oleorresina/Capsul<sup>®</sup> sólo fue significativo en el sistema OS-C. El valor  $r^2$  ajustado indica que el modelo explica el 97,3% y 90,6% de la variabilidad en la eficiencia de encapsulación en los sistemas OS-C y OSS-C, respectivamente.

Las Figuras 6 y 7 muestran los gráficos de Superficie Respuesta estimada para el diseño composito central centrado en la cara para los sistema OS-C y OSS-C, respectivamente. En estas figuras se observa que en la medida que se incrementa la relación oleorresina/Capsul, mejora la eficiencia de encapsulación de capsantina. La temperatura no ejerce un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación, sin embargo, a mayores temperaturas de secado mejora la retención de capsantina debido a un aumento en la velocidad de secado, reduciendo el tiempo de residencia de los pigmentos carotenoides (Rosenberg *et al.*, 1990).



**Figura 6. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para el diseño compuesto central centrado en la cara para el sistema OS-C.**



**Figura 7. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para el diseño compuesto central centrado en la cara para el sistema OSS-C.**

En la Tabla 7 se presentan las condiciones óptimas de elaboración de las micropartículas de los sistemas OS-C y OSS-C. Para el sistema OC-C se consideraron las mismas condiciones óptimas de los sistemas anteriores.

**Tabla 7. Condiciones y caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas OS-C, OSS-C y OC-C.**

Sistemas	Relación Oleoresina/Capsul®	Temperatura de entrada (° C)	Capsantina superficial (% ±DE)	Eficiencia Encapsulación de capsantina (% ± DE)	Recuperación de capsantina (% ± DE)
OS-C	1:3	200	16,9 ± 1,5 <sup>a</sup>	83,1 ± 1,5 <sup>c</sup>	74,5 ± 1,8 <sup>a</sup>
OSS-C	1:3	200	8,4 ± 0,3 <sup>c</sup>	91,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	69,9 ± 2,5 <sup>a</sup>
OC-C	1:3	200	11,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	88,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	68,2 ± 0,2 <sup>a</sup>

OS-C: oleoresina saponificada-Capsul®; OSS-C: oleoresina sin saponificar-Capsul®; OC-C: oleoresina capsantina aislada-Capsul®. \*Letras distintas en columnas, indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

El porcentaje de recuperación no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los sistemas estudiados, porque las micropartículas se prepararon utilizando las mismas condiciones óptimas de oleoresina/Capsul y temperatura de entrada al secador, siendo el efecto del tipo de oleoresina el principal efecto a evaluar. Así, los resultados muestran que los sistemas donde la capsantina estaba libre (OS-C y OC-C) presentaron una eficiencia de encapsulación significativamente menor ( $p < 0,05$ ) con respecto al sistema OSS-C (Anexo 9.5), mostrando que los ácidos grasos que esterifican a la capsantina en el sistema OSS-C favorecen su interacción con los sitios hidrofóbicos del Capsul®, disminuyendo el porcentaje de superficiales.

En la Tabla 8 se presenta el contenido de humedad y tamaño de las micropartículas de los sistemas OC-C, OS-C y OSS-C obtenidas bajo condiciones óptimas.

**Tabla 8. Contenido de humedad y tamaño de las micropartículas de los sistemas OC-C, OS-C y OSS-C, obtenidas bajo condiciones óptimas.**

Sistema	Humedad (% ± DS)	Tamaño de partícula D(3,2) (µm)
OC-C	5,3 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,9
OSS-C	5,6 ± 0,20 <sup>a</sup>	3,9
OS-C	3,4 ± 0,09 <sup>b</sup>	4,4

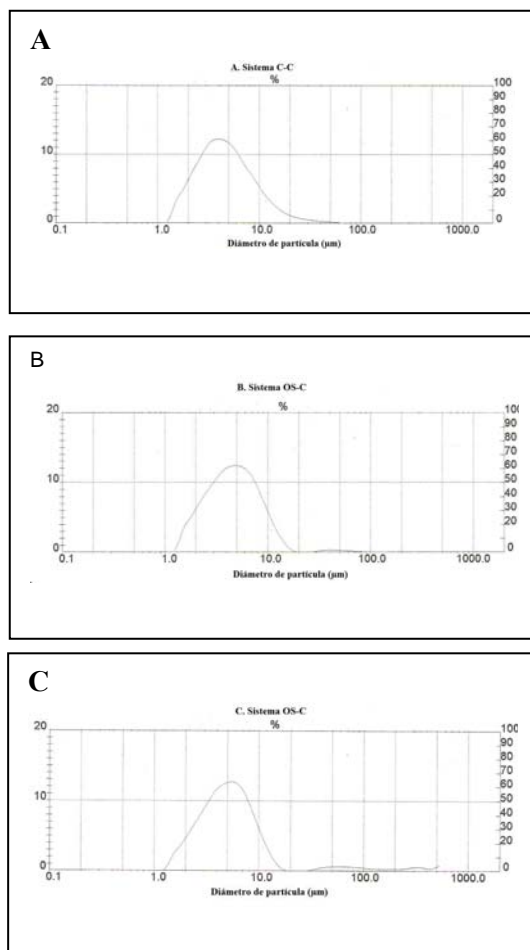
OS-C: oleoresina saponificada-Capsul®; OSS-C: oleoresina sin saponificar-Capsul®; OC-C: oleoresina capsantina aislada-Capsul®. \*Letras distintas indican diferencias significativas entre sistemas ( $p < 0,05$ ).

La humedad presentó un rango de 3,4 a 5,6% (Anexo 9.4), que se encuentra dentro del rango esperado para micropartículas elaboradas utilizando secado por atomización como método de encapsulación, permitiendo asegurar la calidad microbiológica de las micropartículas.

Como se observa en la Tabla 8 el tamaño de las micropartículas elaboradas en condiciones óptimas se presenta de acuerdo al valor D (3,2), el cual fluctuó entre 3,9 y 4,4  $\mu\text{m}$  y está dentro de los rangos reportados en la literatura en procesos de secado por atomización (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Tamaños de partícula dentro del rango encontrado en este estudio se han reportado para micropartículas de oleoresina de pimienta negra con almidón modificado (Shaikh *et al.*, 2006) y licopeno con una mezcla de gelatina y sacarosa (Shu *et al.*, 2006), con rangos de 1,38-24  $\mu\text{m}$ , 5-15  $\mu\text{m}$  y 2-15  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Rangos de tamaño de partícula más amplios se encontraron en micropartículas de oleoresina de pimentón con gránulos porosos de almidón de arroz/gelatina (2-60  $\mu\text{m}$ ) y con goma arábica (2-50  $\mu\text{m}$ ) (Santos *et al.*, 2005);  $\beta$ -caroteno con almidón de tapioca modificado (75-150  $\mu\text{m}$ ), almidón de tapioca nativo (106-250  $\mu\text{m}$ ) y maltodextrina (DE 24) (106-250  $\mu\text{m}$ ) (Loksuwan, 2007); d-limoneno con goma arábica, maltodextrina y mezclas de ambas utilizando como emulsificante éster de sacarosa, éster de poliglicerol y pectina de remolacha azucarera (13,8-35,1  $\mu\text{m}$ ) (Paramita *et al.*, 2010).

La Figura 8 (A, B, C) muestra las curvas de distribución de tamaño para las micropartículas de los sistemas OC-C, OS-C y OSS-C obtenidas bajo condiciones óptimas, respectivamente. La distribución de tamaño para los tres sistemas estudiados fue unimodal, con partículas en sólo un rango de tamaño.

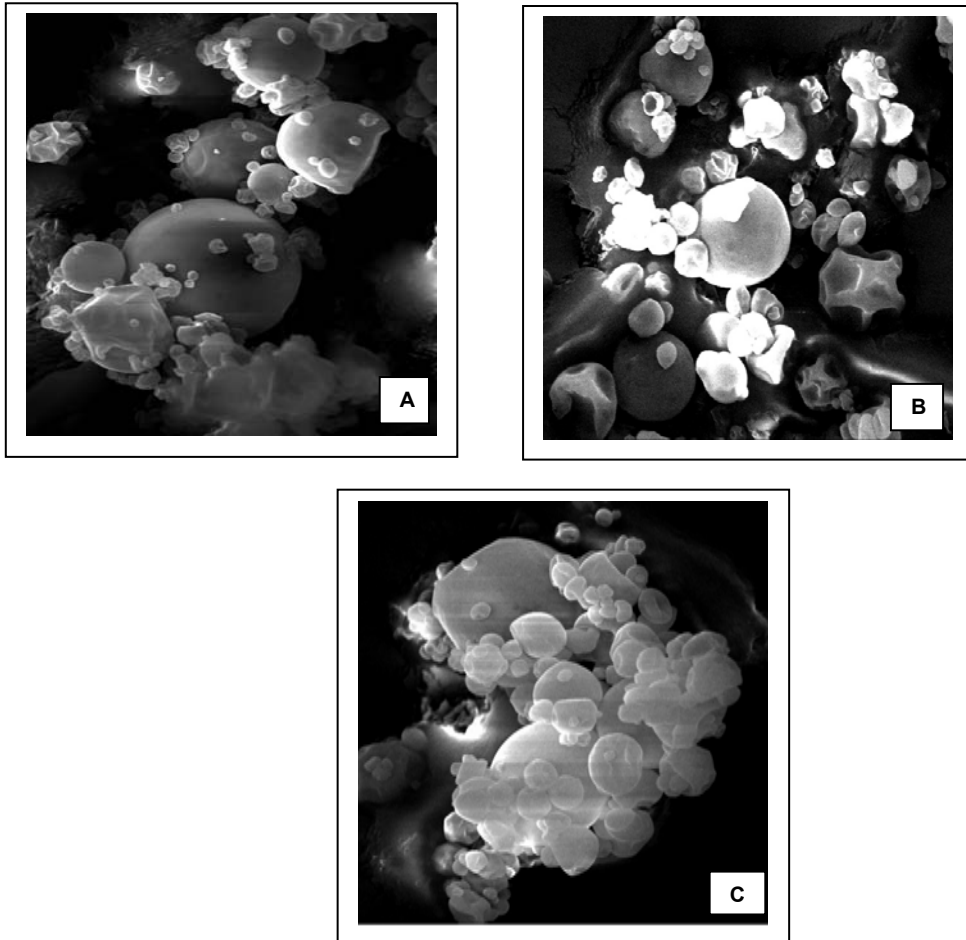


**Figura 8: Distribución de tamaño de partícula para las micropartículas de los sistemas OC-C (A), OS-C (B) y OSS-C (C) obtenidas bajo condiciones óptimas.**

La Figura 9 (A, B y C) muestra las fotografías por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las micropartículas de los sistemas OC-C, OS-C y OSS-C, obtenidas bajo condiciones óptimas, respectivamente.

