

Desarrollo de una formulación de nano y micropartículas de licopeno extraído por fluidos supercríticos a partir de residuos agroindustriales de tomate (*Lycopersicon esculentum*).

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Innovación Alimentaria y Nutrición

Nataly Saavedra Hortúa

Asesor

Julián Alberto Londoño Londoño

Doctor en Ciencias Químicas

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de Ingeniería

Ingeniería de Alimentos

Caldas – Antioquia

2015

Contenido

Abreviaturas	8
Resumen	10
Introducción.....	11
Justificación.....	15
Objetivos	17
Objetivo General:	17
Objetivos Específicos:.....	17
Marco Teórico	18
Licopeno	18
Deshidratación:	22
Tecnologías de extracción:	24
Microencapsulación	30
Liposomas.....	33
Estabilidad	41
Metodología	44
Preparación del material vegetal.....	44
Validación de la metodología en la determinación y cuantificación de licopeno por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	45
Linealidad:.....	46
Efecto matriz:	47
Selectividad.....	47
Límite de detección y cuantificación:	48
Extracción de licopeno por fluidos supercríticos.	51
Cinética de extracción	51
Extracción del licopeno.....	52
Microencapsulación del extracto de licopeno utilizando secado por aspersion	54
Rendimiento en el proceso de microencapsulación.....	56
Eficiencia de encapsulación (contenido de licopeno)	56
Caracterización de las micropartículas obtenidas.....	57
Estabilidad de las micropartículas	58
Liberación controlada de licopeno a diferentes pH.....	59

Encapsulación de licopeno utilizando liposomas	60
Caracterización de los liposomas	62
Efecto térmico sobre el contenido de licopeno en liposomas	63
Perfil de liberación de licopeno a pH neutro	63
Resultados y Discusión	65
Identificación de licopeno.....	65
Validación de la metodología en la determinación y cuantificación de licopeno por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	66
Efecto matriz.....	66
Linealidad:	66
Selectividad:	67
Límite de detección y cuantificación:	68
Exactitud, repetibilidad y precisión intermedia:	69
Extracción de licopeno por fluidos supercríticos.	69
Cinética de extracción	69
Extracción de licopeno.....	71
Microencapsulación del extracto de licopeno utilizando secado por aspersión	76
Microscopía electrónica de barrido (SEM) para las micropartículas	79
Tamaño de las micropartículas y estabilidad del licopeno en función del tiempo ...	80
Efecto térmico en el contenido de licopeno	84
Perfil de liberación de licopeno	88
Elaboración de liposomas para la encapsulación de licopeno	92
Eficiencia de encapsulación	92
Caracterización de los liposomas y estabilidad en el tiempo	95
Efecto térmico en el contenido de licopeno	97
Perfil de liberación de licopeno	99
Conclusiones.....	101
Perspectivas.....	103
Referencias	104

Lista de Tablas

Tabla 1. Datos comerciales del mercado mundial de licopeno	20
Tabla 2. Algunos estudios en los cuales se analiza los efectos del licopeno en el tratamiento y/o prevención de enfermedades.	22
Tabla 3. País de procedencia de autores de artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre extracción de licopeno empleando fluidos supercríticos	26
Tabla 4. Artículos, autores e intensidad de citación en publicaciones que relacionan extracción de licopeno a través de fluidos supercríticos entre 1998 y 2016.....	27
Tabla 5. País de procedencia de autores de artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre liposomas y licopeno	40
Tabla 6. Agentes encapsulantes empleados en la microencapsulación del extracto de licopeno.....	55
Tabla 7. Coeficientes de variación y porcentajes de recuperación obtenidos para los parámetros de precisión y exactitud en la validación del método	69
Tabla 8. Rendimiento total, rendimiento de licopeno y capacidad antioxidante (ORAC) obtenidos en la extracción SC-CO ₂ de licopeno a partir de residuos agroindustriales de tomate.	72
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para el rendimiento de licopeno obtenido en la extracción SC-CO ₂ a partir de residuos agroindustriales de tomate.	72
Tabla 10. Tamaño de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión en el proceso de microencapsulación de licopeno para tiempo inicial (t:0) y después de 30 días de almacenamiento (t:30).....	82

Tabla 11. Parámetros del modelo exponencial utilizado en la liberación de licopeno proveniente de las micropartículas secadas por aspersion.....	91
Tabla 12. Tamaño de partícula y potencial z para los liposomas vacíos y cargados con licopeno almacenados a 4°C durante 20 días en oscuridad.	96
Tabla 13. Parámetros del modelo exponencial utilizado en la liberación de licopeno proveniente de la suspensión liposomal DPPC-Extracto de licopeno.	99

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química del licopeno (a) isómero <i>all-trans</i> (b) isómero <i>15-cis</i>	19
Figura 2. Artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre extracción de licopeno empleando fluidos supercríticos.	25
Figura 3. Áreas y enfoques de artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre extracción de licopeno empleando fluidos supercríticos.....	27
Figura 4. Estructura general de un fosfolípido.	35
Figura 5. Esquema de fosfolípidos en la formación de liposomas.	36
Figura 6. Artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre liposomas y licopeno.	40
Figura 7. Áreas y enfoques de artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre liposomas y licopeno	41
Figura 8. (a) Materia prima (b) Cortes del tomate para secado (c) Tomate puesto en el secador de lecho fluidizado (d) Tomate seco para extracción por fluidos supercríticos.	45
Figura 9. Esquema del equipo de fluidos supercríticos.	51
Figura 10. Cromatogramas obtenido por HPLC para (a) estándar de licopeno (<i>all-trans</i>) y beta-caroteno (b) extracto de licopeno obtenido por fluidos supercríticos (c) Tomate utilizado para la extracción.	65
Figura 11. Espectros de absorción de licopeno (A) estándar (B) extracto de obtenido por fluidos supercríticos.	67
Figura 12. Adición de estándar de licopeno en blanco matriz.	68
Figura 13. Curva de cinética para de extracción SC-CO ₂ (75°C y 25 MPa) de licopeno proveniente de residuos agroindustriales de tomate.	70
Figura 14. Solubilidad del licopeno extraído por SC-CO ₂ a partir de residuos agroindustriales de tomate.....	71

Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta para el diseño aplicado a la extracción por fluidos supercríticos-CO ₂ de licopeno.....	74
Figura 16. (a) Parámetros de humedad y actividad acuosa de las micropartículas. (b) porcentajes de rendimiento y eficiencia de encapsulación en el proceso de microencapsulación de licopeno por secado por aspersion.....	76
Figura 17. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las micropartículas obtenidas por secado por aspersion.....	80
Figura 18. Degradación del licopeno en micropartículas obtenidas por secado por aspersion durante almacenamiento a 20 °C.....	83
Figura 19. Contenido de licopeno remanente después del tratamiento térmico realizado (esterilización).....	84
Figura 20. Efecto de la esterilización sobre el tamaño de las micropartículas secadas por aspersion.....	88
Figura 21. Comportamiento del modelo utilizado para el perfil de liberación de licopeno proveniente de las micropartículas.....	89
Figura 22. Liberación acumulada de licopeno proveniente de las micropartículas obtenidas por secado por aspersion.....	90
Figura 23. Eficiencias de encapsulación para los sistemas liposomales de licopeno.	93
Figura 24. Estructuras químicas de los fosfolípidos empleados en la encapsulación de licopeno.	94
Figura 25. Contenido de licopeno después del proceso de esterilización para el extracto sin encapsular y para el sistema liposomal DPPC-Licopeno.	99
Figura 26. Perfil de liberación de licopeno a 37 °C y pH 7.0 desde la suspensión liposomal preparada con DPPC.....	100

Abreviaturas

AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro.

Cap: Capsul®.

CARO: Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno, conocido en inglés como ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

DMPC: Dimiristoilfosfatidilcolina, por su nombre en inglés Dimyristoylphosphatidylcholine.

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina, por su nombre en inglés Dipalmitoylphosphatidylcholine.

%EE: Porcentaje de eficiencia de encapsulación.

GA: Goma arábica.

HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a Detector de arreglo de diodos, por su nombre en inglés High Performance Liquid Chromatography coupled with Diode Array Detector.

HEL: Lecitina hidrogenada de huevo.

MD: Maltodextrina 19-20.

PAS: Proteína aislada de soya.

Sac: Sacarosa Comercial.

SC-CO₂: Dióxido de carbono en estado supercrítico, por su nombre en inglés Supercritical Carbon Dioxide.

SEM: Microscopia de barrido electrónico, por su nombre en inglés Scanning Electron Microscopy.

SFE: Extracción por fluidos supercríticos de su nombre en inglés Supercritical Fluid

Extraction.

RMCD: β -ciclodextrina metilada, por su nombre inglés Randomly Methylated β -Cyclodextrin.

Resumen

En esta investigación se utilizaron los residuos agroindustriales de tomate de aliño para la obtención de licopeno, un compuesto bioactivo con características funcionales interesantes para la industria nutracéutica y cosmética. El proceso global incluyó la recolección de los residuos de una central de abastos del departamento de Antioquia, el procesamiento y selección de estos, el secado mediante lecho fluidizado, la extracción del licopeno mediante fluidos supercríticos, la validación del método analítico por HPLC-DAD, el desarrollo de formulaciones mediante la elaboración de liposomas y secado por aspersión y el estudio correspondiente de su estabilidad y perfil de liberación.

Los resultados obtenidos permitieron verificar la validación del método cromatográfico en la identificación y cuantificación de licopeno extraído por fluidos supercríticos, establecer el tiempo y condiciones óptimas para su extracción (75°C y 25 MPa), identificar los mejores agentes encapsulantes por secado por aspersión (goma arábica y maltodextrina), los mejores fosfolípidos para la elaboración de liposomas (DPPC y HEL) así como estudiar la estabilidad de los sistemas de encapsulación en el tiempo, bajo un tratamiento térmico y analizar el perfil de liberación de licopeno provenientes de estos sistemas en diferentes valores de pH.

Palabras Claves: Licopeno, residuos agroindustriales de tomate, extracción por fluidos supercríticos, encapsulación, estabilidad.

Introducción

La industria agrícola produce gran cantidad de residuos derivados del procesamiento posterior a la cosecha, muchos de estos residuos cuando no son debidamente manejados pueden ocasionar problemas ambientales, por lo que el desarrollo de estrategias que impliquen una utilización eficiente de estos residuos genera una solución atractiva en la obtención de nuevos productos junto con beneficios económicos sociales y ambientales (Romo-Hualde, Yetano-Cunchillos, González-Ferrero, Sáiz-Abajo, & González-Navarro, 2012, 1045). En general, los residuos agroindustriales contienen compuestos bioactivos que pueden ser utilizados en la obtención de productos con diferentes aplicaciones en industrias del sector farmacéutico, cosmético y de alimentos (Strati & Oreopoulou, 2014, 311; Vági et al., 2007, 218). Sin embargo, en Colombia estos residuos no se han aprovechado de manera eficiente debido a la dificultad de tener métodos apropiados para la obtención de sustancias con la calidad e inocuidad necesaria para ser incluidas en la elaboración de nuevos productos (Alzate, Jiménez, & Londoño-Londoño, 2011, 110).

Específicamente se ha reportado en uno de los abastecimientos de frutas y hortalizas más importantes de Colombia, la Central Mayorista de Antioquia, la generación de 32 metros cúbicos diarios de residuos, de los cuales 6,57 son de tomate de aliño (González, 2013, 55). El tomate de aliño (*Lycopersicum esculentum L.*) se cultiva ampliamente, con una producción anual de 100 millones de toneladas en 144 países, es el segundo cultivo más importante en el mundo (Kalogeropoulos, Chiou, Pyriochu, Peristeraki, & Karathanos, 2012, 213). Según el departamento de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

(FAOSTAT) China es el primer productor, seguido por la India y Estados Unidos (FAOFAST, 2014). De acuerdo a la Encuesta Nacional Agropecuaria ENA 2014, el cultivo de tomate en Colombia registró una producción de 173.580 toneladas, equivalente a una participación del 17,12 % en la producción de cultivos de hortalizas. El departamento que presentó una mayor producción fue Boyacá (57.300 toneladas) seguido por Antioquia (28.196 toneladas) y Cundinamarca (25.862 toneladas) (Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), 2015)).

En el caso particular de los residuos del cultivo de tomate de aliño, se ha generado un interés debido a la posibilidad de extraer compuestos bioactivos como carotenoides, con propiedades físicas y químicas llamativas para las industrias farmacéutica y alimentaria, en especial para el mercado de nutracéuticos (Santana-Méridas, González-Coloma, & Sánchez-Vioque, 2012, 447). El licopeno es el carotenoide mayoritario en los tomates maduros, que le confiere el pigmento rojo característico de estos frutos. Debido a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, este compuesto ha sido estudiado en la prevención de enfermedades cardiovasculares, degenerativas y algunos tipos de cáncer (Okonogi & Riangjanapatee, 2015, 727; Waliszewski & Blasco, 2010, 254).

La extracción de licopeno y otros compuestos bioactivos puede realizarse por diferentes métodos, tales como extracción líquido-líquido, sólido-líquido, extracción asistida por ultrasonido, extracción enzimática y extracción por fluidos supercríticos (Santana-Méridas et al., 2012, 451; Strati & Oreopoulou, 2014, 312). La extracción con fluidos supercríticos utilizando dióxido de carbono (SFE-CO₂) es ampliamente utilizada para la obtención de compuestos no polares (Wijngaard, Hossain, Rai, & Brunton,

2012, 505), por ejemplo la extracción de compuestos lipofílicos provenientes de productos agrícolas (Xynos et al., 2012, 89). Se han reportado distintas investigaciones para la extracción de licopeno por fluidos supercríticos en las cuales se ha evaluado el efecto de la temperatura, presión, flujo de CO₂, tamaño de partícula, presencia de co-solvente y tiempo de extracción (Baysal, Ersus, & Starmans, 2000, 5507; Nobre, Palabra, Pessoa, & Mendes, 2009, 682; Perretti et al., 2013, 177; Zuknik, Norulaini, & Mohd, 2012, 254).

En esta investigación las variables de estudio para la SFE-CO₂ fueron presión y temperatura. Una vez obtenido el extracto de licopeno proveniente de los residuos agroindustriales de tomate de aliño, se planteó llevar a cabo dos procedimientos de encapsulación. La microencapsulación mediante secado por aspersion para la cual se ha reportado investigaciones en la encapsulación de licopeno utilizando diferentes agentes encapsulantes tales como Capsul® (Rocha, Fávaro-Trindade, & Grosso, 2012, 37), gelatina y sacarosa (Shu, Yu, Zhao, & Liu, 2006, 664), goma arábiga y proteína aislada de soya (Li et al., 2015, 301). El otro método de encapsulación utilizado, los liposomas, han despertado interés en las investigaciones debido a su funcionalidad y versatilidad de empleo ya que tienen la capacidad de incorporar moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también de carácter anfifílico (Ruano, 2013, 22) así como la liberación controlada y específica del compuesto bioactivo, adicionalmente al utilizar compuestos naturales en su elaboración brindan biocompatibilidad y biodegradabilidad, características de gran importancia en los sectores farmacéuticos y de alimentos (Đorđević et al., 2014^a, 469).

En resumen esta investigación planteó como objetivo la utilización de los residuos agroindustriales de tomate de aliño para la obtención de un extracto de licopeno obtenido por fluidos supercríticos SC-CO₂, el cual fue empleado en la formulación de sistemas micro y nano estructurados que permitieron ofrecer una posible aplicación en la industria nutracéutica y/o farmacéutica.

Justificación

Debido al incremento en la demanda de productos con propiedades que permitan mejorar la condición de salud de los consumidores, la extracción de compuestos bioactivos presentes en residuos agroindustriales constituye una oportunidad de contribuir al desarrollo industrial en un país como Colombia que cuenta con una amplia diversidad agrícola.

En esta investigación se utilizaron los residuos de tomate de aliño provenientes de una central de abastos de Antioquia (en la cual se reportan más de 6 metros cúbicos diarios de estos (González, 2013, 55) y la tecnología de fluidos supercríticos utilizando CO₂ para realizar la extracción del licopeno, un pigmento lipofílico que ha generado gran interés por su función en la prevención de enfermedades crónicas, sin embargo, la característica química que le confiere su alta actividad antioxidante también lo hace susceptible de experimentar reacciones de degradación durante su almacenamiento, por lo cual, junto a la extracción de este compuesto se plantea desarrollar una formulación de encapsulación que ofrezca una mejoría en su estabilidad para su incorporación en una matriz determinada.

En primer lugar, los procedimientos tradicionales de extracción con solventes orgánicos pueden generar un impacto ambiental negativo, la extracción con fluidos supercríticos ha presentado una gran demanda para extraer compuestos con interés nutricional y/o farmacéutico debido a una de las ventajas que presenta esta tecnología al generar productos libres de residuos tóxicos. Uno de los compuestos más utilizado como solvente en su estado supercrítico es el dióxido de carbono, además de la

facilidad de llegar a su estado supercrítico (temperatura y presión fácilmente alcanzable) no es inflamable y su costo es relativamente bajo comparado con otros solventes.

Por otro lado, uno de los parámetros más críticos en la protección de los compuestos es la elección del método de encapsulación, por ello en este trabajo se planteó desarrollar dos métodos para encapsular licopeno: la elaboración de liposomas y la microencapsulación por secado por aspersion.

Cada uno de los procesos descritos anteriormente: el aprovechamiento de residuos agroindustriales de tomate, la extracción de licopeno con SC-CO₂ y el desarrollo de una formulación mediante la encapsulación del compuesto bioactivo, representa un abordaje multidisciplinario que pretende contribuir no solo con un desarrollo científico sino con un impacto en el sector agroindustrial, proporcionando ventajas desde el punto de vista ambiental por la disminución del volumen de residuos de tomate que quedan en la región sin utilizar; a nivel económico, ofreciendo una mejora en la tasa retributiva de los centros de abasto por la disminución de los residuos enviados al relleno sanitario; a nivel tecnológico, ofreciendo una alternativa por la generación de un ingrediente con valor agregado y la posibilidad de establecer alianzas en empresas interesadas en la utilización de residuos agroindustriales y/o generación de compuestos bioactivos.

Objetivos

Objetivo General:

Desarrollar una formulación de licopeno encapsulado, extraído por fluidos supercríticos a partir de residuos agroindustriales de tomate (*Lycopersicum esculentum*).

Objetivos Específicos:

- Estandarizar las condiciones de extracción de licopeno a escala de laboratorio utilizando residuos agroindustriales de tomate.
- Determinar la formulación adecuada para la encapsulación del licopeno mediante el desarrollo de sistemas nano (liposomas) y microestructurados (micropartículas).
- Caracterizar las nano y micropartículas obtenidas en la encapsulación del licopeno mediante parámetros fisicoquímicos (morfología, tamaño, carga y contenido incorporado), estabilidad y perfil de liberación.

Marco Teórico

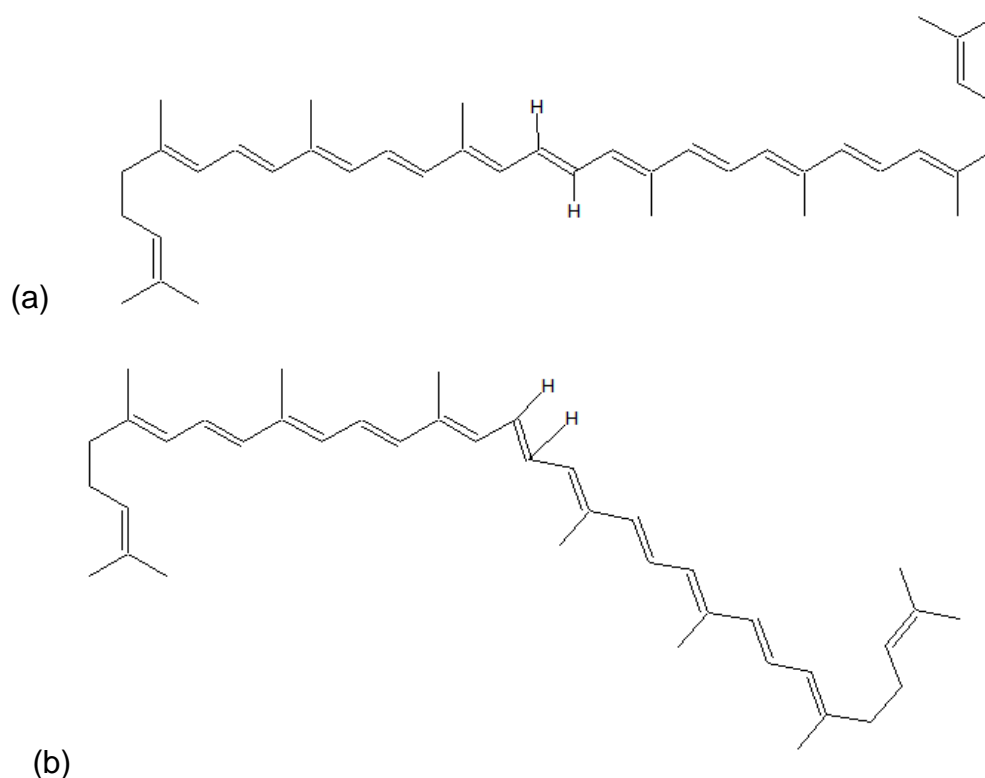
Licopeno

El tomate es rico en compuestos bioactivos tales como licopeno, ácido ascórbico, vitamina E, flavonoides (Gümüşay, Borazan, Ercal, & Demirkol, 2015, 156) los cuales presentan propiedades antioxidantes que resultan interesantes para la elaboración de productos nutracéuticos y farmacéuticos (Zuknik et al., 2012, 254). De los pigmentos lipofílicos presentes en el tomate, el licopeno es el compuesto que se encuentra en mayor proporción, entre un 80% a 90% (Waliszewski & Blasco, 2010, 255), su concentración puede variar de 30 a 200 mg /kg de fruta fresca y de 430 a 2950 mg /kg en base seca (Machmudah et al., 2012, 290). Referente a su estructura química, está conformado únicamente por carbono e hidrógeno clasificándose así como caroteno dentro de la familia de los carotenoides (Vitale, Bernatene, & Pomilio, 2010, 196). Su cadena alifática está formada por cuarenta átomos de carbono, con trece dobles enlaces, once de los cuales son conjugados (cadena poliénica), característica que le confiere alta reactividad frente al oxígeno y radicales libres (Jomova & Valko, 2013, 102; Vitale et al., 2010, 197). Debido a la instauración en su cadena, también presenta sensibilidad a ácidos, peróxidos y lipoxigenasas poliénicas (Carranco, Calvo, & Pérez, 2011, 234).

A diferencia de otros carotenoides como el α y β caroteno, el licopeno no tiene actividad de provitamina A debido a que carece de la estructura de anillo γ - iónico (Waliszewski & Blasco, 2010, 256) (Figura 1). En comparación con otros carotenoides

como el beta-caroteno producido a gran escala por síntesis química, el licopeno es obtenido de fuentes naturales a partir de hongos y plantas (Vitale et al., 2010, 197).

Figura 1. Estructura química del licopeno (a) isómero *all-trans* (b) isómero 15-*cis*. (Elaborada con el programa ACD Labs. 6,0.).



Comercialmente, el precio del licopeno está relacionado con su origen, ya sea a partir de tomate o del hongo *Blakeslea trispora* y con su pureza, pudiendo alcanzar USD 6000 /Kg (Tabla 1). El comercio de licopeno se valoró para el 2003 en 27 millones de dólares, pero desde 2006 ha estado creciendo en el mercado de los alimentos funcionales y a pesar que está muy por debajo comparado con otros carotenoides como β -caroteno y luteína, se estima que para el 2018 llegue a unos USD 100 millones (ODEPA, 2013,3).

Tabla 1.Datos comerciales del mercado mundial de licopeno

Producto	Compañía	Ubicación de la compañía	Origen del Licopeno	Pureza (%)	Precio (\$ / kg)
Tomate Lyco 160	Obipektin	Suiza	Tomates	0,16	12 23
NutriPhy Lycopene 100, GIN601841	Chr Hansen	Dinamarca	Tomates	3,8 – 4,2	635 83
Licopeno	Abl biotechnologies	India	Tomates maduros	6	286 28
Licopeno	Abl biotechnologies	India	Tomates maduros	8	374 55
Licopeno	Abl biotechnologies	India	Tomates maduros	10	465 21
Lyc- O-Red® 10% CWD	Buckton Scott Limited	Reino Unido	Tomates maduros seleccionados y no modificados genéticamente	>10	489 10
Lyc O Mato ®	LycoRed Natural Products Industries Ltd.	NorteAmérica	Tomates	15	6 000 00
Licopeno Natural Beadlet 5% CWS	Vita-solarbio	China	<i>Blakeslea trispora</i> (hongo)	5	115 00
Licopeno	AHD International	USA		5	163 00
Licopeno Natural Beadlet 5% TAB	Vita-solarbio	China	<i>Blakeslea trispora</i> (hongo)	10	185 00
Licopeno Natural Beadlet 10% CWS	Vita-solarbio	China	<i>Blakeslea trispora</i> (hongo)	10	195 00

Adaptada de: (Casas, Faraldi, & Bildstein, 2008, 24).

