

Formulación de nanopartículas y micropartículas de luteína extraída por fluidos supercríticos a partir de excedentes de cosecha de lechuga (*Lactuca sativa L.*) y repollo (*Brassica oleracea*).

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

María Victoria Álvarez Henao

Asesora

Luz María Álzate Tamayo

Magister en Ciencias Alimentarias y Farmacéuticas

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de Ingeniería

Ingeniería de Alimentos

Caldas – Antioquia

2016

Agradecimientos

Agradezco principalmente a Dios por todas las bendiciones que me ha regalado, y la oportunidad de compartir y conocer personas que han hecho de mí una persona diferente.

A mi familia, mi papá, mi mamá, Jose y Leo que aunque no lo crean, me dieron mucha fortaleza, y siempre han estado conmigo en todas las decisiones que he tomado.

A compañeros de maestría (y a los del salón de posgrado) que se han convertido en amigos y me han brindado apoyo durante todo este proceso formativo, con sus conocimientos, con sus valiosos puntos de vista, y con su voz para decir ya falta poco.

A los compañeros de laboratorio, con los cuales me he sentido muy mimada, asesorada y acompañada, en la realización de mis ensayos, por el tiempo dedicado y por los espacios que me daban para que aprovechara a realizar mediciones en los equipos.

A mis profesores de maestría que me dieron bases en el desarrollo de sus asignaturas que me permitieron complementar este proyecto de investigación.

A mi asesora Luzma y al profesor Julián Londoño que me brindaron todos sus conocimientos sin restricciones, para formarme mejor como persona, estudiante e investigadora.

A los evaluadores de este trabajo por sus observaciones y sus aportes me ayudaron a ampliar la visión que tenía de este proyecto, encontrando más expectativas.

Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 9 |
| Introducción..... | 11 |
| Justificación..... | 14 |
| Objetivos | 16 |
| General | 16 |
| Específicos..... | 16 |
| Marco Conceptual | 17 |
| Residuos agroindustriales..... | 17 |
| Carotenoides..... | 17 |
| Luteína..... | 22 |
| Métodos de extracción de carotenoides | 28 |
| Extracción por solventes..... | 28 |
| Extracción por fluidos supercríticos | 28 |
| Encapsulación..... | 30 |
| Microencapsulación por atomización..... | 34 |
| Nanoencapsulación mediante liposomas | 34 |
| Rendimiento de encapsulación..... | 38 |
| <i>Por secado por atomización</i> | 38 |
| <i>Por liposomas</i> | 38 |

| | |
|--|----|
| Metodología | 40 |
| Secado y molienda de material vegetal (repollo y lechuga) | 40 |
| Validación de la metodología para determinación de luteína por HPLC | 41 |
| Cromatografía..... | 41 |
| Preparación de estándares y soluciones | 42 |
| Cuantificación | 43 |
| Extracción por FSC | 44 |
| Microencapsulación del extracto de FSC por medio de secado por atomización | 46 |
| Caracterización de las micropartículas | 47 |
| Eficiencia de encapsulación | 47 |
| Tamaño de partícula..... | 49 |
| Determinación de la actividad de agua (Aw) | 49 |
| Humedad | 49 |
| Microscopía óptica | 50 |
| Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 50 |
| Preparación de liposomas..... | 51 |
| Caracterización de los liposomas | 52 |
| Tamaño de partícula..... | 52 |
| Potencial z | 53 |
| Eficiencia de encapsulación por liposomas | 53 |

| | |
|---|----|
| Estudio de estabilidad de los extractos encapsulados..... | 54 |
| Microcápsulas..... | 54 |
| Liposomas | 54 |
| Resultados y discusiones..... | 56 |
| Validación de la metodología para determinación de luteína por HPLC. | 56 |
| Extracción por FSC..... | 58 |
| Microencapsulación del extracto por secado por atomización. | 63 |
| Morfología de micropartículas..... | 66 |
| Estudio de estabilidad micropartículas..... | 69 |
| Encapsulación por liposomas y caracterización:..... | 71 |
| Estudio de estabilidad de liposomas..... | 74 |
| Conclusiones..... | 80 |
| Referencias | 82 |