En los tres sistemas se observan micropartículas con forma esférica y paredes lisas, junto a micropartículas con superficie contraída. Ambos tipos de micropartículas presentan paredes continuas y aparentemente sin presencia de fisuras o grietas. La formación de micropartículas con abolladuras es una característica usual del secado por atomización. El encogimiento de las partículas durante el proceso de secado se puede producir a bajas o altas temperaturas de

entrada al secador (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005). A bajas temperaturas, existe una menor difusión del agua y las partículas tienen más tiempo para encogerse, mientras que a altas temperaturas, la rápida evaporación del agua y la alta presión en el interior de las partículas, también produce encogimiento.



**Figura 9. Microfotografías SEM para las micropartículas de los sistemas OC-C (A); OS-C (B) y OSS-C (C), obtenidas bajo condiciones óptimas (Mag. 300 Kx).**

Una morfología similar se observó en micropartículas de  $\beta$ -caroteno con almidón de tapioca modificado, almidón de tapioca nativo y maltodextrina (24 DE) como agentes encapsulantes (Loksuwan, 2007), de licopeno con Capsul (Rocha *et al.*, 2012), de oleorresina de comino con goma arábica, maltodextrina (18 DE) y almidón modificado (Hi Cap-100) (Kanakdande *et al.*,

2007), de l-mentol con Capsul® y Hi Cap-100 (Soottitantawat *et al.*, 2005) y de oleorresina de pimienta negra con goma arábica y Hi Cap-100 (Shaikh *et al.*, 2006).

A diferencia de lo encontrado en este estudio, Santos *et al.* (2005) y Soottitantawat *et al.* (2005) reportaron que las micropartículas preparadas con goma arábica presentaron mayores abolladuras que las micropartículas obtenidas con Capsul®, Hi Cap-100 y almidón de arroz. Además, Krishnan *et al.* (2005b) encontraron que las micropartículas preparadas con almidón de arroz-gelatina presenta intersticios y poros, debido a que la gelatina no forma una película continua en la superficie comprometiendo su capacidad de actuar como material de barrera, similar a lo reportado en la encapsulación de oleorresina de cardamomo utilizando Hi Cap-100 y maltodextrina.

La morfología de las micropartículas depende de diferentes parámetros que intervienen en el secado como: temperatura de alimentación al secador, temperatura del aire de entrada al secador y solvente utilizado entre otros factores (Kosaraju *et al.*, 2006).

### **3.6 Estudio de estabilidad de capsantina**

La cinética de degradación de capsantina fue monitoreada durante el almacenamiento de las micropartículas de los sistemas OC-C, OS-C y OSS-C obtenidas bajo condiciones óptimas a 40, 50 y 70° C. Se determinó el orden de la reacción, constantes de velocidad, vida media y parámetros termodinámicos.

La Figura 10 (A, B, C) muestra el logaritmo natural del porcentaje de retención de capsantina versus tiempo (h) para las micropartículas de los sistemas OC-C, OS-C y OSS-C obtenidas bajo condiciones óptima, almacenadas a 40, 50 y 70° C. A partir de la pendiente de estos gráficos, se obtuvieron las constantes de velocidad de degradación de capsantina para cada sistema y temperaturas estudiadas.

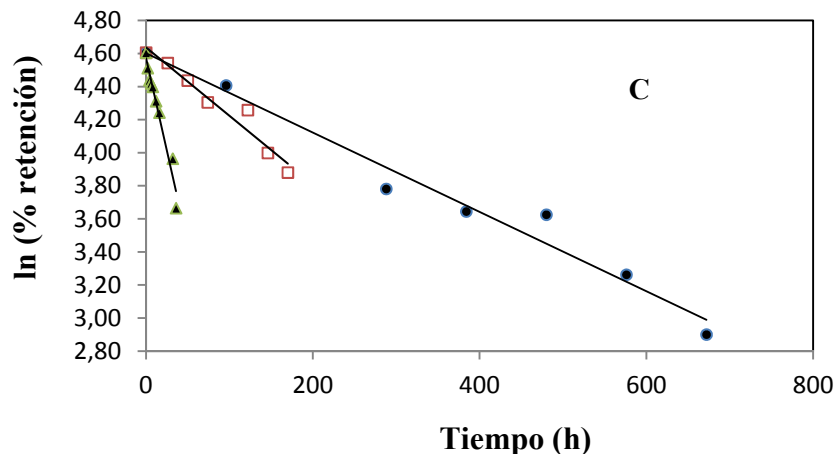
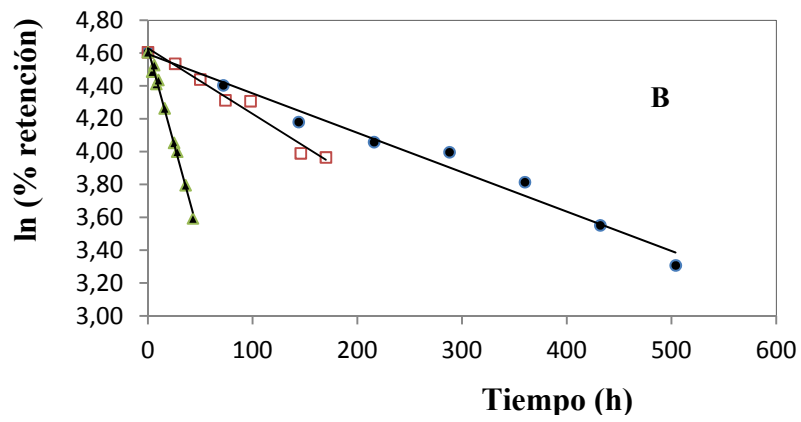
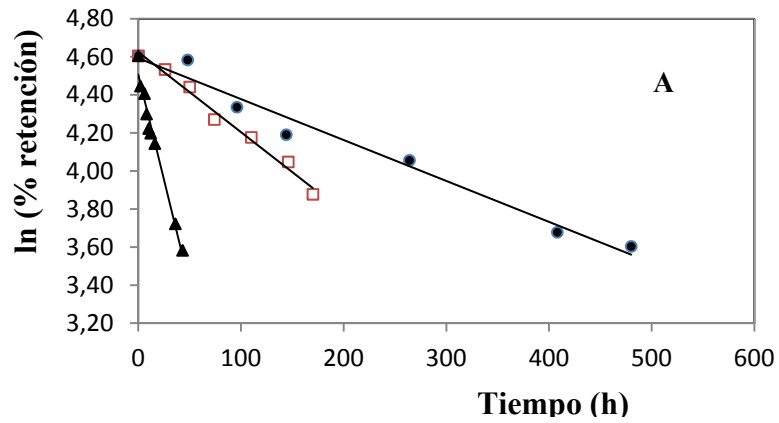


Figura 10. Cinética de degradación de capsantina para las micropartículas de los sistemas OC-C (A), OS-C (B), OSS-C (C) obtenidas bajo condiciones óptimas ● (40°C), □ (50°C) y ▲ (70°C) .



El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se utilizó como criterio para determinar el orden de reacción. La degradación de capsantina en los tres sistemas siguió una cinética de primer orden a las tres temperaturas estudiadas. Resultados similares se reportaron para: oleorresina de pimentón (Jarén-Galán y Mínguez Mosquera, 1999; Rascón *et al.*, 2011), extracto de pimentón disuelto en agua (Shin *et al.*, 2001) y solución estándar de capsantina esterificada y no esterificada (Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2002b). La misma cinética de degradación se reportó para  $\beta$ -caroteno (Ramoneda *et al.*, 2011), y para *trans*- $\beta$ -caroteno, *trans*-licopeno y *trans*-rubixantina (Robert *et al.*, 2003). Contrariamente, en oleorresina de paprika microencapsulada se encontró una cinética de degradación de carotenoides de segundo orden (Beatus *et al.*, 1985).

La Tabla 9 muestra las constantes de velocidad de degradación de capsantina ( $k$ ) en las micropartículas de los sistemas OSS-C, OS-C y OC-C obtenidas bajo condiciones óptimas, almacenadas a 40, 50 y 70° C.

**Tabla 9. Constantes de velocidad de degradación ( $k$ ) de capsantina en las micropartículas de los sistemas OSS-C, OS-C, OC-C obtenidas bajo condiciones óptimas, almacenadas a 40, 50 y 70° C.**

SISTEMAS			
Temperatura (°C)	OSS-C $k$ ( $h^{-1}$ ) $\pm$ DE	OS-C $k$ ( $h^{-1}$ ) $\pm$ DE	OC-C $k$ ( $h^{-1}$ ) $\pm$ DE
40	$2,4 \times 10^{-3} \pm 0,9 \times 10^{-4a}$	$2,4 \times 10^{-3} \pm 2,8 \times 10^{-4a}$	$2,0 \times 10^{-3} \pm 2,8 \times 10^{-4a}$
50	$4,0 \times 10^{-3} \pm 3,5 \times 10^{-4b}$	$4,0 \times 10^{-3} \pm 2,8 \times 10^{-4b}$	$4,2 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-4b}$
70	$2,3 \times 10^{-2} \pm 1,6 \times 10^{-3c}$	$2,3 \times 10^{-2} \pm 1,6 \times 10^{-3c}$	$2,2 \times 10^{-2} \pm 2,1 \times 10^{-4c}$

OC-C: oleorresina capsantina- capsul; OS-C: oleorresina saponificada-capsul; OSS-C: oleorresina sin saponificar-capsul. Letras distintas indican diferencias significativas

Un incremento en la temperatura de almacenamiento llevó a un aumento en la constante de velocidad de degradación ( $k$ ) de capsantina en los tres sistemas estudiados. La velocidad de degradación de capsantina encontrada es menor a lo indicado para otros carotenoides como rubixantina, licopeno y  $\beta$ -caroteno encapsulados con almidón y gelatina (Robert *et al.*, 2003), sugiriendo que la estabilidad de los pigmentos carotenoides depende de su estructura química y de la naturaleza del polímero utilizado como agente encapsulante.