El licopeno representa del 21-43 % de los carotenoides totales que se encuentran en el suero humano, con niveles en el plasma en un rango de 0,22 a 1,06 nmol/mL (Waliszewski & Blasco, 2010, 255). Aunque en el tomate y sus productos derivados, se encuentra principalmente el isómero geométrico *trans* del licopeno (79-91%), en los tejidos animales y humanos se acumula principalmente los isómeros *cis*, los cuales presentan una mayor biodisponibilidad, probablemente por presentar una mejor solubilidad en las micelas del ácido biliar y por lo tanto una facilidad de ser incorporados en los quilomicrones (Vitale et al., 2010, 197).

En la tabla 2, se describen algunos trabajos en los que se evaluó el comportamiento del licopeno en el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas. (Vitale et al., 2010, 202).

Tabla 2. Algunos estudios en los cuales se analiza los efectos del licopeno en el tratamiento y/o prevención de enfermedades.

Objetivo	Efecto
Comprobar la acción quimioterapéutica en leucemias y linfomas.	Inhibición de la actividad de la enzima adenosindesaminasa (ADA).
Estudio en hombres con estadios T1 y T2 de adenocarcinoma prostático.	Incremento de la concentración de licopeno en aproximadamente 3 veces los tejidos prostáticos.
Corroborar la disponibilidad de licopeno.	Mayor disponibilidad del licopeno administrado en alimentos procesados suplementado en tabletas.
Examinar el efecto del licopeno en siete líneas de células humanas.	La proliferación celular no siempre se afecta cuando la concentración de licopeno no es muy elevada.
Verificar la modificación de la expresión de la proteína <i>conexina</i> 43 en una línea celular de cáncer de próstata.	Los cambios son independientes del contenido de licopeno del tomate y son más evidentes cuando el licopeno se administra en forma pura.
Analizar la proliferación y la apoptosis en cuatro líneas celulares malignas.	Los efectos dependen de la dosis de licopeno y del tipo de célula maligna.

Fuente: (Vitale et al., 2010, 202)

Deshidratación:

La deshidratación es una de las operaciones unitarias más utilizadas para la preservación de alimentos, especialmente frutas y hortalizas cuyo contenido de agua es superior al 80% (Sagar & Suresh, 2010, 15). Su objetivo es reducir el contenido de agua en un alimento evitando reacciones de deterioro fisicoquímico y contaminación microbiológico durante su almacenamiento (López et al., 2013, 293). Adicionalmente la deshidratación ofrece una serie de ventajas comerciales tales como: facilidad de

almacenamiento y transporte, aumento en el tiempo de permanencia del producto en el mercado, un mayor aprovechamiento de las producciones (sobre todo en épocas de superproducción) y la generación de oportunidades para el desarrollo de nuevos productos con ingredientes funcionales (García, Muñiz, Hernandez, González, & Fernández, 2013, 62; Nunes et al., 2016, 882).

Las principales variables que modulan la velocidad del movimiento del agua desde el alimento hacia el exterior del mismo son: el tiempo, la temperatura y la superficie de contacto del alimento con el fluido deshidratante, conforme se incrementa la temperatura y la superficie de contacto del alimento con el fluido deshidratante, aumenta la velocidad de deshidratación, no obstante, temperaturas altas pueden ocasionar pérdidas de compuestos bioactivos presentes en los alimentos (Ochoa-Reyes et al., 2012, 39; Rodríguez et al., 2016, 537). Entre las diferentes metodologías que se han desarrollado para llevar cabo procesos de deshidratación se encuentran secado solar, aire caliente, microondas, liofilización, deshidratación osmótica y lecho fluidizado (Marín, Lemus, Flores, & Vega, 2006; Ochoa-Reyes et al., 2012, 39). En esta última tecnología el producto se pone en contacto con el fluido deshidratante (aire caliente) el cual genera un movimiento fluido y continuo de las partículas sólidas (fluidización), obteniendo un buen intercambio másico entre el producto y el fluido deshidratante, por lo cual no se hace necesario el uso de temperaturas altas para lograr buenas eficiencias en el proceso, otra de las ventajas que ofrece esta tecnología es la reducción en el tiempo de secado (Bakal, Sharma, Sonawane, & Verma, 2012, 608), originando así una reducción en el costo del proceso. Esta tecnología ha sido utilizada para la deshidratación y secado de alimentos tales como semillas (soya)

(Perea, 2011, 48), papas (Bakal et al., 2012, 608), hortalizas (zanahoria, lechuga, pimentón, arveja, cebolla, repollo, tomate) (Corporación Universitaria Lasallista, 2011) y frutas con alto contenido de vitamina C (Kumar, 2015, 4).

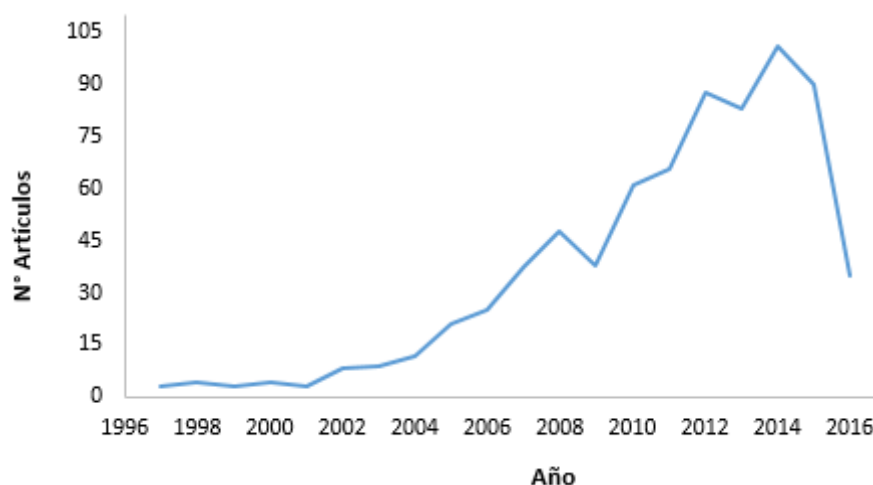
Tecnologías de extracción:

Algunos métodos convencionales para la extracción de licopeno de diferentes fuentes incluyen mezcla de solventes como acetona, cloroformo, hexano, etanol, acetato de etilo, benceno, éter de petróleo entre otros, los cuales pueden dejar trazas en el producto final contaminándolo y proporcionando alguna posibilidad de riesgo por su toxicidad, por lo cual estos métodos no resultan adecuados para usos cosméticos, farmacéuticos y del área de alimentos (Roldan-Gutiérrez & Castro, 2007, 167).

Como alternativa surge la extracción por fluidos supercríticos, la cual presenta la ventaja de ser una técnica de extracción más limpia, de alta selectividad (la cual se genera mediante la variación de condiciones de presión y temperatura) y que permite fraccionar y separar compuestos de acuerdo a su polaridad haciéndola una técnica aplicable a nivel industrial (Peralta, 2010, 8). Uno de los compuestos que más se utiliza como fluido supercrítico para realizar este tipo de extracciones es el CO₂ dadas las ventajas que ofrece, presenta baja temperatura y presión crítica (31,1 °C y 7,38 MPa (Romo-Hualde et al., 2012,1045), alta difusividad, baja viscosidad baja densidad y tensión superficial, no es inflamable, ni corrosivo, ni tóxico, adicionalmente presenta una fácil accesibilidad por su bajo costo y alta pureza (Ciurlia, Bleve, & Rescio, 2009, 338; Nyam et al., 2010,1278).

En relación a artículos científicos en los que se reporta la extracción de licopeno empleando fluidos supercríticos, de acuerdo a la información disponible en la base de datos Scopus¹, luego de emplear la fórmula de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("supercritical fluids") AND TITLE-ABS-KEY (lycopene), se encuentra que entre el período 1996-2016 en la literatura se reportan 739 artículos que relacionan licopeno y fluidos supercríticos, siendo el año 2014 el de mayor producción con 101 artículos identificados (figura 2). En la tabla 3 se indica la participación de Colombia y de los primeros diez países en producción de artículos.

Figura 2. Artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre extracción de licopeno empleando fluidos supercríticos.



Adaptada de: Scopus¹. Fecha de consulta: 03-04-2016

¹ Scopus es una base de datos de literatura científica que incluye resúmenes y citas de publicaciones científicas revisadas por pares, libros académicos y memorias de conferencias. Disponible en: <https://www.elsevier.com/solutions/scopus>

Tabla 3.País de procedencia de autores de artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre extracción de licopeno empleando fluidos supercríticos

País	N° Artículos	Porcentaje
China	159	22%
España	78	11%
Brasil	64	9%
Italia	52	7%
Estados Unidos	49	7%
Taiwan	36	5%
Japón	33	4%
Malasia	32	4%
India	30	4%
Alemania	26	4%
Colombia	6	1%
Otros Países	174	23%
Total	739	100%

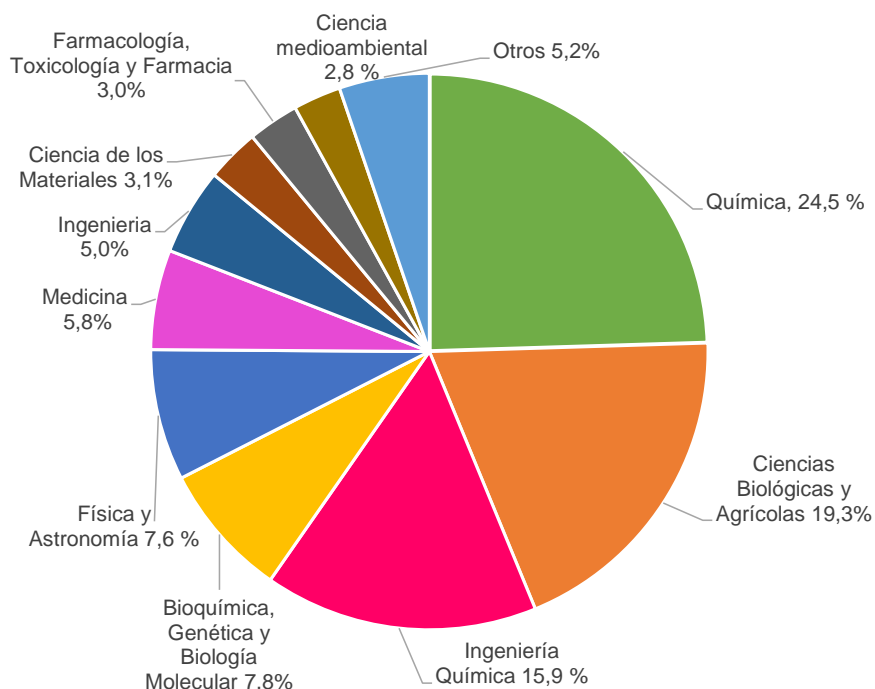
Adaptada de: Scopus¹. Fecha de consulta: 03-04-2016

En cuanto a las temáticas y enfoques de estos artículos², la mayor parte se enfoca en el área de química (24,5%), mientras que en segundo lugar se ubica ciencias biológicas y agrícolas (19,3%), seguido de ingeniería química (15,9%). Las áreas de conocimiento relacionadas se presentan en la figura 3.

Los textos que relacionan alimentos y extracción de licopeno a través de fluidos supercríticos, con sus autores, nombre de artículos, años y fuentes de publicación, se encuentran en la tabla 4

² Un mismo artículo puede estar relacionado con diversas áreas de conocimiento, pero este análisis considera la principal área de conocimiento del artículo.

Figura 3. Áreas y enfoques de artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre extracción de licopeno empleando fluidos supercríticos.



Adaptada de: Scopus¹. Fecha de consulta: 03-04-2016

Tabla 4. Artículos, autores e intensidad de citación en publicaciones que relacionan extracción de licopeno a través de fluidos supercríticos entre 1998 y 2016.

Autores	Nombre Artículo	Año, Fuente, Páginas y No. Citaciones
Durante, M., Lenucci, M.S., Marrese, P.P., Rizzi, V., De Caroli, M., Piro, G., Fini, P., Russo, G.L., Mita, G.	α -Cyclodextrin encapsulation of supercritical CO ₂ extracted oleoresins from different plant matrices: A stability study	(2016) Food Chemistry, 199, pp. 684-693.
Lenucci, M.S., De Caroli, M., Marrese, P.P., Iurlaro, A., Rescio, L., Böhm, V., Dalessandro, G., Piro, G.	Enzyme-aided extraction of lycopene from high-pigment tomato cultivars by supercritical carbon dioxide	(2015) Food Chemistry, 170, pp. 193-202. Cited 4 times.
Strati, I.F., Oreopoulou, V.	Recovery of carotenoids from tomato processing by-products - A review	(2014) Food Research

- International, 65 (PC), pp. 311-321. Cited 2 times.
- Durante, M., Lenucci, M.S., Mita, G. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from pumpkin (*Cucurbita* spp.): A review (2014) *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (4), pp. 6725-6740. Cited 5 times.
- Perretti, G., Troilo, A., Bravi, E., Marconi, O., Galgano, F., Fantozzi, P. Production of a lycopene-enriched fraction from tomato pomace using supercritical carbon dioxide (2013) *Journal of Supercritical Fluids*, 82, pp. 177-182. Cited 7 times.
- Domadia, B.A., Vaghela, N.R. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomatos by using CO₂ as a solvent: A review (2013) *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5 (4), pp. 188-191. Cited 3 times.
- Lenucci, M.S., Durante, M., Anna, M., Dalessandro, G., Piro, G. Possible use of the carbohydrates present in tomato pomace and in byproducts of the supercritical carbon dioxide lycopene extraction process as biomass for bioethanol production (2013) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (15), pp. 3683-3692. Cited 5 times.
- Domadia, B.A., Vaghela, N.R. A review on supercritical fluid extraction of lycopene from tomatos by using CO₂ as a solvent (2013) *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 6 (2), pp. 102-105.
- Rostagno, M.A., D'Arrigo, M., Martínez, J.A., Martínez, J.A. Combinatory and hyphenated sample preparation for the determination of bioactive compounds in foods (2010) *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29 (6), pp. 553-561. Cited 24 times.
- Shi, J., Yi, C., Ye, X., Xue, S., Jiang, Y., Ma, Y., Liu, D. Effects of supercritical CO₂ fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin (2010) *LWT - Food Science and Technology*, 43 (1), pp. 39-44. Cited 27 times.
- Riggi, E. Recent patents on the extraction of carotenoids (2010) *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, 2 (1), pp. 75-82. Cited 5 times.

- Vaughn Katherine, L.S., Clausen Edgar, C., King Jerry, W., Howard Luke, R., Julie, C.D. Extraction conditions affecting supercritical fluid extraction (SFE) of lycopene from watermelon (2008) *Bioresource Technology*, 99 (16), pp. 7835-7841. Cited 30 times.
- Blanch, G.P., Ruiz del Castillo, M.L., del Mar Caja, M., Pérez-Méndez, M., Sánchez-Cortés, S. Stabilization of all-trans-lycopene from tomato by encapsulation using cyclodextrins (2007) *Food Chemistry*, 105 (4), pp. 1335-1341. Cited 34 times.
- Choksi, P.M., Joshi, V.Y. A review on lycopene - Extraction, purification, stability and applications (2007) *International Journal of Food Properties*, 10 (2), pp. 289-298. Cited 19 times.
- Vági, E., Simándi, B., Vásárhelyiné, K.P., Daood, H., Kéry, A., Doleschall, F., Nagy, B. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products (2007) *Journal of Supercritical Fluids*, 40 (2), pp. 218-226. Cited 70 times.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review (2006) *Food Chemistry*, 98 (1), pp. 136-148. Cited 386 times.
- Seo, J.S., Burri, B.J., Quan, Z., Neidlinger, T.R. Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin (2005) *Journal of Chromatography A*, 1073 (1-2), pp. 371-375. Cited 50 times.
- Yang, S.X., Shi, W., Zeng, J. Modelling the supercritical fluid extraction of lycopene from tomato paste waste using neuro-fuzzy approaches (2004) *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 3174, pp. 880-885. Cited 2 times.
- Pól, J., Hyötyläinen, T., Ranta-Aho, O., Riekkola, M.-L. Determination of lycopene in food by on-line SFE coupled to HPLC using a single monolithic column for trapping and separation (2004) *Journal of Chromatography A*, 1052 (1-2), pp. 25-31. Cited 28 times.
- Sabio, E., Lozano, M., Montero De Espinosa, V., Mendes, R.L., Pereira, A.P., Palavra, A.F., Coelho, J.A. Lycopene and β -Carotene Extraction from Tomato Processing Waste Using Supercritical CO₂ (2003) *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 42 (25), pp. 6641-6646. Cited 84 times.

- Rozzi, N.L., Singh, R.K., Vierling, R.A., Watkins, B.A. (2002) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (9), pp. 2638-2643. Cited 110 times.
- Baysal, T., Ersus, S., Starmans, D.A.J. (2000) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 (11), pp. 5507-5511. Cited 149 times.

Adaptada de: Scopus¹. Fecha de consulta: 15-01-2016

Microencapsulación

La microencapsulación es definida como un proceso en el cual pequeñas partículas o gotas de líquido son rodeadas por un recubrimiento, la matriz que recubre es conocida como pared y el material interno es denominado núcleo, el cual puede estar formado por uno o varios componentes. La eficiencia en la encapsulación está relacionada tanto con las características fisicoquímicas del material encapsulante como con las del núcleo: funcionalidad química, solubilidad, polaridad y volatilidad (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007, 1108).

Numerosas sustancias han sido estudiadas como agentes encapsulantes para la preparación de micropartículas, estos materiales incluyen polímeros de origen sintético, que pueden ser biodegradables como no biodegradables y de origen natural, provenientes usualmente de proteínas y carbohidratos (ej: almidón, agarosa, carragenina) (Vikrant K. et al., 2011, 171). Los almidones, han sido ampliamente utilizados dada su buena solubilidad, baja viscosidad y alto contenido de sólidos, sin embargo la mayoría de ellos carecen de propiedades interfaciales requeridas para

obtener altas eficiencias de encapsulación, por lo cual muchas veces son modificados o combinados con otros componentes tales como gomas o proteínas (Gharsallaoui et al., 2007, 1114). Las gomas, las cuales son utilizadas de manera versátil en la microencapsulación de alimentos por sus propiedades emulsificantes y de formación de película (Akhavan, Jafari, Assadpoor, & Dehnad, 2016, 380). Las proteínas, las cuales presentan un carácter anfifílico que les confiere propiedades funcionales y fisicoquímicas requeridas para encapsular materiales hidrofóbicos (Gharsallaoui et al., 2007, 1114). Dentro de las proteínas comúnmente usadas para la encapsulación de alimentos se encuentran caseína, suero, gelatina, soya y proteína proveniente de cereales (Nesterenko, Alric, Silvestre, & Durrieu, 2013, 470).

La microencapsulación ofrece una serie de ventajas tales como: la disminución de la reactividad del núcleo con factores ambientales, la reducción en la velocidad de transferencia del material encapsulado al medio externo, la liberación controlada del núcleo y el enmascaramiento del sabor del núcleo (Gharsallaoui et al., 2007, 1108; Madhav & Kala, 2011, 1243).

El secado por aspersion, secado por enfriamiento, secado por congelación, coacervación, co-cristalización, extrusión, inclusión molecular, polimerización interfacial, emulsiones múltiples y atrapamiento en liposomas son algunos de los procesos utilizados para la microencapsulación (Jiménez-Colmenero, 2013, 1414; Madhav & Kala, 2011, 1244; Romo-Hualde et al., 2012, 1046). La selección del método depende de las propiedades del material a encapsular, el tamaño de las micropartículas, costos de producción y su aplicación, así como del mecanismo que se desee para su liberación (Vergara, 2013, 13). El complejo de coacervación es

principalmente utilizado en la microencapsulación de sustancias hidrofóbicas y es basado en la interacción entre diferentes polímeros con cargas opuestas, ha sido utilizado en algunos sectores industriales tales como farmacéuticos, alimentos, químicos y cosméticos para la liberación controlada de algunos tipos de compuestos tales como aromas, medicamentos y pinturas con un amplio rango de aplicaciones (Alvim & Grosso, 2010, 1069). El secado por aspersion, por su facilidad de uso y costo relativamente bajo es el más utilizado en la industria de alimentos para la microencapsulación de compuestos activos (Drusch, 2007, 1223), adicionalmente ofrece un procedimiento sencillo para la disminución de la actividad acuosa en los productos, proporcionando una mejora en la estabilidad microbiológica de estos así como la reducción de reacciones de degradación química o biológica, también permite reducir costos de transporte, almacenamiento y la obtención de productos con solubilidades indicadas (Gharsallaoui et al., 2007, 1109). Entre algunos ejemplos en los cuales se ha utilizado esta técnica se tienen: Aromas como orégano, citronela, aceite de cardamomo, bacterias probióticas, aceites vegetales, ácido fólico, hierro, leche, carotenoides y vitaminas (C,E) (Fernandes, Borges, & Botrel, 2014, 524; Parra, 2010, 5678; Rocha et al., 2012, 37).

En el secado por aspersion un producto líquido es atomizado en una corriente de gas caliente (generalmente aire) para instantáneamente obtener polvo. Este procedimiento involucra 4 etapas: 1) Preparación del producto líquido de alimentación, el cual puede ser una solución, emulsión o suspensión 2) la homogenización de la dispersión 3) la atomización, la cual se produce al pasar la emulsión través de una boquilla y mezclarse con una corriente de gas caliente, el objetivo de esta etapa es

optimizar la transferencia de calor y de masa entre el líquido y el aire seco , y la 4) en la que se lleva a cabo la evaporación del solvente (agua generalmente) para obtener finalmente las micropartículas en la cámara de secado. Dependiendo de la dirección en la que el líquido establece contacto con el flujo de aire se clasifica el proceso como “co-corriente”, si el contacto se lleva a cabo en la misma dirección, en este proceso se utilizan temperaturas de entrada de 150-220 °C y para productos sensibles a la temperatura se usa un rango de 50-80°C. Por el contrario, si el líquido se pulveriza en la dirección opuesta a la dirección del flujo de aire el proceso es denominado “contra corriente”, en este caso aunque el proceso tiene un menor consumo energético el producto se expone al contacto de temperaturas más altas, por lo cual tiene limitaciones para productos termolábiles (Gharsallaoui et al., 2007, 1109). Finalmente vale la pena mencionar los parámetros importantes de monitorear en el secado por aspersión: temperatura de entrada y salida del aire de secado y el flujo de alimentación del producto a secar (Parra, 2010, 5678; Soukoulis & Bohn, 2015, 1555).

Liposomas

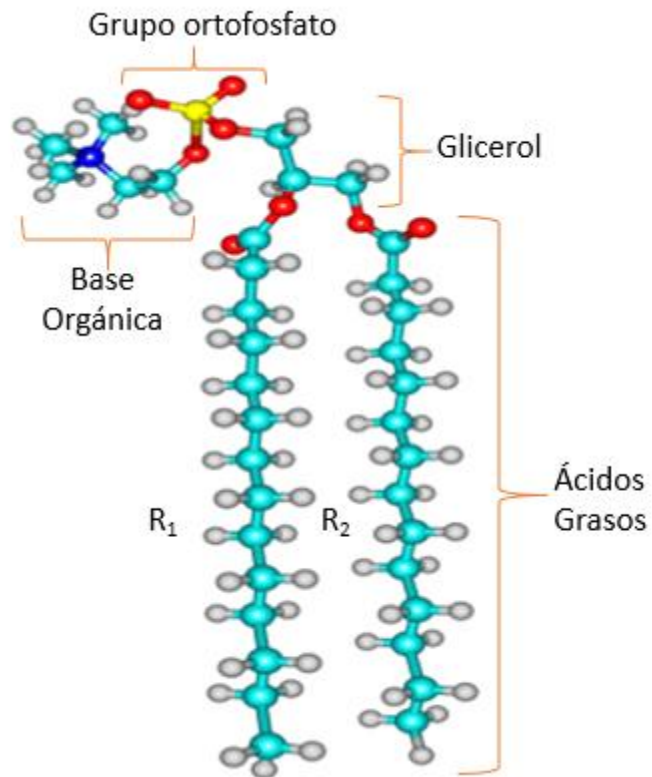
Los liposomas son vesículas esféricas que tienen en su núcleo un medio acuoso encerrado por una o más bicapas de fosfolípidos (Patil & Jadhav, 2014,8). De acuerdo a las características estructurales, en particular al número de bicapas y al tamaño, los liposomas se pueden clasificar en MLV (vesículas multilamelares, 0,1-10 μm), o vesículas unilamelares, las cuales a su vez se clasifican en SUV (vesículas unilamelares de diámetro pequeño $<100\text{ nm}$), en LUV (vesículas unilamelares grandes 100-500 nm) y en GUV (vesículas unilamelares gigantes $\geq 1\mu\text{m}$) (Lanio et al., 2009^a,

24). La sonicación de una suspensión de MLV provoca la ruptura de estas vesículas produciendo SUV con un radio de 30-60 nm aproximadamente. Extrusiones repetidas de una suspensión de MLV a través de membranas de policarbonato, producen LUV con un diámetro que puede oscilar entre 80–400 nm en relación a la membrana utilizada (Lanio et al., 2009b, 24). Dependiendo del tamaño, los liposomas pueden visualizarse con diferentes técnicas, microscopía de contraste de fase, fluorescencia o confocal, pueden utilizarse para analizar vesículas de varios μm mientras que vesículas con tamaño menor a 0,5 μm requieren ser analizadas por microscopía electrónica (Londoño, 2010, 131).

