

Obtención de la oleorresina de p prika por medio de tecnologías emergentes en Colombia: un ejemplo de la innovación de producto

Maritza Andrea Gil Garzón*, Carlos Esteban Restrepo Restrepo**, Leonidas de Jesús Mill n Cardona***, Benjamín Alberto Rojano****

Resumen

Introducción. La tendencia actual de consumo está enmarcada en el desarrollo y comercialización de productos naturales y libres de contaminantes; en la búsqueda de nuevas tecnologías, para la obtención de estos productos con un valor agregado, se ha logrado la apertura de nuevos mercados nacionales e internacionales cada vez más competitivos, como es el caso del uso de una tecnología de producción más limpia como la extracción por fluidos supercríticos que reemplaza métodos tradicionales de extracción, altamente contaminantes, debido al empleo de solventes tóxicos, y la microencapsulación por medio del secado por aspersión o *spray-drying*, que permite prolongar la vida útil por la protección de las principales componentes y le confieren funcionalidad, en especial a productos de la industria alimenticia y farmacéutica, además, facilita su transporte, almacenamiento y aplicación en otras matrices. **Objetivo.** En el presente trabajo se aplican dos tecnologías de desarrollo incipiente en nuestro país para la obtención de oleorresina microencapsulada de p prika cultivada en Colombia. **Metodología.** La extracción por FSC-CO₂ se llevó a cabo bajo las condiciones de presión de 280 y 350 bar y temperatura de 50 C y 70 C. Las variables respuesta fueron: el rendimiento (%R), grados ASTA, la determinación de tinción y la relación teórica de

* Ingeniera de Alimentos, magíster en Ciencia-Química. Decana (E) Facultad de Ingenierías Corporación Universitaria Lasallista.

** Ingeniero de Alimentos, Gerente Días Rodas Colombia

*** Ingeniero Industrial, especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Docente Corporación Universitaria Lasallista

**** Químico, magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos, doctor en Ciencias Químicas. Director del Grupo de Investigación en Química de los Productos Naturales y los Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín

la fracción isocrómica (R/Y) de los pigmentos rojos (capsantina y capsorubina) y amarillos (β -caroteno, β -criptoxantina, capsoluteína, zeaxantina, violaxantina). Se empleó la espectroscopía ultravioleta visible UV-Vis para la cuantificación del β -caroteno y la capacidad antioxidante fue evaluada por ABTS. En la microencapsulación las condiciones del secado fueron: temperatura de entrada (180°C), temperatura de salida (90°C), presión de atomización (35 psi) y diámetro de la boquilla (1 mm). La relación oleoresina/encapsulante fue 1:10 utilizando goma arábica o Capsul. **Resultados.** Las mejores condiciones encontradas para la extracción por fluidos supercríticos fueron 350 bar y 60°C. Los resultados del diseño estadístico confirman que la presión afecta las variables respuestas %R, ASTA y relación R/Y; caso contrario sucede con la temperatura, $p > 0.05$. La oleoresina de paprika presenta una concentración de β -caroteno de 1.09 $\mu\text{g/mL}$, lo cual está relacionado con la capacidad antioxidante encontrada por ABTS, con un valor de $4500 \pm 2100 \mu\text{mol trolox/100 g}$ extracto de oleoresina. Se encontró mediante la microscopía de barrido electrónico –SEM– que el mejor encapsulante fue el Capsul (diámetro de microcápsula de 15 μm), el porcentaje de material encapsulado 90% y oleoresina externa 12%. **Conclusión.** El uso de la extracción por fluidos supercríticos y la microencapsulación por *spray-drying* permiten obtener un producto libre de solventes orgánicos y con mayor tiempo de vida útil, con características de calidad que pueden ser competitivas en el mercado nacional e internacional, por alcanzar los estándares de color ofertados con metodologías de extracción tradicional, que pueden ser nocivas por los solventes empleados.

Obtaining paprika oleoresin by the use of emerging technologies in Colombia. a product innovation example

Abstract

Introduction. The current consumption trend is framed in developing and commercializing natural and pollutant free products. In the search for new technologies to obtain such products with added values, new national and international markets have been opened, achieving a higher competitiveness with, for instance, the use of a cleaner production technology like the extraction by the use of supercritical fluids, replacing highly contaminating traditional extraction methods that use toxic solvents, and micro encapsulation by spray-drying, which allows a lengthening of the product's shelf life by protecting its main components, especially in food and pharmaceutical products. Besides, transportation, storage and the application in other matrixes gets easier. **Objective.** Two technologies were applied in this research work. They are just beginning to be applied in Colombia to obtain microencapsulated oleoresin from paprika. **Methodology.** The extraction by FSC-CO₂ was made under 280 y 350 bar and 50°C y 70°C

conditions. The response variables were: performance (%R), ASTA degrees, staining determination and theoretical relation of the isochromic fraction (R/Y) of red pigments (capsanthin and capsorubin) and yellow pigments (β -carotene, β -cryptoxanthin, capsolutein, zeaxanthin, violaxanthin). Visible ultra-violet spectroscopy UV-Vis was used for the quantification of β -carotene and the anti oxidative capability was evaluated by ABTS. In the micro encapsulation, the drying conditions were: Inlet temperature (180 C), outlet temperature (90 C), atomizing pressure (35 psi) and nozzle diameter (1mm). The relation oleoresin/encapsulant was: 1:10 using Gum Arabic or Capsule. **Results.** The best conditions found to extract supercritical fluids were 350 bar and 60 C. The results of the statistic design confirm that pressure affects the %R, ASTA and R/Y relation variables. Just the opposite happens with the temperature, $p>0.05$. Paprika oleoresin has a 1.09 $\mu\text{g/mL}$ β -carotene concentration, and this is related to the anti oxidative capability found by ABTS, with a $4500 \pm 2100 \mu\text{mol trolox/100 g}$ oleoresin extract value. The electronic scanning microscopy allowed us to find that the best encapsulant was the Capsule (micro capsule's diameter: 15 μm), the percentage of encapsulated material 90% and the external oleoresin 12%. **Conclusion.** The use of the extraction by supercritical fluids and spray-drying microencapsulation are useful to have a product free of organic solvents and with a longer shelf life, quality characteristics that can be competitive in national and international markets because they have the color standards offered by those gotten with traditional extraction methodologies, which can be harmful due to the solvents they require.

Introducción

Las tendencias actuales de los consumidores exigen propuestas que promuevan la transformación y comercialización de productos naturales con un valor adicional; por lo tanto, resulta indispensable comprometer la labor de las pequeñas y medianas empresas –PYMES– hacia el desarrollo de productos innovadores que permitan impulsar el sector agr colo colombiano, brindándole a este la posibilidad de acceder a recursos tecnológicos de alto nivel con el fortalecimiento de la productividad y ampliación de la cobertura en mercados nacionales e internacionales¹.

Dentro del sector agr colo, las oleorresinas y aceites esenciales son considerados como una de las principales fuentes naturales con un alto potencial para su producción, que requiere del apoyo e intervención por parte de los diferentes actores económicos, como es el caso específico de la oleorresina de p prika. Existen diferentes factores que justifican la producción de oleorresina de p prika, como: la alta demanda interna y externa, la riqueza geográfica del país para el cultivo de las materias primas como alternativa de reemplazo de cultivos ilícitos y solución

a problemáticas de desarrollo rural y en especial, la oportunidad de apertura de nuevos mercados, entre otras^{2,3}.

Con respecto a la demanda de oleorresinas en Colombia se encuentra que la producción es prácticamente nula, lo que genera grandes volúmenes de importación para satisfacer la industria alimenticia y farmacéutica. Para el 2003 se importaron casi 500 toneladas entre oleorresinas y aceites esenciales, lo que representa casi un 98% del consumo de este tipo de materias primas en el país. El Gobierno, consciente de esta necesidad, ha apoyado la financiación de cultivos de paprika en el norte del país, reto de desarrollo tecnológico e innovador por la viabilidad para la inserción en mercados nacionales e internacionales, en especial, en la industria alimenticia por su uso como colorante, aderezo y/o saborizante, mezcla de especias, entre otras utilizadas en una amplia gama de aplicaciones industriales^{4,5}.

En el ámbito internacional, la demanda de la oleorresina de paprika se concentra en países como España (49%), Estados Unidos (29%), México (19%), considerados como los principales importadores, junto con Israel, Chile y Holanda con una menor demanda⁶. En general, estos países son reconocidos por las altas exigencias en la normativa para la importación de productos naturales de origen agrícola; de allí que el desarrollo de la microencapsulación empleando el secado por aspersión *-spray- drying*, de la oleorresina de paprika cultivada en Colombia y extraída por medio de fluidos supercríticos utilizando el dióxido de carbono como solvente FSC-CO₂, es un proyecto concebido desde el inicio como una oportunidad para la aplicación de dos tecnologías incipientes en Colombia, pero con un alto impacto en el mundo por las ventajas ambientales, técnicas y económicas que permiten el desarrollo e innovación de productos competitivos.

Según lo descrito, la combinación de estas dos tecnologías en la industria de aditivos se convierte en una oportunidad de desarrollo, no sólo para la paprika, sino también para otros productos similares autóctonos de nuestro país. De esta forma, el desarrollo del proyecto "Microencapsulación de oleorresina de paprika cultivada en Colombia extraída mediante la tecnología de fluidos supercríticos" en el cual se enmarcan los resultados descritos a continuación, se crea como una alternativa de industrialización de la oleorresina de paprika para impulsar el sector de los aceites esenciales y oleorresinas en Colombia, motivar el desarrollo tecnológico en las empresas y propiciar una participación académica en la transferencia de conocimiento a través de esta tecnología.

Estado del arte de la investigación e innovación

La obtención de la oleorresina de paprika microencapsulada demanda el conocimiento de aspectos químicos y tecnológicos que se describen a continuación.