No se observó isomerización de la capsantina durante el estudio de estabilidad de las micropartículas de los tres sistemas a las tres temperaturas estudiadas, en acuerdo con lo encontrado por Wagner y Warthesen (1995) para  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno encapsulados con almidón hidrolizado almacenados a temperaturas entre 37 y 65° C.

La velocidad de degradación de capsantina en las micropartículas con capsantina aislada (OC-C), saponificada (OS-C) y sin saponificar (OSS-C) no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) a cada una de las temperaturas estudiadas (Anexo 9.6), indicando que la esterificación de la capsantina no influye sobre la estabilidad de este pigmento. En estudios con otros carotenoides esterificados con ácidos grasos poliinsaturados se observó un aumento en la constante de velocidad de degradación debido a que un ambiente más oxidativo aceleraría la degradación de los pigmentos al compararla con las formas sin esterificar (Pérez-Galvez y Mínguez-Mosquera, 2002a). Estas diferencias se podrían atribuir al tipo de ácido graso que esterifica a la capsantina ya que, en pimentón la capsantina está esterificada preferentemente con ácidos grasos saturados.

Los estudios acerca del efecto de carotenoides esterificados y no esterificados sobre la oxidación de lípidos son controversiales. Goda *et al.* (1997) y Matsufuji *et al.* (1998) reportaron que la capsantina esterificada y no esterificada inhibe la oxidación por el mismo mecanismo, lo que sugiere que la habilidad de la capsantina de atrapar radicales libres no es influenciada por la esterificación, sino que estaría dada principalmente por la presencia del grupo ceto en su estructura. Sin embargo, Biacs *et al.* (1989) reportaron que la capsantina esterificada es más estable hacia lipoxigenasas de las semillas que la capsantina no esterificada. Mientras que Jarén-Galán y Mínguez-Mosquera (1997) encontraron que la capsantina diesterificada y el  $\beta$  caroteno son más inestables que la capsantina no esterificada.

La Tabla 10 presenta los parámetros de Arrhenius, vida media y parámetros termodinámicos para capsantina de las micropartículas en los tres sistemas estudiados (OC-C; OS-C; OSS-C) almacenadas a 40, 50 y 70°C. En la Figura 10 se muestra la línea isocinética de degradación de capsantina.

**Tabla 10. Parámetros de Arrhenius, vida media, y parámetros termodinámicos de Capsantina en las micropartículas de los sistemas OSS-C, OS-C y OC-C, obtenidas bajo condiciones óptimas.**

Sistemas	Energía activación (Kcal/mol)	Intercepto (ln A)	R <sup>2</sup>	Vida media calculada a 25°C (días ± DE)	Entalpía de activación (Kcal/mol)	Entropía de activación (cal/mol K)	R <sup>2</sup>
OC-C	17,3 ± 0,86 <sup>a</sup>	21,5 ± 1,26 <sup>a</sup>	0,99	62	16,6 ± 0,86 <sup>a</sup>	-20,9 ± 2,51 <sup>a</sup>	0,99
OS-C	16,5 ± 0,28 <sup>a</sup>	20,5 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,98	53	15,9 ± 0,28 <sup>a</sup>	-22,9 ± 0,68 <sup>a</sup>	0,98
OSS-C	15,9 ± 0,41 <sup>a</sup>	19,5 ± 0,69 <sup>a</sup>	0,98	48	15,3 ± 0,42 <sup>a</sup>	-24,8 ± 1,37 <sup>a</sup>	0,98

OC-C: oleorresina capsantina- capsul; OS-C: oleorresina saponificada-capsul; OSS-C: oleorresina sin saponificar-capsul.

La entalpía de activación ( $\Delta H^\ddagger$ ) y entropía de activación ( $\Delta S^\ddagger$ ) se obtuvieron de la pendiente e intercepto, respectivamente del gráfico de  $\ln(k/T)$  vs  $1/T$ . El análisis estadístico no mostró diferencias significativas para la energía de activación, entalpía de activación y entropía de activación entre los sistemas estudiados (OC-C, OS-C y OSS-C) (Anexo 9.7). Pérez-Galvez *et al.* (2000) reportaron la misma energía de activación para la fracción roja de oleorresina de pimentón, sin embargo, la entalpía de activación fue superior y la entropía de activación inferior, a lo reportado en este estudio, debido a que la capsorrubina se incluyó en la fracción roja y ésta es más estable que capsantina.

La vida media estimada de capsantina a 25° C wa mayor a lo reportado para micropartículas de oleorresina de rosa mosqueta encapsulada (Robert *et al.*, 2003), de  $\beta$ -caroteno (7-27 días a 25°C) (Desobry *et al.*, 1997) y de carotenoides de oleorresina de ají (18-25 días a 35°C) (Rodriguez –Huezo *et al.*, 2004), todos utilizando secado por atomización como método de encapsulación.

Por otro lado es posible observar que a mayor entalpía disminuye la entropía de activación, la existencia de dicha inversión supone un punto isocinético que podría conducir matemáticamente a una relación lineal entre la entalpía y la entropía de activación como un efecto de compensación (Labuza, 1980).

En la Figura 11 se presenta el gráfico de entalpía de activación versus entropía de activación ( $r^2= 0,999$ ), que sugiere que la capsantina, independiente de la forma en que se encuentre, se degrada por un mecanismo similar (Ulgen y Ozilgen, 1991). El mismo efecto fue reportado por

Henry *et al.* (1998) en la cinética de degradación oxidativa de licopeno, luteína, 9-*cis* y *trans*- $\beta$ -caroteno en aceite de azafrán.

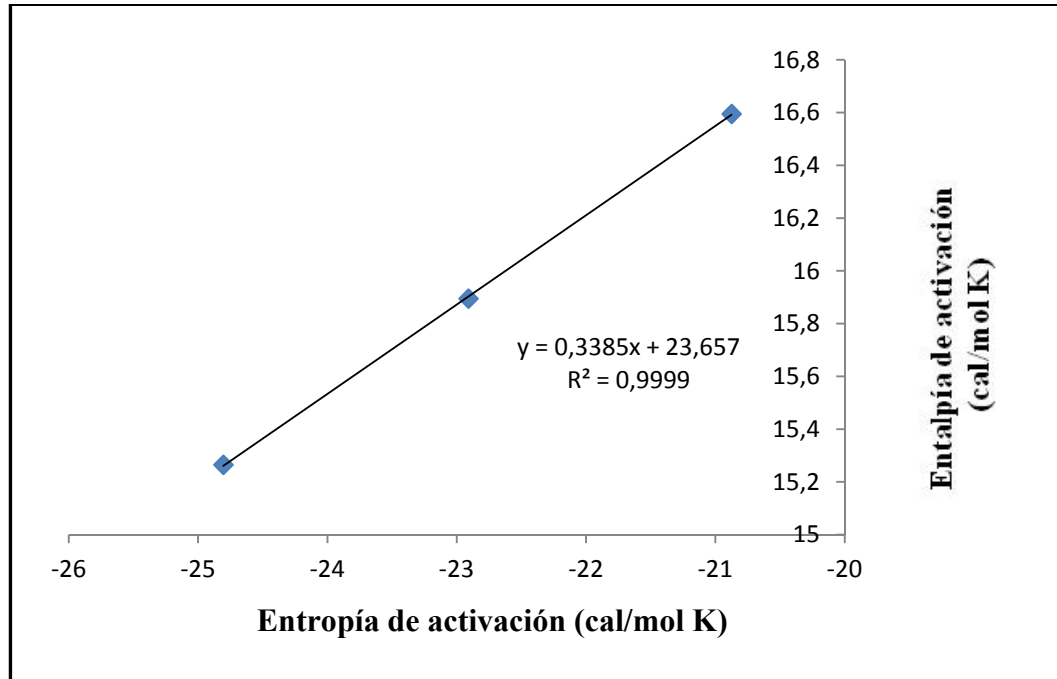


Figura 11. Línea isocinética para degradación de capsantina.

#### 4. CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió el efecto de la esterificación de capsantina sobre la eficiencia de encapsulación y la estabilidad de capsantina. Los resultados obtenidos mostraron que la hipótesis y objetivos planteados se cumplieron.