Los fosfolípidos, compuestos mayoritarios de los liposomas, están formados por una molécula de glicerol (un alcohol con tres grupos hidroxilo) en la cual dos grupos alcohol han sido esterificados por una molécula de ácido graso, formando un 1,2-diacil glicerol. Las cadenas alquílicas provienen de ácidos grasos saturados, monoinsaturados o poliinsaturados y constituyen la parte hidrófoba del fosfolípido (R_1 y R_2 en Figura 4). El tercer grupo alcohol del glicerol se encuentra modificado por un grupo ortofosfato unido a una base orgánica como colina, etanolamina, serina o a un alcohol cíclico como el inositol (Díaz,Pereira-Cabral, & Lorenzo, 2012, 5; Valenzuela, Valenzuela, Sanhueza, De la Barra, & Morales, 2014, 434) formando la parte hidrófila del fosfolípido. Cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa, tiende a formar una bicapa multilamelar concéntrica con capas de lípidos separadas por espacios acuosos, de tal manera que las sustancias hidrosolubles presentes en la fase acuosa durante la formación del liposoma, quedarán encapsuladas en el compartimento vesicular,

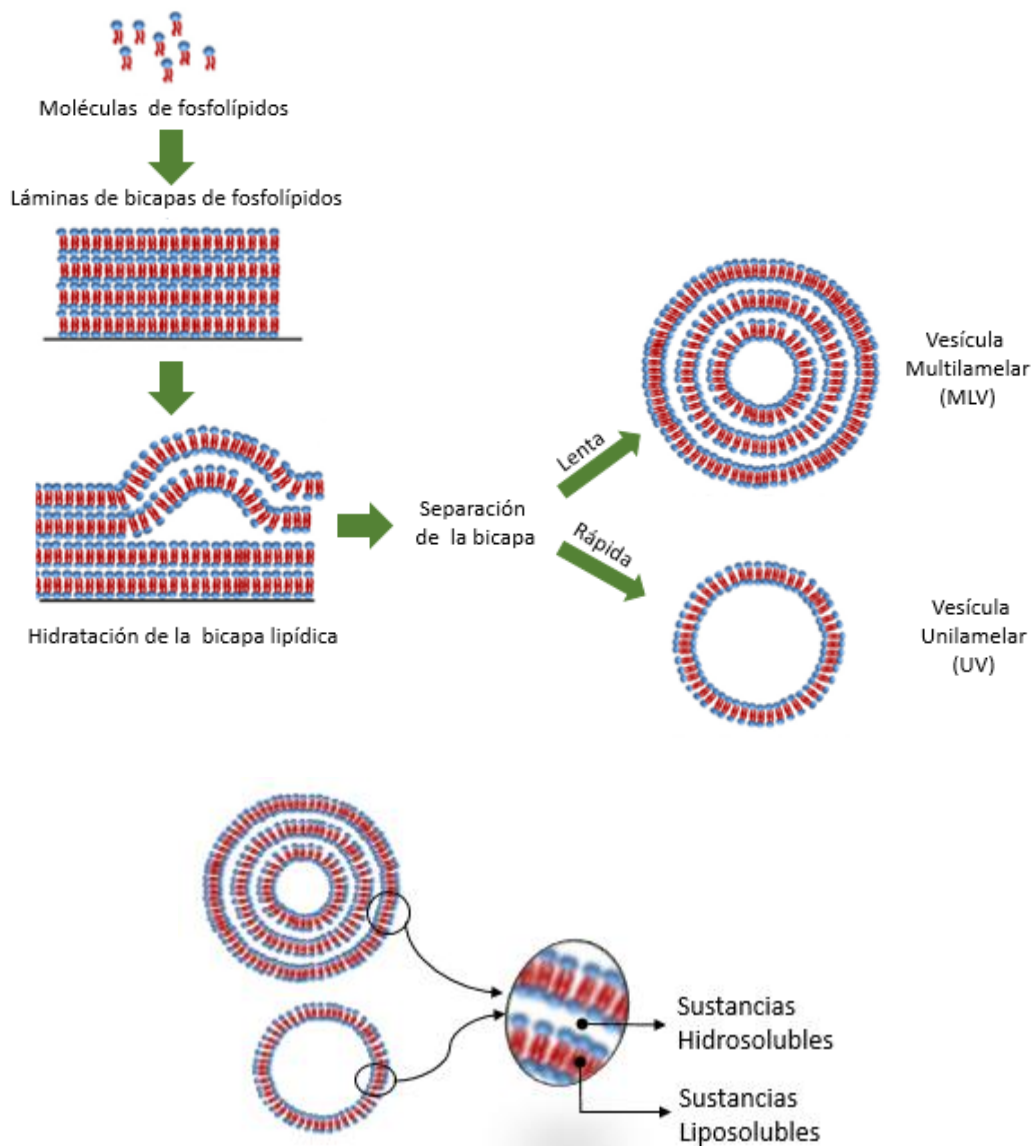
mientras que sustancias liposolubles quedarán distribuidos en las bicapas (Figura 5) (Londoño, 2010, 200).

Figura 4. Estructura general de un fosfolípido.



(Elaboración propia. ChemCraft 1,7)

Figura 5.Esquema de fosfolípidos en la formación de liposomas.



Adaptada de: (Patil & Jadhav, 2014,9)

Dependiendo de la fuente los fosfolípidos se clasifican en sintéticos (obtenidos mediante síntesis química) y en naturales, provenientes de plantas, principalmente aceites vegetales (tales como soya, algodón y girasol) y de tejidos animales, como cerebro de bovino y yema de huevo. En términos de producción, la yema de huevo y la

soja constituyen la fuente más importante de esta clase de fosfolípidos (Li et al., 2015, 84).

Desde el punto de vista del comportamiento térmico, los fosfolípidos pueden encontrarse en forma de gel o en forma cristalina. La temperatura que indica el paso de una fase a otra es denominada temperatura de transición (T_m), y está directamente relacionada con la naturaleza de la cabeza polar, el tamaño de la cadena hidrocarbonada (cuanto mayor es la longitud de la cadena, mayor es la energía necesaria para realizar el cambio de fase y por ende mayor la T_m), y la presencia de insaturaciones en la cadena hidrocarbonada (los enlaces múltiples aumentan la dificultad de empaquetamiento y por ende disminuye la T_m) (Ruano, 2013, 21).

Entre algunos de los métodos utilizados para la preparación de liposomas se encuentran: la hidratación mediante agitación de una película lipídica previamente formada por evaporación de una solución de los lípidos disueltos en un solvente orgánico (generalmente cloroformo), obteniendo vesículas MLV con una distribución heterogénea de tamaño y lamelalidad. Otro método es la inyección rápida de una mezcla lipídica (disuelta en etanol o éter) en una disolución tampón, originando una mezcla heterogénea de vesículas SUV, LUV y MLV, debido a la baja solubilidad de determinados lípidos en estos solventes este método en ocasiones es limitado (Lanio et al., 2009b, 24). En el método denominado diálisis del detergente, las vesículas se preparan mezclando detergente y fosfolípidos, lo cual origina la formación de micelas mixtas, de tal manera que una vez se dializa el detergente se obtienen vesículas unilamelares (Ruano, 2013, 43). El método de evaporación de fase inversa, utiliza una inyección rápida de una solución acuosa en una fase orgánica que contiene los lípidos,

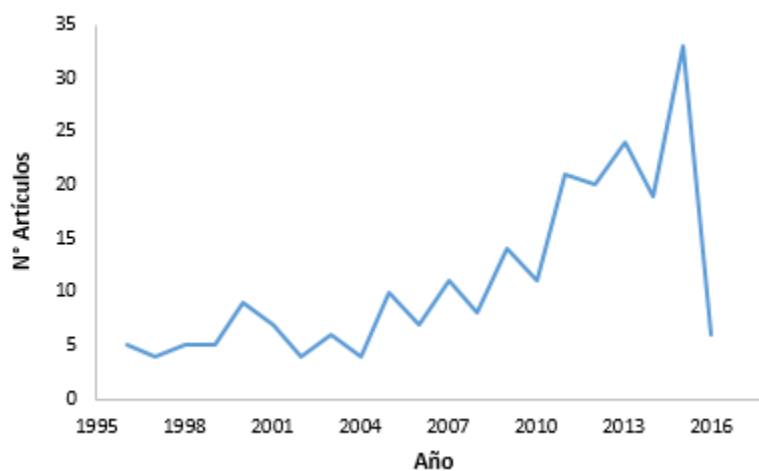
obteniendo vesículas en suspensión acuosa de 0,1 a 1,0 μm de diámetro, otro método es el método de deshidratación y rehidratación de vesículas el cual resulta adecuado para la encapsulación de biomoléculas lábiles como proteínas y ADN (Lanio et al., 2009b, 24). Para asegurar la utilización de los liposomas en aplicaciones analíticas y biomédicas se evalúan distintos parámetros, con el fin de garantizar su calidad, entre estos parámetros se incluyen el tamaño de la nanopartícula, su índice de polidispersidad, el número de lamelas, la eficiencia de encapsulación y la proporción de fosfolípido con el material a encapsular (Edwards & Baeumner, 2006, 1432). La espectroscopia de correlación fotónica o dispersión dinámica de luz corresponde a una de las técnicas instrumentales que se ha desarrollado para determinar el tamaño de los liposomas, medido como el radio hidrodinámico promedio de las partículas en suspensión (Edwards & Baeumner, 2006, 1433), la resonancia magnética nuclear y la resonancia paramagnética de electrones se han descrito como técnicas útiles para investigar la lamelaridad y permeabilidad de las bicapas (Londoño, 2010, 202). La caracterización de la carga en la superficie del liposoma, se determina a través de del potencial z, el cual se evalúa midiendo la movilidad de los liposomas en un campo que presenta una diferencia de potencial. Este parámetro resulta importante por su relación con la estabilidad coloidal y la tendencia de las vesículas para formar agregados (Popovska, Simonovska, Kavrakovski, & Rafajlovska, 2013, 187).

La utilización de estos sistemas para la encapsulación de sustancias en la formulación de alimentos ha tenido gran desarrollo, empleándose para enzimas, vitaminas, péptidos funcionales y carotenoides (Tan et al., 2014^a, 1233). A su vez, dado que simulan la estructura de la bicapa de las células en el intestino, han sido

ampliamente utilizados como sistemas de modelo de membrana para estudiar la permeabilidad y el efecto de moléculas intrínsecas en la absorción de moléculas nutricionalmente importantes (Balachandran & Rao, 2003, 612). También presentan aplicaciones relacionadas con tratamientos dermatológicos, vacunas, imágenes diagnósticas y en la liberación específica de medicamentos generando con esto un aumento en la eficiencia del fármaco y una disminución de sus efectos secundarios (Sipai, Vandana, & Prasanth, 2012, 17).

En relación a documentos que relacionen la producción de liposomas y licopeno, al emplear la fórmula de búsqueda TITLE-ABS-KEY (liposome*) AND TITLE-ABS-KEY (lycopene), se encuentran 233 artículos en la base de datos Scopus, cuya dinámica de publicación entre 1996 y 2016 se presentan en la figura 6. Respecto a los países en los que se ha publicado, se encuentra que Estados Unidos, China y Alemania se concentran los principales autores³ (Tabla 4). Las principales áreas temáticas se muestran en la figura 7.

³ En la base de datos el nombre de un país se puede repetir si hay dos autores del mismo país en un mismo artículo.

Figura 6. Artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre liposomas y licopeno.

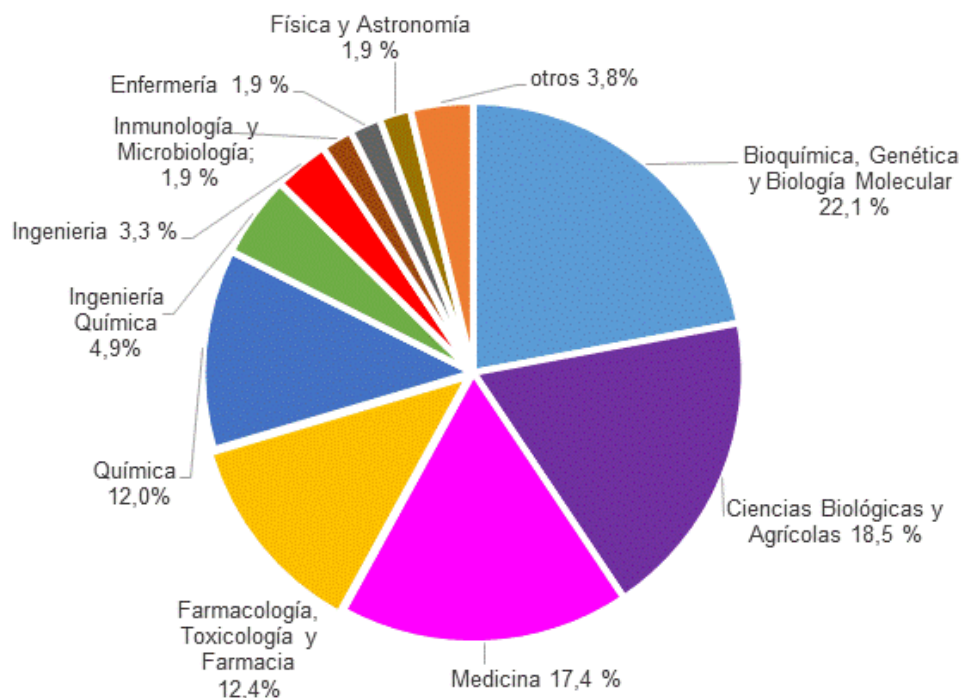
Adaptada de: Scopus¹. Fecha de consulta: 03-04-2016

Tabla 5. País de procedencia de autores de artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre liposomas y licopeno

País	N° Artículos	Porcentaje
Estados Unidos	41	18
China	38	16
Alemania	25	11
India	22	9
Brasil	15	6
Reino Unido	14	6
España	13	6
Polonia	12	5
Corea del Sur	12	5
Italia	11	5
Otros	30	13
Total	233	100

Adaptada de: Scopus¹. Fecha de consulta: 03-04-2016

Figura 7. Áreas y enfoques de artículos reportados entre 1996 y 2016 sobre liposomas y lícopeno



Adaptada de: Scopus¹. Fecha de consulta: 03-04-2016

Estabilidad

Los estudios de estabilidad tienen una gran relevancia en los sistemas biológicos para evaluar la integridad química de los medicamentos, productos biofarmacéuticos y establecer la cinética de degradación de estos (Do Nascimento, De Jesus Oliveira, Basílio Júnior, De Araújo-Júnior, & Macêdo, 2013, 59). Además de presentar un gran interés en el sector farmacéutico, los estudios de estabilidad resultan primordiales en la industria de alimentos, para establecer las condiciones necesarias que permiten conservar las propiedades físicas, organolépticas y químicas de los productos alimenticios que se ofrece al consumidor. Uno de los conceptos claves para determinar

la estabilidad en los alimentos secos es la actividad acuosa (A_w)⁴, la mayoría de las bacterias patógenas no pueden crecer por debajo de una actividad acuosa de 0,85 y el crecimiento de los microorganismos es inhibido a valores menores de 0,6 (Rahman, 2009, 727).

La evaluación de la estabilidad de los sistemas encapsulados es un factor importante para asegurar su calidad y aplicación (Toledo et al., 2015, 2). En el caso de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión, frecuentemente se evalúan parámetros como actividad acuosa, estabilidad térmica, tamaño y color de las micropartículas así como el contenido del compuesto encapsulado (Borrmann, Ferreira, & Da Rocha Leão, 2011, 379; Carneiro, Tonon, Grosso, & Hubinger, 2013, 445; Li et al., 2015, 306; Rocha et al., 2012, 38; Shu et al., 2006, 666;. Xue et al., 2013, 442).

En los liposomas, su estabilidad está relacionada con los parámetros fisicoquímicos que afectan la estabilidad de las membranas lipídicas y/o el sustrato encapsulado. La inestabilidad química puede ser ocasionada por reacciones de hidrólisis y/o reacciones de peroxidación, por ejemplo la oxidación vía radicales libres en las cadenas acílicas insaturadas de los lípidos que componen la membrana (Popovska et al., 2013, 183). Por otra parte, la migración del compuesto encapsulado hacia la membrana y procesos de agregación y fusión de las vesículas liposomales para formar partículas más grandes ocasionan una disminución en la estabilidad física de estos sistemas (Sipai et al., 2012, 18). Usualmente la estabilidad para los liposomas es evaluada en parámetros tales como tamaño (diámetro), potencial z, capacidad de retención (eficiencia de encapsulación) y velocidad de liberación del compuesto

⁴ La A_w es una propiedad fisicoquímica importante que ha mostrado una mayor relación con las propiedades microbianas, físicas y químicas de los productos naturales que el contenido de humedad (Dunlop, McAuley, Blackall, & Stuetz, 2016, 201).

encapsulado (Mitri, Shegokar, Gohla, Anselmi, & Müller, 2011, 269; Okonogi & Riangjanapatee, 2015, 727; Popovska et al., 2013, 186; Tan et al., 2013, 8178; Tan et al., 2014, 693).

Metodología

Reactivos:

Estándar de licopeno (Extrasynthese, Genay, Francia), hexano, diclorometano, cloroformo y acetona (grado reactivo, Merck, Darmstadt, Alemania), acetona, y metanol, (grado HPLC, Merck, Darmstadt, Alemania), acetato de etilo (Honeywell Burdick & Jackson, Michigan, Estados Unidos), CO₂ (99,9% pureza, Cryogas, Medellín, Colombia), RMCD: β ciclo dextrina metilada, AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro, Trolox: ácido-6- hidroxí-2,5,7,8- terametilcroman-2- carboxílico y asolecitina de soya (Sigma – Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos), aceite cristal USP (Protokimica, Medellín- Colombia), Capsul®, maltodextrina 19-20, proteína aislada de soya y goma arábica (Bell Chem Internacional S.A, Medellín, Colombia), gelatina para microbiología y Tween® 20 (Merck, Darmstadt, Alemania); sacarosa comercial (Incauca, Cali, Colombia), DMPC: 1,2- dimiristoil – sn- glicero-3-fosfatidil colina, DPPC: 1,2- dipalmitoil-sn-glicero 3- fosfatidil colina y HEL: lecitina hidrogenada de huevo (Avanti Polar Lipids, Inc. ®, Alabaster, Estados Unidos).

Preparación del material vegetal

Los residuos agroindustriales de tomate fueron obtenidos de la Central Mayorista de Antioquia (Medellín, Colombia) posteriormente fueron tratados para su desinfección con una solución de ácido peracético, Titan® (1,3 mL/L) durante 20 minutos. Se realizaron cortes del fruto (Figura 8.b) para ser colocados en el secador de lecho fluidizado (modelo 0193, serie 002 ACTUM, Rionegro, Antioquia- Colombia). La temperatura empleada durante el proceso de secado fue de 50 °C y la humedad del

producto final cercana al 10% medida por termogravimetría mediante un analizador halógeno de humedad (Modelo HB43-S, Mettler Toledo International Inc.). Con el fin de obtener un tamaño de partícula más pequeño y homogéneo, el tomate seco fue reducido a través de un molino de discos (Victoria, Colombia) y seleccionado a través de un tamiz estándar para ensayo Test Sieve ASTM E11 entre las mallas 30 (apertura de 0,600 mm) y la malla 40 (apertura de 0,425 mm), obteniendo así partículas con un tamaño promedio de 512 μm . El tamaño de partícula utilizado fue similar al de otras investigaciones (Grosso et al., 2010, 3580; Machmudah, Kawahito, Sasaki, & Goto, 2007, 423). El material aquí obtenido fue guardado en bolsas oscuras y condiciones de humedad controlada hasta posterior uso en extracciones.

Figura 8. (a) Materia prima (b) Cortes del tomate para secado (c) Tomate puesto en el secador de lecho fluidizado (d) Tomate seco para extracción por fluidos supercríticos.



Validación de la metodología en la determinación y cuantificación de licopeno por **cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**.

Para identificación y cuantificación de licopeno en la matriz vegetal de estudio se utilizó un cromatógrafo HPLC UltiMate™ 30000 equipado con un software Chromeleon

versión 7,2 (Dionex, ThermoScientific, Estados Unidos) un detector de arreglo de diodos (DAD), una columna C 30 YMC – Carotenoid (5 μm ; 250 x 4,6 mm) (Allentown, PA, Estados Unidos) y una temperatura de análisis de 20°C. El procedimiento fue similar al desarrollado en estudios anteriores (Álvarez et al., 2015, 893) con algunas modificaciones, fase móvil: (A) Acetona : (B) Metanol; 100% de B fue mantenido durante los primeros 30 segundos, luego se aumentó el porcentaje de A al 100% hasta el minuto 34. Finalmente se incrementó al 100% de B hasta el minuto 35. El flujo de todos los análisis fue de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 μL . El análisis se realizó a una longitud de onda de 472 nm, la identificación de licopeno se realizó por comparación con el tiempo de retención del estándar y la cuantificación mediante una curva de calibración con estándar externo.

Para la validación del método se tuvieron en cuenta los criterios de: linealidad, repetibilidad, precisión intermedia, selectividad, exactitud (porcentaje de recuperación), límites de detección y cuantificación.

Linealidad:

Para obtener el rango de concentraciones en el cual el método presenta un nivel adecuado de respuesta directamente proporcional a la concentración del analito se preparó a partir del estándar de licopeno una solución de 1000 $\mu\text{g/mL}$ utilizando cloroformo como disolvente, a partir de ésta se prepararon las diluciones respectivas para obtener los cinco niveles de concentración 1, 3, 5, 8, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$. Para cada nivel de concentración se prepararon soluciones por triplicado y cada una se cuantificó por duplicado mediante HPLC-DAD.

El criterio de aceptación se basó en un coeficiente de correlación (R) y determinación (R^2) $\geq 0,99$ y un porcentaje de residuales menor al 20% (SANCO/12571/2013)⁵.

Efecto matriz:

Adicional a la curva descrita anteriormente se elaboró una curva en presencia de la matriz, teniendo en cuenta los mismos niveles de concentración. Un blanco de la matriz se preparó limpiando 10 mg de tomate seco, a los cuales se adicionaron 1,5 mL de hexano:diclorometano (1:1), se llevó al agitador mecánico por 1 minuto, posteriormente se llevó a sonicación a 25°C, 25 KHz y 99% en un ultrasonido serie DTY, Scientz, Ningbo- China), luego se centrifugó (Mikro 120, Hettich, Alemania) a 14000 rpm por 15 minutos y se separó el sobrenadante en un tubo de ensayo. Se secó con corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 5 mL de cloroformo.

Selectividad

Inicialmente se analizaron los diferentes componentes de la fase móvil y del diluyente para establecer la selectividad del método, luego con el fin de confirmar la identidad del analito y la capacidad del método para medirlo, se analizaron las lecturas del estándar de licopeno en solvente, un blanco de la matriz y el enriquecido del blanco matriz a una concentración específica de licopeno.

⁵ European Commision Health & Consumer Protection (2014), Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. . SANCO/12571/2013. (pp. 25). Recuperada de http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf.

Límite de detección y cuantificación:

Se prepararon 10 soluciones del blanco de la matriz de forma independiente y se analizaron por HPLC-DAD. Luego se calculó la desviación estándar de todas las mediciones en los blancos y junto con la pendiente de la curva de calibración en presencia de matriz se determinó el límite de detección (LD) y cuantificación (LC) de la siguiente manera:

Ecuación 1:

$$\text{Límite de detección: } \frac{3 * \text{Desviación Estándar}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

$$\text{Límite de cuantificación: } \frac{10 * \text{Desviación Estándar}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

Exactitud (porcentaje de recuperación):

Dos analistas⁶ realizaron de forma independiente: 8 muestras “sin enriquecer”, 8 muestras “nivel bajo” de enriquecimiento y 8 muestras “nivel medio” de enriquecimiento. Las muestras se prepararon y analizaron el mismo día por los dos analistas.