Lista de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Fuentes de obtención y funciones principales de carotenoides más comúnmente encontrados en los alimentos | 21 |
| Tabla 2. Diferentes productos que contienen luteína existentes en el mercado, nombres comerciales, presentación y fabricantes | 24 |
| Tabla 3. Métodos de encapsulación más comunes, ventajas y desventajas de su uso | 32 |
| Tabla 4. Nombres y estructuras de algunos fosfolípidos naturales y sintéticos..... | 36 |
| Tabla 5 Factores a tener en cuenta para cálculo de la proporción de harinas lechuga: repollo | 41 |
| Tabla 6. Diseño de experimentos para las extracciones de luteína mediante FSC a partir de la mezcla de lechuga:repollo..... | 45 |
| Tabla 7. Diseño de mezclas. Agentes encapsulantes para secado por atomización ... | 46 |
| Tabla 8. Resumen de los parámetros de validación realizados en el método cromatográfico | 56 |
| Tabla 9. Diseño de experimentos para las extracciones variables de respuesta rendimiento total y cantidad de luteína..... | 59 |
| Tabla 10. Caracterización de formulaciones realizadas por secado por atomización .. | 64 |
| Tabla 11. Tamaño de partículas de las diferentes proporciones molares (0,5, 1 y 2) con los fosfolípidos HEPC y DMPC..... | 73 |
| Tabla 12. Potencial Z de las diferentes proporciones molares (0,5, 1 y 2) con los fosfolípidos HEPC y DMPC..... | 74 |
| Tabla 13. Cambio del potencial Z de liposomas de HEPC con luteína en el tiempo.... | 78 |
| Tabla 14. Cambio del potencial Z de liposomas de DMPC y luteína en el tiempo | 78 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura química de algunos carotenos a. α -caroteno, b. β -caroteno, c. γ -caroteno, d. Licopeno..... | 19 |
| Figura 2. Estructuras de algunas xantofilas. a. Luteína, b. Zeaxantina, c. Criptoxantina, d. astaxantina..... | 20 |
| Figura 3. Proceso de elaboración de liposomas por método de hidratación de película..... | 51 |
| Figura 4. Cromatograma de identificación de luteína y B-caroteno en lechuga y repollo..... | 57 |
| Figura 5. Superficies de respuesta de la extracción de luteína por fluidos supercríticos..... | 60 |
| Figura 6. Cinética de extracción de oleoresina y de luteína a partir de lechuga:repollo en el tiempo..... | 63 |
| Figura 7. Estabilidad de las formulaciones 1 y 3 obtenidas por secado por atomización y extracto obtenido por FSC a condiciones de a 40°C y 75% humedad relativa..... | 70 |
| Figura 8. Proporción molar de fosfolípido utilizados/luteína vs % Encapsulación..... | 71 |
| Figura 9. Estabilidad de liposomas con luteína y solución de luteína sin encapsular a 4°C a través de tiempo..... | 75 |
| Figura 10. Estabilidad de tamaño de liposomas de HEPC en el tiempo a condiciones de refrigeración..... | 76 |
| Figura 11. Estabilidad de tamaño de liposomas de DMPC en el tiempo a condiciones de refrigeración..... | 77 |

Lista de imágenes

| | |
|--|----|
| Imagen 1. Agentes encapsulantes vistos por microscopia óptica (izquierda) y por SEM (derecha). a) Almidón Modificado, b) Goma arábica y c) maltodextrina..... | 67 |
| Imagen 2. Mejores formulaciones de encapsulación de luteína en secado por atomización vistas por microscopia óptica (izquierda) y por SEM (derecha). a) Formulación 1 y b) formulación 3 | 68 |

Resumen

Entre los excedentes de cosecha que más se generan en Colombia, se encuentran los de hoja, tales como la lechuga y el repollo, a los cuales se les ha dado un inadecuado manejo, siendo algunas veces dispuestos en botaderos a cielo abierto o en afluentes de agua, lo que ocasiona daños en el ambiente, y otras veces llevados a productos de poco valor agregado como lo es el compostaje. La lechuga y el repollo, contienen luteína, un compuesto con actividad antioxidante, que puede ayudar a prevenir algunas enfermedades, entre ellas la más destacada es la degeneración macular relacionada a la edad; sin embargo, cuando se extrae luteína esta se vuelve altamente inestable en presencia de oxígeno, temperaturas altas, pH, metales, entre otros factores, por lo cual se ve la necesidad de protegerla. Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue obtener una formulación de nanopartículas y micropartículas de luteína extraída por fluidos supercríticos a partir de excedentes de cosecha de lechuga (*lactuca sativa l.*) y repollo (*brassica oleracea*). La luteína fue extraída mediante la tecnología de fluidos supercríticos, para escoger la mejor condición de extracción de luteína, se realizó un diseño factorial de superficie de respuesta variando la presión y temperatura, calculando el rendimiento total del extracto y la cantidad de luteína en dicho extracto. Luego de esto, el extracto fue encapsulado por dos metodologías, secado por atomización y liposomas. Para el secado se realizó un diseño de mezclas, caracterizando cada una de las formulaciones en cuanto a rendimiento de secado, eficiencia de encapsulación, A_w , humedad y tamaño de partícula. Para los liposomas se escogieron dos fosfolípidos uno natural y otro sintético, variando la proporción de cada fosfolípido con la cantidad de extracto