1. En la encapsulación de oleorresinas de hojuelas de pimentón, la variable relación oleorresina/capsul tuvo un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación de capsantina, la cual aumentó con la mayor incorporación de Capsul en la formulación.
2. Las micropartículas con oleorresina de hojuelas de pimentón donde la capsantina se encuentra esterificada (OSS-C) mostraron una eficiencia de encapsulación mayor con respecto a aquellas micropartículas con capsantina sin esterificar (OS-C y OC-C), sugiriendo que los ácidos grasos que esterifican a la capsantina en el sistema OSS-C favorece su interacción con los sitios hidrofóbicos del Capsul®.
3. Las constantes de velocidad de degradación de capsantina fueron iguales para los tres sistemas de micropartículas (OSS-C, OS-C y OC-C) estudiadas, mostrando que la esterificación de la capsantina no afecta su estabilidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitirían el desarrollo de micropartículas de oleorresina de hojuelas de pimentón con potencial aplicación como ingredientes funcionales.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. AIZAWA, K. y INAKUMA, T. Dietary capsanthin, the main carotenoid in paprika (*Capsicum annuum*), alters plasma high density lipoprotein cholesterol levels and hepatic gene expression in rats. British Journal of Nutrition. 102: 1760-1766, 2009.
2. ALAMILLA-BELTRÁN, L., CHANONA-PÉREZ, J. J., JIMÉNEZ-APARICIO, A. R., GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. Description of morphological changes of particles along spray drying. Journal of Food Engineering. 67: 179-184, 2005.
3. ALMELA, L., LÓPEZ-ROCA, J., CANDELA, M., ALCÁZAR, M. Carotenoid composition of new cultivars of red pepper for paprika. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 39: 1606-1609, 1991.
4. AMAYA, C., SERNA, S., CÁRDENAS, E., NEVERA-MUÑOZ, A. Evaluation of different solvent systems for the extraction and fractionation of oleoresins from guajillo peppers. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 47: 127-130, 1997.
5. AOCS. Fatty Acids Composition by GLC, cis, cis and the trans Isomers, Official Methods of Analysis and Recommended Practices. In: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign, IL,: AOCS Press, 1993.
6. AOCS, Ai 2 75. Moisture and volatile matter. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist Society, 1993.
7. AUGUSTÍN, M., y HEMAR, Y. Nano and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. Chemical Society Reviews. 38: 902-912, 2009.
8. BEATUS, Y., RAZIEL, A., ROSENBERG, M., KOPELMAN, I. Spray-drying microencapsulation of paprika oleoresin. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 18: 28-34, 1985.
9. BEKKER, N.P., UT'CHENCO, N.T., GLUSHENKOVA, A.I. Physicochemical properties and composition of lipids from *capsicum annuum* seeds. Chemistry of Natural Compounds. 37 (2): 131-133, 2001.
10. BIACS, P., CZINKOTAI, B., HOSCHKE, A. Factors affecting stability of colored substances in paprika powders. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 363-367, 1992.
11. BIACS, P., DAOOD, H., PAVISA, A., HAJDU, F. Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annuum* L. var Sz-20). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 37 (2): 350-353, 1989.
12. BURNS, J., FRASER, P., BRAMLEY, P. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. Phytochemistry. 62 (6): 939-947, 2003.
13. CARDONA, E., RÍOS, L., RESTREPO, V., GLORIA M. Extracción del carotenoide licopeno del tomate chonto (*Lycopersicum esculentum*). Vitae. 13 (2): 44-53, 2006.
14. CZINKOTAI, B., DAOOD, H., BIACS, P., HAJDU, F. Separation and detection of paprika pigments by HPLC. Journal of Liquid Chromatography. 12: 2707-2717, 1989.
15. CHING, L. y MOHAMED, S. Alpha-tocopherol content in 62 tropical plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 3101-3105, 2001.
16. DAOOD, H. G.; VINKLER, M.; MARKUS, F.; HEBSHI, E. A.; BIACS, P. A. Antioxidant Vitamin Content of Spice Red Pepper (Paprika) as Affected by Technological and Varietal Factors. Food Chemistry. 55 (4), 365-372, 1996.
17. DELI, J., MOLNAR, P., MATUS, Z., TOTH, G. Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during ripening;

- biosynthesis of carotenoids in red paprika. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 1517–1523, 2001.
18. DESAI, K. y PARK, H. Recent development in microencapsulation of foods ingredients. Drying Technology. 23 (7): 1361-1394, 2005.
  19. DESOBRI, S; NETTO, F; LABUZA, T. Comparison of spray-drying and freeze drying for Beta-carotene encapsulation and preservation. Journal of Food Science. 62: 1158-1162, 1997.
  20. FINOTELLI, P. y ROCHA-LEAO, M. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray drying. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering. 1-11, 2005.
  21. FLORES-MARTÍNEZ, H., OSORIO, G., GALLARDO, T. Optimal spray-drier encapsulation process of orange oil, Drying. Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004). Sao Paulo, Brazil, 22-25 August 2004, vol A, pp. 621-627, 2004.
  22. GAO, Y., NAGY, B., LIU, X., SIMANDI, B., WANG, Q. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lutein esters from Marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound. The Journal of Supercritical Fluids. 49: 345-350, 2009.
  23. GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an review. Food Research International. 40: 1107-1121, 2007.
  24. GIBBS, B., KERMASHA, S., ALLI, I., MULLIGAN, N. Encapsulation in the food industry: a review. International Journal of Food Science and Nutrition. 50: 213-224, 1999.
  25. GODA, Y., NAKAMURA, H., SAKAMOTO, S., ISHIKAWA, K., MAITANI, T., YAMADA, T. Photostability of coloring constituents in paprika color. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 38: 240-247, 1997.
  26. GÓMEZ-LADRÓN DE GUEVARA, R., GONZÁLEZ, M., GARCÍA-MESEGUER, M., NIETO, J., AMO, M., VARÓN, R. Effect of adding natural antioxidants on color stability of paprika. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82: 1061-1069, 2002.
  27. GOVINDARAJAN, V.S. Capsicum Production, Technology, Chemistry, and Quality-Part II. Processed Products, Standards, World Production and Trade. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 23: 207-288, 1986.
  28. HASLER, C.M. Functional foods: their role in disease prevention and health. Food Technology. 52, 63–69, 1998.
  29. HENRY, L., CATIGNANI, G., SCHWARTZ, S. Oxidative degradation kinetic of Lycopene, Lutein, and 9-cis and all-trans  $\beta$ -Carotene. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75 (7): 823-829, 1998.
  30. HIRAYAMA, O., NAKAMURA, K., HAMADA, S., KOBAYASHI, Y. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. Lipids. 29: 149-150, 1994.
  31. HOJNIK, M., SKERGET, M., KNEZ, Z. Extraction of lutein from Marigold flower petals. Experimental kinetics and modelling. Food Science and Technology. 41 (10): 2008-2016, 2008.
  32. HORNERO-MÉNDEZ, D. y MÍNGUEZ-MOSQUERA, I. Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplast of *Capsicum annum* ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (5): 1617-1622, 2000.

33. HORNERO-MÉNDEZ, D., GÓMEZ, R., MÍNGUEZ MOSQUERA, M.I. Carotenoid Biosynthesis Changes in Five Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars during Ripening. Cultivar Selection for Breeding. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (9): 3857-3864, 2000.
34. ITTAH, Y., KANNER, J., GRANIT, R. Hydrolysis study of carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annuum* L. variety Lahava) by HPLC/Photodiode Array Detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 41(6): 899-901, 1993.
35. JARÉN-GALÁN, M. y MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.  $\beta$ -Carotene and Capsanthin Co-oxidation by lipoxygenase. Kinetic and thermodynamic aspect of the reaction. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 4814-4820, 1997.
36. JARÉN-GALÁN, M. y MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. Quantitative and qualitative changes associated with heat treatments in the carotenoid content of paprika oleoresins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 4379-4383, 1999.
37. JONSDOTTIR, R., BRAGADOTTIR, M., ARNARSON, G. Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). Journal of Food Science. 70(7): 433-440, 2005.
38. JUNG, JM.. y SUNG, T.K. A new method for analysis of capsaicinoids content in microcapsule. Kor. Journal of Food Science Technology. 32: 42-49, 2000.
39. KANAKDANDE, D., BHOSALE, R., SINGHAL, R. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum Arabic, maltodextrin and modified starch. Carbohydrates Polymers. 67: 536-541, 2007.
40. KANNER, J.; HAREL, S.; MENDEL, H. Content and stability of R-tocopherol in fresh and dehydrated pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 27: 1316-1318, 1979.
41. KAPLAN, DL. Biopolymers from renewable resources. Berlín: Springer, 1998.
42. KOLANOWSKI, W., LAUFENBERG, G., KUNZ, B. Fish oil stabilisation by microencapsulation with modified cellulose. International Journal of Food Science and Nutrition. 55(4):333-43, 2004.
43. KOSARAJU, S.L., D'ATH, L., LAWRENCE, A. Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery. Carbohydrate Polymers. 64: 163-167, 2006.
44. KRISHNAN, S., BHOSALE, R., SINGHAL, R. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum Arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. Carbohydrate polymers. 61: 95-102, 2005a.
45. KRISHNAN, S., KSHIRSAGAR, A., SINGHAL, R. The use of gum Arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. Carbohydrate polymers. 62: 309-315, 2005b.
46. LABUZA, T.P. Enthalpy/Entropy compensation in food reactions. Food Technology. 34: 67-77, 1980.
47. LANDRUM, J. y BONE, R. Lutein, Zeaxanthin and the macular pigment. Archives of Biochemistry and Biophysics. 385: 28-40, 2001.
48. LAOS, K., LOUGAS, T., MANDEMETS, A., VOKK, R. Encapsulation of  $\beta$ -carotene from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice in Furcellaran Beads. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 8: 395-398, 2007.
49. LARROZA, N., y MERCADANTE A. Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. Brazilian Archives of Biology and Technology, An International Journal. 50 (5): 893-900, 2007.