Muestras sin enriquecer:

Ocho muestras de 10 mg de tomate seco fueron pesadas. Sobre cada una de ellas se adicionaron 1,5 mL de hexano:diclorometano (1:1) y se llevaron a agitación mecánica por 1 minuto. Posteriormente fueron colocadas en sonicación a 25°C, 25 KHz

⁶ Químicas inscritas al grupo de investigación GRIAL y al Laboratorio de Trazabilidad y Residualidad de la Corporación universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia.

y 99% en un ultrasonido (serie DTY, Scientz, Ningbo- China), después, fueron colocadas en centrifugación (Mikro 120, Hettich, Alemania) a 14000 rpm por 15 minutos. Se separó el sobrenadante en tubo de ensayo y se realizó el proceso dos veces más, juntando luego para cada muestra los tres sobrenadantes. Los cuales fueron secados en corriente de nitrógeno y reconstituidos en cloroformo para ser analizados por HPLC-DAD.

Muestras nivel bajo de enriquecimiento:

Se procedió de manera similar a las muestras sin enriquecer, la diferencia estuvo en la adición de 50 μL de una solución de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del estándar antes de llevar a cabo el proceso de extracción.

Muestras nivel medio de enriquecimiento

Se procedió de manera similar a las muestras sin enriquecer, la diferencia estuvo en la adición de 50 μL de una solución de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del estándar antes de llevar a cabo el proceso de extracción.

Los valores de concentración de las soluciones del estándar de licopeno utilizadas para el enriquecimiento (30 y 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fueron seleccionados teniendo en cuenta valores de concentración del 10% y 30% del nivel más alto de la curva de calibración (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Así para el nivel bajo se esperarí una concentración de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10% del nivel más alto de concentración de la curva) y para nivel medio una concentración de 4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (30% del nivel más alto de concentración de la curva). El

porcentaje de recuperación para cada nivel se determinó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 2

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{M - \text{MSE}}{\text{NE}} * 100$$

M: contenido de licopeno ($\mu\text{g/mL}$) en la muestra

MSE: Contenido de licopeno ($\mu\text{g/mL}$) en la muestra sin enriquecer

NE: concentración del nivel de enriquecimiento: 1,5 $\mu\text{g/mL}$ (nivel bajo), 4,5 $\mu\text{g/mL}$ (nivel medio).

El criterio de aceptación fue tomado de la AOAC “Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals” en la que se establece un rango de recuperación del 80-115% para concentraciones del orden de $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (AOAC, 2002, 19).

Repetibilidad y precisión intermedia

Para evaluar los criterios de precisión del método se utilizaron los datos obtenidos en la prueba de porcentaje de recuperación realizada por los dos analistas. Se analizó la variación del analista en cada nivel de enriquecimiento (coeficiente de variación de las muestras analizadas para nivel bajo y medio) y para evaluar la precisión intermedia se compararon los coeficientes de variación entre analistas para ambos niveles de enriquecimiento. El criterio de aceptación fue coeficientes de variación $< 10\%$ (Ramírez, Olarte, Téllez & Palma, 2013, 13).

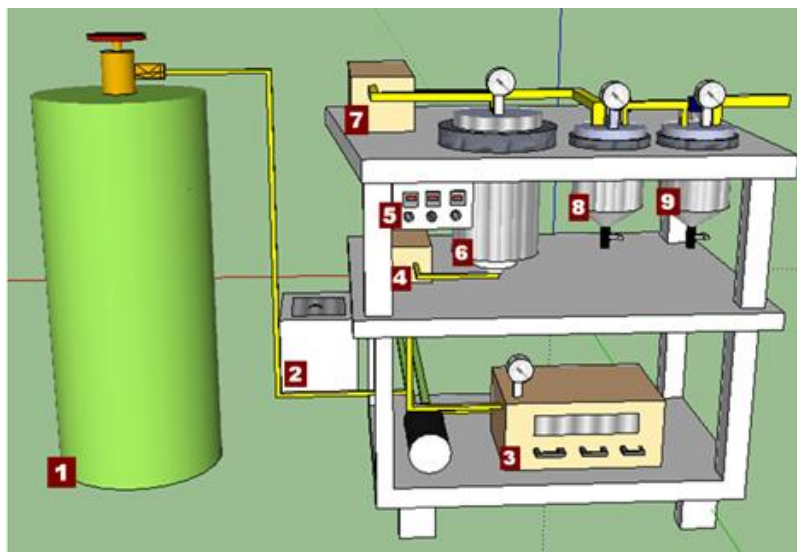
Extracción de licopeno por fluidos supercríticos.

Cinética de extracción

Para determinar el tiempo indicado de extracción de licopeno proveniente de la matriz vegetal se realizó una cinética de extracción a 75°C, 45 MPa (Zuknik et al., 2012, 255) y un flujo de 100g /minuto de CO₂ durante 300 minutos.

El esquema del equipo utilizado se muestra en la figura 9, es un equipo de fluidos supercríticos a escala laboratorio (Thar Process, Inc. Pittsburgh, PA, Estados Unidos), equipado con un tanque extractor de un litro de capacidad y dos separadores.

Figura 9. Esquema del equipo de fluidos supercríticos.



(1) Tanque de CO₂ (2) sistema de enfriamiento (3) bomba (4) precalentador (5) panel de control de calentamiento para el extractor, separador 1 y 2 (6) extractor (7) controlador de presión (8) separador 1 (9) separador 2.

Las muestras (extractos obtenidos en el separador 1) se tomaron cada 5, 10, 15, 20 y 30 minutos. Estas muestras fueron recolectadas en frascos de vidrio ámbar y almacenadas a una temperatura de -20°C hasta análisis por HPLC-DAD.

Extracción del licopeno

Se planteó un diseño factorial (2k+m) con cinco replicas al centro utilizando el programa Statgraphics Centurion XV. Los valores de temperatura y presión empleados fueron 60, 70, 80°C y 25, 35, 45 MPa. Todas las extracciones se llevaron a cabo durante 180 minutos (tiempo establecido por la cinética de extracción, anteriormente explicada) y con un flujo de 100 g CO₂ /min. Las muestras fueron recolectadas en frascos de vidrio ámbar y almacenadas a una temperatura de -20°C hasta análisis por HPLC-DAD.

En cada extracción realizada se evaluó el rendimiento total, el rendimiento de licopeno y la capacidad antioxidante del extracto obtenido. Los valores óptimos fueron determinados mediante un modelo de superficie de respuesta.

Rendimiento total:

Se calculó teniendo en cuenta la masa total de extracto obtenido y la masa de material vegetal utilizado en cada extracción.

Ecuación 3

$$\%Rendimiento\ Total = \frac{Masa\ de\ extracto\ obtenido\ (g)}{Masa\ de\ material\ vegetal\ (g)} * 100$$

Rendimiento de licopeno:

Para determinar la concentración de licopeno en cada extracción, 10 mg de extracto fueron pesados y disueltos en 1 mL de cloroformo, luego se llevaron las muestras a agitación mecánica a 3000 rpm por 1 minuto y se analizaron por HPLC-DAD. El análisis se realizó por triplicado. Adicionalmente se calculó el contenido de licopeno por gramo de material vegetal mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 4

$$\text{Concentración de Licopeno} = \frac{(\text{mg})\text{Licopeno}}{(\text{g}) \text{ de extracto}} * \frac{(\text{g})\text{extracto}}{(\text{g})\text{material vegetal}}$$

Determinación de capacidad antioxidante (ORAC):

La capacidad antioxidante fue analizada por el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), el cual de manera general mide la capacidad de los antioxidantes presentes en las muestras para proteger la fluoresceína del daño oxidativo causado por el AAPH como fuente de radicales peróxilos ($\text{ROO}\cdot$). La intensidad de la fluorescencia se midió en un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA). Para la curva de calibración, se utilizó Trolox en concentraciones de 5,10, 25, 50, 100, 150, 200 μM , en buffer fosfato pH 7,4 10 Mm. Como muestra de análisis se utilizó el extracto lipofílico reconstituido con acetona siguiendo el método modificado de Sales y Resurrección (2010); posteriormente se mezcló con una solución de β -ciclodextrina metilada (RMCD, por sus siglas en inglés). En una microplaca de 96 pozos (Costar, USA) se adicionaron en estricto orden: fluoresceína 1 μM , buffer fosfato, la dilución respectiva de Trolox (5,10, 25, 50, 100, 150, 200 μM) y la muestra. Posteriormente se llevó la microplaca al lector de placas donde se preincubó durante 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo fue adicionado a cada

pozo la solución de AAPH y se procedió al análisis de la intensidad de la fluorescencia durante dos horas a una longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 520 nm respectivamente. Cada muestra fue analizada por triplicado y los resultados se reportan como micro moles equivalentes de Trolox por cada gramo de extracto ($\mu\text{mol TE/ g}$ extracto).

Microencapsulación del extracto de licopeno utilizando secado por aspersion

La naturaleza y proporción de los agentes encapsulantes empleados en cada formulación se indican en la tabla 6 basados en estudios previamente reportados (Shu et al., 2006, 666; Tang & Li, 2013, 421). En todas las formulaciones se mantuvo la misma relación en peso de agente encapsulante:extracto de licopeno (10:0,1). En cada formulación se utilizó 0,2 g de extracto de licopeno y como vehículo de incorporación se adicionó 0,7 g de aceite cristal. Para garantizar la relación de agente encapsulante total se tuvo en cuenta la proporción mostrada en la tabla 6 de tal manera que la masa total de los agentes encapsulantes a emplear por formulación siempre fue de 22,5 g.

Para cada formulación se pesaron las cantidades respectivas de agentes encapsulantes, se disolvieron en agua destilada y se mantuvieron por agitación magnética constante hasta total disolución. Todas las formulaciones se dejaron en hidratación y refrigeración desde el día anterior al secado. Antes de incorporar el extracto de licopeno, cada formulación se agitó mecánicamente por medio del Ultraturrax (Modelo T50 Basic , IKA, Brasil) durante 10 minutos a 2000 rpm, posterior a este tiempo se adicionó gota a gota la solución oleosa del extracto, una vez finalizada

su adición se procedió a medir los sólidos solubles (°Brix) por medio de un refractómetro digital (HI96801, HANNA Instruments) y se mantuvo en agitación por medio del Ultraturrax durante 15 minutos a 2000 rpm previo secado por atomización. Los °Brix para todas las formulaciones fueron en promedio de $14,73 \pm 0,5$.

Tabla 6. Agentes encapsulantes empleados en la microencapsulación del extracto de licopeno

Formulación	Agente Encapsulante*	Proporción
F1	Cap : MD	2 : 1
F2	Cap: MD : PAS	1 : 2,5 : 1
F3	GA: MD	2 : 1
F4	Gel: Sac	1: 2,3

***Cap**: Capsul®, **MD** : Maltodextrina 19-20; **PAS** : Proteína aislada de soya **GA**: Goma arábica; **Gel**: Gelatina; **Sac**: Sacarosa Comercial.

El proceso de secado se llevó a cabo en un equipo a escala laboratorio Lab Plant SD-05 (Huddersfield, Inglaterra), con un flujo de alimentación de 4 mL/min, un porcentaje de aspiración del 65%, una temperatura de entrada de 150 ± 5 °C y una temperatura de salida de 93 ± 5 °C, la emulsión se mantuvo con agitación magnética constante y desde su elaboración hasta finalizar el proceso de secado fue protegida de la luz con papel aluminio.

El producto obtenido se guardó en recipientes de vidrio color ámbar y fueron almacenados en un desecador con una humedad relativa del 19% y una temperatura de 25 °C hasta su análisis.

Rendimiento en el proceso de microencapsulación

Se calculó mediante la siguiente fórmula:

Ecuación 5

$$\% \text{ Rendimiento: } \frac{\text{Producto obtenido en el secado (g)}}{\text{Agentes encapsulantes (g)} + \text{Extracto (g)} + \text{Aceite (g)}} * 100$$

Eficiencia de encapsulación (contenido de licopeno)

Procedimiento basado en Xue et al. (2013, 441) con algunas modificaciones. Para cada formulación se tomó una muestra de 50 mg, se le adicionó 600 µL de acetato de etilo se llevó durante 2 minutos a agitación mecánica (Fisher Scientific, Estados Unidos) a 3000 rpm y a centrifugación por 10 minutos a 14000 rpm (Mikro 120, Hettich, Alemania). Se descartó el sobrenadante (licopeno “libre” o no encapsulado) y al material restante (precipitado) se le adicionó 1 mL de agua destilada, posteriormente la muestra se llevó a agitación mecánica por un tiempo de 2 minutos a 3000 rpm y llevada a sonicación durante 3 minutos a 25 kHz, 99% de potencia y 20°C en un ultrasonido (serie DTY, Scientz, Ningbo- China). Se adicionaron 500 µL de acetato de etilo y se llevó a agitación mecánica por 2 minutos a 3000 rpm con posterior centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos. Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un microtubo de 2 mL, el proceso de extracción fue repetido dos veces más. El total del sobrenadante fue secado bajo corriente de nitrógeno y reconstituido en cloroformo para su posterior análisis por HPLC-DAD.

Caracterización de las micropartículas obtenidas

Las micropartículas se caracterizaron mediante parámetros de porcentaje de humedad, actividad acuosa, tamaño de partícula y su morfología se estudió por medio de microscopia electrónica de barrido.

Porcentaje de humedad

El contenido de humedad se determinó por termogravimetría mediante un analizador halógeno de humedad (Modelo HB43-S, Mettler Toledo International Inc.). Alrededor de un gramo de muestra fue utilizado para cada medición, las cuales se realizaron por triplicado para cada una de las formulaciones.

Actividad acuosa (Aw)

Utilizando la técnica de punto de rocío de espejo enfriado mediante un AquaLab Serie 3 (Decagon Devices, Inc., Pullman, Estados Unidos) se determinó la actividad acuosa de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión. El análisis para cada formulación se realizó por triplicado.

Tamaño de partícula

Mediante el método de dispersión de luz dinámica utilizando un analizador de partícula zeta/nano NanoPlus 3 (Micromeritics®, Estados Unidos) se determinó la distribución del tamaño promedio de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión. Para cada formulación se realizaron tres repeticiones cada una con serie de 30 datos, los cuales fueron promediados. En las condiciones de análisis se utilizó agua

destilada como disolvente, con una viscosidad de 0,8878 cp y un índice de refracción de 1,33. Cada medición utilizó aproximadamente 10 mg de muestra disueltos en 1 mL de agua destilada, antes del análisis la muestra se llevó durante 60 segundos a agitación mecánica a 3000 rpm. El método de análisis empleado por el equipo fue CONTIN con factor de dispersión RGD.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las micropartículas obtenidas y de los agentes encapsulantes utilizados en las formulaciones fue analizada mediante un microscopio electrónico de barrido (Jeol, modelo JSM-6490 LV, Japón) en alto vacío, con un voltaje de aceleración de 10 kV y un detector de electrones secundario. Previo al análisis las muestras fueron fijadas en una cinta de grafito y cubiertas con plata mediante un equipo Denton Vacuum (Desk IV, Estados Unidos).

Estabilidad de las micropartículas

Efecto de la temperatura (esterilización) en el contenido de licopeno

De cada formulación se tomaron 300 mg y se adicionaron 6 mL de agua destilada, luego se agitó de forma mecánica a 2000 rpm durante 1 minuto aproximadamente hasta total disolución. Luego se tomaron tres muestras de 1 mL para el proceso de esterilización (muestras por triplicado) y tres muestras de 1 mL como control (sin esterilización). El proceso de esterilización fue llevado a cabo en un autoclave (MAGNA, Colombia) durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C y una presión de 103 KPa.

Posteriormente todas las muestras se llevaron a sonicación por tres minutos a 99 % 25 KHz y 20 °C en un ultrasonido (serie DTY, Scientz, Ningbo- China). Luego se adicionó a cada muestra 500µL de acetato de etilo y se continuó el proceso de extracción tal como se describe en la sección de eficiencia de encapsulación.

Liberación controlada de licopeno a diferentes pH

Se cuantificó la cantidad de licopeno liberado a 37°C durante dos horas con tiempos de análisis de 0, 15, 30, 60 y 120 minutos para tres valores de pH en cada una de las formulaciones. Se utilizaron buffer pH 4,00 (biftalato de potasio 99%, Bioquigen, Colombia), pH 7,00 (di-hidrogeno fosfato de potasio 99%, Bioquigen, Colombia) y pH 10 (carbonato y bicarbonato de sodio, Oakton, USA).

Se adicionaron 200 mg de cada formulación a 4,0 mL de buffer respectivo (según pH de estudio) se utilizó agitación mecánica durante 1 minuto a 2000 rpm hasta completar su disolución, se tomaron alícuotas de 400 µL como muestras de análisis para cada uno de los tiempos anteriormente mencionados. Para cada tiempo se tomaron muestras por duplicado.

Posteriormente las muestras fueron llevadas a un agitador mecánico de incubación a 37°C (MAXQ 4000, ThermoScientific, Estados Unidos) las muestras fueron cubiertas con papel de aluminio. Una vez terminado el tiempo de tratamiento, a cada una de las muestras se les adicionó 350 µL de acetato de etilo, se llevó a agitación mecánica por 2 minutos a 3000 rpm y luego a centrifugación durante 5 minutos a 14000 rpm, se separó el sobrenadante en un microtubo y se repitió este

proceso una vez más. El sobrenadante total fue secado bajo corriente de nitrógeno para luego ser analizados por HPLC.

Contenido de licopeno en función del tiempo

Semanalmente se determinó el contenido de licopeno encapsulado en cada una de las formulaciones, las mediciones se hicieron por triplicado. El contenido de licopeno remanente se calculó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 6

$$\% \text{ Contenido de licopeno} = \frac{\text{licopeno encapsulado en la semana de estudio}}{\text{licopeno encapsulado inicial}} * 100$$

El contenido de licopeno inicial hace referencia al determinado a tiempo cero, es decir al tiempo en el que las formulaciones fueron elaboradas.

Se tomó de cada formulación 50 mg y se siguió el procedimiento descrito anteriormente en la sección de eficiencia de encapsulación (contenido de licopeno).

Encapsulación de licopeno utilizando liposomas

Los liposomas fueron elaborados según el método de hidratación de película (Londoño-Londoño, Lima, Jaramillo, & Creczynski-pasa, 2010, 7). Se utilizaron fosfolípidos de origen sintético: DMPC, DPPC y de origen natural: asolecitina de soya y HEL, para encapsular el extracto de licopeno obtenido por fluidos supercríticos.

La proporción en peso que se utilizó en las formulaciones liposomales fue de 2:1 (fosfolípido:extracto de licopeno).

Las soluciones de fosfolípidos con y sin licopeno (blancos) fueron evaporadas en un rotaevaporador (R114 Buchi, Alemania), con un baño de agua (B-480, Buchi, Alemania) a la temperatura de transición de cada fosfolípido y con una bomba de vacío (R 300, Boeco, Alemania) a 60 MPa, hasta evaporar completamente el solvente.

Una vez obtenida la película tras evaporación se hidrató mediante buffer fosfato 10 mM pH 7,0, se colocó en baño térmico (según temperatura de transición del fosfolípido) durante 35 minutos y se llevó a agitación mecánica por 1 minuto con el fin de desprender la película de la pared del balón. Posteriormente se llevó a sonicación por 10 minutos a 40 kHz, 66% de potencia en un ultrasonido (serie DTY, Scientz, Ningbo- China), la temperatura empleada para cada ensayo varió de acuerdo al fosfolípido de trabajo. Después de este proceso los liposomas fueron llevados a un proceso de extrusión a través de un mini-extrusor (Avanti Polar Lipids, Canadá- Estados Unidos) utilizando membranas de policarbonato (Whatman) de 0,4 μm y 0,2 μm .

Eficiencia de encapsulación de licopeno en liposomas

Las suspensiones liposomales obtenidas fueron centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C (Z326K, HERMLE Labotechnik, Alemania), luego se eliminó el sobrenadante y se adicionó buffer 10 mM pH 7,0 posteriormente se repitió el ciclo de centrifugación y se eliminó el sobrenadante. Al precipitado obtenido se le adicionaron 150 μL de solución al 10% de Tween ® 20 y se llevó a agitación mecánica durante 1 minuto a 3000 rpm, luego se adicionó cloroformo, se repitió el proceso de agitación y se

llevó a centrifugación por 5 minutos a 14000 rpm y 4 °C . Se tomó la parte orgánica y se llevó a análisis por HPLC-DAD.

Para determinar la eficiencia de encapsulación se cuantificó la cantidad de licopeno a encapsular con cada fosfolípido y se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 7

$$\% \text{ Eficiencia de Encapsulación: } \frac{\text{Cantidad de Licopeno dentro de los liposomas}}{\text{Cantidad de Licopeno a encapsular}} * 100$$

Para cada fosfolípido se realizó el análisis por triplicado.

Se seleccionó el fosfolípido que presentara la mayor eficiencia de encapsulación para realizar la caracterización, estudios de efecto térmico, liberación de pH y estudio de estabilidad.

Caracterización de los liposomas

Tamaño de partícula

De la suspensión liposomal (DPPC-Licopeno) extrudía por membrana de 0,2 µm se tomaron 100 µL de muestra y se adicionaron a 1 mL de agua destilada, se agitó y se llevó al analizador de partícula zeta /nano Nano plus 3 (Micromeritics ®, Estados Unidos), la forma de obtención de resultados es la misma que se describe en la sección de caracterización de micropartículas obtenidas por secado por aspersion.

Potencial Z

Se utilizó el analizador de partícula zeta /nano Nano plus 3 (Micromeritics®, Estados Unidos) mediante el método de movilidad electroforética. Para la lectura, se

emplearon 100 μL de muestra en 1 mL de agua ultrapura (miliQ, 18,2 M Ω .cm), cada análisis se realizó por triplicado.

Efecto térmico sobre el contenido de licopeno en liposomas

Se repartieron 6 muestras, tres de ellas como control (sin esterilización) y las tres restantes para el procedimiento de esterilización. El proceso térmico se llevó a cabo en un autoclave (MAGNA, Colombia) durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C y una presión de 103 kPa. Una vez finalizado el tratamiento las seis muestras fueron centrifugadas a 4 °C durante 15 minutos y 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y al precipitado obtenido se le adicionaron 150 μL de solución al 10% de Tween ® 20, se llevó a agitación mecánica durante 1 minuto a 3000 rpm, posteriormente se adicionaron 170 μL cloroformo, se repitió el proceso de agitación y se llevó a centrifugación por 5 minutos a 14000 rpm y 4 °C. Se tomó la parte la parte orgánica y se analizó por HPLC-DAD.

Perfil de liberación de licopeno a pH neutro

Se tomaron muestras por duplicado para los cinco tiempos de análisis: 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. Posteriormente las muestras fueron cubiertas con papel de aluminio para protegerlas de la luz y se llevaron a un agitador mecánico de incubación previamente calentado a 37°C (MAXQ 4000, ThermoScientific, Estados Unidos), una vez finalizado el tiempo de tratamiento, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C, se tomó el sobrenadante y se adicionaron 150 μL de cloroformo, se

agitaron y nuevamente se llevaron a centrifugación a 4°C, 14000 rpm durante 5 minutos, se tomó la parte orgánica y se analizó por HPLC –DAD.

Estabilidad en el tiempo

Se evaluaron los parámetros de: contenido de licopeno encapsulado, tamaño y potencial z a dos tiempos (0 y 20 días). La metodología utilizada fue similar a la descrita anteriormente para cada parámetro.

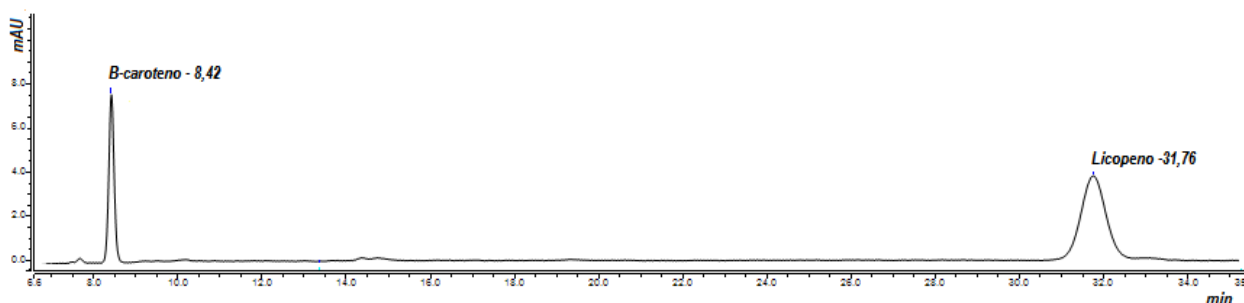
Resultados y Discusión

Identificación de licopeno

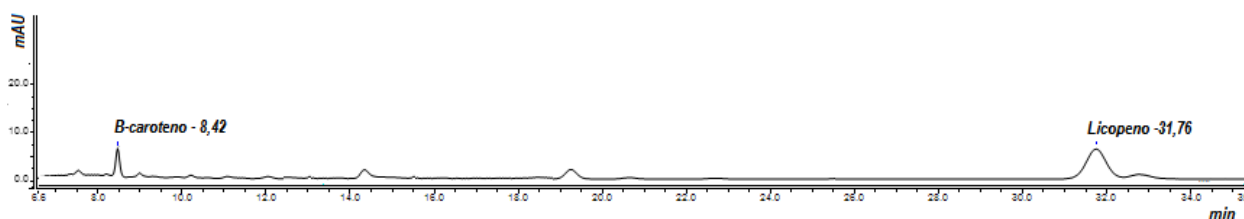
En la figura 10 se muestran los cromatogramas obtenidos para los estándares (licopeno (*all-trans*) y beta-caroteno) (Figura 10.a), para uno de los extractos obtenidos por fluidos supercríticos (Figura 10.b) y para el tomate utilizado en la extracción (Figura 10.c). Al comparar los cromatogramas se observa el mismo tiempo de retención en todas las muestras, tanto para el licopeno *all-trans* como para el beta-caroteno, corroborando así la presencia de estos dos compuestos tanto en tomate utilizado para la extracción como el extracto obtenido por fluidos supercríticos.