adicionado, evaluando la eficiencia de encapsulación, el tamaño de partícula y el potencial Z. Además, se evaluó la estabilidad de la luteína en las mejores formulaciones del secado por aspersión y de liposomas a condiciones aceleradas y en refrigeración, respectivamente. La mejor condición de extracción por fluidos supercríticos fue de 350 bar y 65 °C, con un rendimiento de 9,42 mg luteína/g extracto. Las mezclas de agentes encapsulantes llevadas a cabo en el secado por atomización demostraron que la formulación 1 y 3 (goma arábica y mezcla de goma arábica: maltodextrina: almidón modificado, respectivamente) fueron las que mejor encapsularon el extracto de luteína en un porcentaje del $91,94 \pm 6,88$ y $65,72 \pm 0,93$ respectivamente. En la encapsulación por liposomas, la mejor proporción de fosfolípidos/luteína, fue de 2:1 para el fosfolípido dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) y 1:1 para fosfatidilcolina hidrogenada de huevo (HEPC). Tanto la encapsulación por secado por atomización como los liposomas mostraron proteger el extracto de luteína en el medio que fueron evaluados. De acuerdo a los resultados, la obtención de luteína a partir de excedentes de cosecha de lechuga y repollo, se puede considerar como una alternativa para la generación de productos de alto valor agregado; con compuestos bioactivos, que pueden ser utilizados en diferentes industrias.

Palabras Clave: Excedentes de cosecha, luteína, encapsulación, estabilidad, extracción por fluidos supercríticos

Introducción

En los últimos años, varios investigadores han dirigido su atención en el aprovechamiento de residuos agroindustriales y los excedentes de cosecha, con el fin de obtener diferentes compuestos bioactivos, los cuales han sido asociados con la reducción de enfermedades tales como cardiovasculares, neurodegenerativas, ciertos tipos de cáncer, inflamación, cataratas y degeneración macular (Ribeiro da Silva et al., 2014, 398). En Colombia, se producen una gran diversidad de frutas y verduras, las cuales en ocasiones se convierten en excedentes de cosecha, debido a las operaciones preliminares de comercialización. Sin embargo estos excedentes de cosecha tienen un inadecuado manejo, muchas veces debido a los altos costos que trae darles una disposición adecuada, convirtiéndose así en un problema de contaminación dado que suelen ser arrojados en fuentes de agua o botaderos a cielo abierto, ocasionando un daño no solo ambiental sino también de salud pública. Es así, como llama la atención el volumen de generación de residuos principalmente de repollo y la lechuga, en lugares como la Central Mayorista de Antioquia, donde se originan alrededor de 3.69 y 8.17 m³ diarios respectivamente (Alzate Tamayo, 2013, 55); con los cuales se busca la oportunidad de obtener compuestos bioactivos, como opción de tener productos con valor agregado, para futuras aplicaciones en industrias de alimentos, cosmética o farmacéutica.

Uno de los compuestos bioactivos presentes en la lechuga y el repollo, que ha despertado gran interés es la luteína; esta se encuentra principalmente en vegetales de hojas verdes oscuras (Aruna, Mamatha, & Baskaran, 2009, 632), la cual tiene una acción antioxidante, previniendo la generación macular relacionada a la edad (Khalil et

al., 2012, 603). Es por ello que el uso de formulaciones que contienen luteína en los suplementos nutricionales ha ganado creciente popularidad (Kumar Tiwary, Kumar, Kumar Nanda, & Chakraborty, 2014, 176), aumentando así rápidamente su demanda (Xin-yu, Long-sheng, & Chun-shan, 2005, 306), esperando que el mercado mundial para el consumo de luteína aumente a US \$ 308 millones en 2018 (Lin, Lee, & Chang, 2014, 1).

Para obtener este compuesto, se han realizado diferentes metodologías de extracción entre ellas se encuentran la extracción con solventes orgánico y fluidos supercríticos. La extracción por solventes orgánicos, puede dejar trazas de los solventes utilizados, que contaminan potencialmente el ambiente (Gao et al., 2010, 214) y puede ocasionar daños en la salud a largo plazo. Una forma de obtener este compuesto de forma más limpia y segura, es por medio de la tecnología de fluidos supercríticos, la cual consiste en llevar el fluido hasta el punto supercrítico, por medio de temperatura y presión, permitiendo mayor interacción con la matriz y extrayendo más selectivamente el compuesto de interés. El CO₂ supercrítico, es usado para la extracción de antioxidantes de diferentes materiales, además protege térmicamente los compuestos ofreciendo un producto libre de solventes (Gong, Plander, Xu, Simandi, & Gao, 2011, 2875).