50. LOKSUWAN, J. Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. Food Hydrocolloids. 21: 928-935, 2007.
51. MARCHAL, L., BEEFTINK, H., TRAMPER, J. Towards a rational design of commercial maltodextrins. Trends in Food Science and Technology. 6: 397-406, 1999.
52. MARÍN, A., FERRERES, F., TOMÁS-BARBERÁN, F., GIL, M. Characterization and quantification of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 3861-3869, 2004.
53. MÁRKUS, F., DAOOD, H., KAPITÁNY, J., BIACS, P. Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 100-107, 1999.
54. MARTÍN, J., LENIS, L., OROZCO, M., SOLARTE, C. Extracción de pigmento del fruto del ají (*Capsicum spp*) y cuantificación de los carotenoides mayoritarios capsantina y capsorrubina. El hombre y la máquina. 27: 94-99, 2006.
55. MATSUFUJI, H., NAKAMURA, H., CHINO, M., TAKEDA, M. Antioxidant Activity of Capsanthin and the Fatty Acid Esters in Paprika (*Capsicum annuum*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46: 3468-3472, 1998.
56. MATSUFUJI, H., ISHIKAWA, K., NUNOMURA, O., CHINO, M., TAKEDA, M. Anti-oxidant content of different coloured sweet peppers, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annuum L.*). International Journal of Food Science and Technology. 42: 1482-1488, 2007.
57. MATUS, Z., DELI, J., SZABOLCS, J. Carotenoid composition of yellow pepper during ripening: isolation of beta cryptoxanthin 5,6-epoxide. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 39 (11):1907–1914, 1991.
58. MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A., VICARIO, I., HEREDIA, F. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 54 (2): 149-155, 2004.
59. MEUNIER, J., CARDOT, J., MANZANILLA, E., WYSSHAAR, M., ALRIC, M. Use of spray-cooling technology for development of microencapsulated capsicum oleoresin for the growing pig as an alternative to in-feed antibiotics: A study of release using in vitro model. Journal of Animal Science. 85:2699–2710, 2007.
60. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., y HORNERO-MÉNDEZ, D. Separation and quantification of the carotenoid pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum L.*), paprika and oleoresin by Reversed Phase HPLC. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 41: 1616 –1620, 1993.
61. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I., y HORNERO-MÉNDEZ, D. Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola and Agridulce. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42: 38-44, 1994a.
62. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M., y HORNERO-MÉNDEZ, D. Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42:640–644, 1994b.
63. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. y HORNERO MÉNDEZ, D. Comparative study of the effect of paprika processing on the carotenoid in peppers (*Capsicum annuum*) of the Bola and Agriculce Varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42: 1555-1560, 1994c.
64. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M., PÉREZ-GÁLVEZ, A., HORNERO-MÉNDEZ, D. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples “colorantes” naturales. CTC Alimentación. 26: 108-113, 2006.

65. MOZAFARI, M., KHOSRAVI, K., BORAZAN, G., CUI, J., PARDAKHTY, A., YURDUGUL, S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. International Journal of Food. Properties. 11: 833-844, 2008.
66. NACHTIGALL, A. Extracao, saponificacao e actividade antioxidante de luteína obtida de flores de Tagetes patula L. and Calendula officinalis L. Tesis (Doctor Scientiae). Vicosa Minas Gerais, Brasil Universidade Federal de Vicosa, 2007.
67. PARAMITA V., FURUTA T., YOSHI H. Microencapsulation efficacy of d-Limonene by spray drying using various combinations of wall materials and emulsifiers. Food Science and Technology Research. 16: 365-372, 2010.
68. PARK, P., KIM, E., CHU, K. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. Separation and Purification Technology. 53: 148-152, 2007.
69. PASQUET, V., CHÉROUVRIER, J., FARHAT, F., THIÉRY, V., PIOT, J., BÉRARD, V., KAAS, R., SERIVE, B., PATRICE, T., CADORET, J., PICOT, L. Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction. Process Biochemistry, 2010.
70. PEDROZA, R. Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. México, 2002.
71. PÉREZ-GÁLVEZ, A., JARÉN-GALÁN, M., MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I. Effect of high-temperature degradative processes on ketocarotenoids present in paprika oleoresin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 2966-2971, 2000.
72. PÉREZ-GÁLVEZ, A. y MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. Structure-reactivity relationship in the oxidation of carotenoid pigments of the pepper (*Capsicum annum L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 4864-4869, 2001.
73. PÉREZ-GÁLVEZ, A. y MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. Lipid environment as modulator of the oxidation process of xanthophylls present in red pepper fruit (*Capsicum annum L.*). In: Empis JA (ed) Functionalities of pigments in food. Artes Gráficas, Alcabideche, pp 315-318, 2002a.
74. PÉREZ GÁLVEZ, A. y MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I. Degradation of non-esterified and esterified xanthophylls by free radical. Biochimica et Biophysica Acta. 1569: 31-34, 2002b.
75. PÉREZ-GÁLVEZ, A. y MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. Degradation, under non-oxygen-mediated autooxidation, of carotenoid profile present in paprika oleoresins with lipid substrates of different fatty acid composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 632-637, 2004.
76. PÉREZ-GÁLVEZ, A, JARÉN-GALÁN, M, MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. Impact of the increased thermal processing on retinol equivalent values of paprika oleoresin. Journal of Food Engineering. 71, 379-385, 2005.
77. PÉREZ-GÁLVEZ, A., LÓPEZ, J., NÚÑEZ, E., DEL AMOR, F., CARBONELL, A. Effects of agricultural practices on color, carotenoids composition, and minerals contents of sweet peppers, cv. Almuden. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55: 8158-8164, 2007.
78. RAFAJLOVSKA, V., SLAVESKA, R., KOLEVA, L., KLOPCESKA, J. Spice paprika oleoresin extraction under different conditions involving acetone and etanol. Journal of Food Agriculture and Environment. 5 (2): 65-69, 2007.
79. RAMESH, M., WOLF, W., TEVINI, D., Jung G. Influence of processing parameters on the drying of spicy paprika. Journal of Food Engineering. 49: 63-72, 2001.

80. RAMONEDA, X., Peggy, A., Ponce, M., Buera, M., Elizalde, B. Degradation of Beta-carotene encapsulated in mixtures of amorphous polymer matrices: Effect of water sorption properties and physical state. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2011.
81. RASCÓN, M., BERISTAÍN, C., GARCÍA, H., SALGADO, M. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. Food Science and Technology. 44: 549-557, 2011.
82. RÉ, I. Microencapsulation by spray drying. Drying Technology. 16 (6): 1195-1236, 1998.
83. REINECCIUS, G. Carbohydrates for flavor encapsulation. Food Technology. 45: 144-146, 1991.
84. RESTREPO, M. Oleorresinas de capsicum en la industria alimentaria. Lasallista de Investigación. 3 (2): 43-47, 2006.
85. ROBERT, P., CARLSSON, R., ROMERO, N., MASSON, L. Stability of spray-drying encapsulated carotenoid pigments from Rosa Mosqueta (Rosa rubiginosa) oleoresin. Journal of the American Oil Chemists' Society. 80 (11): 1115-1120, 2003.
86. ROCHA, G., FÁVARO, C., FERREIRA, C. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. Food and Bioproducts Processing. 90: 37-42, 2012.
87. RODRIGUEZ-HUEZO, M.E., R. PEDROZA-ISLAS, L.A. PRADO-BARRAGAN, C.I. BERISTAIN AND E.J. VERNON-CARTER, Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. Journal of Food Science. 69: 351-359, 2004.
88. RODRÍGUEZ, Y., DEPESTRE, T., GÓMEZ, O. Obtención de líneas de pimiento (*Capsicum annum*) progenitoras de híbridos F1, resistentes a enfermedades virales, a partir del estudio de cuatro sub-poblaciones. Ciencia e Investigación Agraria. 34 (3): 237-242, 2007.
89. RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI Press: Washington D.C, 1999.
90. ROSENBERG M., Kopelman I., Talmon Y. Factors affecting retention in spray-drying micro-encapsulation of volatile materials. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38: 1288-1294, 1990.
91. ROSENBERG, M. y LEE, S. Water-insoluble, whey protein-based microspheres prepared by an all-aqueous process. Journal of Food Science. 69: 50-58, 2004.
92. SAÉNZ, C., TAPIA, S., CHÁVEZ, J., ROBERT, P. Microencapsulacion by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). Food Chemistry. 114 (2): 616-622, 2009.
93. SANTAMARÍA, R., REYES, M., BÁRZANA, E., FERNANDO, D., GAMA, F., MOTA, M., LÓPEZ, A. Selective enzyme mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili Guajillo Puya (*Capsicum annum L.*) using ethanol as solvent. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 3063-3067, 2000.
94. SANTOS, A., FAVARO, C., GROSSO, C. Preparation and characterization of paprika oleoresin microcapsules obtained by spray drying. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 25: 322-326, 2005.
95. SCHWARTZ, M. Secado por atomización. Factores que intervienen en la retención del aroma en los alimentos. Alimentos. 14 (4): 65-67, 1989.

96. SCHWEIGGERT, U., KAMMERER, D., CARLE, R., SCHIEBER, A. Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum L.*) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Rapid. Communications in Mass Spectrom. 19:2617-2628, 2005.
97. SHAHIDI, F. y HAN, X. Encapsulation of food ingredients. Critical Review in Food Science and Nutrition. 33 (6): 501-547, 1993.
98. SHAIKH J., BHOSALE R., SINGHAL R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. Food Chemistry. 94: 105-110, 2006.
99. SHIN, J., CHUNG, H., SEO, J., SIM, J., HUH, C., KIM, S., BAEK, Y. Degradation kinetic of capsanthin in paprika (*Capsicum annuum L.*) as affected by heating. Journal of Food Science. 66: 15- 19, 2001.
100. SHU, B; YU, W; ZHAO, Y; LIU, X. Study on microencapsulation by spray drying. Journal of Food Engineering. 76: 664-669, 2006.
101. SOOTTITANTAWAT, A., TAKAYAMA, K., OKAMURA, K., MURANAKA, D., YOSHII, H., FURUTA, T., OHKAWARA, M., LINKO, P. Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics. Innovative Food Science and Emerging technologies. 6 (2): 163-170, 2005.
102. SOVOVÁ, H., SAJFRTOVÁ, M., BÁRTLOVÁ, M., OPLETAL, L. Near-Critical extraction of pigments and oleoresin from stinging nettle leaves. The Journal of Supercritical Fluids. 30: 213-224, 2004.
103. STAHL, W. y SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspect of Medicine. 24: 345-351, 2003.
104. SUN, T., XU, Z., WU, T., JANES, M., PRINYAWIWATKUL, W., NO, H. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum L.*). Journal of Food Science. 72 (2): 98-102, 2007.
105. TRUBIANO, P. y LACOURSE, N. Emulsionstabilizing starches. In: RISCH, S.J.; Reineccius G.A. Flavor encapsulation. Washington, DC: ACS, 1988. 45-54. (ACS Symposium Series, 370).
106. ULGEN, N. y OZILGEN, M. Kinetic compensation relations for ascorbic acid degradation and pectinesterase inactivation during orange juice pasteurization. Journal of the Science of Food and Agriculture. 57: 93-100, 1991.
107. UQUICHE, E., del VALLE, J., ORTIZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annuum L.*) oleoresin. Journal of Food Engineering. 65: 55-66, 2004.
108. WAGNER, L., y WARTHESEN, J. Stability of Spray-Dried encapsulated carrot carotenes. Journal of Food Science. 60: 1048.1053, 1995.
109. XIANG, Y., LIU, D., YANG, J., JIN, P., CHENG, M. 1997. Microencapsulation of *Capsicum* oleoresin. Food Science, China. 18 (11): 27-30. Zilberboim R, Kopelman I., Talmon Y. 1986. Microencapsulation by a dehydrating liquid: Retention of paprika oleoresin and aromatic esters. Journal of Food Science. 51: 1301-1306, 1997.