Generalidades de la paprika

La paprika (*Capsicum annum L.*) es un pimiento; hortaliza perteneciente a la familia de las Solanáceas. Presenta diferentes especies que han evolucionado

principalmente en América Central y del Sur; es valorada por su sabor y color. La paprika seca y molida es de igual forma un aderezo y un ingrediente saborizante esencial en guisos, aderezos, carnes y rellenos alimenticios¹.

En la década de los cincuenta, los primeros extractos de paprika (pimentón dulce) fueron producidos por la industria alimenticia en respuesta a su demanda por

- Color consistente y fuerte.
- Calidad microbiológica superior.
- Reducido espacio de almacenaje.
- Larga vida de anaquel.
- Compatibilidad con otras especias y extractos colorantes.

La parte que se utiliza son los frutos. Estas son bayas huecas, carnosas, en cuyo interior se encuentran las semillas suspendidas en tabiques. Contiene ácidos grasos, aceites esenciales, pigmentos, compuestos pungentes, resinas, proteínas, celulosas, pentosas, vitaminas y minerales⁶.

La especie *Capsicum annum L.* se comercializa en tres formas: como frutos enteros, frutos deshidratados y molidos y, como oleorresinas. Dentro los estándares internacionales, el más usado para determinar la calidad de la paprika son las Normas ASTA (*American Spice Trade Association*)⁷, que entre otros parámetros, cuantifican la intensidad de color.

Existen tres variedades importantes:

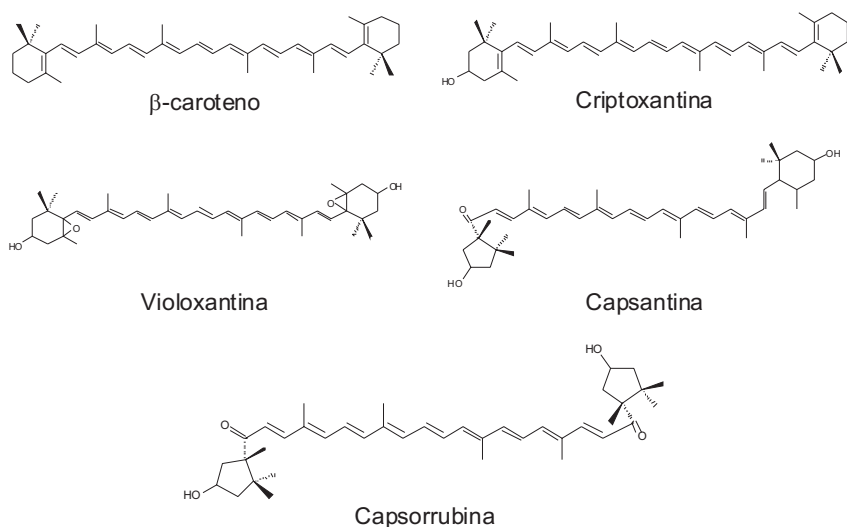
- Pimentón dulce: como su nombre indica, tiene su sabor característico pero no es picante
- Pimentón picante: este producto pica en mayor o menor grado dependiendo del grado de maduración o la variedad
- Pimentón agridulce: no es considerada una variedad distinta, sino una mezcla de las dos anteriores.

Según la materia prima, el pimentón o paprika adquiere, además, diversas propiedades y usos, como:

- Dar color a mantequillas, margarinas y quesos
- En patatas fritas, chips, aperitivos, cereales en hojuelas
- Conserva de pescado en aceite, algunos tipos de sopas y comida congelada
- En fabricación de salsas, ensaladas, embutidos (salchichas, chorizo, mortadela, morcilla), conservas, comidas preparadas, jamones
- Cuando se precisa un color brillante y vivo en la fabricación de alimentos
- En la industria farmacéutica (oleorresina hidrosoluble) para la composición de algunos medicamentos
- Los huevos y carnes de aves se colorean añadiendo oleorresina en sus piensos

- Confituras, jaleas, mermeladas, las cuales son más apetecibles al incorporarles oleorresina
- En helados, pastas, aceites, mayonesas, aderezos, entre otros⁸.

Pigmentos. El matiz amarillo-naranja a rojo-naranja de paprika es creado mediante la mezcla de pigmentos carotenoides biosintetizados en los cromoplastos de su vaina. Las xantofilas están presentes al principio como esteres de ácidos grasos, en las vainas y las preparaciones de oleorresina. Pequeñas cantidades de carotenos libres y pigmentos de xantofila están también presentes. En el gráfico 1, se muestran las estructuras de los principales caroteinodes responsables de color en la paprika⁹.



Gráfico 1. Estructuras de los principales carotenoides presentes en la paprika

Funcionalidad de los carotenoides. Los carotenoides cobran gran importancia dentro de la industria de colorantes naturales, ya que son considerados como uno de los principales pigmentos orgánicos. Existen alrededor de 600 estructuras distribuidas en 52 variedades de planta¹⁰, pero solo alrededor de 24 de las estructuras son encontradas en productos para consumo humano¹¹, como la luteína, β-caroteno, vilanxantina y neoxantina¹².

En recientes estudios los carotenoides han sido reconocidos como potenciales antioxidantes que intervienen en la prevención de enfermedades cardacas¹³ y reguladores de la respuesta del sistema inmune para la inhibición de enfermedades crónicas, tales como: cáncer de varios órganos y enfermedades degenerativas^{10,14-18}. La actividad biológica de los carotenoides es conferida por su estructura, la cual está conformada por unidades de polienos que conforman cadenas hidrofóbicas que

permiten a la molécula absorber la luz y atrapar el oxígeno singulete, neutralizar radicales y estabilizar radicales peroxilo¹⁹.

En la mayoría de los casos, los carotenoides se encuentran en su forma *trans*, lo que facilita su asociación con proteínas, pero dificulta su extracción, identificación y análisis durante la digestión. De allí, que los carotenoides sean estables en su ambiente natural, pero durante la maduración son más lábiles. De otra parte, la digestión de los carotenoides es limitada por su biodisponibilidad, de esta forma, los carotenoides suministrados por vía oral como suplementos, solución o suspensión en aceite son mejor absorbidos²⁰ que aquellos que se encuentran en alimentos con un alto contenido de fibra, la cual puede disminuir las concentraciones de carotenoides en el plasma^{21,22}. Por lo anterior, la presentación de los carotenoides disponibles en sus matrices oleosas naturales es la mejor forma para la absorpcin y aprovechamiento de los principios activos.

Debido a las funciones biológicas presentes en los carotenoides son de gran interés en la industria alimentaria o farmacéutica como suplementos, fortificadores de alimentos²³ y aditivos en la industria alimenticia²⁴⁻²⁶.

Los carotenoides comerciales más importantes son los pigmentos rojos disueltos en triacilglicéridos (TAG), conocidos como oleorresinas extraídas de la pprika en polvo (*Capsicum annum L.*) descritos a continuacin²⁷.

Generalidades de la oleorresina de pprika

La oleorresina es una mezcla fluida de resina y aceite esencial. Los aceites esenciales, por su parte, son sustancias volátiles de origen vegetal, químicamente complejas; la mayor parte de las plantas los contienen, pero solo de 200 a 300 especies tienen aplicación comercial; los aceites esenciales pueden encontrarse distribuidos en todas las partes de la planta (hojas, tallos, semillas, flores, raíces y frutos), en diferente proporción y calidad.

La oleorresina es el aceite resultante del proceso de extracción y concentración del pimentón. Tiene un color rojo intenso y gran viscosidad. La oleorresina es uno de los colorantes orgánicos naturales permitido para uso alimentario por las diferentes normativas de cada país. Las técnicas para medir el color en la pprika son parámetros de calidad que le aportan valor comercial. Se puede decir que la intensidad de color de un kilo de oleorresina de pimentón equivale a 100.000 unidades de color ASTA y equivale además a unos 20 kilos de pimienta de primera calidad.

Métodos para determinar el control de la calidad de la pprika y su oleorresina

El color está relacionado con la calidad de los carotenoides presentes en la pprika²⁸⁻³⁰; por consiguiente, el deterioro durante el almacenamiento de la pprika en polvo es un problema en la mayoría de las empresas productoras³¹.

Esta degradación se debe a muchos factores, como la variedad de la pprika, el contenido de humedad³², estado de maduración de la cosecha, estado de salud de los frutos secos antes del proceso de molienda previa a la extraccin³³. Por lo tanto, se han empleado durante los últimos años diversos métodos para la medición del color en este producto y sus derivados. El más utilizado es el método ASTA o capacidad total de coloracin⁷. Otro método utilizado es la determinación del grado de tincin³⁴, que se conoce como un método para determinar la relación entre pigmentos rojos y amarillos en la muestra.

Estos métodos pueden indicar la mayor o menor capacidad que tiene la pprika u oleoresina como pigmento rojo. Mínguez-Mosquera y autores (1984, 1992, 1998) encontraron que estos métodos espectrofotométricos son ineficaces en la identificación de posibles adulteraciones y proponen otros métodos basados en la cuantificación total de cada uno de los componentes responsables del color por cromatografía líquida de alta resolución –HPLC^{25,26,35}, de gran precisión y exactitud, pero es considerada como un método costoso y poco práctico en la caracterización de materias primas, en especial en empresas con un alto volumen de recepción de pprika de distintos proveedores. Sin embargo, recientemente, fue propuesto método espectrofotométrico para estimar la concentración de la fracción isocromtica responsables del color rojo (R) y amarillo (Y) y el total de carotenoides presentes en la oleoresina de pprika, el cual puede ser utilizado como un índice rápido y cuantitativo de su calidad³⁶

Métodos de extracción de la oleoresina de pprika

El proceso de extracción empleado industrialmente para la obtención de la oleoresina de paprika es uno de los principales factores determinantes en la calidad del color del producto final. En la actualidad existen métodos tradicionales como la extracción sólido-líquido por soxhlet o fluidos supercríticos, como se describe a continuación.