Sin embargo, cuando la luteína es extraída de su matriz, se convierte en un compuesto altamente inestable, lo que lleva a la necesidad de proteger su funcionalidad de un medio externo o de condiciones que no le favorecen (Guadarrama-Lezama et al., 2012, 30; Fang & Bhandari, 2010, 510). Entre las metodologías que hay para encapsular están, los liposomas y el secado por aspersión. Los liposomas consisten en vesículas de tamaño nanométrico, en los cuales el agente encapsulante

son los fosfolípidos (compuestos formados por una molécula de glicerol a la que se le unen dos ácidos grasos y un fosfato); esta una técnica simula una membrana biológica, lo que hace que el compuesto encapsulado pueda ser más fácilmente absorbido (Mayer, Bally, Hope, & Cullis, 1986, 333). El secado por aspersión, es una técnica de encapsulación a escala micro, la cual mediante la modulación de variables como temperatura de entrada, presión de aire, velocidad de alimentación y porcentaje de aspiración, permite obtener de una mezcla líquida (compuesto de interés + el agente encapsulante) micropartículas.

Por lo anterior, el objetivo del presente fue obtener una formulación de nanopartículas y micropartículas de luteína extraída por fluidos supercríticos a partir de excedentes de cosecha de lechuga (*Lactuca sativa L.*) y repollo (*Brassica oleracea*).

Justificación

Los excedentes de cosecha de muchas hortalizas, se han convertido en un problema de índole económica, social, ambiental e incluso de salubridad, ya que por su mal manejo, generan situaciones de contaminación de aire y afluentes de agua, pérdidas por la mala planificación de las cosechas y por dar cumplimiento a las expectativas de los consumidores, creando focos de contaminación, malos olores, mala disposición de éstos en botaderos a cielo abierto. Entre los excedentes de cosecha que más se producen en Colombia se encuentran las hortalizas de hojas, tales como la lechuga y el repollo (DANE, Departamento Administrativo Nacional de Estadística, 2011, 20) de las cuales se producen cerca de 56,345 y 74,936 ton / año respectivamente (Ministerio De Agricultura y desarrollo Rural, 2012, 248 y 269). Además en los procesos de post-cosecha, estos vegetales tienen un volumen de excedentes de alrededor del 30%, generando pérdidas económicas de aproximadamente 1,2 billones de pesos, problemas comerciales, sociales y ecológicos (CORPOICA, 2006, 156). Pese a esto, los residuos orgánicos son una fuente importante de compuestos que pueden ser utilizados debido a sus propiedades favorables tecnológica o nutricionalmente, como antioxidantes que pueden tener un efecto benéfico para la salud humana (Londoño-Londoño et al., 2010, 82).

Entre los compuestos que pueden ser obtenidos a partir de residuos orgánicos, se encuentran los carotenoides como la luteína, la cual tiene beneficios en la salud, principalmente por sus propiedades antioxidantes y la prevención de algunas enfermedades como la degeneración macular relacionada a la edad y podría ser eventualmente considerada como un nutriente; ya que alrededor de 100 millones de personas tienen el riesgo de desarrollar degeneración macular solo en el occidente del

globo terráqueo, pudiendo ser prescritos suplementos de luteína (Fernández-Sevilla, Acién Fernández, & Molina Grima, 2010, 27).

La luteína ha sido ampliamente usada como colorante en la industria de alimentos, su demanda global ha aumentado rápidamente en los últimos años (Fu et al., 2014, 1), la cantidad de ventas solamente en los Estados Unidos es \$ 150,000,000 y como aditivo para pastos ascienden a unos US \$ 150 millones por año (Del Campo et al., 2004, 848).

Sin embargo, la extracción de carotenoides ha sido utilizando solventes orgánicos, los cuales tienen muchas regulaciones restrictivas (Macías-Sánchez, Fernandez-Sevilla, Fernández, García, & Grima, 2010, 928). Por ello es importante considerar la extracción por fluidos supercríticos con dióxido de carbono (CO₂), ya que los productos obtenidos mediante esta tecnología son generalmente reconocidos como seguros (GRAS) por la administración americana de fármacos y alimentos (Romo-Hualde, Yetano-Cunchillos, González-Ferrero, Sáiz-Abajo, & González-Navarro, 2012, p. 1045).

Aun así, la luteína es sensible a factores como la luz, pH, temperatura y oxígeno, razón por la cual es necesario protegerla, mediante técnicas como la encapsulación, entre estas se encuentran el secado por atomización, que proporciona altos rendimientos y se aplica en matrices alimentarias principalmente; y los liposomas, los cuales gracias a su composición de fosfolípidos hace que sea utilizado en la industria farmacéutica y cosmética.

Por lo anterior es importante considerar la extracción por fluidos supercríticos de luteína a partir de excedentes de cosecha y residuos de repollo y lechuga e incluir su posterior encapsulación para aumentar su estabilidad durante el almacenamiento.

Objetivos

General

Formular nano y micropartículas de luteína obtenidas a partir de excedentes de cosecha de lechuga y repollo.