## 6. ANEXOS

### ANEXO 1

#### PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE CAPSANTINA A PARTIR DE HOJUELAS DE PIMENTÓN PELETIZADO

##### **Extracción 1 (Método de Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993)**

1. Para la extracción se pesaron 2 g de hojuelas de pimentón deshidratado, las que fueron molidas en un mortero. Se agregaron 2 g de Celite® para facilitar la molienda.
2. Una vez molidas, se colocaron en un embudo con papel filtro y se fue agregando acetona p.a, la que fue recolectada en un matraz junto con los pigmentos, hasta que no se observó color en las hojuelas molidas.
3. Posteriormente los pigmentos que quedaron en la acetona utilizada en el paso 2, fueron transferidos a éter etílico en un embudo de decantación, realizando sucesivos lavados con agua destilada para eliminar la acetona e impurezas. Una vez traspasados los pigmentos a éter etílico, la mezcla fue tratada varias veces con sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para remover toda el agua.
4. La fase éter, que contiene los pigmentos en diferentes estados de esterificación con ácidos grasos, fue saponificada con solución de KOH-Metanol al 10% por 12 horas en la oscuridad (relación fase éter: KOH-Metanol al 10% fue de 50:50).
5. Posteriormente, la fase orgánica, que contiene los pigmentos saponificados, fue lavada varias veces con agua destilada hasta pH neutro.
6. Finalmente, la muestra fue filtrada haciéndola pasar por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , recolectada y almacenada a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

##### **Extracción 2 (Método de Hojnik *et al.*, 2008)**

1. La extracción de los pigmentos carotenoides combinó la extracción con una saponificación simultánea.

2. Se utilizó hexano, etanol, acetona ó etil acetato grado p.a. como solvente (relación solvente/materia prima de hojuelas de pimentón 1 L/100 g) y solución de hidróxido de potasio al 10% p/v (relación solución alcali/materia prima de hojuelas de pimentón, 7,5 mL/g).
3. Se colocaron las hojuelas de pimentón molidas, el solvente y la solución de saponificación al mismo tiempo en un matraz, manteniendo la muestra en agitación constante y a temperatura de 40° C.
4. Se tomó 1 mL de extracto desde el matraz a los 2, 4, 8, 15, 30, 60, 120, 180 y 300 minutos, para la elaboración de la cinética de extracción de capsantina saponificada.
5. A las muestras obtenidas en el paso 4 se les realizaron sucesivos lavados con agua destilada, se filtró en papel filtro y se llevo a sequedad utilizando nitrógeno.
6. Las muestras se mantuvieron congeladas a -20° C hasta su análisis.
7. Los extractos fueron analizadas mediante HPLC, llevándolos a un aforo de 5 ml, 10 ml y 25 ml para que las áreas obtenidas estuvieran dentro de la curva de calibración y se calculó la concentración de capsantina saponificada.

## ANEXO 2

### CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Se empleó un equipo MERCK HITACHI D-600, con detector L-4250 UV visible y una bomba L-6200 Intelligent Pump, conectada a un microprocesador y un registrador computarizado. Se utilizó una columna RP-18 MERCK 3  $\mu$ m.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: longitud de onda de 450 nm, la fase móvil se presenta en la tabla 1.

**Tabla 1. Fase móvil en equipo HPLC**

Tiempo min	% Acetona	% Agua
0	75	25
5	75	25
10	95	5
17	95	5
22	100	0
27	75	25
37	75	25

El flujo fue de 1 mL/min y el volumen de inyección de 20  $\mu$ L.

#### **Cálculo de la concentración**

El cálculo de la concentración de capsantina se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula, utilizando el coeficiente de extinción en acetona ( $E^{1\%} = 2300$ ).

$$X (\mu\text{g}) = \frac{A * y (\text{mL}) * 10^6}{A^{1\%}_{1\text{cm}} * 100}$$

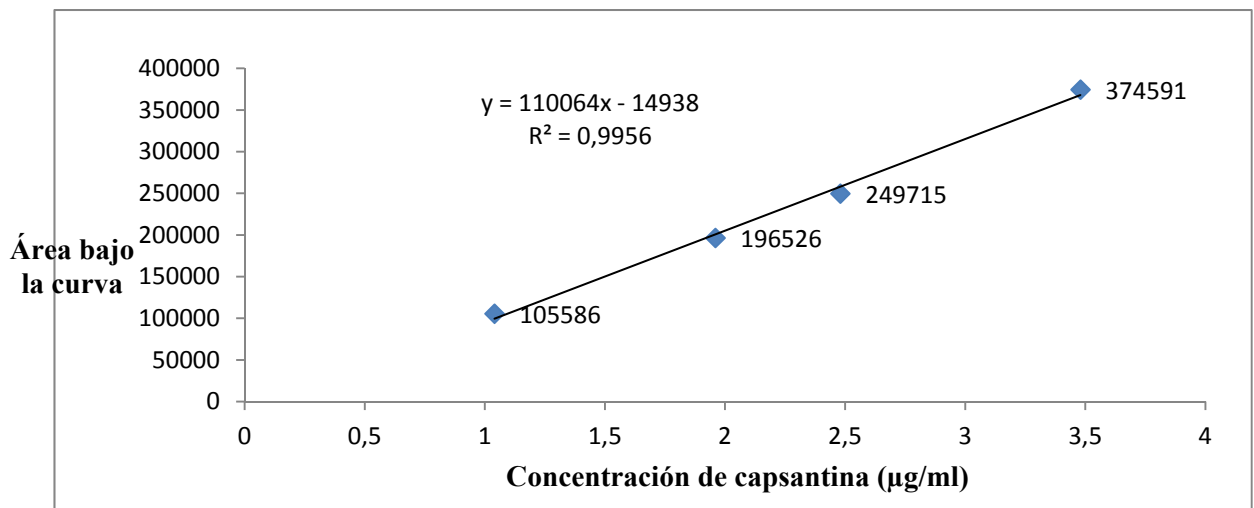
$$X (\mu\text{g/g}) = \frac{x (\mu\text{g})}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

Donde X es la concentración de capsantina, A la absorción y  $A^{1\%}_{1\text{cm}}$  es el coeficiente de absorción específico.

### Curva de calibración

1. La curva de calibración de capsantina se preparó a partir de la capsantina aislada por columna abierta, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a 460 nm, la concentración se estimó utilizando el coeficiente de extinción en acetona ( $E^{1\%} = 2300$ ).

2. La solución stock tuvo una concentración de 3,48  $\mu\text{g/ml}$  de capsantina, preparándose una serie de diluciones a partir de esta. La curva de capsantina se construyó utilizando las diluciones de 1,04, 1,96, 2,48, 3,48  $\mu\text{g/ml}$ . Luego se realizó la regresión lineal graficando el área bajo la curva versus la concentración de capsantina. Se obtuvo un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9956$  y la ecuación  $Y = 110064x - 14938$ .





### ANEXO 3

#### SEPARACIÓN DE CAPSANTINA POR COLUMNA ABIERTA Y PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR

1. Los carotenoides obtenidos según el método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993) se separaron utilizando una columna de vidrio de 25 cm de largo y 3 cm de diámetro.
2. La columna se sujetó a un soporte metálico mediante pinzas y se aplicó vacío.
3. En la columna se colocó una mezcla de óxido de Mg: Celite (1:1) hasta alcanzar una altura de 12 cm, enseguida se añadieron 2 cm de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro.
4. Se agregó la fase móvil de iniciación (éter de petróleo p.a.) hasta que se distribuyó uniformemente en toda la columna antes de agregar la muestra con los pigmentos.
5. Una vez añadida la muestra se fue cambiando la fase móvil en polaridad creciente para lograr una adecuada separación de los pigmentos carotenoides.
6. Los solventes utilizados fueron: 100% éter de petróleo (EP), 5% éter etílico en EP, 5-70% de acetona en EP, 100% acetona, 5% agua en acetona.
7. A cada fracción se le evaporó el solvente en un evaporador rotatorio y fueron inyectadas para su identificación en un equipo HPLC utilizando el método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993).

## ANEXO 4

### CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard (HP) 5890 serie II con detector FID, integrador HP 3395, con columna SP-2560, 100 m x 0,25  $\mu$ m film x 0,20 d.i. (Supelco, USA). Para preparar los ésteres metílicos se usó el método de la AOCS Ce-2 66, de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se pesaron 100 mg del extracto de capsantina esterificada, sin esterificar y capsantina aislada
2. Agregar 5 mL de solución de NaOH 0,5 N
3. Calentar por 5 minutos, luego enfriar.
4. Agregar 5 mL de trifloruro de boro en metanol y calentar por 3 minutos.
5. Enfriar y agregar NaCl saturado
6. Agregar 1.5 mL de hexano y agitar suavemente.
7. Agregar carbón activado a esta solución y retirar la fase hexano, filtrándola en embudo con papel filtro y recolectándola en un tubo con tapa. Repetir este proceso 3 veces.