Extracción por Soxhlet. La extracción Soxhlet es un método convencional ampliamente empleado en la industria, y se basa en la separación de compuestos que no se pueden volatilizar en fase gaseosa, pero que en presencia de solventes orgánicos y altas temperaturas se puede obtener una óptima separación de los analíticos presentes en el compuestos con un alto rendimiento y alto porcentaje de recuperación del solventes. Este procedimiento no requiere equipos sofisticados. La obtención de la oleoresina de pprika se realiza en un alto grado por este método, y es el hexano el solvente empleado más eficiente por sus propiedades fisicoqumicas³⁷.

El empleo de la extracción por soxhlet para la obtención de la oleoresina de pprika, a pesar de ser la más empleada industrialmente, presenta algunas desventajas como isomerización de los carotenoides presentes o la pérdida parcial de la actividad de la provitamina A, por descomposición debido a las altas tempera-

turas empleadas para la remoci3n por evaporaci3n de los solventes presentes en el extracto³⁸⁻⁴⁰. Adicionalmente, los solventes empleados se caracterizan por alta inflamabilidad, lo que genera un riesgo en términos de almacenamiento, pero la principal desventaja de la extracci3n en general por soxhlet con solventes orgánicos, es atribuida a la toxicidad de los solventes y muchas veces no es posible garantizar una total remoci3n, lo cual puede generar problemas de seguridad alimentaria al ser empleados en la industria alimenticia y farmacéutica, y como consecuencia son productos asociados a problemáticas con la legislaci3n ambiental en la mayoría de los países, que en general no es permitido como solvente residual por encima de 25 mg/kg¹⁴.

Extracci3n por fluidos supercríticos – FSC. La tecnología de extracci3n por fluidos supercríticos surge como una alternativa para sustituir métodos convencionales como la extracci3n s3lido-líquido soxhlet. El principio de esta tecnología consiste en el empleo de un gas o un líquido que a condiciones ambientales es calentado y comprimido hasta alcanzar un estado superior a su punto crítico, lo cual es denominado como fluido supercrítico. El proceso se basa en cuatro principios básicos: extracci3n, expansi3n, separaci3n y compresi3n del fluido. Las principales aplicaciones de los fluidos supercríticos consisten en la descontaminaci3n de suelos, lavado de máquinas y textiles, fabricaci3n de polímeros, productos farmacéuticos, cosméticos, alimentos y aceites esenciales. En la tabla 1, se muestran los principales solventes empleados en la extracci3n por FSC y sus propiedades críticas.

Tabla 1. Propiedades críticas de fluidos de interés en procesos supercríticos

Fluido	Temperatura crítica Tc/K	Presi3n crítica Pc/bar	Volumen crítico Vc/cm ³ .mol ⁻¹
Di3xido de carbono	304.12	73.7	94.07
Etano	305.3	48.7	145.5
Propano	369.8	42.5	200.0
Agua	647.1	220.6	55.95
Amonio	405.4	113.5	72.47
n- hexano	507.5	30.2	368.0
Metanol	512.6	80.9	118.0

El di3xido de carbono (CO₂) en estado supercrítico es uno de los disolventes más utilizados en este tipo de tecnología, pues abunda en la naturaleza, es barato, fácil de transportar y no es t3xico. En la obtenci3n de la oleoresina de pprika

es el gas más empleado debido al carácter lipofílico de los carotenoides presentes en la pprika, los cuales se solubilizan fácilmente en el CO₂ supercrítico permitiendo su extracción a bajas temperaturas evitando la pérdida de los principios biológicos de estos compuestos termolábiles, además de una posible extracción selectiva al permitir el equipo la variación de las condiciones por encima de sus condiciones crticas⁴¹. Otra de las ventajas del uso del CO₂ durante la extracción de la oleorresina es que después de la etapa de despresurización y aislamiento del producto final, el gas puede ser recogido y reciclado, lo que reduce la contaminación ambiental y representa reducción de costos operativos dentro del proceso. De igual forma al eliminar los solventes orgánicos dentro del proceso de extracción, existe la ventaja de que la oleorresina se encuentre bajo condiciones apropiadas para el consumo humano directo.

El primer estudio que reporta el empleo de FSC-CO₂ para la extracción de la oleorresina de pprika fue realizada por Jaren- Galen y colaboradores³⁸. Ellos establecieron el empleo de co-solventes como el etanol o acetona al 1%, que dio como resultados un alto rendimiento. El rango de presiones empleado fue entre 137.9 - 482.6 bar, donde encontraron una mayor cantidad de b-caroteno a bajas presiones, mientras las fracciones con mayor carotenoides rojos fueron obtenidas a presiones más altas³⁸. Las siguientes investigaciones trabajaron en rangos diferentes de presión y temperatura: Gnayfeed, Daood y Biacs (2001) confirmaron que la solubilidad de los pigmentos presentes en la pprika y su rendimiento se mejoran con el aumento de la presión entre 100 - 200 hasta 400 bar (ambos en 40°C)⁴²; Daood y colaboradores (2002) evaluaron el efecto de la presión, la temperatura y el uso del propano como solvente y concluyeron que el rendimiento es ineficiente (12%), pero la máxima extracción de carotenoides se realizó a 400 bares⁴³; Ambrogi, Cardarelli, y Eggers (2002) también confirmaron una mejor extracción con el aumento de la presión en el proceso (300 – 500 bar), y reportaron una solubilidad de 7.5 g oleorresina/kg CO₂ en 60°C y 300 bar⁴⁴. Uquiche y colaboradores (2004) estudiaron la cinética de extracción en 40° C en función del tamaño de partícula del sustrato peletizado evidenciando un aumentó en la densidad evidente bajo condiciones de altas presiones⁴⁵. En 2009, Rutkowska y Stolyhwo propusieron el uso de dióxido de carbón líquido (LCO₂) en estado subcrítico para extracción, una técnica menos costosa; de all dedujeron que el incremento de la polaridad del LCO₂ se debe al decrecimiento de la temperatura facilitando el fraccionamiento de los pigmentos de acuerdo a la polaridad, en orden creciente, de los pigmentos. Los principales triacilglicerol y β-caroteno se obtuvieron entre +6°C y -6°C. A -16°C se obtuvieron los pigmentos más polares (capsorubina, capsantina, zeaxantina) y sus respectivos ésteres grasos cidos⁴⁶.

Microencapsulación de la oleorresina de pprika

La microencapsulación es una técnica de recubrimiento de compuestos formados por uno o diferentes tipos de compuestos de tamaño micro o nano con

una película o barrera delgada continua o discontinua de polímeros que es diseñada para proteger el contenido de efectos adversos bajo condiciones establecidas predeterminadas. El material protector puede estar conformado por una capa simple o compuesta⁴⁷.

La microencapsulación tiene una amplia aplicación en la industria de alimentos, como las vitaminas, sabores, aromas, colores u oleorresina. Por medio de la microencapsulación, además de proteger los compuestos antes mencionados del deterioro, permite un mejor manejo del producto final, ya que lo convierte en un polvo fluido facilitando la incorporación de esta en diferentes matrices, evita la interacción indeseable de sabores y aromas o facilita la absorpcion de compuestos bioactivos en el organismo^{48,49}.

Existen varios métodos para llevar a cabo la microencapsulación como son: el secado por aspersión, la aspersión por enfriamiento, la extrusión, la cobertura por lecho fluidizado, el atrapamiento en liposomas, la inclusión de complejos, la coacervación y la polimerización interfacial, pero la técnica más empleada en la industria es el secado por aspersión. La técnica ha sido aplicada en el encapsulamiento de aceites, oleorresinas y jugos⁵⁰⁻⁵³.

Fernández y Trujillo (2007) describieron los trabajos realizados sobre microencapsulación de oleorresina de pprika, donde refieren los diferentes encapsulantes empleados como goma arabiga⁵⁴, almidones modificados⁵⁵, maltosa, dextrina, almidón de arroz y gelatina, con resultados de tamaño de partícula óptimos entre 16 y 20.3 μm ⁵⁶.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en tres aspectos:

- Extracción: influencia de presión y temperatura sobre los parámetros de calidad del color, por medio de la determinación de la tinción, los grados ASTA, relación teórica de las fracciones isocromtica roja y amarilla (R/Y), evaluados en la oleorresina de pprika obtenida por extracción utilización supercrítica CO_2 .
- Capacidad antioxidante: evaluación de la actividad de antioxidante por medio de método de ABTS en función del b-caroteno presente en la oleorresina de pprika.
- Microencapsulación: determinación de las condiciones de microencapsulación con dos compuestos encapsulantes y el sobre efecto en la vida útil del producto final.

Materiales y métodos

Material vegetal y reactivos

La pprika fue suministrada por la empresa CODINAL Ltda. (Antioquia, Colombia).

La molienda fue realizada en un molino de pines T-17, donde los aspectos tenidos en cuenta para el diseño experimental contemplaron dos variables y dos niveles, correspondientes a un diseño factorial balanceado 2^2 con tres réplicas.

La caracterización bromatológica (cenizas, grasa, humedad y proteína) y microbiológica (aerobios mesófilos, coliformes, recuento de mohos y levaduras, salmonella) se realizaron bajo las normas estándar AOAC⁵⁷.

Los reactivos empleados para el desarrollo de los métodos espectrofotométricos para determinar el control de calidad fueron grado analítico (MERCK). El estándar de β -caroteno empleado para la cuantificación en la oleoresina de pprika (Fluka, catálogo N22040). Durante la extracción con FSC se empleó dióxido de carbono suministrado por la empresa AGAFANO (Medellín, Colombia) al 99.99% de pureza.