Específicos

- Caracterizar los excedentes de cosecha de repollo y lechuga, determinando su contenido de luteína.
- Estandarizar un protocolo a escala de laboratorio para la extracción de luteína a partir de excedentes de cosecha de repollo y lechuga.
- Desarrollar diferentes formulaciones para la encapsulación de luteína, determinando la composición de agente encapsulante adecuado.
- Caracterizar las micropartículas obtenidas (morfología, tamaño, carga, contenido incorporado), que permita elegir una formulación óptima, para la posterior evaluación de estabilidad.

Marco Conceptual

Residuos agroindustriales

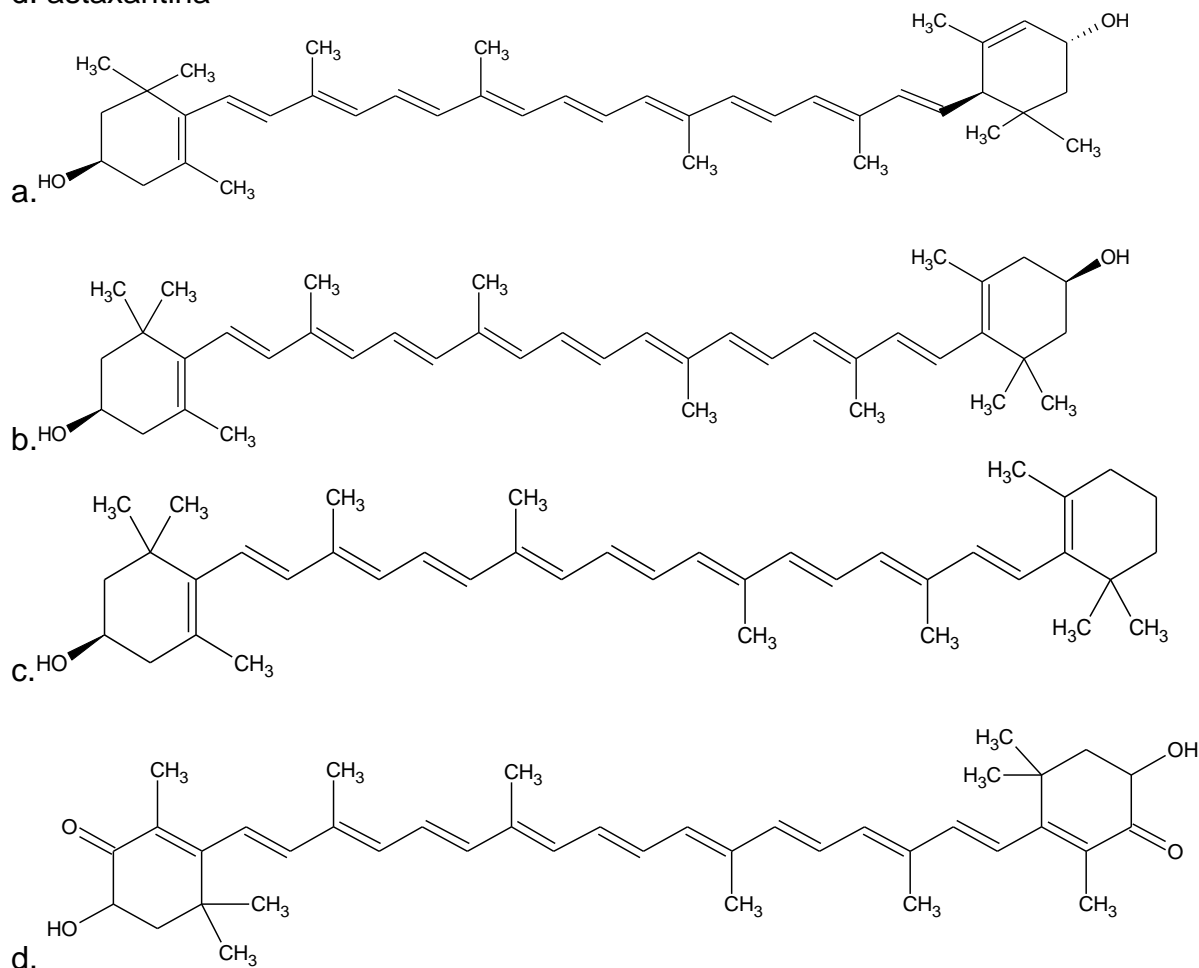
En los últimos años, el consumo y comercialización de verduras se ha venido incrementando debido a sus atractivas propiedades sensoriales y al reconocimiento de su valor nutricional (Ayala-Zavala et al., 2011, 1867; Silva et al., 2014). Sin embargo, dichas actividades de comercialización y transformación de vegetales generan gran cantidad de residuos y excedentes poscosecha y de transformación que representan un problema debido a su fácil descomposición (Schieber, Stintzing, & Carle, 2001), representando un problema de salud pública para los centros de distribución, incrementando también los costos de disposición de los mismos. A pesar de esto, estos residuos también son buena fuente de compuestos bioactivos, los cuales se han convertido en gran interés para la comunidad científica en los últimos años; estos compuestos son metabolitos principalmente secundarios, que tienen propiedades promotoras de la salud (Sharma, Karki, Thakur, & Attri, 2012, 22). Algunos compuestos naturales producidos biológicamente a partir de las plantas, frutas y vegetales, contienen compuestos fenólicos, carotenoides, antocianinas y tocoferoles (Ajila, Naidu, Bhat, & Rao, 2007, 983) los cuales contienen propiedades antioxidantes, y han sido de gran valor para la salud humana (Nawirska-olsza, Biesiada, Sokó, & Kucharska, 2011, 52).