Figura 10. Cromatogramas obtenido por HPLC para (a) estándar de licopeno (*all-trans*) y beta-caroteno (b) extracto de licopeno obtenido por fluidos supercríticos (c) Tomate utilizado para la extracción.

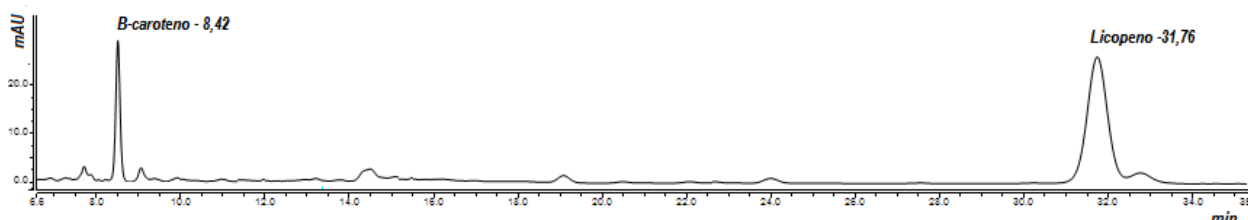
(a)



(b)



(c)



Validación de la metodología en la determinación y cuantificación de licopeno por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Efecto matriz

Se compararon las pendientes obtenidas para las dos curvas realizadas tanto en solvente como blanco matriz, obteniendo una diferencia menor al 15% (SANCO/12571/2013)⁷. Lo cual indica que cualquiera de las dos curvas puede ser utilizada en la cuantificación del analito.

Linealidad:

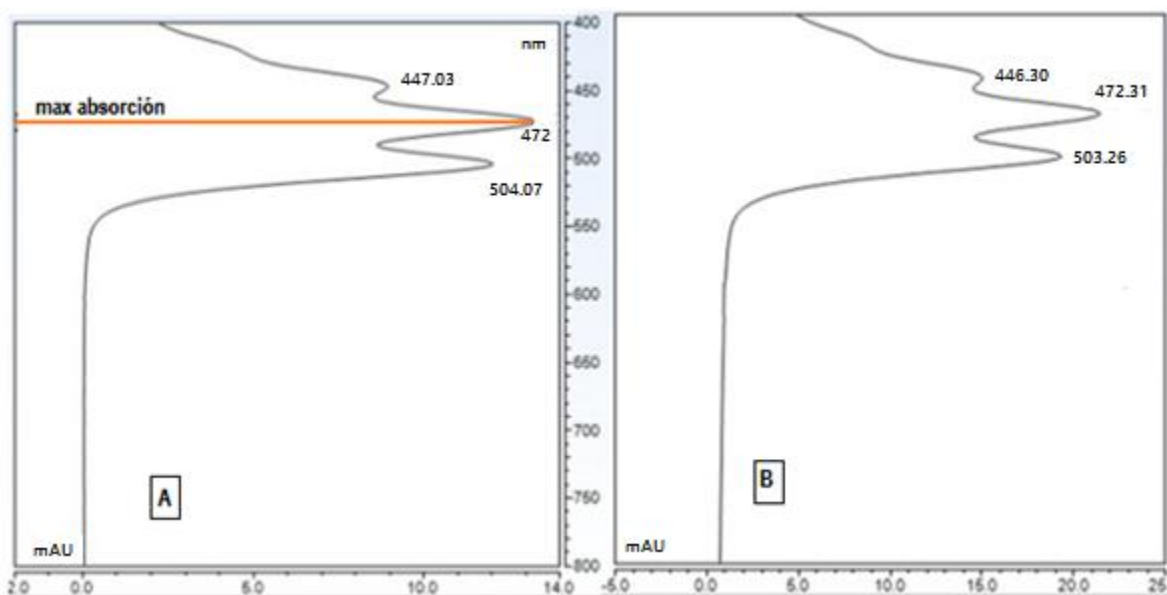
El rango de trabajo lineal utilizado en la validación del método fue de 1 - 15 µg/mL. La ecuación de la regresión lineal determinada por el método de los mínimos cuadrados fue $Y: 0,679x - 0,1539$, con un coeficiente de correlación lineal (R) de 0,99 , un coeficiente de determinación (R^2) de 0,998 y un porcentaje de residuales < 20, indicando así una adecuada descripción de la recta como modelo matemático para el método de estudio (Ramírez et al., 2013, 13).

⁷ European Commission Health & Consumer Protection (2014), Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. . SANCO/12571/2013. (pp. 25). Recuperada de http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf.

Selectividad:

Al analizar los cromatogramas de la fase móvil y del diluyente no se observó ningún tipo de interferencia, se continuó con el análisis del tiempo de retención del analito (licopeno *all-trans*) tanto en el tomate utilizado para las extracciones como en el extracto obtenido por fluidos supercríticos, observando el mismo tiempo de retención en todos los cromatogramas, adicionalmente se corroboró la identidad del licopeno *all-trans* comparando los espectros de absorbancia con los del estándar, con pico característicos a 447, 472 y 504 nm, como se muestra en la figura 11.

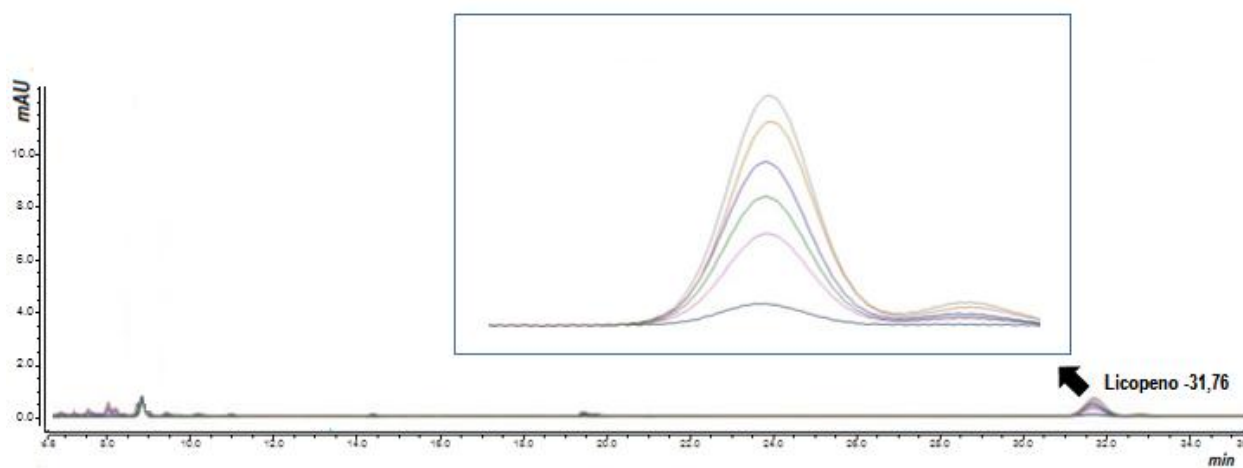
Figura 11. Espectros de absorción de licopeno (A) estándar (B) extracto de obtenido por fluidos supercríticos.



El análisis del cromatograma para el blanco matriz enriquecido confirmó que los otros compuestos presentes en la matriz no generaron interferencia, debido a que al

aumentar la concentración del analito únicamente se incrementó el área relacionada con la señal del licopeno *all-trans*.

Figura 12. Adición de estándar de licopeno en blanco matriz. La señal más baja corresponde al blanco, siguientes señales en orden ascendente corresponden a concentraciones de estándar adicionado de 1, 3, 5, 8 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.



Con todo esto se puede afirmar que el método permitió diferenciar el analito principal de los otros compuestos presentes en la matriz como por ejemplo la presencia de otros carotenos e isómeros del licopeno.

Límite de detección y cuantificación:

El método utilizado permitió detectar el analito en concentraciones $\geq 0,122$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ (límite de detección) y cuantificarlo en concentraciones $\geq 0,300$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ (límite de cuantificación).

Exactitud, repetibilidad y precisión intermedia:

Los resultados obtenidos para evaluar los parámetros de exactitud, repetibilidad y precisión intermedia se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Coeficientes de variación y porcentajes de recuperación obtenidos para los parámetros de precisión y exactitud en la validación del método

Nivel de Concentración	% CV		%Recuperación	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Bajo	9,66	3,66	87,63	94,3
Medio	2,34	4,21	99,59	99,88

Los porcentajes de recuperación tanto para el nivel bajo como para el nivel medio se encontraron en el rango de aceptación (AOAC, 2002, 19), mostrando así una buena exactitud del método.

La repetibilidad del método se evaluó con los coeficientes de variación obtenidos para el mismo analista en cada nivel de estudio y la precisión intermedia comparando los coeficientes de variación entre analistas para el mismo nivel, en ambos casos se observan porcentajes de coeficiente de variación (%CV) menor o igual al 10% lo cual indica una buena repetibilidad y precisión intermedia del método analítico.

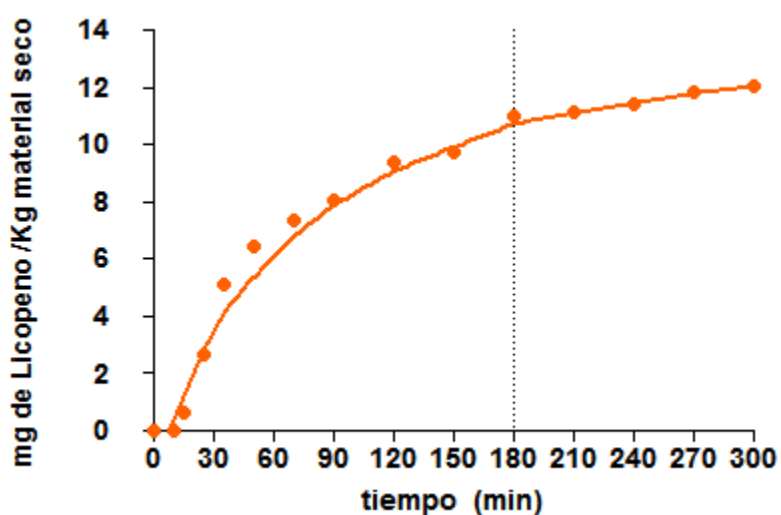
Extracción de licopeno por fluidos supercríticos.

Cinética de extracción

En la figura 13 se muestra la curva del rendimiento acumulado de licopeno en función del tiempo, en esta se observa que para tiempos superiores a 180 minutos no

se obtienen cambios apreciables. Teniendo en cuenta los costos que trae el proceso de extracción y el poco incremento obtenido después de 180 minutos, se seleccionó este valor de tiempo como el indicado para realizar las extracciones del diseño de experimentos para la extracción de licopeno por fluidos supercríticos CO₂.

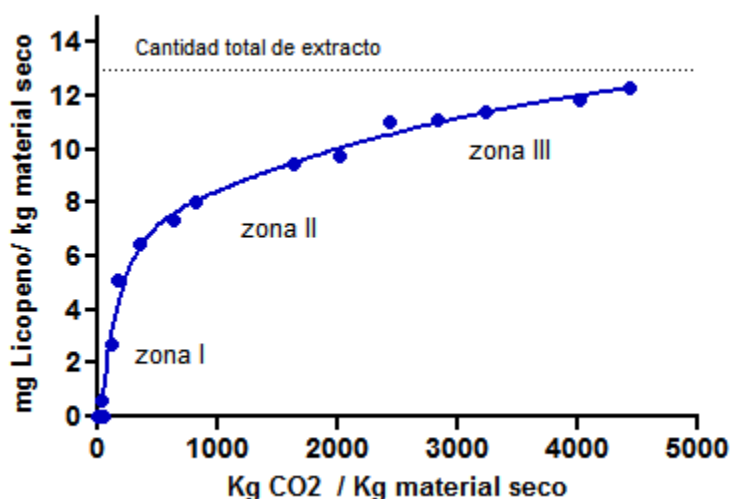
Figura 13. Curva de cinética para de extracción SC-CO₂ (75°C y 25 MPa) de licopeno proveniente de residuos agroindustriales de tomate.



Adicional al tiempo de extracción, se calculó la solubilidad del licopeno en las condiciones de extracción en las que se realizó la cinética (75 °C y 25 MPa), mediante la pendiente de la recta obtenida en la región lineal de la gráfica de rendimiento de licopeno en función de la masa de CO₂ (Zona I figura 14) , el valor obtenido fue de $3,48 \times 10^{-6}$ g licopeno/ g CO₂ (equivalente a 3,48 mg licopeno /Kg CO₂) el cual se encuentra dentro el intervalo de solubilidad reportada por otros autores (Del Valle & Urrego, 2012, 159). Así mismo se observa en la figura 14 las principales zonas de una curva típica de extracción integral (Del Valle y Urrego, 2012, 158), la zona I en la cual

dominan los procesos de solubilidad, la zona II en la cual se obtiene la transición entre la solubilidad y el dominio por transferencia de masa y la zona III donde predomina los procesos de transferencia de masa.

Figura 14. Solubilidad del licopeno extraído por SC-CO₂ a partir de residuos agroindustriales de tomate.



Extracción de licopeno

En la tabla 7 se muestra el plan experimental de las extracciones realizadas, los valores de presión y temperatura utilizadas, así como los resultados obtenidos del rendimiento total, rendimiento de licopeno y capacidad antioxidante (ORAC).

El análisis estadístico se realizó mediante el software Statgraphics Centurion XV, para cada variable respuesta se evaluó el efecto de temperatura, presión así como la interacción entre ellas, encontrando únicamente para el rendimiento de licopeno un efecto significativo ($p < 0,05$) de la temperatura con un nivel de confianza del 95,0% (Tabla 9). Sobre el rendimiento total y la capacidad antioxidante no se presentaron

efectos significativos de las variables estudiadas (valores de $p > 0,05$ para todos los factores e interacciones entre estos).

Tabla 8. Rendimiento total, rendimiento de licopeno y capacidad antioxidante (ORAC) obtenidos en la extracción SC-CO₂ de licopeno a partir de residuos agroindustriales de tomate.

N° Extracción	Temperatura (°C)	Presión (MPa)	Rendimiento Licopeno (µg Licopeno/ g material seco)	Rendimiento Total (g extracto/kg material seco)	ORAC (µmol TE/ g extracto)
1	80	25	166,75	26,89	152,57
2	70	35	38,21	10,11	113,30
3	70	35	75,24	16,73	139,93
4	60	25	22,68	9,11	890,11
5	80	45	91,68	20,18	394,32
6	70	35	60,03	12,88	129,30
7	60	45	85,49	22,12	224,19
8	70	35	82,69	19,62	134,66
9	70	35	33,50	5,31	129,30

El modelo se ajustó con un R² del 70 % a la siguiente ecuación:

Ecuación 8

$$\sqrt{\text{Rendimiento licopeno}}$$

$$= -55,531 + 0,896412 * \text{Temperatura} + 1,39748 * \text{Presión} - 0,0195548 * \text{Temperatura} * \text{Presión}$$

La prueba de falta de ajustes arrojó un valor $p > 0,05$ (Tabla 9) indicando así que el modelo seleccionado resultó adecuado para la descripción de los datos con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para el rendimiento de licopeno obtenido en la extracción SC-CO₂ a partir de residuos agroindustriales de tomate.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	17,9764	1	17,9764	8,31	0,0449
B:Presión	0,328056	1	0,328056	0,15	0,7167
AB	15,2957	1	15,2957	7,07	0,0564
Falta de ajuste	5,88391	1	5,88391	2,72	0,1744
Error puro	8,64872	4	2,16218		
Total (corr.)	48,1327	8			

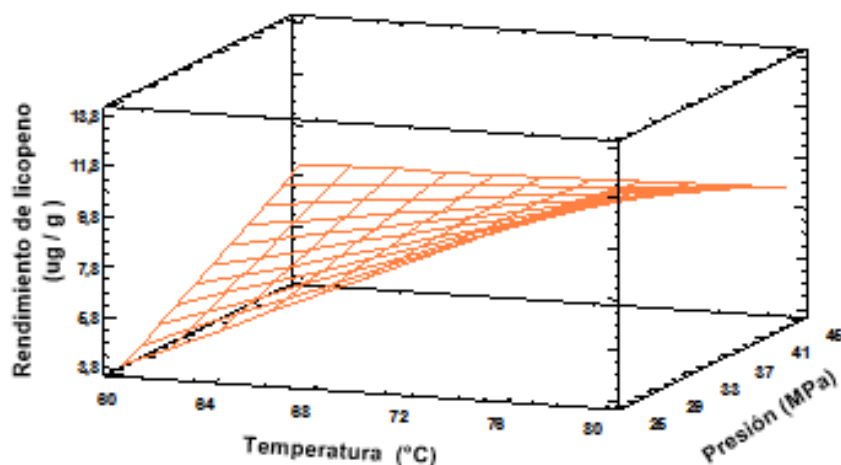
Teniendo en cuenta que el único factor que presentó efecto significativo en el rendimiento de licopeno fue la temperatura, se analizaron los siguientes grupos de extracciones: N° (1 y 4) realizadas a 25 MPa y N° (5 y 7) realizadas a 45 MPa (Tabla 8). Para ambos grupos se observó que el incremento en la temperatura ocasionó valores más altos en el contenido de licopeno, rendimientos superiores para las extracciones N°1 y 5 (realizadas a 80°C). Adicionalmente se observó que el efecto de la temperatura en las extracciones a presiones altas (45 MPa), extracciones 5 y 7, fue bajo, con un cambio de tan solo 6,19 µg licopeno/ g material seco, mientras que para las extracciones realizadas a presiones bajas (25 MPa), extracciones N° 1 y 4, el efecto produjo un cambio de 144,07 µg Licopeno/ g material seco.

El incremento en el rendimiento de licopeno al aumentar la temperatura puede ser explicado por el aumento que se genera en la presión de vapor del licopeno y por ende el incremento en su solubilidad, adicionalmente al aumentar la temperatura se genera un mejor transporte de soluto en la matriz y/o desde la matriz al solvente (procesos de transferencia de masa) probablemente por la destrucción parcial de las estructuras vegetales que contienen licopeno (Machmudah et al., 2012, 293; Yi, Shi, Xue, Jiang, & Li, 2009, 1091). Resultados reportados en literatura científica soportan que incrementos en la temperatura de extracción del SC-CO₂ genera rendimientos más altos de licopeno (Zuknik et al., 2012, 254).

En la figura 15 se muestra la superficie de respuesta para el análisis realizado, encontrando 80°C y 25 MPa como los valores óptimos de temperatura y presión para la extracción de licopeno, con un rendimiento de 166,75 µg licopeno/g material seco

(equivalente aproximadamente a 89.7 μg licopeno/g material fresco. Este valor se encuentra dentro de los valores reportados por otros investigadores. Mattea, Martín, & Cocero (2009, 258) reportaron una variación en el contenido de licopeno de 3 a 20 mg/100g fruto fresco, Yi Chun et al. (2009, 1088) determinaron en su estudio de extracción por fluidos supercríticos, un contenido máximo de 31,25 μg licopeno/g de tomate fresco (100°C, 40 MPa y 1,5 mL/minutos). Topal, Sasaki, & Oto (2006, 5607) reportaron un máximo rendimiento de 1,18 mg licopeno/g de muestra a 40 MPa, 100°C, flujo de 2,5 mL/minuto en un tiempo de 5,5 horas de extracción. Rozzi, Ingh, Ierling, & Atkins, (2002, 2642), encontraron una eficiencia máxima de extracción del 61%, equivalente a 14,86 μg licopeno/g material seco a 86°C, 35MPa y 500 mL CO₂. Egydio, Moraes, & Rosa (2010, 163) investigaron la extracción de licopeno en un rango de 40-80°C encontrando un máximo de rendimiento a 80°C y 35 MPa.

Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta para el diseño aplicado a la extracción por fluidos supercríticos-CO₂ de licopeno.



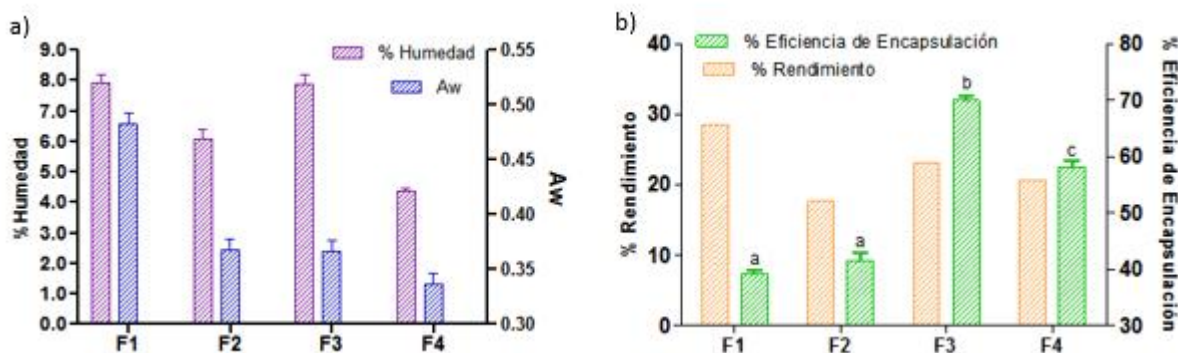
Una alternativa para incrementar el poder de solvatación del CO₂ supercrítico es utilizar solventes orgánicos como co-solventes durante la extracción, sin embargo este uso puede generar preocupación por los efectos tanto en la salud como en el medio ambiente debido a las trazas de estos compuestos, por esta razón los investigadores han llevado a cabo extracciones utilizando otro tipo de compuestos como co-solventes, Machmudah et al, (2012, 292), encontraron un incremento en la eficiencia de extracción del 28,5 % empleando semillas de tomate, este aumento fue atribuido a una mejora en el transporte y solubilidad del licopeno desde la matriz sólida al CO₂ supercrítico, atribuido a la presencia del ácido linoleico presente en las semillas. Vasapollo (2004, citado en Yi et al., 2009, 1089) describe en su investigación como la presencia de aceites vegetales utilizados como co-solventes mejora el rendimiento de licopeno y contribuye a su estabilidad.

Es importante mencionar que el contenido de licopeno en matrices vegetales depende de diversos factores tales como, la especie y la temperatura de crecimiento, maduración y almacenamiento del fruto, debido a que el licopeno es el último pigmento que aparece durante la maduración y su desarrollo es inhibido a temperaturas superiores a 30-32°C. Lie et (2009, citado en Shi & Xue, 2010, 621) reportaron un incremento en el contenido de licopeno entre 4 y 21 días de almacenamiento. Todas estas variables hacen que los contenidos de licopeno presenten variaciones al comparar las investigaciones que se realizan en condiciones de extracción similar.

Microencapsulación del extracto de licopeno utilizando secado por aspersión

En la figura 16 se muestran los parámetros de humedad para las micropartículas obtenidas en el secado por aspersión para la encapsulación de licopeno proveniente de la extracción por fluidos supercríticos así como los porcentajes de rendimiento y la eficiencia de encapsulación para cada una de las formulaciones realizadas.

Figura 16. (a) Parámetros de humedad y actividad acuosa de las micropartículas. (b) porcentajes de rendimiento y eficiencia de encapsulación en el proceso de microencapsulación de licopeno por secado por aspersión. Se muestran los resultados promedio \pm desviación estándar ($n=3$). F1: (Cap+MD), F2: (Cap+MD+PAS), F3: (GA+MD), F4: (Gel+Sac). Los resultados con diferente letra presentan diferencia significativa con un nivel de confianza del 95,0%.



Los valores de contenido de humedad y actividad acuosa para las micropartículas obtenidas por secado por aspersión de todas las formulaciones presentaron valores adecuados para disminuir el daño microbiológico y reducir la reactividad del sistema, factores que afectan la estabilidad del producto durante su almacenamiento. El contenido de humedad como se muestra en la figura 16.a estuvo del 4,4% al 7,9 %, intervalo dentro del rango sugerido (3 al 10%) para esta clase de alimentos (Li et al., 2015, 305; Xue et al., 2013, 442). Los valores de actividad acuosa

(Aw) determinados fueron menores a 0,6 generando así una adecuada estabilidad microbiológica para todas las formulaciones (Quek, Chok, & Swedlund, 2007, 390).