Extracción por fluidos supercríticos con dióxido de carbono – FSC-CO₂

Descripción técnica del equipo de extracción por fluidos supercríticos. La extracción por fluidos supercríticos se realizó en un equipo de escala semi industrial. En la tabla 2 se presentan los datos técnicos del equipo seleccionado.

Tabla 2. Información técnica del equipo de extracción por fluidos supercrítico

Característica	Límites
Capacidad Máxima del extractor	12 litros x 2
Presion del extractor	45Bar
Temperatura maxima del extractor	90C
Presión máxima de la columna de separación	22 Bar
Temperatura máxima de la columna de separación	90C
Capacidad máxima de la columna de separación	4 L
Presión del separador	9.8 Bar
Temperatura máxima del separador	90C
Capacidad máxima del separador	90C
Capacidad máxima del separador	5 L
Solvente	Dióxido de Carbono (CO2) Pureza> 99.5% Humedad< 0.2%

Determinación de las variables de operación durante la extracción. Para la elección de los niveles de trabajo de la presión se tuvieron en cuenta los valores óptimos de presión reportados por Jarn-Galn *et al.*, 1999 y las temperaturas evaluadas por Daood *et al.*, 2002. Por lo anterior, se eligieron las presiones de 280 y 350 bares y las temperaturas de 40 y 50C^{38,43}.

La metodología seguida para la extracción consiste en la presurización del CO₂ líquido, hasta las condiciones deseadas y este es llevado al cilindro de extracción; simultáneamente se pasa el gas supercrítico y la oleorresina por la válvula de regulación de presión a los cilindros de separación. Para las diferentes condiciones establecidas se emplean aproximadamente 5000 g el pimiento rojo seco, el cual es cargado en un cilindro de acero equipado con filtros de red de 13 mL. Durante el proceso de extracción, la presión, la temperatura de extracción y el caudal CO₂ fueron controlados por ajuste en las válvulas sobre el panel de control. Cuando el tiempo previsto fue alcanzado (90 minutos), el proceso es detenido, el cilindro de extracción es despresurizado y la oleorresina es recogida solo del primer cilindro de separación, ya que en el segundo cilindro no se obtuvo producto; el producto es reposado en el cilindro durante 20 minutos para permitir la evaporación del solvente. La oleorresina obtenida es almacenada en recipientes con protección de rayos ultravioleta y mantenida bajo refrigeración, hasta el momento de evaluación.

Evaluación del color

Grados ASTA. Los grados ASTA, presentes en la muestra de oleorresina, son determinados por el método de la norma internacional ASTA⁷.

Determinación de la tinción. El grado de tinción presente en la muestra de oleorresina es determinado por el método de Mínguez y Pérez-Galvez³⁰ donde 0.025 g del extracto es disuelto en 50 mL de acetona y la absorbancia de la solución es medida a 470 y 454 nm en un UV-Vis Agilent con arreglo de diodos, modelo 8453E. El grado de tinción es determinado por la relación de las absorbancias A_{470}/A_{454} .

Relación teórica de las fracciones isocromaticas roja y amarilla, R/Y. Los carotenoides se unen en cadenas proporcionando una fracción roja (R) conformada por capsantina y capsorubina y una fracción amarilla (Y) que reúne el β -caroteno, β -criptoxantina, capsoluteina, zeaxantina y violaxantina. Cada una de las fracciones pueden ser cuantificadas por HPLC con el uso de estándares o por medio del método de la cuantificación isocromatica de las fracciones R/Y, propuesta por Mínguez-Mosquera and Pérez-Gálvez (1998). Esta última metodología se crea con la finalidad de dar una respuesta rápida y precisa de aplicación industrial, la cual consiste en la saponificación de los carotenoides que durante la maduración se esterifican, para una posterior lectura de la absorbancia por UV-Vis y con el uso de los coeficientes de extinción reportados por los autores, se puede definir la concentración de cada una de las fracciones con un error máximo de 4% con respecto a la cuantificación por HPLC³⁰.

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = A_{\text{valor}}(\text{FD})/CMm \quad (1)$$

Donde A es la absorbancia de la muestra a 456 (fracción total) y 525 (fracción roja), por diferencia se determina la fracción amarilla, FD es el factor de dilución empleado, C, la concentración que se hallará con los valores de E (coeficiente de extinción) que según la literatura son para la fracción roja ($E_{OR}=1041 \pm 51.033$) y amarilla ($E_{OY}=1613 \pm 47.850$) y Mm es la masa de muestra empleada.

El cálculo de la relación teórica R/Y es estimada usando el valor medio de las absorbancias de cada fracción previamente separadas por cromatografía de columna semipreparativa –TCL y expresadas como $A_{525}/A_{456-525}^{30}$.

La separación por columna es realizada en una placa de 20 x 20 cm y 0.7 mm de grosor, con silica gel 60 GF₂₅₄ marca Merck (Darmstadt, Germany). El extracto de carotenoides sin saponificar es aplicado sobre la columna y separado con una mezcla de solventes de hexano/acetato de etilo/etanol/acetona (95:3:2:2)⁵⁸. La fracción amarilla está comprendida en una banda con un tiempo de retención de 0.78 a 0.58. Ambas fracciones son retiradas del plato y disueltas en acetona. La fracción colectada es disuelta hasta 50 mL de acetona y almacenadas a -30°C, antes de ser analizada³⁶.

Diseño de experimentos

El diseño central compuesto llevado a cabo en el software STATGRAPHICS (XV) tomó como respuesta para los factores de entrada o variables independientes (presión y temperatura), tres aspectos de importancia relacionados con la calidad y eficiencia del método empleado:

- Rendimiento: expresado en (g de olerresina extraído/g de paprika x 100)
- Grados ASTA: capacidad total de coloración. Rango esperado entre 500 y 3500 color ASTA.
- Determinación del grado de tinción y la relación teórica, R/Y: relación de las fracciones de las cadenas de los pigmentos que conforman la p prika, proporcionados por la presencia de carotenoides (rojo y amarillo, R/Y). Rango esperado entre 1.2 y 1.5

En la tabla 3 se muestran los factores o variables y sus respectivos niveles empleados en el diseño de experimentos, para la extracción por fluidos supercríticos.

Tabla 3. Factores y niveles evaluados para el diseño experimental

Variables independientes	Variable Codificada			Variable Natural		
	-1	0	+1	Niveles		
Presión (Bar)	-1	0	+1	280	315	350
Temperatura (�C)	-1	0	+1	50	60	70

Para optimizar la variable respuesta se utilizó la metodología de la pendiente ascendente (técnica de optimización que tiene como objetivo encontrar el y/o los puntos que maximizan o minimizan la ecuación de superficie de respuesta). Este proceso permite recorrer secuencialmente la trayectoria de la máxima o mínima pendiente que conduce a la dirección del máximo o mínimo aumento de la respuesta⁵⁹.

Cuantificación del β -caroteno

La cuantificación del β -caroteno presente en la oleorresina de pprika se realiza a partir de una curva de calibración de un estándar del caroteno diluido en acetona, en concentraciones obtenidas en un rango entre 0.96 y 3.9 $\mu\text{g/mL}$. Cada solución estándar es analizada por triplicado. La cuantificación se realiza por medio de la determinación de la absorbancia en un espectrofotómetro *Agilent*, con arreglo de diodos, modelo 8453E a 460 nm.

Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS

El método reportado por Re, et al., (1999) con algunas modificaciones es empleado para la determinación de la capacidad antioxidante del extracto de pprika, donde el reactivo 2,2'-azinobis(cido 3-ethylbenzothiazolina-6-sulfnico) es disuelto en agua desionizada hasta una concentración de 7mM, seguida de una adición de persulfato de potasio 2.45 mM. La reacción se realiza a temperatura ambiente y en ausencia de luz entre 12 y 16 horas. El radical catión de ABTS es diluido en una solución buffer salina de fosfato (PBS) 0.01 M y pH 7.4 hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 aproximadamente, a 734 nm. El extracto es preparado en etanol y diluido con 980 μL del radical catión obtenido; la reacción toma 30 minutos en completarse antes de ser medida la absorbancia final en un espectrofotómetro Jenway Model 6320D a 734 nm. Todas las absorbancias se realizaron por triplicado y con sus respectivas soluciones de referencia o blancos⁴⁷.

Microencapsulación

Las pruebas de microencapsulación se realizaron en un equipo de secado por aspersión Mini Spray Dryer, B-290. De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, se encontr que las variables: temperatura de entrada, T_o , Temperatura de salida, T_p , presión de atomización, P_a y diámetro de boquilla, \varnothing_b , son constantes; sólo en el caso de aquellos trabajos donde se requiere realizar la cinética, se varía la temperatura de entrada. Por esta razón, se tomaron los valores más usados que presentaron buenos rendimientos^{55,60}, se modificaron las concentraciones de los componentes de la emulsión y se compar la calidad de encapsulación con diferentes materias primas, ya que en trabajos previos, se utilizaron relaciones con valores muy bajos de oleorresina con respecto al encapsulante y esto no es aplicable a escala industrial, a pesar de haber generado buenos resultados en la superficie y tamaño de la microcápsula.

Determinación de las variables óptimas de operación. Se consideraron las siguientes variables:

- Temperatura de entrada (T_e): 180°C
- Temperatura de salida (T_p): 90°C
- Presión de atomización (P_a): 35 psi
- Diámetro de la boquilla (\varnothing_b): 1 mm

Los encapsulantes utilizados fueron:

- Goma arábiga
- Almidón modificado, Capsul

La relación establecida para la emulsión se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Componentes de la emulsión para microencapsular oleorresina de paprika

Materias primas emulsión	Cantidad
Oleorresina	4 g
Material encapsulante	40 g
Emulsificante (Tween 80)	0.5 mL

Caracterización de la oleorresina microencapsulada. Se realizaron varios análisis que son considerados importantes para la determinación de la calidad del proceso de microencapsulación.