Luego se inyectaron 0.5 microlitros de la fase hexano al cromatógrafo de gases. La temperatura inicial del horno fue de 160° C durante tres minutos y luego programada con un incremento de 2° C/min hasta alcanzar 200° C. La temperatura del inyector y la del detector correspondió a 240° C. El gas portador correspondió a hidrógeno. La identificación de cada ácido graso se efectuó mediante la determinación de los tiempos absolutos y relativos de retención de cada ácido graso, comparado con estándares puros Calbiochem (Merck, Darmstadt, Alemania).

## ANEXO 5

### DETERMINACIÓN DE TOCOFEROLES POR HPLC

#### Reactivos

- 1-. Hexano HPLC
- 2-. Estándares de tocoles.

#### Procedimiento:

Se pesaron 100 mg de aceite filtrado y anhidro, en un matraz ámbar aforado de 10 mL, aforando con hexano HPLC. Se inyectaron 20 µl de la solución anterior al equipo HPLC con detector de fluorescencia, de acuerdo al método de la AOCS Ce 8-89. El equipo HPLC estuvo compuesto de una bomba Merck-Hitachi L-6200 A (Merck, Darmstadt, Alemania), inyector Rheodyne 7725i, loop 20 µL, detector de fluorescencia Merck-Hitachi F-1050 acoplado a un computador con software Clarity. Los peaks fueron detectados a 290 nm (longitud de onda de excitación) y 330 nm (longitud de onda de emisión). Se utilizó una columna LiChrocart Superspher Si60 (250 x 4di, 5µm Merck, Alemania). La fase móvil correspondió a 2-propanol en hexano (0,5:99,5 v/v) con un flujo de 1mL/min. La identificación y cuantificación de tocoferoles se realizó usando un estándar Calbiochem (Merck, Darmstadt, Alemania).

La identificación y cuantificación se realizó por comparación con los estándares de tocoferoles de concentración conocida, mediante la siguiente fórmula:

$\text{Ppm Tocol} = (a \times C \times V \times d) / (A \times P)$ ; donde:

a= Área del peak del tocol en la muestra

C= Conc. Del tocol en el estándar (ug/ml)

V= Volumen del matraz aforado (ml)

D= Factor de dilución (si correspondiera)

A= Área del peak del tocol en el estándar

P= Peso de la muestra (g)

## ANEXO 6

### PREPARACIÓN DE LAS DISPERSIONES PARA MICROENCAPSULACIÓN

1. Para preparar 100 g de emulsión se utilizó un vaso de precipitado de 250 ml. Se prepararon emulsiones que contenían Capsul®, agua y oleorresina, empleando en los experimentos una relación oleorresina/agente encapsulante 1:1 (10% de oleorresina, 10% de Capsul® y 80% de agua); 1:2 (10% de oleorresina, 20% de Capsul® y 70% de agua) y 1:3 (10% de oleorresina, 30% de Capsul® y 60% de agua), correspondiente a un contenido teórico de un 50%, 33% y 25% de oleorresina en el polvo obtenido, respectivamente.

2. La emulsión se preparó calentando el agua hasta 70° C y se fue agregando lentamente el Capsul ® hasta su completa disolución que demoró aproximadamente 30 minutos y durante ese tiempo fue mantenida en agitación constante con un imán rotatorio.

3. Una vez disuelto el encapsulante, se enfrió la solución de Capsul®, colocando el vaso precipitado en agua fría, hasta que alcanzó la temperatura ambiental. Se retiró el imán del vaso precipitado y posteriormente se añadió la oleorresina en forma uniforme sobre la solución de Capsul ® y agua.

4. La emulsión resultante se homogeneizó en un homogenizador IKA modelo 750, Alemania según las siguientes condiciones:

- 15000 revoluciones por minuto (rpm) por 2 minutos
- 19000 rpm por 2 minutos.
- 22000 rpm por 1 minuto

y fue alimentada a un secador “spray”.

## ANEXO 7

### CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS

#### **Contenido de capsantina superficial**

Para la determinación de capsantina superficial, se pesaron 100 mg de micropartículas en un tubo con tapa, al cual se agregaron 3 mL de hexano:éter etílico (50:50) grado p.a. Se agitó en forma manual por 30 segundos. Una vez que el polvo decantó se retiró el sobrenadante, que contenía la capsantina superficial, con pipeta pasteur llevándolo a sequedad con Nitrógeno líquido. Posteriormente ese sobrenadante se disolvió en éter etílico y se saponificó según método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993). La determinación del contenido de capsantina se realizó por HPLC según el método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993).

#### **Contenido de capsantina total**

Para la determinación de capsantina total, se pesaron 100 mg de polvo en un tubo con tapa, se agregó 1 mL de agua bidestilada, homogeneizándolo en agitador eléctrico Vórtex® (Cenco Instrument B.V. Breda, Holanda) durante 1 minuto. Posteriormente se agregaron 2.5 ml de acetato de etilo, 2.5 mL de etanol, 2.5 mL de hexano y 2.5 mL de agua bidestilada, se homogeneizó en forma manual y se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 2 minutos para posteriormente retirar el sobrenadante con pipeta pasteur el que fue depositado en un matraz de corazón, esta operación fue repetida hasta que no se observó presencia de color en el residuo que quedó en el tubo. Posteriormente se evaporó el solvente del matraz de corazón en un evaporador rotario a 40° C y la muestra seca se disolvió en éter etílico y se realizó la saponificación según método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993). La determinación del contenido de capsantina se realizó por HPLC según el método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993).

## ANEXO 8

### CONCENTRACIÓN DE CAPSANTINA SAPONIFICADA DURANTE EL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y SAPONIFICACIÓN SIMULTÁNEA

**Tabla 1. Concentración de capsantina saponificada durante el proceso de extracción y saponificación simultánea desde hojuelas de pimentón deshidratado.**

Tiempo (min)	Concentración de capsantina saponificada (ug/g de hojuela de pimentón)			
	Solventes de extracción			
	Acetona	Etanol	Hexano	Etil acetato
0	0	0	0	0
2	631,39 ± 29,20	490,85 ± 6,43	0	167,88 ± 5,74
4	790,45 ± 72,38	771,59 ± 40,33	62,90 ± 2,36	162,70 ± 20,49
8	715,17 ± 54,37	837,97 ± 40,33	81,63 ± 0,31	182,27 ± 0,12
15	979,00 ± 63,82	1090,01 ± 6,40	143,64 ± 11,46	192,64 ± 10,23
30	868,55 ± 46,41	1105,82 ± 16,35	139,18 ± 8,61	209,76 ± 2,10
60	920,12 ± 16,90	1194,44 ± 33,59	153,21 ± 5,07	196,72 ± 10,69
120	1049,50 ± 61,17	1235,37 ± 27,87	158,25 ± 2,68	243,67 ± 14,64
180	1077,64 ± 38,46	1472,05 ± 41,64	186,28 ± 5,92	246,60 ± 1,56
300	1258,68 ± 56,77	1489,87 ± 6,56	189,29 ± 5,65	254,69 ± 2,08

## ANEXO 9

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### **9.1 Diseño de microencapsulación por secado por atomización de oleoresina de pimentón saponificada (*Capsicum annuum L.*) utilizando Capsul® como agente encapsulante.**

**Tabla 1. Análisis de varianza para eficiencia de encapsulación de capsantina en la oleoresina saponificada de *Capsicum annuum L.***

Fuente	Suma de cuadrados	de Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-valor
A:temperatura	3,30042	1	3,30042	0,33	0,5942
B: relación	3102,65	1	3102,65	314,18	0,0001
AA	15,5746	1	15,5746	1,58	0,2775
AB	2,08803	1	2,08803	0,21	0,6695
BB	111,781	1	111,781	11,32	0,0282
Error total	39,5013	4	9,87533		
Total (corr.)	3264,22	9			

R-cuadrado = 98,7899 por ciento

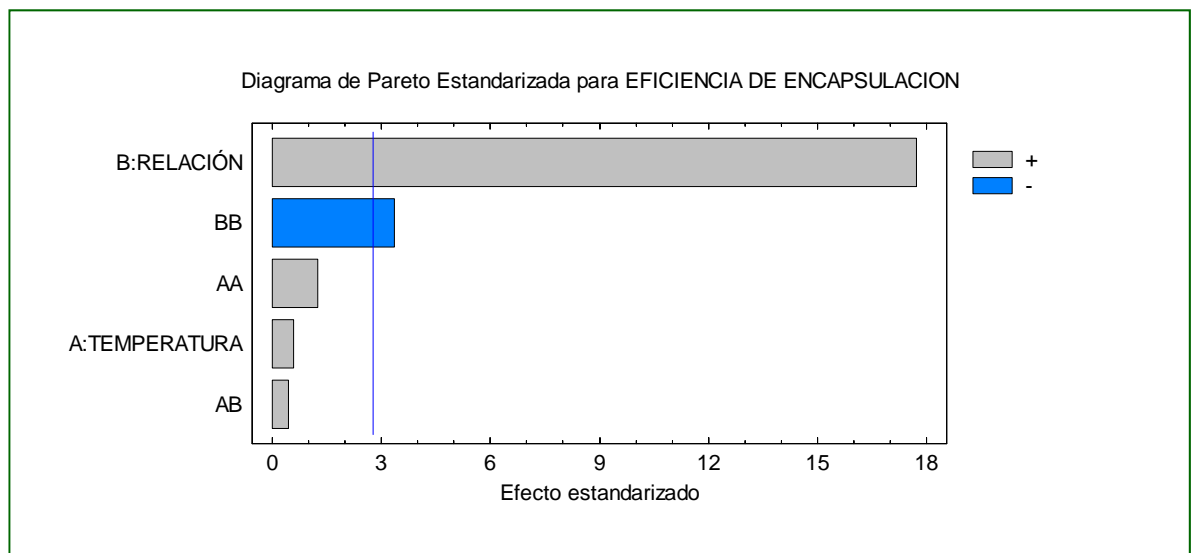
R-cuadrado (ajustada por gl) = 97,2772 por ciento