Los rendimientos en el proceso de secado oscilaron entre el 18% al 29% (Figura 16.b), mientras que la eficiencia de encapsulación estuvo entre el 39% al 70%. Las eficiencias determinadas en este estudio presentaron valores similares a las reportadas por otras investigaciones para la microencapsulación de licopeno por secado por aspersión, Rocha et al, empleando gelatina y sacarosa reportaron en su estudio rangos del 12-82% (Rocha et al., 2012, 40); además fueron reportados rangos del 21 al 30% utilizando almidón modificado y eficiencias del 25-88 % empleando goma arábica, goma gellan y maltodextrina (Rocha-Selmi, Favaro-Trindade, & Grosso, 2013, 4). Utilizando proteína aislada de soya y goma arábica se reportan eficiencias del 69 al 85% (Li et al., 2015, 303). Se reportaron eficiencias del 41-44% para la microencapsulación por secado por aspersión para el aceite de soya empleando proteína aislada de soya como material encapsulante (Tang & Li, 2013, 442).

En este estudio el porcentaje de eficiencia más alto se obtuvo para la formulación 3, en la que se utilizaron goma arábica y maltodextrina como agentes encapsulantes, este comportamiento puede ser atribuido a las excelentes propiedades emulsificantes y de formación de película que presenta la goma arábica en combinación con las propiedades de protección en los procesos de transferencia de oxígeno que ofrece la maltodextrina (Gharsallaoui et al., 2007, 1115) ofreciendo así una buena encapsulación para el extracto de licopeno. Matioli & Rodríguez-Amaya, (2002, 201) reportaron una mejor estabilidad para el licopeno encapsulado con la utilización de estos dos agentes encapsulantes en comparación con la estabilidad ofrecida utilizando

únicamente goma arábica. Parra et al, (2010, 5675) combinaron maltodextrina y goma arábica para la microencapsulación por secado por aspersion de otros productos oleosos tales como el aceite de cardamomo. Otro estudio indicó que la sustitución del 50% de goma arábica por glucosa generó un incremento en la eficiencia de encapsulación del 18%, no obstante la maltodextrina DE 18,5 fue considerada la más indicada en la sustitución parcial de la goma arábica debido a la buena solubilidad y rápida reconstitución del material encapsulante (Gharsallaoui et al., 2007, 1115).

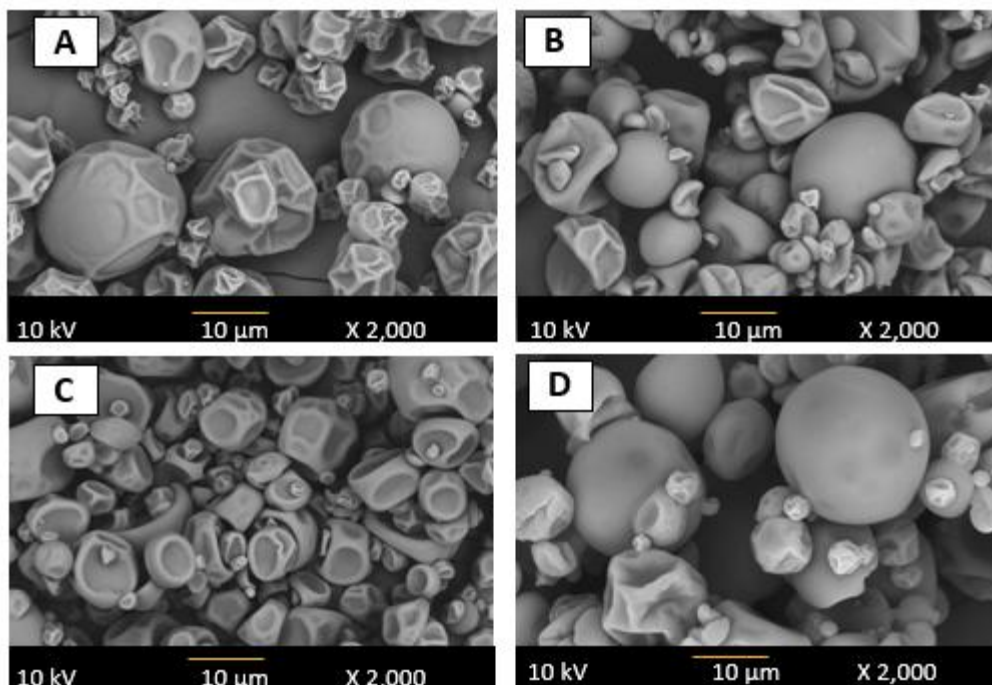
Adicionalmente, se reporta la elaboración de una patente para la encapsulación de licopeno por secado por aspersion utilizando goma arábica y almidón modificado (Jing, Chai, Shi & Gu, 2014).

La segunda formulación que presentó el porcentaje de eficiencia de encapsulación más alto fue la formulación 4 en la que se utilizaron como agentes encapsulantes, gelatina y sacarosa, la gelatina se caracteriza por su alta actividad emulsificante, estabilizante y alta tendencia a formar una buena red de atrapamiento (Gharsallaoui et al., 2007, 1116). Se han reportado estudios en los que la gelatina en combinación con la sacarosa ha presentado un buen desempeño en la microencapsulación de beta-caroteno y licopeno, encontrando eficiencias entre 12% al 82% (Shu et al., 2006, 665). La formulación 1 aunque presentó el valor más alto en el porcentaje de rendimiento como se muestra en la figura 16.b obtuvo el porcentaje más bajo de encapsulación junto con la formulación 2. Teniendo en cuenta la proporción y naturaleza de los agentes encapsulantes empleados para la formulación 1 y 3 (Tabla 6) se puede concluir que entre el Capsul® y la goma arábica, esta última presentó mejores propiedades en la encapsulación de extracto licopeno.

Microscopía electrónica de barrido (SEM) para las micropartículas

En la figura 17 se compara la morfología de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión para las 4 formulaciones de estudio, en la figura 17 se observa que todas las formulaciones presentaron micropartículas de diferente tamaño, con superficies externas continuas (sin fisuras, grietas, o interrupciones), característica que puede ofrecer una mejor protección al compuesto encapsulado, superficies continuas con formación de pliegues y concavidades, similares a la figura 17.A, fueron obtenidas por Glaucia A. et al., empleando Capsul® como agente encapsulante para la microencapsulación de licopeno, la presencia de pliegues sobre la superficie fue atribuida a la rápida evaporación de las gotas de la emulsión durante el proceso de secado (Rocha et al., 2012, 39). Utilizando gelatina y sacarosa para la encapsulación de licopeno, Shu et al., (2006, 668) reportaron imágenes equivalentes a las obtenidas en la figura 17.D, la suavidad presentada en las superficies externas fue atribuida a la adición de sacarosa en la formulación.

Figura 17. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión (A) Formulación 1 (Cap + MD), (B) Formulación 2 (Cap+MD+PAS) (C) Formulación 3 (GA+ MD) (D) Formulación 4 (Gel+ Sac).



Tamaño de las micropartículas y estabilidad del licopeno en función del tiempo

En la tabla 10 se muestra el tamaño (tomado como diámetro promedio) de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión el día de su elaboración (t: 0 días) y a los 30 días, las micropartículas a tiempo 0 presentaron un tamaño de 0,5 – 1,5 μm las cuales se encuentran cerca al rango reportado para partículas obtenidas mediante secado por aspersión (1 μm - 50 μm) (Nesterenko et al., 2013, 471). En esta misma tabla se observa que las micropartículas de menor diámetro promedio al iniciar el análisis son las de la formulación 1 y que las de mayor diámetro y mayor índice de

polidispersidad son las de formulación 2. Al concluir los 30 días las micropartículas que presentaron un menor cambio en el diámetro promedio fueron las de la formulación 1 y las de mayor cambio las de la formulación 3, referente al índice de polidispersidad no se observó un cambio apreciable.

A tiempo inicial (t:0 días) no se encontró relación del tamaño obtenido con la eficiencia de encapsulación presentada por las micropartículas (Tabla 10 y Figura 16). A un tiempo de 30 días las micropartículas de las formulaciones 3 y 4 fueron las que presentaron mayor tendencia de aglomeración (incremento en el tamaño) y como se observa en la figura 18 presentaron un mayor porcentaje de retención del licopeno al tiempo final de estudio, esta tendencia puede ser explicada al tener en cuenta que el proceso de aglomeración disminuye la exposición de las partículas al oxígeno ofreciendo así una protección al licopeno para su destrucción (Quek et al., 2007, 391), lo cual explicaría también la tendencia observada para las micropartículas de la formulación 1, la cual presentó un menor tamaño a los 30 días y el menor porcentaje de retención de licopeno (Tabla 10 y Figura 18). Matioli & Rodríguez-Amaya (2002, 201), observaron en su investigación que el tamaño de las partículas fue el factor principal para afectar la estabilidad del licopeno, obteniendo una mayor facilidad a la oxidación en las partículas de menor tamaño.

Tabla 10. Tamaño de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión en el proceso de microencapsulación de licopeno para tiempo inicial (t:0) y después de 30 días de almacenamiento (t:30).

Formulación	t:0		t: 30	
	Diámetro promedio (µm)	PD*	Diámetro promedio (µm)	PD
F1	0,592	0,348	0,929	0,458
F2	1,523	0,715	1,416	0,607
F3	1,469	0,545	2,348	0,563
F4	1,148	0,347	1,546	0,545

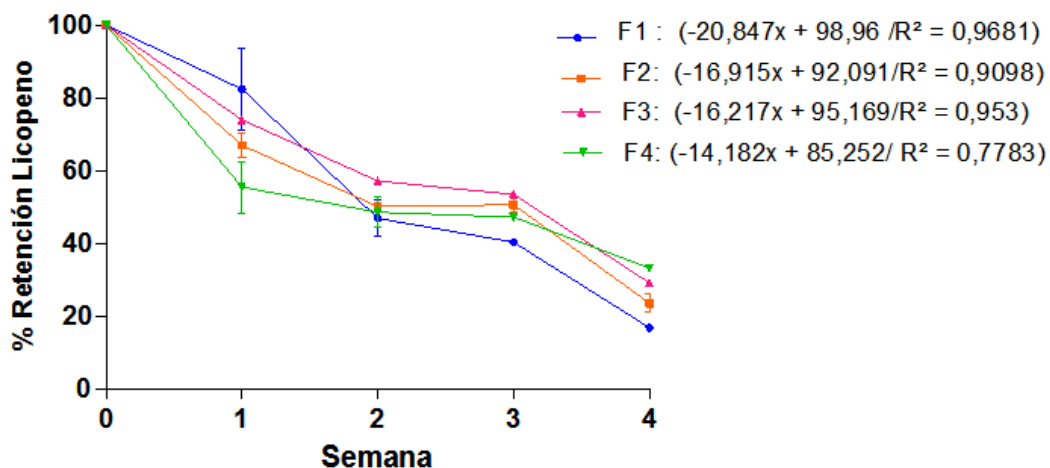
*PD: Índice de Polidispersidad.

F1: (Cap+MD), F2: (Cap+MD+PAS), F3: (GA+MD), F4: (Gel+Sac).

El estudio de estabilidad en función del tiempo para el licopeno microencapsulado por secado por aspersión durante el almacenamiento a 20°C se muestra en la figura 18.

Las formulaciones 1 y 3 en la primera semana ofrecieron una mayor protección del licopeno, sin embargo durante las otras semanas de estudio la formulación 1 presentó bajos porcentajes de retención, en comparación con la formulación 3 la cual presentó una buena tendencia de protección durante todo el tiempo de estudio para el contenido de licopeno, corroborando así las buenas propiedades encapsulantes que ofrecen los agentes encapsulantes de esta última formulación. Con el fin de comparar las velocidades de degradación para cada formulación se realizó un modelo de regresión lineal, las ecuaciones se muestran en la figura 18, encontrando que la formulación que presentó una mayor tasa de degradación (un valor más alto de la pendiente) fue la formulación 1.

Figura 18. Degradación del licopeno en micropartículas obtenidas por secado por aspersión durante almacenamiento a 20 °C. Los valores mostrados corresponden al valor promedio de los datos \pm desviación estándar (n=2). F1: (Cap+MD), F2: (Cap+MD+PAS), F3: (GA+MD), F4: (Gel+Sac).



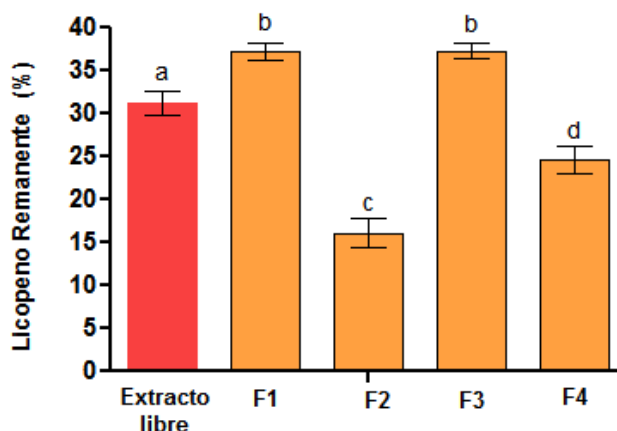
Matioli & Rodríguez-Amaya (2002, 202), en la microencapsulación de licopeno proveniente de la pulpa de guayaba encontraron pérdidas en el contenido de licopeno del 50% almacenado a temperatura ambiente durante 18 días utilizando goma arábica como agente encapsulante. Xue et al., (2013, 443) utilizando zeína como agente encapsulante para la encapsulación de oleorresina de tomate obtuvo una pérdida en el contenido de licopeno del 66% al almacenar las micropartículas a 25°C durante 18 días. Como se indica en la figura 18 para la semana 3 la disminución del contenido de licopeno microencapsulado se obtuvo en el rango del 60% al 46% para las formulaciones 1 y 3 respectivamente.

Efecto térmico en el contenido de licopeno

En la figura 19 se muestra el estudio de estabilidad al tratamiento térmico (esterilización) realizado a las micropartículas obtenidas por secado por aspersión para las cuatro formulaciones de análisis. En ella se observa que las formulaciones 1 y 3 presentaron un efecto protector en comparación con el extracto obtenido por fluidos supercríticos de licopeno sin encapsular, a diferencia de las formulaciones 2 y 4 en las que se presentó un efecto negativo para el contenido de licopeno.

Para evaluar si había diferencias significativas entre los tratamientos realizados se llevó a cabo la prueba F mediante un análisis ANOVA en la cual se encontró un valor p menor a 0,05 indicando una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 formulaciones y el extracto sin encapsular con un nivel de confianza del 95 %. Posteriormente para determinar cuáles medias eran significativas se realizó la prueba de múltiples rangos encontrando 4 grupos homogéneos, (Extracto libre), (F1-F3), (F2) y (F4) indicados en la figura 19 con las letras a, b, c, y d respectivamente.

Figura 19. Contenido de licopeno remanente \pm desviación estándar (n=3) después del tratamiento térmico realizado (esterilización). F1: (Cap+MD), F2: (Cap+MD+PAS), F3: (GA+MD), F4: (Gel+Sac). Los resultados con diferente letra presentan diferencia significativa con un nivel de confianza del 95,0%.



Las principales causas de la degradación del licopeno durante el procesamiento de alimentos son la oxidación e isomerización. Shi, Kakuda, Jiang, & Mittal (2007, 357) realizaron un estudio evaluando la estabilidad de licopeno en el rango de temperatura de 100°C a 180°C encontrando que a temperaturas superiores a 100°C se incrementaba la degradación de ambos isómeros del licopeno *cis* y *trans* concluyendo así que a temperaturas por encima de 100°C el mecanismo principal que influye en la degradación de este compuesto es la oxidación. Knockaert et al., (2012, 1296) estudiaron el efecto de los procesos de pasteurización y esterilización sobre el contenido de licopeno en puré de tomate, obteniendo como resultado, que el contenido total de licopeno no se afectó durante el proceso de pasteurización pero sí presentó una disminución significativa en el proceso de esterilización, como consecuencia de la degradación oxidativa del licopeno.

La oxidación es un proceso complejo que depende de varios factores tales como las condiciones de procesamiento, humedad, temperatura y la presencia de pro o antioxidantes (Shi, Le Maguer, & Bryan, 2002, 152). Dado que para las cuatro formulaciones se emplearon las mismas condiciones de procesamiento, temperatura, presión, humedad y tiempo de exposición, se infiere la presencia de sustancias que podrían actuar como pro-oxidantes en las formulaciones 2 y 4 que hayan ocasionado un mayor deterioro en el contenido de licopeno una vez efectuado el proceso de esterilización. Shi et al., (2002, 152) mencionan que la presencia de azúcares, ácidos y aminoácidos afectan la degradación del licopeno en productos alimenticios procesados. Lo cual puede explicar el comportamiento obtenido para las últimas formulaciones

mencionadas, debido a la presencia de proteína aislada de soya en la formulación 2 y de gelatina y sacarosa en la formulación 4.

Las proteínas son compuestos susceptibles a la desnaturalización, este proceso involucra cambios conformacionales de sus estructuras nativas sin la alteración de la secuencia de aminoácidos que las componen, uno de los factores que influyen en este proceso es la temperatura, así mismo la interacción con el agua también afecta las propiedades fisicoquímicas de las proteínas como consecuencia de la modificación de sus estructuras tridimensionales (Sun, 2005, 295). En algunos casos la desnaturalización de las proteínas puede provocar el desplegamiento completo de las cadenas proteicas, provocando la exposición de los grupos internos al medio (Lupano, 2013, 13). Se ha estudiado mediante calorimetría diferencial de barrido los cambios en la estructura nativa de la proteína de soya por efecto del incremento en la temperatura, observando los dos picos de desnaturalización correspondientes a las fracciones proteicas principales el primero para glicina (11 S globulina) y el segundo para glicina (7S globulina) (Guerrero, Betty, Kerry, & De la Caba, 2012, 56; Nesterenko et al., 2013, 471; Sun, 2005, 295). Las temperaturas correspondientes a las pérdidas de agua residual para esta proteína se encontraron a 100°C y 220°C (Tang, Choi, & Ma, 2007, 96).

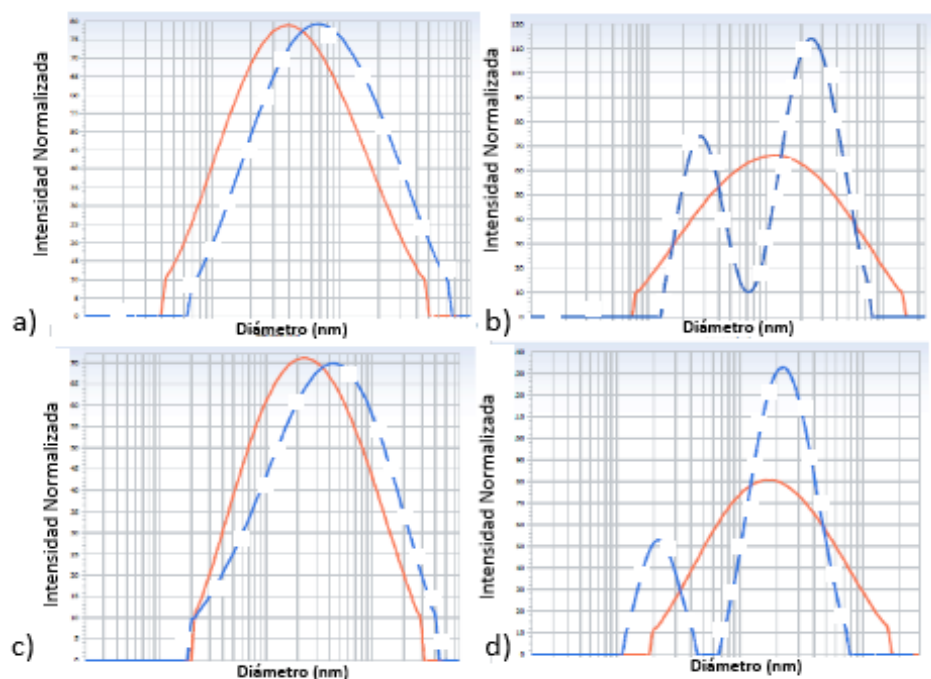
La gelatina es un biopolímero natural muy versátil derivado del colágeno insoluble fibroso presente en piel, cartílago, huesos y residuos de animales mamíferos y peces. Cuando se lleva a calentamiento se provoca la desnaturalización y separación de sus tres hélices (cadenas de polipéptidos enrolladas entre sí mediante puente de hidrógeno) (Acosta, 2014, 30).

Para ambas formulaciones (1 y 4) es probable que bajo el tratamiento térmico efectuado las proteínas hayan presentado cambios en sus estructura tridimensional exponiendo sus cadenas proteicas al medio facilitando así tanto su degradación como la oxidación del licopeno por la posible interacción de los grupos funcionales con el compuesto encapsulado.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se concluye que la combinación entre almidón modificado de maíz (Capsul®) con maltodextrina y de esta última con goma arábiga ofrecieron un efecto de protección para el extracto de licopeno microencapsulado (formulaciones 1 y 3), contrario a la combinación de los agentes encapsulantes de las formulaciones 2 y 4, en donde están presentes compuestos como proteínas y sacarosa.

En la figura 20 se muestra el efecto que produjo la esterilización en el tamaño de las micropartículas de cada formulación, para las formulaciones 1 y 3 se presentó un efecto de agregación (figura 20 a y c) y para las formulaciones 2 y 4 un efecto de fragmentación (figura 20.b y d), lo cual se relaciona con lo mostrado en la figura 19, una mayor protección para el licopeno encapsulado en las micropartículas de las formulaciones 1 y 3. La presencia de partículas más pequeñas (figura 20 b y d), podría indicar la presencia de fragmentos de los agentes encapsulantes, no obstante sería necesario realizar la identificación de estos para confirmar esta hipótesis.

Figura 20. Efecto de la esterilización sobre el tamaño de las micropartículas secadas por aspersión. La línea continua hace referencia a las micropartículas sin esterilizar y la línea segmentada indica las micropartículas sometidas al proceso de esterilización. (a) Formulación 1 (Cap +MD) (b) Formulación 2 (Cap+MD+PAS) (c) Formulación 3 (GA+MD) (d) Formulación 4 (Gel+Sac).



Perfil de liberación de licopeno

Con el fin de describir y comparar el proceso de liberación de licopeno proveniente de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión para las cuatro formulaciones de estudio se utilizó un modelo exponencial, que sigue una ecuación de tipo:

$$Y=Y_0 + (\text{Plateau}-Y_0)*(1-\exp(-K*X)), \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

Y: contenido de licopeno liberado, expresado en: Licopeno liberado $\mu\text{g}/\text{g}$ formulación.

Yo: contenido de licopeno liberado a tiempo 0, expresado en: Licopeno liberado $\mu\text{g}/\text{g}$ formulación.

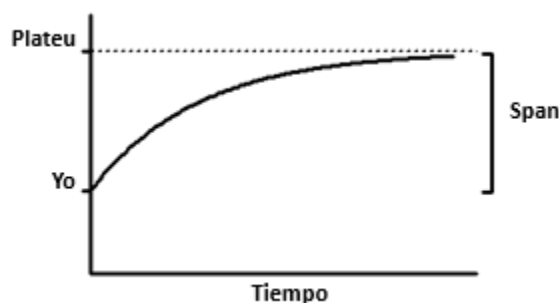
Plateu: estimación del contenido de licopeno liberado a tiempo infinito, expresado en: Licopeno liberado $\mu\text{g}/\text{g}$ formulación.

K: constante de velocidad de liberación (minutos^{-1}).

X: tiempo (minutos).