Microscopia de Barrido Electrónico -MEB. El microscopio electrónico de barrido (MEB) utiliza un haz de electrones de alta energía para generar una variedad de señales en la superficie de las muestras sólidas. Las señales que se derivan muestran las interacciones de los electrones y revelan información acerca de la muestra incluyendo la morfología externa (textura), composición química y estructura cristalina y la orientación de los materiales que componen la muestra⁶¹. Para la determinación del tamaño de partícula de la microcápsula de oleorresina se empleó un microscopio electrónico de barrido (MEB) Jeol JSM 5910 LV, con una aceleración de tensión de 30 KV, sistema de vacío junto con la bomba mecánica, el filamento de tungsteno, con detector de electrones secundarios (SE), retro proyectadas (EEB) y de rayos X tipo de EDS y WDS.

Determinación de la eficiencia de la microencapsulación. El rendimiento se siguió según el método de Fagen et al., 1955. El porcentaje de oleorresina atrapada se determinó lavando 10 mg de oleorresina con 0.5 mL de etanol absoluto y filtrado en un papel de filtro Whatman No 1; el residuo sólido fue disuelto en

cloroformo y agitado en un sonicador durante 5 minutos; la solución resultante fue leída en un Espectrofotómetro a 460nm⁶².

Estabilidad de la oleorresina entrapada dentro de la microcápsula. Se tomaron muestras en tres momentos (día primero, 15 días y 30 días) y se calculó el porcentaje de de retención del analito por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{Retención} = (\text{Abs}_{(460\text{nm})} / \text{Abs}_{(t=0)}) \times 100 \quad (2)$$

Donde:

$\text{Abs}_{(460\text{nm})}$: absorbancia de la muestra en los diferentes tiempos (15 días y 30 días)

$\text{Abs}_{(t=0)}$: absorbancia en el tiempo cero

Un gráfico del semi-logaritmo de los porcentajes de retención contra tiempo, para determinar la constante de velocidad (k) de la pendiente del gráfico LN % de retención entrapados o material microencapsulado contra el tiempo expresado en días.

Tiempo de vida media. La vida útil de la oleorresina microencapsulada fue calculada por medio de la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo de vida media} = 0.693/k \quad (3)$$

Donde:

k : es la constante de velocidad⁵²

Seguimiento a la calidad por medio de grados ASTA. La calidad de la microcápsula se siguió por medio de las unidades de color (Grados ASTA), ya que es el parámetro que es tenido en cuenta para determinar el valor comercial.

Análisis y resultados

Caracterización de materia prima: bromatológica y microbiológica

La selección del proveedor de la pprika permitió el aseguramiento de la calidad de esta, y debido al diseño estadístico planteado, se decidió realizar el muestreo de un mismo lote y caracterizar la materia prima para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

La tabla 5 muestra la información de los análisis bromatológicos requeridos para la estandarización de los procesos, a los que serán sometidos la muestra y el análisis microbiológico para dar garantía de la calidad y seguridad alimentaria del producto.

Tabla 5. Caracterización bromatológica y microbiológica de la p prika

Análisis Bromatológico		
Grasa	11.93	± 0.30
Cenizas	9.49	± 0.07
Humedad	6.30	± 0.24
Proteína (%N)	2.28	± 0.12
Proteína, %	14.27	± 0.77
Análisis Microbiológico		
	Valor obtenido	Nivel M�x. Permitido
Aerobios mesófilos	< 100	M�x. 1000 UFC/g
Recuento de mohos y levaduras	100	M�x. 100 UFC/g
Coliformes	Ausente	Ausente
Salmonella	Ausente	Ausente

Los resultados obtenidos del diseño experimental para la determinación de las condiciones óptimas de la molienda, empleando un diseño factorial balanceado 2² con tres réplicas, se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Factores, niveles y variables respuesta del diseño factorial balanceado de las condiciones de molienda

Factores	Niveles	Respuesta		Respuesta	
		60:10	40:20	60:20	40:10
Tamaño de partícula (\varnothing_p , malla)	60 40	(500 ± 10) μ m	(500 ± 10) μ m	(500 ± 10) μ m	(500 ± 10) μ m
Tiempo (t_m , minutos)	10 20	(500 ± 10) μ m	(500 ± 10) μ m	(500 ± 10) μ m	(500 ± 10) μ m

Según los resultados, para la obtención final de un tamaño de partícula requerido de 500 μ m, la malla óptima es de tamaño 40 y el tiempo de tamizado es de 20 minutos. La muestra tamizada (20–30 mesh) es dispuesta para los tratamientos de extracción y microencapsulación.

Extracción de la oleoresina por fluidos supercríticos

La tabla 7 presenta los resultados obtenidos sobre los análisis de color realizados (ASTA, grado de tinción y relación teórica de las fracciones isocrom ticas roja y amarilla, R/Y) a las diferentes condiciones de presión y temperatura empleadas

durante la extracci3n y bajo los parámetros del diseño central empleado para el análisis.

Tabla 7. Rendimiento de la oleorresina, ASTA, Determinaci3n de Tinci3n y Relaci3n te3rica de las fracciones de pigmento rojo y amarillo de las oleorresinas extraídas

Tratamiento	Presi3n (Bar)	Temperatura (�C)	Rendimiento de Oleorresina (% de oleorresina extraída/P�prika)
1	350	50	9,7
2	280	50	8,4
3	350	70	10,2
4	280	70	8,2
5	315*	60*	9,4*
6	315*	60*	9,1*
7	315*	60*	9,2*

ASTA	Grado de Tinci3n (A_{470}/A_{454})	Relaci3n te3rica R/Y ($A_{525}/A_{456-525}$)
212	0,9677	1,2368
120	0,9431	1,5395
198	0,9604	1,0310
101	0,9407	0,7542
118	0,9482	1,5467
108	0,9456	1,1226
116	0,9516	1,4413

Fracci3n Roja (R) = capsantina + capsorubina. Fracci3n Amarilla (Y) = β -caroteno + β -criptoxantina+ capsoluteina + zeaxantina + violaxantina. *Replicas al centro

El diseño central compuesto utilizado en el presente trabajo permiti3o elaborar una prueba de bondad de ajuste para la evaluaci3n estadística del modelo matemático ajustado. En la tabla 8, se muestra el análisis de varianza de las variables respuesta definidas (Rendimiento de Oleorresina, ASTA, Grado de Tinci3n y Relaci3n Te3rica R/Y). El término residual que resulta al extraer la variabilidad total correspondiente a los términos del modelo fue, a su vez, utilizado para generar una prueba de bondad de ajuste al descomponerse en un término de error

puramente aleatorio, y en un término de error, debido a la falta de ajuste del modelo. La falta de ajuste no significativa ($p > 0.05$) indica que las superficies de respuesta ajustan bien los datos, por lo tanto, se puede tomar su función polinómica para encontrar las combinaciones óptimas que se deseen analizar de la presión y temperatura. El error cuadrático ajustado indica que los modelos explican un 95.44%, 46.79, 82.92% y 27.35% la variabilidad de las variables respuesta encontradas. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Mediante el análisis de varianza se encontraron diferencias significativas $p < 0.05$ en la presión para las variables respuestas Rendimiento de Oleoresina, ASTA y grado de tinción; caso contrario sucedió con y la Relación Teórica R/Y.

Como se muestra en el gráfico 2, de los resultados obtenidos del efecto de las variables se puede inferir que el rendimiento de oleoresina, grados ASTA y el Grado de Tinción incrementa cuando la presión pasa del nivel inferior al nivel superior y la temperatura no influye sobre estos cambios. La relación teórica R/Y aumenta con el mayor valor de temperatura y un cambio de presión del nivel inferior al nivel superior, pero cuando se encuentra con una temperatura inferior disminuye.

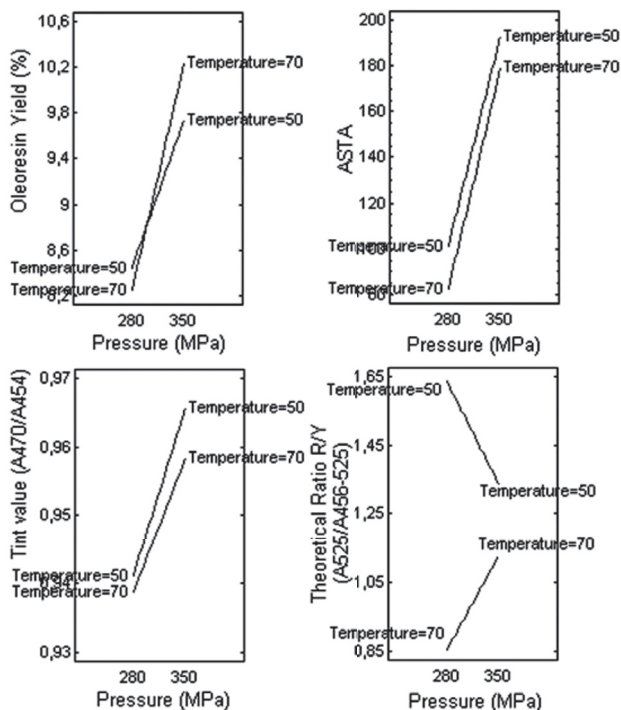


Gráfico 2. Efectos de los variables (Presión y Temperatura) en el Rendimiento Oleoresina, Grados ASTA, Grado de Tinción y Relación Teórica

Tabla 8. Análisis de varianza para modelos refinados de Y (Grados ASTA), Z (Grado de Tinción) W (Relación Teórica R/Y)