Error Estándar de Est. = 3,1425

Error absoluto de la media = 1,65607

Estadístico Durbin-Watson = 2,62514 (P = 0,8310)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0,319961



**Fig. 1. Gráfico de Pareto estandarizado para eficiencia de encapsulación de capsantina de micropartículas de oleoresina de pimentón saponificado.**

**Tabla 2. Condiciones óptimas para la obtención de micropartículas en la oleorresina de pimentón saponificada.**

Sistema	Relación oleorresina/Capsul	Temperatura (°C)
OS-C	1:3	200

**9.2 Diseño de microencapsulación por secado por atomización de oleorresina de pimentón sin saponificar (*Capsicum annuum L.*) utilizando Capsul® como agente encapsulante.**

**Tabla 3. Análisis de varianza para eficiencia de encapsulación de capsantina en la oleorresina sin saponificar de *Capsicum annuum L.***

Fuente	Suma de cuadrados	de Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:temperatura	0,749067	1	0,749067	0,02	0,8876
B: relación	2951,27	1	2951,27	89,35	0,0007
AA	6,78306	1	6,78306	0,21	0,6739
AB	61,4656	1	61,4656	1,86	0,2442
BB	22,7136	1	22,7136	0,69	0,4536
Error total	132,127	4	33,0318		
Total (corr.)	3171,7	9			

R-cuadrado = 95,8342 por ciento

R-cuadrado (ajustada por gl) = 90,6269 por ciento

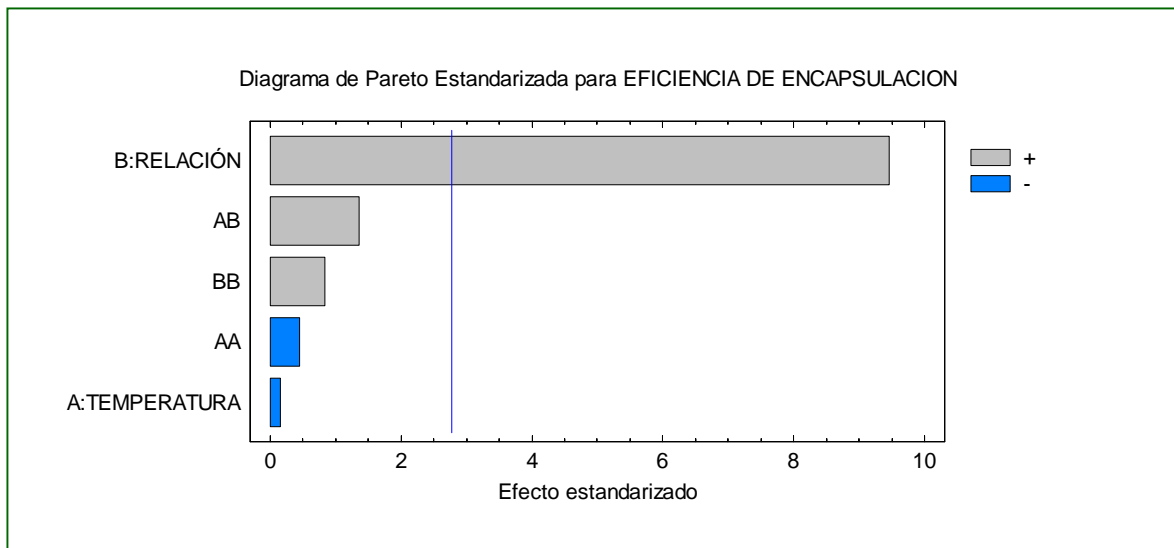
Error Estándar de Est. = 5,74733

Error absoluto de la media = 2,988

Estadístico Durbin-Watson = 1,70023 (P = 0,887)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0,0759568





**Fig. 2. Gráfico de Pareto estandarizado para eficiencia de encapsulación de capsantina de micropartículas de oleoresina de pimentón sin saponificar.**

**Tabla 4. Condiciones óptimas para la obtención de micropartículas en la oleoresina de pimentón sin saponificar.**

Sistema	Relación oleoresina/Capsul	Temperatura (°C)
OSS-C	1:3	200

### **9.3 Análisis estadístico de la extracción y saponificación simultánea de capsantina utilizando distintos solventes de extracción**

**Tabla 3. Análisis de varianza para los distintos solventes utilizados en la extracción y saponificación simultánea de capsantina a los 300 minutos de extracción y comparación con el método convencional.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,80018E6	4	950044,	453,33	0,0000
Intra grupos	10478,6	5	2095,72		
Total (Corr.)	3,81065E6	9			

**Tabla 4. Test de Tukey de comparación de los distintos solventes utilizados en la extracción y saponificación simultánea de capsantina a los 300 minutos de extracción y comparación con el método convencional.**

<b>Solventes</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
Hexano	2	189,295	A
Acetato de etilo	2	254,69	A
Acetona	2	1258,68	B
Etanol	2	1489,87	C
Mét. Convencional	2	1620,0	C

Letras distintas indican diferencias significativas

**9.4 Análisis estadístico para comparar el contenido de humedad en las micropartículas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C obtenidas bajo condiciones óptimas**

**Tabla 5. Análisis de varianza para el contenido de humedad en las micropartículas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	6,06573	2	3,03287	154,74	0,0009
Intra grupos	0,0588	3	0,0196		
Total (Corr.)	6,12453	5			

**Tabla 6 . Test de Tukey para comparar el contenido de humedad en las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

<b>Sistemas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
OS-C	2	3,35	A
C-C	2	5,28	B
OSS-C	2	5,64	B

Letras distintas indican diferencias significativas

**9.5 Análisis estadístico de superficiales, eficiencia de encapsulación y recuperación de capsantina de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

**Tabla 7. Análisis de varianza para el % de capsantina superficial de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	73,9429	2	36,9714	45,18	0,0058
Intra grupos	2,45485	3	0,818283		
Total (Corr.)	76,3977	5			

**Tabla 8. Test de Tukey para comparar las diferencias en el % de capsantina superficial de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

Sistemas	Casos	Media	Grupos Homogéneos
OSS-C	2	8,42	C
C-C	2	11,19	B
OS-C	2	16,855	A

Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 9. Análisis de varianza para el % de eficiencia de encapsulación de capsantina en las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	64,5274	2	32,2637	117,74	0,0014
Intra grupos	0,82205	3	0,274017		
Total (Corr.)	65,3495	5			

**Tabla 10. Test de Tukey para comparar las diferencias en el % de eficiencia de encapsulación de capsantina en las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

Sistema	Casos	Media	Grupos Homogéneos
OS-C	2	83,665	A
C-C	2	88,81	B
OSS-C	2	91,58	C

Letras distintas indican diferencias significativas

**Tabla 11. Análisis de varianza para % de recuperación de capsantina de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas en los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	43,1923	2	21,5961	6,63	0,0792
Intra grupos	9,7657	3	3,25523		
Total (Corr.)	52,958	5			

#### 9.6 Análisis estadístico para el estudio de estabilidad de capsantina a 40, 50 Y 70° C

**Tabla 12. Análisis de varianza de la velocidad de degradación de capsantina en las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C mantenidas a 40° C.**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	2,8E-7	2	1,4E-7	2,63	0,2193
Intra grupos	1,6E-7	3	5,33333E-8		
Total (Corr.)	4,4E-7	5			

**Tabla 13. Análisis de varianza de la velocidad de degradación de capsantina en las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C mantenidas a 50° C**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	4,33333E-8	2	2,16667E-8	0,29	0,7678
Intra grupos	2,2E-7	3	7,5E-8		
Total (Corr.)	2,68333E-7	5			

**Tabla 14. Análisis de varianza de la velocidad de degradación de capsantina en las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C mantenidas a 70° C.**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	0,0000014633	2	7,31667E-7	0,41	0,6956
Intra grupos	0,000005345	3	0,00000178167		
Total (Corr.)	0,00000680833	5			

**Tabla 15. Análisis de varianza energía de activación de capsantina en las micropartículas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,77103	2	0,885517	2,69	0,2144
Intra grupos	0,98845	3	0,329483		
Total (Corr.)	2,75948	5			

**Tabla 16. Análisis de varianza entalpía de activación de capsantina en las micropartículas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,77053	2	0,885267	2,7	0,2131
Intra grupos	0,98215	3	0,327383		
Total (Corr.)	2,75268	5			

**Tabla 17. Análisis de varianza entropía de activación de capsantina en las micropartículas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	15,4514	2	7,72572	2,68	0,2153
Intra grupos	8,6633	3	2,88777		
Total (Corr.)	24,1147	5			

**Tabla 18. Análisis de varianza vida media de capsantina en las micropartículas de los sistemas C-C, OS-C y OSS-C.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	350,661	2	175,331	5,96	0,0902
Intra grupos	88,3179	3	3,29,4393		
Total (Corr.)	438,979	5			

### **9.7 Análisis estadístico para el contenido de tocoferoles en la oleorresina de pimentón saponificada, sin saponificar y capsantina aislada**

**Tabla 19. Análisis de varianza para el contenido de tocoferoles presentes en la oleorresina de *Capsicum annuum* L. saponificada, sin saponificar y capsantina aislada.**

Fuente	Suma de	Gl	Cuadrado	Razón-F	Valor-P
--------	---------	----	----------	---------	---------

	<b>Cuadrados</b>		<b>Medio</b>		
Entre grupos	248,111	2	124,055	<b>59,24</b>	<b>0,0039</b>
Intra grupos	6,28185	3	2,09395		
Total (Corr.)	254,392	5			

**Tabla 20. Test de Tukey de comparación del contenido de tocoferol presente en las oleorresinas de *Capsicum annum L.* saponificada, sin saponificar y capsantina aislada.**

<b>Oleorresinas</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
Capsantina aislada	2	45,9	A
Sin saponificar	2	53,965	B
Saponificada	2	61,65	C

\*Letras distintas indican diferencias significativas