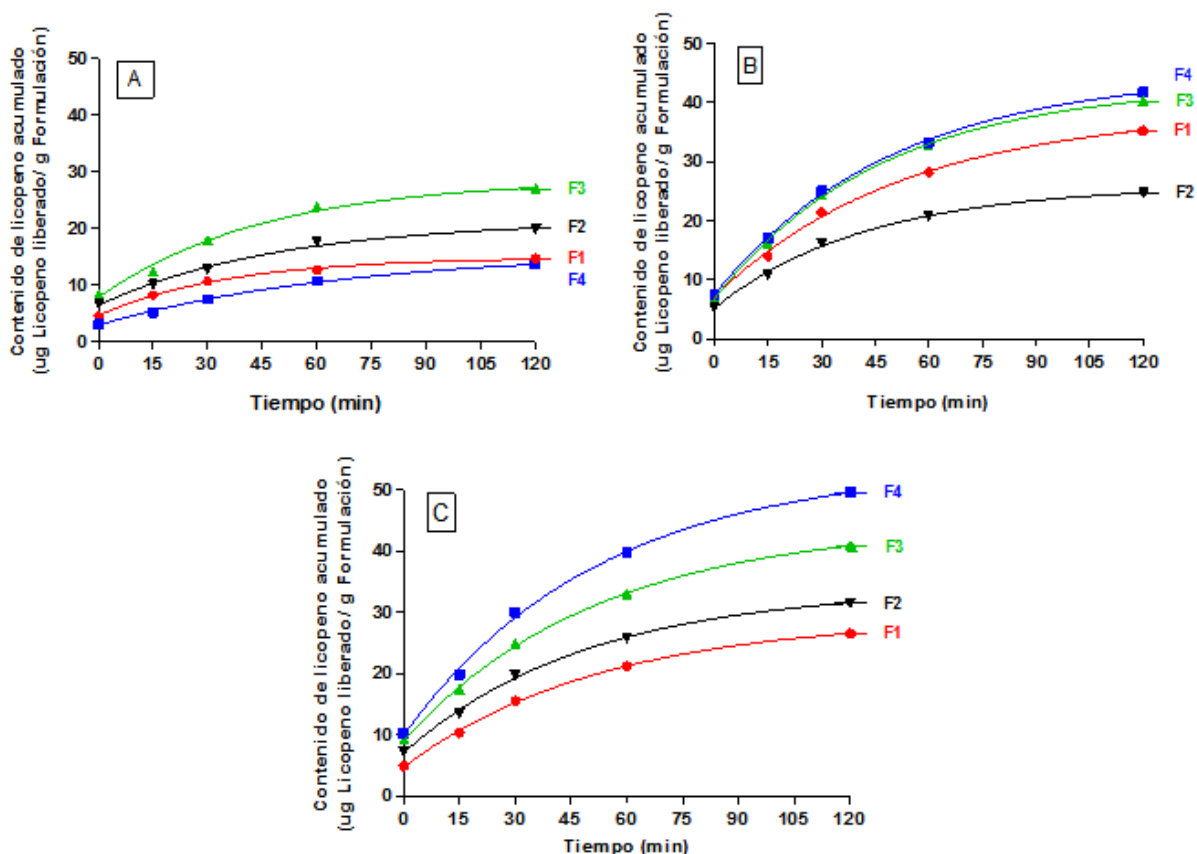
Span, es un parámetro obtenido al calcular la diferencia entre Plateu y Yo, como se muestra en la figura 21. Las unidades de Span para este estudio son licopeno liberado $\mu\text{g}/\text{g}$ formulación.

Figura 21. Comportamiento del modelo utilizado para el perfil de liberación de licopeno proveniente de las micropartículas.



En la figura 22 se muestran los comportamientos de liberación de licopeno y en la tabla 11 se indican los parámetros anteriormente mencionados según el modelo aplicado para describir la liberación de licopeno de las micropartículas en las cuatro formulaciones bajo los tres valores de pH estudiados. Todas las formulaciones presentaron un buen ajuste al modelo de acuerdo a los valores de R^2 obtenidos por cada una de ellas.

Figura 22. Liberación acumulada de licopeno proveniente de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión. (F1-F4) indican las formulaciones de estudio F1: (Cap+MD), F2: (Cap+MD+PAS), F3: (GA+MD), F4: (Gel+Sac). A) pH 4,0 B) pH 7,0 C) pH 10.



Comparando los valores de Y_0 , para cada una de las formulaciones a los tres valores de pH, se observa que la formulación que presentó un comportamiento apreciable dependiente del pH fue la formulación 4, presentando un valor más alto en el contenido de licopeno inicial (Y_0) a pH 10. Referente a los valores de Plateau, para la formulación 2 la estimación del contenido de licopeno liberado fue similar en los tres valores de pH, presentando un comportamiento independiente de pH, para la formulación 3 y 4 el valor de Plateau estima una liberación similar a pH neutro y básico.

Para la formulación 4 se observó una diferencia apreciable al comparar la liberación estimada a tiempo infinito a pH 4 y 10. En los valores de Span las formulaciones 2 y 3 no presentaron cambios importantes, no obstante para la formulación 1 se observó una ligera dependencia del pH presentando su valor más alto a pH 7, en la formulación 4 se observó una mayor dependencia del pH para el parámetro Span, lo cual podría inferirse teniendo en cuenta que para esta formulación se observaron los cambios más importantes tanto para Yo como para Plateu al variar el pH del medio en el cual eran expuestas las micropartículas para la liberación de licopeno encapsulado.

Tabla 11. Parámetros del modelo exponencial utilizado en la liberación de licopeno proveniente de las micropartículas secadas por aspersión.

		F1	F2	F3	F4
pH 4.0	K	0,02820 ± 0,003	0,01994 ± 0,004	0,02191 ± 0,005	0,01438 ± 0,002
	Yo	4,684 ± 0,3	6,542 ± 0,6	7,872 ± 1,0	3,030 ± 0,3
	Plateu	14,95 ± 0,4	21,47 ± 1,1	28,73 ± 1,9	16,05 ± 0,9
	Span	10,27 ± 0,4	14,93 ± 1,1	20,86 ± 1,9	13,02 ± 0,9
	R ²	0,9969	0,9938	0,9894	0,9974
pH : 7.0	K	0,01881 ± 0,002	0,02340 ± 0,002	0,02145 ± 0,001	0,02009 ± 0,001
	Yo	7,078 ± 0,7	5,183 ± 0,5	6,713 ± 0,5	7,507 ± 0,5
	Plateu	38,62 ± 1,8	25,98 ± 0,8	43,08 ± 1,0	45,02 ± 1,1
	Span	31,54 ± 1,7	20,79 ± 0,8	36,36 ± 1,0	37,51 ± 1,1
	R ²	0,9970	0,9978	0,9991	0,9990
pH : 10.0	K	0,01884 ± 0,001	0,02027 ± 0,002	0,01903 ± 0,001	0,01909 ± 0,002
	Yo	4,749 ± 0,3	7,082 ± 0,5	9,087 ± 0,5	9,943 ± 0,9
	Plateu	29,12 ± 0,8	33,92 ± 1,0	44,48 ± 1,0	54,01 ± 1,9
	Span	24,37 ± 0,7	26,83 ± 1,0	35,39 ± 1,0	44,07 ± 1,8
	R ²	0,9990	0,9984	0,9992	0,9982

Teniendo en cuenta que el punto isoeléctrico de las proteínas de la gelatina (uno de los componentes de la formulación 4) es de 4,7 a 5,2 y que cerca este valor la gelatina tiende a formar un gel (Podczeck, F., 2009), podría explicar la baja liberación de licopeno a condiciones de pH 4 comparada con los otros valores de pH en los cuales, al estar alejados del punto isoeléctrico, la resistencia de gel disminuye.

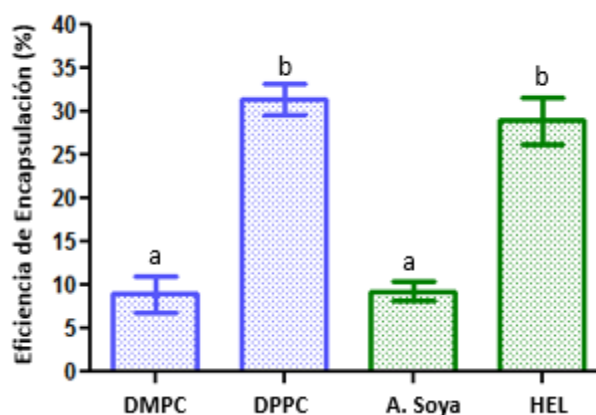
Teniendo en cuenta que la principal zona de absorción del licopeno es la del intestino (Li et al., 2015, 306), se buscan micropartículas que resistan la liberación de su contenido a pH ácidos (estómago) y permitan su liberación en la zona donde presente su principal absorción. Este comportamiento fue observado por el perfil de liberación en las micropartículas de la formulación 4, adicionalmente los agentes encapsulantes de esta formulación (gelatina y sacarosa) son altamente biocompatibles con lo cual podría generar una posible aplicación para la industria farmacéutica o de alimentos.

Elaboración de liposomas para la encapsulación de licopeno

Eficiencia de encapsulación

Los porcentajes de eficiencia de encapsulación obtenidos empleando diferentes fosfolípidos para encapsular extracto de licopeno obtenido mediante fluidos supercríticos se muestran en la figura 23. Obteniendo valores del 9,0 % para DMPC, 9,3 % para asolecitina de soya, 28,4 % para HEL y 30,9 % DPPC. Se realizó una prueba de múltiples rangos obteniendo dos grupos homogéneos como se muestra en la figura 23 marcados con las letras a y b.

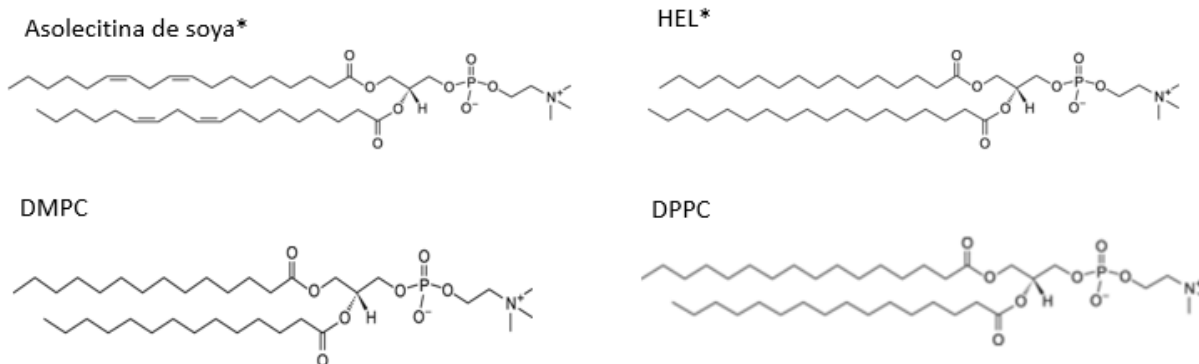
Figura 23. Eficiencias de encapsulación para los sistemas liposomales de licopeno. Cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar ($n=3$). Los fosfolípidos marcados con las mismas letras no presentan diferencias significativas de las medias con un nivel del 95% de confianza.



Teniendo en cuenta que todos los fosfolípidos utilizados presentan el mismo grupo colina se atribuye la diferencia obtenida a la cadena de los ácidos grasos presentes en cada uno de los fosfolípidos. La diferencia principal entre los fosfolípidos naturales se encuentra en su composición lipídica, para la asolecitina de soya se reporta como especie mayoritaria en un 64 % un ácido graso poliinsaturado, el ácido linoleico (C18:2), seguido por 13% de ácido palmítico (C16:0) y un 10 % de ácido oleico (C18:1) (Sigma-Aldrich, s.f) mientras que para HEL la especie mayoritaria corresponde a un ácido graso saturado, un 61% de ácido esteárico (C18:0) seguido por ácido palmítico (C16:0) en un 32% (Avanti Lipids Polar, 2016). Teniendo en cuenta la facilidad de los ácidos grasos poliinsaturados para experimentar reacciones de peroxidación (Tan et al., 2014, 1235; Vemuri & Rhodes, 1995, 102), puede justificarse porque la asolecitina de soya presentó el porcentaje más bajo de eficiencia comparado con HEL. En el caso de los fosfolípidos de origen sintético se observa que ambos presentan el mismo nivel de saturación en la composición lipídica (Figura 24), la

diferencia se observa en el número de carbonos que conforman la cadena de ácidos grasos, para el DMPC 14 átomos de carbono (ácido mirístico) y para el DPPC, 16 átomos de carbono (ácido palmítico), esta diferencia se ve reflejada en el espacio que tendría el licopeno para estar encapsulado y en los valores de las temperaturas de transición de fase.

Figura 24. Estructuras químicas de los fosfolípidos empleados en la encapsulación de licopeno.



*Para asolecitina de soya y lecitina hidrogenada de huevo (HEL) se muestran las estructuras de las especies predominantes. Estructuras químicas tomadas de <http://www.avantilipids.com/>.

Estudios han reportado que la localización del licopeno en los liposomas está dirigida a la parte final de las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Tan et al., 2014, 1233), por lo cual, al incrementar el número de carbonos, aumenta el tamaño de la cadena hidrocarbonada y por ende al crearse una estructura esférica (vesícula liposomal) se incrementa el volumen (espacio) para contener el material encapsulante (licopeno).

Otro parámetro que es modificado al aumentar el número de carbonos en las cadenas de ácidos grasos es la temperatura de transición de fase, la cual hace

referencia a la transición que experimentan las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos de su estructura ordenada (gel) a una de mayor fluidez (líquido cristalina) y a la permeabilidad y estabilidad de los liposomas (Vemuri & Rhodes, 1995, 101), para el DMPC se reporta una temperatura de transición de 23°C y para el DPPC de 41°C, lo cual podría sustentar junto con la explicación del incremento del espacio para el material encapsulante porque de los dos fosfolípidos sintéticos el DPPC presentó una mayor eficiencia de encapsulación.

Aunque no se obtuvo diferencias significativas entre los dos fosfolípidos que presentaron los porcentajes más altos de eficiencia de encapsulación se seleccionó el DPPC, de origen sintético teniendo en cuenta la ventaja que ofrece esta clase de fosfolípidos al tener una composición más precisa y homogénea (Van & Wendel, 2014, 1096).

Caracterización de los liposomas y estabilidad en el tiempo

En la tabla 11 se muestra la caracterización realizada para los liposomas vacíos y con carga (extracto de licopeno) en dos tiempos, (t_0) tiempo inicial y después de 20 días de almacenamiento (t_{20}). Al finalizar este periodo, se determinó el contenido encapsulado encontrándose un 20% del contenido inicial de licopeno encapsulado.

El tamaño obtenido para las partículas de ambas suspensiones liposomales (sin y con licopeno) permitió clasificarlas como vesículas unilamelares grandes, por sus siglas en inglés LUV (Large Unilamellar Vesicles), las cuales en dependencia de la membrana utilizada pueden oscilar entre 80- 400 nm (Lanio et al., 2009, 24).

Tabla 12. Tamaño de partícula y potencial z para los liposomas vacíos y cargados con licopeno almacenados a 4°C durante 20 días en oscuridad.

Muestra	Diámetro promedio (nm)			Índice de Polidispersidad (PD)			Potencial Z Promedio ζ (mV)		
	t_0	t_{20}	ΔD (nm)	t_0	t_{20}	ΔPD	t_0	t_{20}	$\Delta \zeta$ (mV)
Liposomas Vacíos (DPPC)	89.1	126.7	37.6	0.224	0.263	0.039	-11.58	-2.05	9.53
Liposomas cargados (DPPC-Lycopeno)	166.3	243.9	77.6	0.223	0.323	0.100	-30.48	-39.78	-9.3*

(t_0) :tiempo inicial (t_{20}):tiempo de 20 días. *El signo negativo en el $\Delta \zeta$ indica que el cambio se efectuó hacia valores negativos.

Se analizaron a tiempo inicial los tres parámetros de estudio, tamaño (diámetro promedio), índice de polidispersidad, y potencial z (ζ), como se muestra en la tabla 11 la incorporación de licopeno presentó un aumento importante en el diámetro promedio de la partícula sin embargo este no generó un incremento en el índice de polidispersidad, indicando así que se mantuvo una dispersión homogénea en la suspensión liposomal, el índice de polidispersidad es una medida de la homogeneidad de la dispersión en un rango de 0-1, así valores entre 0-0,3 indican una dispersión relativamente homogénea (Tan et al., 2013, 8178), además del diámetro promedio, el potencial z de las partículas liposomales también aumentó debido a la incorporación de licopeno, de manera general valores por encima de + 30 mV y por debajo de - 30 mV son indicativos de la estabilidad de las suspensiones coloidales e incrementan la uniformidad a través de las fuerzas de repulsión entre las partículas (Tan et al., 2013, 8178).

Al finalizar el estudio (t_{20}) se observó un incremento en el diámetro promedio tanto para las partículas vacías como para las cargadas con licopeno, expresando así un efecto de agregación o fusión de las partículas durante el almacenamiento, no

obstante el cambio fue mayor para las partículas cargadas con licopeno (ΔD en tabla 12), resultados similares fueron reportados por Tan et al., (2014, 1236), en su estudio de sistema de liberación con diferentes carotenos, encontraron que las partículas liposomales cargadas con licopeno generaron mayor incremento en el tamaño del diámetro comparado con las partículas vacías, en otro estudio se reportó un incremento del 20- 25 % después de 30 días de almacenamiento a 4°C para liposomas cargados con luteína (Tan et al., 2013, 8178).

El índice de polidispersidad del liposoma vacío en los 20 días de almacenamiento no mostró una diferencia apreciable, caso contrario al incremento reflejado en los liposomas cargados con licopeno en el que se obtuvo un PD: 0,323 indicando así una suspensión liposomal poco homogénea.

En el tiempo de almacenamiento ambas suspensiones liposomales presentaron variación en el potencial z, como se muestra en la tabla 11 los liposomas sin carga presentaron un incremento hacia la región del cero, mientras que las suspensiones cargadas con licopeno incrementaron de manera negativa su valor evidenciando así un efecto con la incorporación del licopeno en la membrana liposomal.

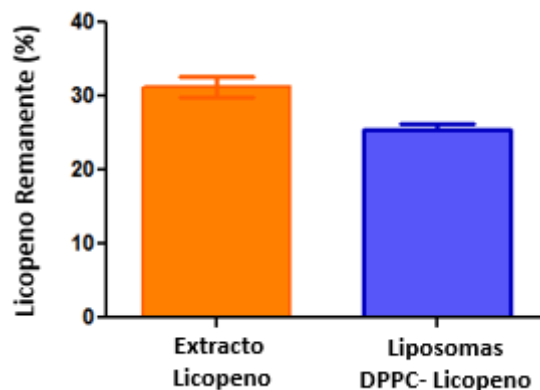
Efecto térmico en el contenido de licopeno

En la figura 25 se muestra el comportamiento de las suspensión liposomal DPPC-Licopeno frente al tratamiento térmico en comparación con el extracto de licopeno sin encapsular, mediante un análisis ANOVA, con un valor de $p < 0,05$ en la prueba-F se encontró que existe una diferencia significativa entre las medias de los dos tratamientos con un nivel de confianza del 95,0% y que los fosfolípidos no ejercieron un

efecto protector para el extracto, por el contrario propiciaron en él la disminución de su contenido.

Los lípidos, componentes mayoritarios de las formulaciones liposomales presentan dos rutas principales de degradación, la hidrólisis y la peroxidación lipídica, (Vemuri & Rhodes, 1995, 105). Se ha reportado que los lípidos son hidrolizables a las altas temperaturas de esterilización (121°C) (Vemuri & Rhodes, 1995, 104) lo cual conlleva a que las suspensiones liposomales sean bastante termolábiles. En el estudio se utilizó DPPC, el cual en su estructura está compuesto por el ácido palmítico (C16:0) que aunque no presenta insaturaciones en su estructura química que promuevan la peroxidación lipídica, al ser hidrolizado a estas temperaturas posiblemente haya generado compuestos que causen cambios tanto en la permeabilidad de las bicapas de los liposomas generando una mayor exposición del licopeno (compuesto encapsulado) al medio como por la interacción de estos con el licopeno (compuesto altamente insaturado), promoviendo en ambos casos la degradación oxidativa del licopeno que como se mencionó anteriormente (sección de esterilización para las micropartículas de secado por aspersión) a elevadas temperaturas es la principal ruta de degradación del licopeno.

Figura 25. Contenido de licopeno después del proceso de esterilización (120°C, 15 min, 15 psi) para el extracto sin encapsular y para el sistema liposomal DPPC-Lycopeno.



Perfil de liberación de licopeno

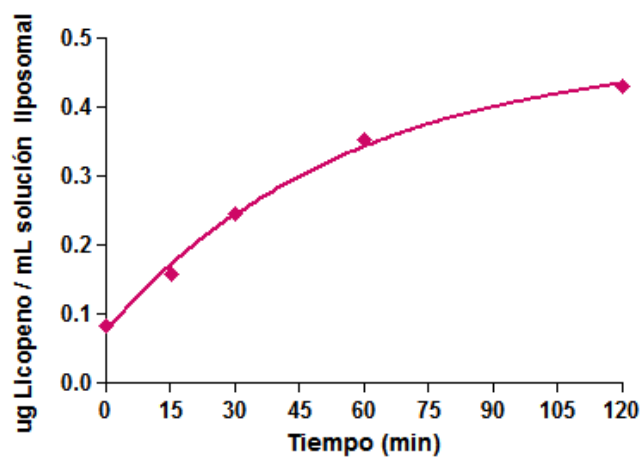
Para analizar el perfil de liberación de licopeno a pH neutro se utilizó el modelo exponencial descrito en la sección de perfil de liberación de licopeno para las micropartículas de secado por aspersión. En la figura 26 se muestra el perfil de liberación de licopeno durante dos horas a pH 7,0. Se determinó mediante el modelo los parámetros mostrados en la tabla 12, los resultados obtenidos se ajustan al modelo seleccionado con un valor de R^2 de 0,9964.

Tabla 13. Parámetros del modelo exponencial utilizado en la liberación de licopeno proveniente de la suspensión liposomal DPPC-Extracto de licopeno.

Parámetro	Valor	SD	Explicación del parámetro según modelo
Yo	0,07553	0,01103	Contenido de licopeno liberado a tiempo inicial
Plateu	0,4812	0,02665	Estimación del contenido de licopeno liberado a tiempo infinito
K	0,01801	0,002740	Constante de velocidad de liberación
Span	0,4057	0,02510	Parámetro obtenido al calcular la diferencia entre plateu y Yo
$t_{1/2}$	38,49		Parámetro obtenido al calcular $\ln 2/k$

Yo, Plateu y Span están expresados como μg Licopeno liberado / mL solución liposomal, el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) en minutos y la constante de velocidad (k) minutos⁻¹.SD: Desviación Estándar.

Figura 26. Perfil de liberación de licopeno a 37 °C y pH 7.0 desde la suspensión liposomal preparada con DPPC.



Conclusiones

- La cinética de extracción permitió establecer el tiempo adecuado de extracción de licopeno a partir de residuos agroindustriales de tomate y calcular la solubilidad del compuesto, los valores respectivos fueron: 180 minutos y 3,48 mg licopeno/ Kg CO₂ a 75°C y 25 MPa. Por su parte, las condiciones óptimas de extracción de licopeno en el intervalo de presión y temperatura evaluados fueron 80°C y 25 MPa, con un flujo de 100 g CO₂/min, obteniendo así un rendimiento de 166,75 µg licopeno/ g material seco, encontrando que la temperatura fue el único parámetro que presentó una influencia significativa sobre el rendimiento de licopeno pudiéndose explicar por el aumento en la presión de vapor del licopeno debido al incremento en la temperatura durante el proceso de extracción SC-CO₂.

- La técnica de secado por aspersion permitió la obtención de micropartículas cargadas con licopeno. La formulación que presentó una mejor eficiencia de encapsulación fue la formulación 3 (%EE: 70), elaborada con goma arábica y maltodextrina en una proporción (2:1). Así mismo, las formulaciones 3 y 4 obtuvieron el mejor desempeño en cuanto a la cantidad de licopeno encapsulado, mientras que la formulación 1 obtuvo la tasa de degradación más alta para un tiempo de almacenamiento igual a 30 días.

- Se caracterizaron física y morfológicamente las micropartículas obtenidas por secado por aspersion para todas las formulaciones de estudio. Las características físicas presentadas estuvieron dentro del rango usual para este tipo de partículas ($A_w <$

0,5, contenido de humedad: 4-8%, tamaño: 0,6 -1,5 μ m). La micrografía realizada mostró de manera general para todas las micropartículas, superficies continuas con algunas concavidades. De igual forma, los resultados obtenidos en el análisis del perfil de liberación de licopeno en función del pH para las micropartículas obtenidas por secado por aspersión permiten proponer una formulación de liberación controlada dependiente del pH (formulación 4), lo cual puede ser de interés en aplicaciones nutraceuticas en las cuales se busque mantener la integridad de la partícula a pH ácido y promover su liberación a pH alcalino.

- En las suspensiones liposomales, los fosfolípidos que presentaron los valores más altos de eficiencia de encapsulación para el extracto de licopeno fueron el DPPC y HEL. Adicionalmente, se evaluó la estabilidad en refrigeración, así como la estabilidad térmica de la suspensión liposomal con DPPC, encontrando que en condiciones de almacenamiento refrigerado la formulación liposomal conservó un 20% del licopeno encapsulado, mientras que en la prueba de estabilidad térmica ocasionó un efecto negativo promoviendo la degradación del licopeno.

Perspectivas

- Teniendo en cuenta el impacto que podría generar en el sector industrial el desarrollo de la formulación de nano y micropartículas de licopeno extraído por fluidos supercríticos se sugiere realizar un análisis económico total del proceso, desde la etapa de recolección de los residuos agroindustriales hasta su obtención.
- Desarrollar prototipos alimentarios y/o farmacéuticos de las formulaciones microencapsuladas (en especial la formulación 4) para evaluar su factibilidad de implementación.
- Hacer pruebas *in vitro* utilizando células (Caco2) como modelo de las células epiteliales del intestino humano para evaluar la estabilidad digestiva, recepción y transporte así como el metabolismo de las micropartículas de la formulación 4 sugeridas con una posible aplicación a la industria de alimentos.