Carotenoides

Pigmentos liposolubles de numerosas frutas y verduras responsables del color rojo, amarillo, naranjado y púrpura, se caracterizan por poseer una larga cadena poliisoprenica (Vitale, Bernatene, Pomilio, & Químicas, 2010, 196); gracias a esto han sido

ampliamente utilizados como colorante en alimentos, bebidas, cosméticos y alimentación animal (Nunes & Mercadante, 2007, 893; Gonnet, Lethuaut, & Boury, 2010, 277). Desde el punto de vista químico, son tetraterpenos constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos (Carranco Jáuregui, Calvo Carrillo, & Pérez-gil Romo, 2011, 234) y se pueden dividir en dos grupos, carotenos y xantofilas. Los carotenos se caracterizan por estar compuestos de carbono e hidrógeno, mientras que los segundos tienen en su estructura oxígeno como grupos hidroxilo, ceto, epoxi, metoxi o ácidos carboxílicos (Abdel-Aal, Akhtar, Zaheer, & Ali, 2013, 1171; Rodríguez-Bernaldo de Quirós & Costa, 2006, 97), siendo menos hidrofóbicos que los carotenos. Los principales carotenos son α , β , γ - caroteno y licopeno (figura 1); mientras que las principales xantofilas son la luteína, zeaxantina, astaxantina, β -criptoxantina, capsantina y flucoxantina (Gonnet et al., 2010, 278; Abdel-Aal et al., 2013, 1171). En la, Figura 2 se muestran algunas estructuras químicas de las xantofilas.

Figura 2. Estructuras de algunas xantofilas. a. Luteína, b. Zeaxantina, c. Criptoxantina, d. astaxantina



La importancia de los carotenoides no es solo su propiedad colorante, sino también han demostrado tener importantes funciones promotoras de la salud, tales como provitamina A y actividad antioxidante, como antioxidantes son capaces de inactivar especies reactivas del oxígeno y puede ayudar a retrasar o prevenir el daño oxidativo (Strati & Oreopoulou, 2014, O'Connell, Ryan, & O'Brien, 2007). Recientes estudios correlacionan niveles elevados de carotenoides en la dieta o en sangre y un efecto protector contra el desarrollo de enfermedades crónicas como ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades degenerativas de la mácula

lútea y cataratas (Matos, Schweigert, Sintes, Rodríguez, & Hurtienne, 2002, Stahl & Sies, 2003, Beltrán, Cuadrado, Estévez, Jiménez, & Olmedilla, 2012), y con el fortalecimiento del sistema inmune (Santos & Meireles, 2010), generando mayor interés en el estudio de su biodisponibilidad (Vitale et al., 2010) y bioaccesibilidad de los carotenoides a partir de frutas y vegetales. En la Tabla 1, se especifica cuáles son los carotenoides encontrados en diferentes alimentos con sus funciones más relevantes, que ha llevado al estudio de estos compuestos. Además de sus propiedades biológicas, los carotenoides son utilizados como antioxidantes naturales en la formulación de alimentos funcionales o como aditivos en alimentos para aumentar su vida útil (Strati & Oreopoulou, 2014).

Tabla 1. Fuentes de obtención y funciones principales de carotenoides más comúnmente encontrados en los alimentos

| Carotenoides | Fuentes | Funciones especializadas | Bibliografía |
|--|--|---|---|
| α , β , γ - Carotenos | Zanahoria, frutas y verduras en general | Vitamina A (Retinol) | (Rodriguez-amaya, 2001; Sangeetha & Baskaran, 2010) |
| Licopeno | Tomates y productos derivados del tomate | Prevención de cáncer de próstata, de colon, de mama y enfermedades cardiovasculares | (Vitale et al., 2010; Erdman, Ford, & Lindshield, 2009) |
| Luteína Y Zeaxantina | Frutas y hortalizas de hojas verdes, maíz, yema de huevo | Prevención de la degeneración macular, cataratas, aterosclerosis, cáncer | (Abdel-Aal et al., 2013; Manke Nachtigall, Stringheta, Cardoso Fidelis, & Manke Nachtigall, 2007; Canovas, Cypel, Farah, & Belfort Jr., 2009) |
| Astaxantina | microlgas, trucha, salmón y crustáceos | disminuye efectos dañinos de la radiación ultravioleta, mejora el sistema inmunológico, anticancerígena, antidiabética y antiinflamatoria | (Carranco Jáuregui et al., 2011; Rodriguez-amaya, 2001; Del Campo et al., 2004) |
| Cantaxantina | Crustáceos | Antioxidante | (Carranco Jáuregui et al., 2011) |
| β -criptoxantina | Naranjas, mandarinas | Antioxidante | (Carranco Jáuregui et al., 2011; Matos et al., 2002) |