Variable	Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrada	F-Relación	P-Valor
Rendimiento Oleorresina	A: Presión	2,7225	1	2,7225	116,68	0,0085
	B: Temperatura	0,0225	1	0,0225	0,96	0,4296
	AB	0,1225	1	0,1225	5,25	0,1490
	Lack-of-fit	0,020119	1	0,020119	0,86	0,4511
	Error puro	0,0466667	2	0,0233333		
	Total (corr.)	2,93429	6			
		R ² = 97.72%		R ² ajustado = 95.44%		
ASTA	A: Presión	8930,25	1	8930,25	318,94	0,0031
	B: Temperatura	301,25	1	301,25	10,75	0,0785
	AB	6,25	1	6,25	0,22	0,6831
	Lack-of-fit	272,25	1	272,25	9,72	0,0893
	Error puro	56,0	2	28,0		
	Total (corr.)	12546,0	6			
		R ² = 73.39%		R ² ajustado = 46.79%		
Grado de Tinción	A: Presión	0,000490623	1	0,000490623	54,19	0,0180
	B: Temperatura	0,0000235225	1		2,60	0,2483
	AB	0,0000060025	1		0,66	0,5010
	Lack-of-fit	0,000034843	1	0,000034843	3,85	0,1888
	Error puro	0,0000181067	2			
	Total (corr.)	0,000573097	6			
		R ² = 90.76%		R ² ajustado = 82.92%		
Relación teórica	A: Presión	0,000167703	1	0,000167703	0,00	0,9586
	B: Temperatura	0,24557	1	0,24557	5,04	0,1540
	AB	0,0839551	1	0,0839551	1,72	0,3198
	Lack-of-fit	0,0905478	1	0,0905478	1,86	0,3061
	Error puro	0,0975132	2	0,0487566		
	Total (corr.)	0,517754	6			
		R ² = 63.67%		R ² ajustado = 27.35%		

A continuación se presenta la ecuación de cada uno de los modelos ajustados, para las variables respuestas consideradas en el estudio:

$$Y_1 = 10,7464 - 0,00642857 * X_1 - 0,15 * X_2 + 0,0005 * X_1 * X_2 \quad (4)$$

$$Y_2 = -169,25 + 1,13571 * X_1 - 1,95 * X_2 + 0,00357143 * X_1 * X_2 \quad (5)$$

$$Y_3 = 0,799768 + 0,000526429 * X_2 + 0,00086 * X_2 - 0,0000035 * X_1 * X_2 \quad (6)$$

$$Y_4 = 10,607 - 0,0250207 * X_1 - 0,155165 * X_2 + 0,000413929 * X_1 * X_2 \quad (7)$$

Donde

- X_1 : Presión
- X_2 : Temperatura
- Y_1 : Rendimiento Oleorresina
- Y_2 : Grados ASTA
- Y_3 : Grado de Tinción
- Y_4 : Relación teórica

Con la metodología de la pendiente ascendente se obtuvieron los valores de los factores que optimizan las variables respuesta teniendo en cuenta los rangos límite esperados. Los resultados encontrados se muestran en el gráfico 3.

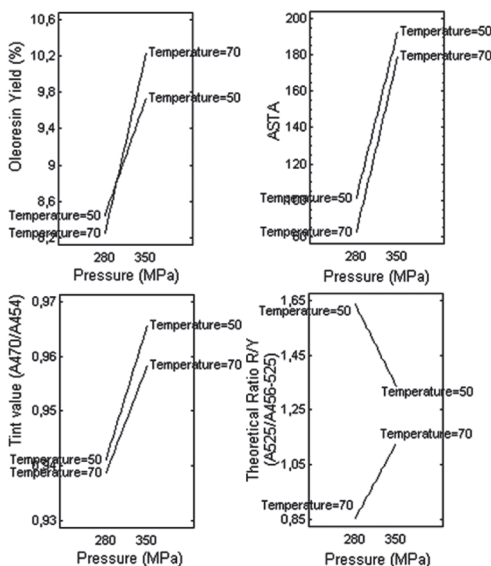


Gráfico 3. Superficies de respuesta que relaciona la Presión (Bar) y Temperatura (°C) con: Rendimiento Oleorresina, Grados ASTA, Grado de Tinción y Relación Teórica (R/Y)

Los valores máximos encontrados en cada uno de los análisis se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Valores máximos de los análisis de rendimiento y color de acuerdo a las variables de presión y temperatura empleadas en la extracción por FSC

Variable respuesta	Valor Máximo	Condiciones	
		Presión (bares)	Temperatura (�C)
Rendimiento, %	10.24	350	70
Grados ASTA, (Unidades de color, UC)	212	350	50
Grado de tinción (A_{470}/A_{454})	0.9604	350	70
Relación teórica de la fracciones isocrom�ticas roja y amarilla (R/Y)	Entre 1.2 y 1.5	280 a 315	55 a 60

Como se observa en los resultados, el rendimiento se encuentra en las condiciones máximas de presión y temperatura, como es reportado en los trabajos anteriores, al igual que los grados ASTA⁶³. De otro lado, el grado de tinción no alcanzó el rango óptimo entre 1.2 y 1.5, para ser clasificado como una oleoresina de alta calidad por su relación equilibrada entre el color rojo y el amarillo; el resultado por debajo del rango pudo presentarse debido al deterioro o degradación de los carotenos en las condiciones más extremas que se emplearon (350 bares y 70 C); de allí que esta prueba no sea muy recomendada en la industria, por la cercanía de las longitudes de onda empleadas en el an lisis⁵⁸.

Los resultados obtenidos mediante la relación teórica de las fracciones isocrom tica roja y amarilla, prueba clasificada según las evaluaciones previas como el método más exacto, obtuvo por medio de las variables propuestas un rango más amplio de operación, y en condiciones no tan extremas como los anteriores, respuesta que es más consecuente con las características termolábiles de los carotenoides presentes; además, los resultados de esta técnica en el rango de presión y temperatura evaluados corresponden a los datos reportados en la literatura.

Finalmente, el diseño de experimentos fue creado en función de encontrar un equilibrio entre los valores máximos en el rendimiento de la oleoresina, grados ASTA y la relación teórica isocrom tica, el cual puede ser encontrado a una presión de 350 bares y una temperatura de 60  C, y de acuerdo con el análisis de varianza, la presión afecta las variables respuesta rendimiento de la oleoresina, los grados ASTA y la relación teórica R/Y; caso contrario sucede con la temperatura la cual no fue significativa $p > 0.05$.

La determinación de la concentración es el último parámetro de control de calidad reportado en la tabla 10, el cual es de gran importancia para la industria.

Tabla 10. Concentraciones de las fracciones isocromática R/Y

Tratamiento	Concentración (g/kg)		
	Fracción Roja A_{525} (EOR=1041±51.033)	Fracción Amarilla (EYR=EOT - EOR=1613 ± 47.850)	Fracción Total A_{456} (EOR=2654±84.868)
1	11.83	9.57	21.40
2	7.16	4.65	11.80
3	8.15	7.91	16.06
4	4.04	5.36	9.40
5	8.88	5.74	14.62
6	6.59	5.87	12.45
7	6.79	4.71	11.50

Los valores se encontraron dentro de los reportados por trabajos previos, excepto por los resultados de la muestra obtenida con el cuarto tratamiento (280 bares y 70°C), el cual presenta una concentración mayor de la fracción amarilla que la fracción roja, lo cual en la realidad es contrario, porque a pesar de que la p prika presenta mayor número de compuestos de la fracción amarilla, estos se encuentran en menor concentración que la capsantina y capsorrubina responsables del color rojo. De otro lado, estos resultados son importantes porque coinciden reportes anteriores, donde confirman que a menores valores de presión y temperatura durante la extracción se puede obtener mayor contenido de β -caroteno, el cual hace parte de la fracción amarilla.

Cuantificación del β -caroteno

De acuerdo con la curva de calibración que presentó un coeficiente de correlación de 0.9979, la concentración del β -caroteno es de 1.09 $\mu\text{g/mL}$. Según estudios realizados por la Ciencia Nacional Academia de Estados Unidos, existe una equivalencia del carotenoide en unidades de actividad de la vitamina A, la cual es llamada Equivalencia de Actividad Retinol (RAE), donde 1 RAE=1.2 μg de β -caroteno de alimento (Solomons, 2003), lo cual muestra que esta cantidad puede ser comparable con algunos alimentos con alto contenido de vitamina A, como el perejil; además, el β -caroteno se absorbe fácilmente en el organismo, lo cual permite una valoración mayor en la interpretación nutricional debido a su rápida y efectiva absorpci n.

Determinación de la capacidad antioxidante

La presencia de carotenoides como β -caroteno y criptoxantina se convierte en la principal causa de la capacidad de antioxidante del pimentón dulce o pprika, en particular β -caroteno, porque es el único carotenoide que durante la maduración de la planta no se esterifica, conservando de esta forma su actividad biológica en el fruto final y por consiguiente en cualquiera de sus derivados. Esto es una de las razones para soportar los valores resultantes de la capacidad antioxidante evaluada por el método de ABTS y expresada en equivalentes Trolox –TEAC, como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Valores de capacidad antioxidante de la oleorresina de pprika determinada por medio de ABTS y expresada en TEAC

	Valor expresado en Trolox
TEAC (μ Mol trolox/100g extracto de oleorresina)	4500 \pm 2100

Los valores obtenidos son comparables con frutos naturales en sus primeras etapas de maduración, pero que estn clasificados como un referente por alta capacidad antioxidante, como es el caso del mortiño.

Por lo anterior, se puede inferir que aunque la mayoría de los compuestos de la oleorresina de pprika son esterificados durante su maduración, lo que origina la pérdida de su actividad biológica, la presencia del β -caroteno es representativa para proporcionarle a este producto un valor funcional, que no había sido reportado antes para la oleorresina de pprika.