Referencias

- Acosta, S. (2014). Propiedades de films de almidón de yuca y gelatina. Incorporación de aceites esenciales con efecto antifungico [Tesis Doctoral] Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Akhavan Mahdavi, Sahar, Jafari, Seid M., Assadpoor, Elham, & Dehnad, Danial. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379–85. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011.
- Álvarez, María V., Hincapié, Sara, Saavedra, Nataly, Alzate, Luz M., Muñoz, Ana M., Jiménez Cartagena, Claudio, & Londoño-Londoño, Julián. (2015). Exploring feasible sources for lutein production: food by-products and supercritical fluid extraction, a reasonable combination. *Phytochemistry Reviews*, 14(6), 891-897. doi:10.1007/s11101-015-9434-0.
- Alvim, Izabela D. & Grosso, Carlos R. (2010). Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material, *Food Science and Technology (Campinas)*, 30(4), 1069–1076. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000400036>.
- Alzate Tamayo, Luz. M., Jiménez Cartagena, Claudio, & Londoño Londoño, Julián. (2011). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para mejorar la calidad sensorial y nutricional de productos avícolas. *Producción + Limpia*, 6(1), 108–127. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552011000100010&lng=en&tlng=es.
- AOAC. (2002). *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*. Recuperado de http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf.
- Avanti Lipids Polar. (2016) Recuperado en 07 de diciembre de 2015, de http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=343&Itemid=212&catnumber=840059.
- Balachandran, B., & Rao, A. V. (2003). Time-dependent uptake and antiperoxidative potential of lycopene in multilamellar liposomes, 36, 611–616. doi:10.1016/S0963-9969(03)00011-5.
- Bakal, Susant B., Sharma, Sharma, Gyanendra P., Sonawane, Sommath P., & Verma, Radhachran. C. (2012). Kinetics of potato drying using fluidized bed dryer. *Journal of Food Science and Technology*, 49(5), 608–13. doi:10.1007/s13197-011-0328-x.

- Baysal, T., Ersus, S., & Starmans, D. A. J. (2000). Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato paste waste. *J. Agric. Food Chem*, *48*, 5507–5511. doi: 10.1021/jf000311t.
- Borrmann, Daniela, Ferreira Leite, Selma G., & Da Rocha Leão, Maria H.M (2011). Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*) juice in Capsul®. *International Journal of Fruit Science*, *11*(4), 376–385. doi:10.1080/15538362.2011.630299.
- Casas , Elvira, Faraldi, Marianna, & Bildstein, Marie. (2008). *Manual de compuestos bioactivos a partir de residuos del procesado del tomate*. Recuperado de http://www.ainia.es/html/portal_del_asociado/2_tomate.pdf.
- Carneiro, Helena C. F., Tonon, Renata V., Grosso, Carlos R. F., & Hubinger, Miriam D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, *115*(4), 443–451. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033.
- Carranco Jáuregui, María E., Calvo Carrillo, Ma. de la Concepción, & Pérez-Gil Romo, Fernando. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *61*(3), 233-241. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222011000300001&lng=es&tlng=es.
- Ciurlia, Loredana, Bleve, Mauro, & Rescio, Leonardo. (2009). Supercritical carbon dioxide co-extraction of tomatoes (*Lycopersicon esculentum L.*) and hazelnuts (*Corylus avellana L.*): A new procedure in obtaining a source of natural lycopene. *The Journal of Supercritical Fluids*, *49*, 338–344. doi:10.1016/j.supflu.2009.03.003.
- Corporación Universitaria Lasallista. (2011). Aprovechamiento de excedentes de cosecha para la obtención de productos de valor agregado [Video]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=FqLQXEVtjYo&feature=youtu.be>.
- Del Valle, José M., & Urrego, Freddy A. (2012). Free solute content and solute-matrix interactions affect apparent solubility and apparent solute content in supercritical CO₂ extractions. A hypothesis paper. *The Journal of Supercritical Fluids*, *66*, 157–175. doi:10.1016/j.supflu.2011.10.006.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2015). Encuesta Nacional Agropecuaria ENA 2014. Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.agronet.gov.co/Paginas/estadisticas.aspx>.
- Díaz Casañas, Elaine C., Pereira-Cabral, I. Guillermo H., & Lorenzo, Wilma A. (2012). Separación de fosfolípidos mediante la aplicación de fuerzas centrífugas. *Revista Cubana de Farmacia*, *46*(1), 4–10.

- Do Nascimento, Ticiano G., De Jesus Oliveira, Eduardo, Basílio Júnior, Irinaldo D., De Araújo-Júnior, João X., & Macêdo, Rui. O. (2013). Short-term stability studies of ampicillin and cephalixin in aqueous solution and human plasma: Application of least squares method in Arrhenius equation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 73, 59–64. doi:10.1016/j.jpba.2012.04.010.
- Dorđević, Verica, Balanč, Bojana, Belščak-Cvitanović, Ana, Lević, Steva, Trifković, Kata, Kalušević, Ana, Kostić, Ivana, Komes, Draženka, Bugarski, Branko, & Nedović, Viktor. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7, 452–490. doi:10.1007/s12393-014-9106-7.
- Drusch, Stephan. (2007). Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1223–1228. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.08.007.
- Dunlop, Mark W., McAuley, Jim, Blackall, Patrick J., & Stuetz, Richard M. (2016). Water activity of poultry litter: Relationship to moisture content during a grow-out. *Journal of Environmental Management*, 172, 201–206. doi:10.1016/j.jenvman.2016.02.036.
- Edwards, Katie A., & Baeumner, Antje J. (2006). Analysis of liposomes. *Talanta*, 68, 1432–1441. doi:10.1016/j.talanta.2005.08.031.
- Egydio, Juliana A., Moraes, Ângela M., & Rosa, Paulo T. V. (2010). Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato juice and characterization of its antioxidation activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, 54, 159–164. doi:10.1016/j.supflu.2010.04.009.
- FAOSTAT. The Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014). Recuperado de <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S>.
- Fernandes, Regiane V. D. B., Borges, Soraia V., & Botrel, Diego A. (2014). Gum arabic / starch / maltodextrin / inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101, 524–532. doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.083.
- García Pereira, Annia, Muñiz Becerá, Sahylin, Hernández Gómez, Antihus, González, Lázaro M., & Fernández Valdés, Daybelis (2013). Análisis comparativo de la cinética de deshidratación osmótica y por flujo de aire caliente de la piña (*Ananas Comosus*, variedad Cayena lisa). *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 22(1), 62–69.
- Gharsallaoui, Adem, Roudaut, Gaëlle, Chambin, Odile, Voilley, Andrée, & Saurel, Rémi. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An

- overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. doi:10.1016/j.foodres.2007.07.004.
- González, Dubán. O. (2013). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales: una aproximación desde la nutrición animal*. (Tesis Ingeniería de Alimentos) Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Colombia. Recuperado de http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1032/1/Aprovechamiento_residuos_agroindustriales_producci%C3%B3n_alimentos_funcionales.pdf.
- Grosso, C., Coelho, J. P., Pessoa, F. L. P., Fareleira, J. M. N. A., Barroso, J. G., Urieta, J. S., Palabra, A.F, Sovová, H. (2010). Mathematical modelling of supercritical CO₂ extraction of volatile oils from aromatic plants. *Chemical Engineering Science*, 65(11), 3579–3590. doi:10.1016/j.ces.2010.02.046.
- Guerrero, P., Beatty, E., Kerry, J. P., & de la Caba, K. (2012). Extrusion of soy protein with gelatin and sugars at low moisture content. *Journal of Food Engineering*, 110(1), 53–59. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.12.009.
- Gümüşay, Özlem A., Borazan, Alev A., Ercal, Nuran, & Demirkol, Omca. (2015). Drying effects on the antioxidant properties of tomatoes and ginger. *Food Chemistry*, 173, 156–162. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.162.
- Jiménez-Colmenero, Francisco. (2013). Emulsiones múltiples: Compuestos bioactivos y alimentos funcionales. *Nutrición Hospitalaria*, 28(5), 1413–21. doi:10.3305/nh.2013.28.5.6673.
- Jing, S., Chai, W., Shi Hui, Gu, Xuejian. (2014). Lycopene microcapsule prepared by adopting a double-coating method and preparation method thereof. China, CN 103948565, A, (A61P37/04, A61P9/00, A23P1/04, A23L1/30, A61P39/06, A61K9/50, A61K31/01, A61P35/00), May 19, 2014, Jul 30, 2014. Recuperado de <http://www.google.com/patents/CN103948565A?cl=en>.
- Jomova, Klaudia, & Valko, Marian. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 102–10. doi:10.1016/j.ejmech.2013.09.054.
- Kalogeropoulos, Nick, Chiou, Antonia, Pyriochou, Vassiliki, Peristeraki, Anna, & Karathanos, Vaios T. (2012). Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT - Food Science and Technology*, 49(2), 213–216. doi:10.1016/j.lwt.2011.12.036.
- Lanio, M. E., Luzardo, M. C., Laborde, R., Sánchez, O., Cruz-leal, Y., Pazos, F., Tejuca, M, Valle, A. (2009a). Las vesículas liposomales: obtención , propiedades y

- aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Revista Cubana de Física*, 26(1), 23–30.
- Lanio, M. E., Luzardo, M. C., Laborde, R., Sánchez, O., Cruz-leal, Y., Pazos, F., Tejuca, M, Valle, A. (2009b). Las vesículas liposomales: obtención , propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Revista Cubana de Física*, 26(1), 23–30.
- Li, Chen, Wang, Jie, Shi, Jing, Huang, Xingjian, Peng, Qiang, & Xue, Feng. (2015). Encapsulation of tomato oleoresin using soy protein isolate-gum aracia conjugates as emulsifier and coating materials. *Food Hydrocolloids*, 45, 301–308. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.11.022.
- Li, Jing, Wang, Xuling, Zhang, Ting, Wang, Chunling, Huang, Zhenjun, Luo, Xiang, & Deng, Yihui. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81-98. doi:10.1016/j.ajps.2014.09.004.
- Londoño Londoño, Julián, A. (2010). Obtención de antioxidantes a partir de residuos de la agroindustria cítrica: una aproximación al desarrollo de hesperidina liposomal [Tesis Doctoral]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Londoño-Londoño, Julián, Lima, Vânia Rodrigues De, Jaramillo, Consuelo, & Creczynski-pasa, Tânia. (2010). Hesperidin and hesperetin membrane interaction: understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 499(1-2), 6–16. doi:10.1016/j.abb.2010.04.023.
- Lopez, Jéssica, Vega-Gálvez, Antonio, Torres, María J., Lemus-Mondaca, Roberto, Quispe-Fuentes, Issis, & Di Scala, Karina, (2013). Effect of dehydration temperature on physico-chemical properties and antioxidant capacity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73(3), 293–300. doi:10.4067/S0718-58392013000300013.
- Lupano, Cecilia E. (2013). *Modificaciones de componentes de los alimentos : cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento*. La Plata:Editorial de la Universidad de La Plata. Recuperado de <https://www.biol.unlp.edu.ar/nutricionybromatologiaF/ModificacionesComponentes.pdf>.
- Machmudah, Siti, Kawahito, Yukari, Sasaki, Mitsuru, & Goto, Motonobu. (2007). Supercritical CO₂ extraction of rosehip seed oil: Fatty acids composition and process optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 41(3), 421–428. doi:10.1016/j.supflu.2006.12.011.
- Machmudah, Siti, Winardi, Sugeng, Sasaki, Mitsuru, Goto, Motonobu, Kusumoto, Nami, & Hayakawa, Kiro. (2012). Lycopene extraction from tomato peel by-product

- containing tomato seed using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 108, 290–296. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.08.012.
- Madhav Satheesh, N. V., & Kala, Shivani. (2011). Review on microparticulate drug delivery system. *International Journal of PharmTech Research*, 3(3), 1242–1254. Recuperado de 2015, de [http://sphinxesai.com/Vol.3No.3/pharm/pdf/PT=05\(1242-1254\)JS11.pdf](http://sphinxesai.com/Vol.3No.3/pharm/pdf/PT=05(1242-1254)JS11.pdf).
- Matioli, Graciette, & Rodriguez-Amaya, Delia B. (2002). Licopeno encapsulado em goma arábica e maltodextrina: Estudo da estabilidade. *Brazil Journal and Food Technology*, 5, 197–203.
- Mattea, Facundo, Martín, Ángel, & Cocero, María J. (2009). Carotenoid processing with supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, 93, 255–265. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.01.030.
- Mitri, Khalil, Shegokar, Ranjita, Gohla, Sven, Anselmi, Cecilia, & Müller, Rainer H. (2011). Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 414, 267–275. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.008.
- Nesterenko, Alla, Alric, Isabelle, Silvestre, Françoise, & Durrieu, Vanessa (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469–479. doi:10.1016/j.indcrop.2012.06.035.
- Nobre, Beatriz P., Palavra, António F., Pessoa, Fernando L.P., & Mendes, Rui L. (2009). Supercritical CO₂ extraction of trans-lycopene from Portuguese tomato industrial waste. *Food Chemistry*, 116, 680–685. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.011.
- Nunes, Juliana C., Lago, Mabel G., Castelo-Branco, Vanessa N., Oliveira, Felipe R., Torres, Alexandre G., Perrone, Daniel, & Monteiro, M. (2016). Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. *Food Chemistry*, 197, 881–890. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.050.
- Nyam, Kar L., Tan, Chin P., Karim, Roselina, Lai, Oi M., Long, Kamariah, & Man, Yaakob B. C. (2010). Extraction of tocopherol-enriched oils from Kalahari melon and roselle seeds by supercritical fluid extraction (SFE-CO₂). *Food Chemistry*, 119, 1278–1283. doi:10.1016/j.foodchem.2009.08.007.
- Ochoa-Reyes, Emilio, Ornelas-Paz, Jose de Jesús, Ruiz-Cruz Saúl, Ibarra-Junquera, Vrani, Pérez-Martínez, Jaime D., Guevara-Arauz, Juan C., & Aguilar, Cristobal N. (2012). Tecnologías de deshidratación para la preservación de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista de Ciencias Biológicas Y de La Salud*, 15(2), 39–46.

- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2013). *Utilización de los residuos de la industria del tomate para la obtención de compuestos bioactivos*. Recuperado de <http://www.agrimundo.cl/?publicacion=utilizacion-de-los-residuos-de-la-industria-del-tomate-para-la-obtencion-de-compuestos-bioactivos>.
- Okonogi, Siriporn, & Riangjanapatee, Pornthida. (2015). Physicochemical characterization of lycopene-loaded nanostructured lipid carrier formulations for topical administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 478, 726–735. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.002.
- Parra Huertas, Ricardo Adolfo. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 63(2), 5669–5684. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1799/179918602020.pdf>.
- Patil, Yogita. P., & Jadhav, Sameer. (2014). Review Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8–18. doi:10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011.
- Podczec, F. (2009). Gelatin. En Rowe, Raymond C., Sheskey, Paul J., & Quinn, Marian E., (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (6th ed., pp. 278–281). Londres: Pharmaceutical Press.
- Peralta Bohóquez, Andres F. (2010). *Desodorización y despigmentación de pulpa de guayaba (P. guajava L.)*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Colombia.
- Perea Flores, María de Jesús. (2011). Efecto del secado por lecho fluidizado en la estructura de semillas de *Ricinus communis* y en la extracción de su aceite como fuente alternativa de biocombustibles. [Tesis Doctoral]. Instituto Politécnico Nacional, México D.F.
- Perretti, G., Troilo, A., Bravi, E., Marconi, O., Galgano, F., & Fantozzi, P. (2013). Production of a lycopene-enriched fraction from tomato pomace using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82, 177–182. doi:10.1016/j.supflu.2013.07.011.
- Popovska, Olga, Simonovska, Jana, Kavrakovski, Zoran, & Rafajlovska, Vesna. (2013). An Overview: methods for preparation and characterization of liposomes as drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 3(3), 182–189.
- Quek, Siew Y., Chok, Ngan. K., & Swedlund, Peter. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46, 386–392. doi:10.1016/j.cep.2006.06.020.

- Rahman, Mohammad. S. (2009). Food stability beyond water activity and glass transition: macro-micro region concept in the state diagram. *International Journal of Food Properties*, 12(4), 726–740. doi:10.1080/10942910802628107.
- Ramírez, Carolina, Olarte, Ermel, Téllez, Eliana, & Palma, Marien. (2013). Validación del método analítico para la determinación de mercurio total en sangre humana por espectrofotometría de absorción atómica Zeeman RA-915 + con el módulo de pirólisis PYRO-915. *Revista Colombiana de Química*, 42(3), 11-16.
- Rocha, Glauca A., Fávaro-Trindade, Carmen S., & Grosso, Carlos Raimundo F. (2012). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioprocess Processing*, 90, 37–42. doi:10.1016/j.fbp.2011.01.001.
- Rocha-Selmi, Glauca A., Favaro-Trindade, Carmen S., & Grosso, Carlos Raimundo F. (2013). Morphology, stability, and application of lycopene microcapsules produced by complex coacervation. *Journal of Chemistry*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/982603>.
- Roldán-Gutiérrez, Jannat M., Luque de Castro, María D. (2007). Lycopene: The need for better methods for characterization and determination, *Trends in Analytical Chemistry*, 26(2), 163–170. doi:10.1016/j.trac.2006.11.013.
- Romo-Hualde, A., Yetano-Cunchillos, A. I., González-Ferrero, C., Sáiz-Abajo, M. J., & González-Navarro, C. J. (2012). Supercritical fluid extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red pepper (*Capsicum annum* L.) by-products. *Food Chemistry*, 133, 1045–1049. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.062.
- Rozzi, N. L. R., Ingh, R. K. S., Ierling, R. A. V, & Atkins, B. A. W. (2002). Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2638–2643. doi: 10.1021/jf011001t.
- Ruano Aldea, Marta. (2013). *Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas*. [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Recuperado de <http://eprints.ucm.es/18042/1/T34218.pdf>.
- Sabín Fernández, Juan D. (2007). *Estabilidad Coloidal de Nanoestructuras Liposómicas*. [Tesis Doctoral]. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Chile.
- Sagar, V. R., Suresh Kumar P., (2010). Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables : a review, *Journal Food Science Technology*, 47(1), 15–26.

- Santana-Méridas, Omar, González-Coloma, Azucena, & Sánchez-Vioque, Raúl. (2012). Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochemistry Reviews*, 11, 447–466. doi:10.1007/s11101-012-9266-0.
- Shi, J., Xue, Jun, Jiang, Y., Ye, X. (2013). 20-Supercritical-fluid extraction of lycopene from tomatoes. En Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Separation, extraction, and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries (619–645). Recuperado de <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/B9781845696450500207>.
- Shi, John, G., Le Maguer, Marc & Bryan, Mike. (2002). Lycopene from tomatoes. En Shi, J., Mazza, G., Le Maguer, M. (Eds), *Functional foods. Biochemical and processing aspects. Volumen 2* (pp.135–167). Londres: CRC Press.
- Shi, John, Kakuda, Yukio, Jiang, Yueming, & Mittal, Gauri S. (2007). Stability of lycopene during food processing. En Shi, J. (Eds) *Functional food ingredients and nutraceuticals. Processing technologies* (pp.353–370). Londres: CRC Press.
- Shu, Bo, Yu, Wenli, Zhao, Yaping, & Liu, Xiaoyong. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 76, 664–669. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.062.
- Sigma-Aldrich.(s.f) Product Information. L-a-Phosphatidylcholine. Recuperada de http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p7443pis.pdf.
- Sipai Altaf B., M., Vandana Yaday, Mamatha, & Prasanth, V.V. (2012). Liposomes: An overview. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 1(1), 13–21.
- Soukoulis, Christos, & Bohn, Torsten. (2015). A comprehensive overview on the micro- and Nano-technological encapsulation advances for enhancing the chemical stability and bioavailability of Carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398, 1549-7852. doi:10.1080/10408398.2014.971353. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26065668>.
- Sun, Xiuzhi S. (2005). *Thermal and mechanical properties of soy proteins*. En E. Academic Press (Ed.), *Bio-Based Polymers and Composites* (pp. 292–326) Recuperado de <http://store.elsevier.com/Bio-Based-Polymers-and-Composites/Richard-Wool/isbn-9780127639529>.
- Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2014). Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review. *Food Research International*, 65, 311–321. doi:10.1016/j.foodres.2014.09.032.

- Tan, Chen, Xia, Shuqin, Xia, Xue, Jin, Xie, Jiehong, Feng, Biao & Zhang, Xiaoming. (2013). Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 8175–84. doi:10.1021/jf402085f.
- Tan, Chen, Xue, Jin, Lou, Xiaowei, Abbas, Shabbar, Guan, Yu, Feng, Biao, Zhang, Xiaoming, & Xia, Shuqin. (2014a). Liposomes as delivery systems for carotenoids: comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release. *Food & Function*, *5*, 1232–1240. doi:10.1039/c3fo60498e.
- Tan, Chen, Xue, Jin, Lou, Xiaowei, Abbas, Shabbar, Guan, Yu, Feng, Biao, Zhang, Xiaoming, & Xia, Shuqin. (2014b). Liposomes as delivery systems for carotenoids: comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release. *Food & Function*, *5*, 1232–1240. doi:10.1039/c3fo60498e.
- Tan, Chen, Zhang, Yating, Abbas, Shabbar, Feng, Biao, Zhang, Xiaoming, & Xia, Shuqin. (2014). Modulation of the carotenoid bioaccessibility through liposomal encapsulation. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, *123*, 692–700. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.10.011.
- Tang, Chuan-He, Choi, Siu-Mei, & Ma, Ching-Yunh. (2007). Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry, *40*, 96–104. doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.06.013.
- Tang, Chuan.-He, & Li, Xin-Rong. (2013). Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Research International*, *52*, 419–428. doi:10.1016/j.foodres.2012.09.010.
- Toledo Hijo, Ariel A. C., da Costa, Joyce M. G., Silva, Eric K., Azevedo, Viviane M., Yoshida, Maria I., & Borges, Soraia V. (2015). Physical and thermal properties of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil microparticles. *Journal of Food Process Engineering*, *38*(15), 1–10. doi: 10.1111/jfpe.12120.
- Topal, Ummihan, Mitsuru, Sasaki, Goto, Motonobu & Hayakawa, Kiro. (2006). Extraction of lycopene from tomato skin with supercritical carbon dioxide : effect of operating conditions and solubility analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(15), 5604–5610. doi: 10.1021/jf0606407.
- Vági, E., Simándi, B., Vásárhelyiné, K.P., Daood, H., Á. Kéry, Doleschall, F., & Nagy, B. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *The Journal of Supercritical Fluids*, *40*, 218–226. doi:10.1016/j.supflu.2006.05.009.
- Valenzuela B., Alfonso, Valenzuela B., Rodrigo, Sanhueza C., Julio, De la Barra D., Fernando, & Morales I., Gladys. (2014). Fosfolípidos de origen marino: una nueva

- alternativa para la suplementación con ácidos grasos omega-3. *Revista Chilena de Nutrición*, 41(3), 433–438.
- Van Hoogevest, Peter, & Wendel, Armin. (2014). The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European Journal of Lipid Science and Technology: EJLST*, 116, 1088–1107. doi:10.1002/ejlt.201400219.
- Vemuri, Sriram, & Rhodes, C. T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70, 95–111.
- Vergara Hinostroza, Cristina del Carmen. (2013). Extracción y estabilización de betalaínas de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) mediante tecnología de membranas y microencapsulación, como colante alimentario.[Tesis Doctoral].Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Vikrant K., Nikman, Dolas,R.T, Somwanshi, S.B., Gaware, V.M., Kotade, K.B., & Dhamak, K.B. (2011). Microparticles: A novel approach to enhance the drug Delivery- A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 3(8), 170–183.
- Vitale, Arturo A., Bernatene, Eduardo A., & Pomilio, Alberto B. (2010). Carotenoides en quimiopreención: Licopeno. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 44(2), 195–238. Recuperado en 28 de febrero de 2014, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342010000300010&lng=es&tlng=es.
- Waliszewski, Krzysztof N., & Blasco, Gabriela. (2010). Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud Pública de México*, 52(3), 254–265. Recuperado en 15 de marzo de 2014, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342010000300010&lng=es&tlng=es.
- Wijngaard, Hilde, Hossain, Mohammad B., Rai, Dilip K., & Brunton, Nigel. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, 46(2), 505–513. doi:10.1016/j.foodres.2011.09.027.
- Xue, Feng, Li, Chen, Liu, Yanlong, Zhu, Xiangwei, Pan, Sivi, & Wang, Lufeng. (2013). Encapsulation of tomato oleoresin with zein prepared from corn gluten meal. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 439–445. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.06.012.
- Xynos, Nikos, Papaefstathiou, Georgios, Psychis, Marios, Argyropoulou, Aikaterini, Aligiannis, Nektarios, & Skaltsounis, Alexios-Leandros. (2012). Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, 67, 89–93. doi:10.1016/j.supflu.2012.03.014.

- Yi, Chun, Shi, John, Xue, Sophia J., Jiang, Yueming, & Li, Dong. (2009). Effects of supercritical fluid extraction parameters on lycopene yield and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 113(4), 1088–1094. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.083.
- Zuknik, Mark H., Norulaini, Nik, N.A., & Mohd Omar, A.K. (2012). Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene: A review. *Journal of Food Engineering*, 112(4), 253–262. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.05.012.