Sin embargo, dada la cantidad de insaturaciones que presentan los carotenoides en sus estructuras, se vuelven susceptibles a cambios debido principalmente a la oxidación, donde factores como la temperatura, la luz, la exposición al oxígeno, las matrices alimentarias, la acidez, el contenido de agua, enzimas, otros antioxidantes y pro-oxidantes pueden influir en la oxidación (Carranco Jáuregui et al., 2011, Dias, Camões, & Oliveira, 2014), produciendo alteraciones que pueden influir en el color de los alimentos y en su valor nutricional (Rao & Rao, 2007).

Luteína

Es uno de los carotenoides más importantes ampliamente encontrado en el suero humano y en alimentos (Alzate, González, & Londoño-Londoño, 2013, 1). Es una xantofila con un importante papel como antioxidante (Macías-Sánchez et al., 2010, 928; Manke Nachtigall, Stringheta, Cardoso Fidelis, & Manke Nachtigall, 2007, 182), recomendada para la prevención de enfermedades cardiovasculares (Tan et al., 2013, 8175), cáncer, disminución de la degeneración macular debido a la edad (Yen, Chiang, & Sun, 2012, 53; Augusta, Odorissi, & Mercadante, 2012, 2057), esta última en especial, dado que es predominante en la macula, un área pequeña de la retina responsable de la visión central y de alta agudeza visual (Mitri, Shegokar, Gohla, Anselmi, & Müller, 2011, 267) y actúa como foto protector (Vitale et al., 2010, 196). Estas características han generado gran interés, dando como resultado un aumento en estudios y producto en el mercado que buscan destacar estas, principalmente en la prevención de enfermedades degenerativas, como la degeneración macular relacionada a la edad, cataratas (Bovier, Lewis, & Hammond, 2013; Fernández-Sevilla et al., 2010; Manke Nachtigall et al., 2007). En la Tabla 2, se aprecian algunos

productos que se encuentran en el mercado, que contienen luteína y su fabricante, en los cuales se destacan presentaciones farmacéuticas como capsulas y tabletas. Dado que los seres humanos no pueden sintetizarla, su ingesta depende del consumo de alimentos ricos en luteína tales como el repollo, brócoli, lechuga, perejil, espinacas y maíz (Kuhnen, 2012, 1610; Mitri, Shegokar, Gohla, Anselmi, & Müller, 2011, 267).

No obstante, debido a los dobles enlaces conjugados que tiene la luteína en su estructura, es inestable a factores tales como calor, luz, oxígeno (Khalil et al., 2012; Kuang et al., 2015; Xiao-ying, Zhi-ping, & Jian-Guo, 2011), pH, agentes reductores y oxidantes (Wang et al., 2012). Por esta inestabilidad propia de la estructura química de la luteína a factores externos y por su poca solubilidad en agua (Zhao, Cheng, Jiang, Yao, & Han, 2014), se ha visto la aplicación de la luteína en la industria de alimentos limitada; la mayoría de alimentos son acuosos y la incorporación de compuestos con baja solubilidad en ellos es lo que llama la atención para la búsqueda de soluciones de carácter tecnológico, que permita que las características, por ejemplo de la luteína, no sean un problema, logrando aprovechar así los beneficios que ella aporta no solo al alimento como posible colorante, sino también a la salud con su efecto antioxidante.

Tabla 2. Diferentes productos que contienen luteína existentes en el mercado, nombres comerciales, presentación y fabricantes