Microencapsulación

Caracterización de la oleorresina microencapsulada

Las microcápsulas obtenidas bajo las condiciones antes mencionadas fueron evaluadas por SEM, para determinar la forma definida globular de las microcápsulas y el tamaño de la partícula. Los resultados obtenidos están cercanos a los reportados en la literatura⁵⁴. En los gráficos 4 y 5, se muestran las fotografías de las microcápsulas obtenidas goma aguar y almidón modificado, Capsul.

Según los resultados obtenidos la microcápsula obtenida con Capsul (Almidón Modificado) tiene menor tamaño de partícula, superficie mejor definida y baja aglomeración del material encapsulante sin forma definida; caso contrario con la Goma Aguar, aunque el tamaño de la partícula todavía se encuentra dentro de los límites reportados.

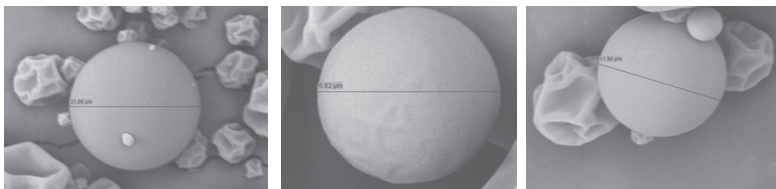


Gráfico 4. Microscopia de Barrido Electrónico de la microcápsula con Capsul

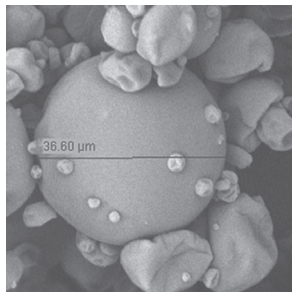


Gráfico 5. Microscopia de Barrido Electrónico de la microcápsula con Goma Aguar

Efectividad de la microencapsulación

Con el fin de verificar la efectividad de la microencapsulación total, se realizaron los análisis para determinar el porcentaje de oleorresina atrapada o microencapsulada y el porcentaje de oleorresina externa. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Porcentaje de material encapsulado y oleorresina externa resultado del uso de dos encapsulantes

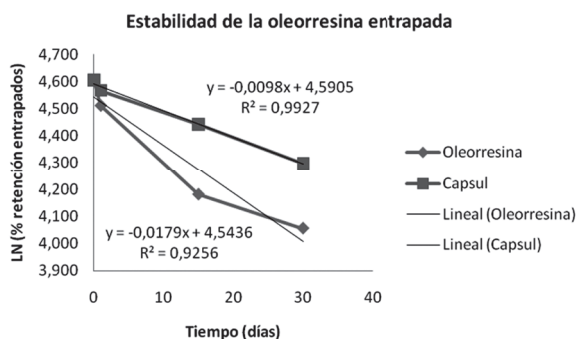
	% Material Encapsulado	% Oleorresina Externa
Microcapsula – Capsul	90	12
Microcapsula – Goma Aguar	82	16

El porcentaje de oleorresina encapsulada con Capsul fue superior al porcentaje que se alcanzó con la Goma Guar, lo cual es coherente con los análisis de MEB, que presentan un menor tamaño de partícula. Estos dos parámetros o pruebas de calidad están relacionados. Para los análisis de tiempo de vida media, se empleó la oleorresina microencapsulada con el almidón modificado, Capsul, por haber presentado menor tamaño de partícula.

Tiempo de vida media

Uno de los principales objetivos de la microencapsulación es la protección de los compuestos bioactivos termolábiles; de allí que la evaluación de la estabilidad de las microcápsulas bajo condiciones de temperaturas extremas (condiciones climáticas de la costa colombiana) fueron evaluados a diferentes tiempos.

En el gráfico 6 se muestra la representación de los datos obtenidos, por el seguimiento del porcentaje de efectividad de la microencapsulación.



Gráfico 6. Estabilidad de la oleorresina atrapada

La gráfica muestra una disminución de la concentración del compuesto activo que se puede dar por la presencia de compuestos volátiles, que en una próxima investigación deben ser calculados por cromatografía gaseosa. De otro lado, se puede observar que la oleorresina microencapsulada es más estable que la oleorresina sin encapsular, siguiendo una cinética de primer orden⁵².

Este análisis fue de gran importancia para saber la relación de oleorresina encapsulada que efectivamente proporcionara color al producto final donde sea incorporado.

El tiempo de vida media fue calculado de la constante de velocidad como $0.693/k$. En la tabla 13 se muestran los resultados del tiempo de vida media de la oleorresina sin microencapsular y microencapsulada con el almidón modificado, Capsul⁵².

Tabla 13. Tiempo de vida media de la oleorresina y microcapsula

Tiempo de vida media (días)	
Oleorresina	4
Capsul	77

El tiempo de vida media está determinado como el tiempo en que disminuye el 50% de las propiedades de interés, en este caso la concentración de la oleorresina entrapada y como se puede ver en la tabla, se nota la diferencia significativa entre la oleorresina microencapsulada que puede alargar su tiempo a condiciones de temperatura extrema (60°C) y humedad, a un tiempo de 77 días, opuesto a los resultados de la oleorresina sin la protección de una barrera o pared que solo conservaría su 50% de acción durante 4 días.

La calidad del color también fue evaluada en el período para el estudio de estabilidad. En la tabla 14 se muestran los resultados.

Tabla 14. Grados ASTA de la oleorresina microencapsulada

	1 día	15 días	30 días
Capsul	119	55	28

El color se ve afectado por las condiciones de temperatura y humedad a las cuales se sometió la microcápsula, pero se debe tener en cuenta que la concentración de la oleorresina se encuentra en una relación 1:10, lo cual afecta significativamente el resultado y sólo hasta introducirlo a una matriz alimenticia, se podrá calcular la capacidad de coloración de la oleorresina y su estabilidad en el tiempo dentro del alimento, comparado con la oleorresina líquida.

Conclusiones

El CO₂, empleado en la extracción por fluidos supercríticos es una fuente alternativa, no tóxica, inerte, no inflamable, con alta pureza y bajo costo, empleado para la obtención de productos naturales libres de solventes orgánicos altamente tóxicos como el hexano, entre otros, que no son recuperables y su tratamiento es altamente contaminante, perjudicial para la salud los vapores generados en su incineración y, principalmente, los efectos colaterales que mínimas cantidades residuales que permanezcan en el producto final extraído y empleado para consumo directo por humanos puede desencadenar en enfermedades como cáncer. Por esta razón, la alternativa de fluidos supercríticos reutilizables es una de las mejores propuestas ambientales en la obtención de la oleorresina de paprika con características de alta calidad por la conservación de sus propiedades bioactivas y ser un producto natural y con altos estándares de calidad.

La microencapsulación de la oleorresina de paprika es una tecnología que permite alargar la vida útil del producto final y facilita el manejo en polvo de un producto, ya que actualmente la oleorresina presenta dificultades para el transporte y la incorporación en matrices alimenticias o cosméticas por su alta viscosidad.

Referencias

1. RESTREPO, Mauricio. Oleoresinas de *capsicum* en la industria alimentaria. En: Revista Lasallista de Investigación. Vol 3. No 2 (2007); p. 43- 47.
2. SAUER, J. D. Geografía histórica de plantas de cultivo. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1993.
3. KLEIN, W., & KLEIN, D. El fortalecimiento de las dimensiones económicas de consolidación de la paz. Londres, (2009).
4. VAN WYK, B.E. Fábricas de Alimentos del Mundo - Identificación, usos culinarios y valor nutricional. Briza, Pretoria (2005).
5. ARIAS, J. & MELGAREJO, L. M. Aj. Historia, diversidad y usos. En: Instituto Amazónico de investigaciones científicas Sinchi. Minambiente y Colciencias. Vol. 29, (2000).
6. BOSLAND P. W. Chiles: a diverse crop. En: HortTechnol. Vol. 2. (1992); p. 6–10.
7. Determination of total natural couloring matter content, ASTA. 1989.
8. BOSLAND, P. W. *Capsicums*: Innovative uses of an ancient crop. En: Progress in new crops, 479-487. Ed. ASHS Press, Arlington, VA, E.E.U.U. (1996).
9. NAGY, V; AGOC S, A; TURCSI, E; MOLNÁR, P; SZABO, Z AND DELI, J En: Tetrahedron Letters. Vol. 17 (2007); p. 9012-9014.
10. STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine. Vol. 24,(2003); p. 345–351.
11. SOUTHON, S., & FAULK S, R. Predicting the bioavailability of antioxidants in food: the case of carotenoids. En: Antioxidants in food. Norwich, UK: Woodhead Publishing Ltda. (2001).
12. BRITTON, G. Carotenoids. Methods in Plant Biochemistry. Vol. 7 (1991); p. 473–518.
13. KOHLMEIER, L., & HASTINGS, S. B. Epidemiological evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. En: Am. J.Clin. Nutr. (1995); p. 1370S-1376S.
14. SHEKELLE, R. B., LIU, S., RAYNOR, W. J., LEPPER, M., MALIZA, C., ROS-SOF, A. Dietary vitamin A and risk of cancer in the western electric study. En: Lancet. Vol. 2 (1981); p.1185–1190.
15. BLOCK G, PATERSON B AND SUBAR A. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. En: Nutr. Cancer. Vol. 18 (1992); p. 1–29.
16. FORMAN, M. R., LANZA, E., YONG, L. C., HOLDEN, J. M., GRAUBARD, B. I., BEECHER, G. R., MELTIZ, M., BROWN, E. D., SMITH J. C. The correlation between two dietary assessments of carotenoid food-composition database. En: Am. J. Clin. Nutr. Vol. 58 (1993); p. 519-524.
17. PALACE, V.P. Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. En: Free Radical Biology & Medicine. Vol. 26 (1999); p. 746–761.

18. TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. En: *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Vol. 58 (2004); p. 100–110.
19. KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. En: *Free Radic. Biol. Med.* Vol. 7 (1989); p. 617–635.
20. FAULKS, R. M.; HART, D. J.; WILSON, P. D. G.; SCOTT, K. J.; SOUTHON S. Absorption of all trans and 9-cis b-carotene in human ileostomy volunteers. En: *Clin. Sci.* Vol. 93 (1997); p. 585–591.
21. OLSON, J. A. Absorption, transport and metabolism of carotenoids in humans. En: *Pure and Applied Chemistry Biochemistry and Biophysics*. Vol. 301 (1994); p. 217-223.
22. PARKER, R. S. Carotenoid and tocopherol composition of human adipose tissue. En: *Am. J Clin. Med.* Vol. 47 (1988); p. 33-36.
23. RUTKOWSKA, J.; STOLYHWO, A. Application of carbon dioxide in subcritical state (LCO₂) for extraction/fractionation of carotenoids from red paprika. En: *Food Chemistry*. Vol. 115 (2009); p. 745–752.
24. SOMOS, A. The paprika, Akadémiai Kiadó, Budapest. (1984); p. 30–44.
25. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; JARÉN-GALÁN, M.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. Color Quality in Paprika. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 40 (1992); p. 2384-2388.
26. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Separation and Quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annum* L.), Paprika, and Oleoresin by Reversed-Phase HPLC. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 41 (1993); p. 1616-1620.
27. JARÉN-GALÁN, M.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Prediction of decoloration in paprika oleoresins. Application to studies of stability in thermodynamically compensated systems. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 47 (1999); p. 945-951.
28. COSTA, J. Pimiento pimentonero. Selección y mejora. En: *H. Técnica 27*; Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias: Madrid (1979).
29. Soriano, M. C.; Navarro, F; Costa, J. Caracterización de nuevos cultivares de pimiento para pimentón. En: *Agríc. Vergel.* (1990); p. 630-632.
30. MÍNGUEZ-MOSQUERA, María Isabel, PÉREZ-GÁLVEZ, P. Color Quality in Paprika Oleoresins. En: *J.Agric. Food Chem.* Vol. 46 (1998); p. 5124-5127.
31. BIACS, P.A.; CZINKOTAN, B.; HOSCHKE, A. Factors affecting stability of colored substances in paprika powders. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 40 (1992); p. 363.
32. MALCHEV, E.; LONCHEVA, N.; TANCHEV, S.; KALPAKCHIEVA, H.; NAHRUNG, D. Quantitative Changes in Carotenoids during the Storage of Dried Red Pepper and Red Pepper Powder. En: *Die Nahrung*. Vol. 26 (1982); p. 415-420.
33. LOPERA, M. R. & MONTOYA, R. Obtención de oleorresina de pimentón (*Capsicum annum* L.). En: *Vitae.* (2006); p. 5-9.

34. [AFEXPO (Asociación de Fabricantes y Exportadores de Pimenton, Oleoresina Derivados), private communication, 1993]
35. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; PEREDA-MARRIN, J. Pepper for paprika (*Capsicum annuum*). Ratio between the red and yellow carotenoid pigments. En: Grasas Aceites. Vol. 35 (1984); p. 4-10.
36. HORNERO-MÉNDEZ, Damaso, MÍNGUEZ-MOSQUERA, María Isabel. Rapid Spectrophotometric Determination of Red and Yellow Isochromic Carotenoid Fractions in Paprika and Red Pepper Oleoresins. En: J. Agric. Food Chem. Vol. 49 (2001); p. 3584-3588.
37. FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J P. Extraccion convencional de oleoresina de pimenton dulce y picante I. Generalidades, composicion, proceso e innovaciones y aplicaciones. En : Grasas y Aceites. Vol. 58. No 3 (2007); p. 252-263.
38. JAREN-GALAN, M.; NIENABER. U.; SCHWARTZ, S. J. Paprika (*Capsicum annuum*) Oleoresin Extraction with Supercritical Carbon Dioxide. En: J. Agric. Food Chem. Vol. 47 (1999); p. 3558 - 3564.
39. SWEENEY, J. M.; MARSH, A. C. Liver storage of Vitamin A in rats fed with carotene stereoisomers. En: J. Nutr. Vol. 103 (1973); p. 20-25.
40. WILSKA-JESZKA, J. F. Chemical and functional properties of food components. Boca Raton, Londres, New York, Washington: CRC Press. (2002).
41. HAN, B.; ZHANG, J. Supercritical CO₂-continuous microemulsions and compressed CO₂-expanded reverse microemulsions. En: Journal of Supercritical Fluids. Vol. 47 (2009); p. 531-536.
42. GNAYFEED, M. H.; DAOOD, H. G.; ILLES, V.; BIACS, P. A. Supercritical CO₂ and subcritical propane extraction of pungent paprika and quantification of carotenoids, tocopherols, and capsaicinoids. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 49 (2001); p. 2761-2766.
43. DAOOD, H.G.; ILLES V.; GNAYFEED, M.H.; MEZSAROS, B.; HORVÁTH, G.; BIACS, P.A. Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and subcritical propane. En: Journal of Supercritical Fluids. Vol. 23 (2002); p. 143-152.
44. AMBROGI, A.; CARDARELLI, D.; EGGERS, R. Fractional extraction of paprika using supercritical carbon dioxide and on-line determination of carotenoids. En: Journal of Food Science. Vol. 67. No 9 (2002); p. 3236-3241.
45. UQUICHE, E.; DEL VALLE, J. M.; ORTIZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annuum L.*) oleoresin. En: Journal of Food Engineering. Vol. 65 (2004); p. 55-66.
46. RUTKOWSKA, J., & STOLYHWO, A. Application of carbon dioxide in subcritical state (LCO₂) for extraction/fractionation of carotenoids from red paprika. En: Food Chemistry. (2009); p. 745-752.
47. RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical ca-

- tion decolorization assay. En: *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 26 (1999); p. 1231–1237.
48. REINECCIUS, G. A. Carbohydrates for flavour encapsulation. En: *Food Technology*. Vol. 45 (1989); p. 144–149.
 49. QI, Z. H., & XU, A. Starch based ingredients for flow encapsulation. En: *Cereal Food World*. Vol. 44 (1999); p. 460–465.
 50. RAGHAVAN, B., ABRAHAM, K. O., & SHANKARANARAYANA, M. L. Encapsulation of spice and other flavour materials. En: *Indian Perfumer*. Vol. 34. No 1 (1990); p. 75–85.
 51. SANKARIKUTTY, B., SREEKUMAR, M. M., NARAYANAN, C. S., & MATHEW, A. G. Studies on microencapsulation of cardamom oil by spray drying technique. En: *Journal of Food Science and Technology*. Vol. 25 No 6 (1988); p. 352–356.
 52. SHAIKH, J., BHOSALE, R., SINGHAL R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. En: *Food Chemistry*. Vol. 94 (2006); p. 105–110.
 53. CHEGINI, G.R. & GHOBADIAN, B. Spray Dryer Parameters for Fruit Juice Drying. En: *World Journal of Agricultural Sciences*. Vol. 3. No 2 (2007); p. 230-236.
 54. ZILBERBOIM, R., KOPELMAN, I. J., & TALMAN, Y. Microencapsulation by dehydrating liquid: Retention of paprika oleoresins and aromatic esters. En: *Journal of Food Science*. Vol. 51 (1986); p. 1301–1310.
 55. JUNG, J. M., & SUNG, T. K. A new method for analysis of capsaicinoids content in microcapsule. En: *Korean Journal of Food Science and Technology*. Vol. 32 (2000); p. 42–49.
 56. FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J. P. Extracción convencional de oleoresina de pimentón dulce y picante I. Generalidades, composición, proceso e innovaciones y aplicaciones. En: *Grasas y aceites*. Vol. 58. No 3, (2007); p. 252-263.
 57. Official Methods of Analysis –AOAC
 58. MÍNGUEZ-MOSQUERA, María Isabel, GARRIDO-FERNÁNDEZ, J., PEREDA-MARÍN, J. Pepper for paprika (*Capsicum annum*). Ratio between the red and yellow carotenoid pigments. En: *Grasas Aceites*; (1984); p. 4-10.
 59. MONTGOMERY, D. C. Response surface methods and other approaches to process optimization. En: *Design and analysis of experiments*. 5a ed. Wiley (ed). Nueva York, USA (2001).
 60. ZILBERBOIM, R., KOPELMAN, I. J., & TALMAN, Y. Microencapsulation by dehydrating liquid: Retention of paprika oleoresins and aromatic esters. En: *Journal of Food Science*. (1986); p. 1301–1310.
 61. GOLDSTEIN, J. Microscopía electrónica de barrido y microanálisis de rayos X. Academic Kluwer / Publishers Pleno (2003); p. 689.
 62. FAGEN, Harold; KOLEN, Eugene; HUSSONG, Ralph. Spectrophotometer method for determining piperine in oleoresin of black pepper. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 3 (1955); p. 860–862.

63. GIRALDO ROJAS, Francisco Javier; GIL GARZÓN, Maritza Andrea; ALZATE TAMAYO, Luz María; RESTREPO DUQUE, Ana María; MILL N CARDONA, Leonidas; ORDON EZ, Andrés; RESTREPO RESTREPO, Carlos Esteban. Comparación de métodos de extracción de oleoresina de p prika (*Capsicum annuum L.*) mediante la tecnología de fluidos supercríticos y método soxhlet. En: Producción Más Limpia. Vol. 4. No 1 (2009); p. 17-26.
64. SOLOMONS, N. W. Vitamina A y carotenoides. En: Conocimientos actuales sobre nutrición. Octava edición. Editorial BA Bowman BA y RM Russell RM. Washington (2003); p. 137-158.

“Perspectivas y Avances de Investigación”
de la serie “Lasallista Investigación y Ciencia”

se terminó de imprimir en la Editorial Artes y Letras S.A.S.
en noviembre de 2010.