| Nombre comercial | Presentación | Composición | Fabricante | País de fabricación | Referencia |
|---------------------------------|--------------------------|--|----------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| DeVISION | Capsulas | Luteína, Vitaminas antioxidantes y Minerales | boticae, pharmatoc | España | (Boticae, 2016a) |
| | viales para reconstituir | | | | |
| DeVISIÓN RETINOX | Capsulas | Luteína, Ácido graso Omega 3 (DHA), Zeaxantina, vitaminas (B1, B2, B3, B6, B9, B12, E y C) y minerales (Manganeso, Cobre, Selenio y Zinc). | | | (Boticae, 2016b) |
| Luteína 40mg | Capsulas | Luteína (20%), zeaxantina | Nature's Bounty | Estados Unidos | (Nature's Bounty Inc., 2016) |
| EyeVit Plus | Capsulas | Omega 3, bioflavonoides cítricos, luteína, vitamina E, beta-caroteno, zinc | Health Aid | Reino Unido | (Healthaid, 2016) |
| DHA + LUTEIN 615mg | Capsulas | Aceite DHA, Florago, luteína, gelatina, glicerina y beta-caroteno | Nature Essential | España | (Nature Essential, 2010) |
| Lutein 20mg, natural carotenoid | Capsulas | luteína y zeaxantina | Good'N Natural | Estados Unidos | (Naturallife, 2016) |
| Centrum Silver Luteína | Tabletas | Contiene vitaminas del complejo B, selenio, zinc, vitamina A, E, D Y C, calcio, fósforo, magnesio y manganeso, luteína | pfizer consumer healthcare | Estados Unidos | (consumer Healthcare - pfizer, 2016) |
| Occus with Lutein | Capsulas | luteína, zeaxantina, vitamina A, vitamina C, vitamina E, zinc, cobre | Healthy America | Estados Unidos | (healthy-america, 2015) |
| Naturbite Luteína 10mg | Capsulas | Luteína (extracto 10%) | Naturbite | España | (Naturbite, 2013) |

| | | | | | |
|------------------------------------|---|---|----------------|----------------|----------------------------|
| Lamberts plus lutein plus | Tabletas | Luteína, zeaxantina, mirtilo, zarzamora, semilla de uva, beta caroteno, acetato de vitamina A | Lamberts | España | (lamberts Plus, 2016) |
| Visio luteína | Capsulas | Arándano negro, luteína | super diet | Francia | (Dietetica online, 2013) |
| eye support | Capsulas | Antocianinas, luteína, astaxantina, zeaxantina | Dr. Mercola | Estados Unidos | (iHerb Inc., 2016) |
| Lutein lycopene carotene complex | Capsulas | Beta caroteno, luteína, licopeno | Solgar | Estados Unidos | (Suplementos Solgar, 2016) |
| visionace Plus Omega-3 con Luteína | Capsulas | omega 3 de aceite de pescado, esterios de luteína | Vitabiotics | Reino Unido | (Vitabiotics Ltd., 2016) |
| Vita Energía | sobre, polvo para reconstituir | Aminoácidos, Vitaminas, minerales, antocianina ,fibra prebiótica, acai Berry, luteína (Extracto de caléndula) | Fuxion Prolife | Perú | (Fuxion Prolife, 2014) |
| Vita Energía Xtra T | sobre, polvo para reconstituir | Aminoácidos, Vitaminas, minerales, antocianina ,fibra prebiótica, acai Berry, luteína (Extracto de caléndula), té Verde | | | (FuXion PrOLife, 2016c) |
| Probal | sobre, polvo para reconstituir | Vitaminas, aminoácidos, luteína (Extracto de caléndula) , extracto de Soya | | | (FuXion PrOLife, 2016b) |
| FLX TE | sobre, polvo para reconstituir | Luteína, cúrcuma, jengibre, glutamina, vitaminas | | | (FuXion PrOLife, 2016a) |
| Omniviu Supreme | sobre, polvo para reconstituir y envase de 200 ml (para diluir) | Vitamina A, luteína y zeaxantina, además de otros antioxidantes como la vitamina C y E, extractos de grosella, arándano, jamaica y uva. | Omnilife | México | (omnilife, 2016) |
| Good 4 You VISTA | Envase 500 ml | Néctar de frutas con jugo de kiwi, limón y pulpa de manzana, 50 % reducida en azúcar, enriquecido con luteína. | Good 4 You | México | (Liverpool, 2016) |

| | | | | | |
|---|--------------------|--|------------------|----------------|---|
| ZUMA | Capsulas | Aceite de pescado (omega 3), extracto de targetes erecta marigold (luteína y zeaxantina), extracto de arándanos, vitamina E, C, B6, B12, ácido fólico, zinc, cobre, magnesio | S-LAB | Polonia | (Doz.pl, 2016) |
| Arándanos con Luteína | Capsulas | Extracto de Arándano , luteína, ADH (Ácido Docosaheptaenoico) | NUTRILITE | Estados Unidos | (amway Europa, 2016) |
| Opti-Vimin | Tabletas | Luteína, zeaxantina, Vitamina A, E, C, zinc, cobre, manganeso, selenio | Inti | Bolivia | (Drogueria Inti, 2016) |
| Arándano con Minerales, Vitaminas y Luteína | Tabletas | Luteína, beta caroteno, vitamina C, selenio y zinc | Herbalife | México | (Productos Herbalife, 2016) |
| LuteinGold | Capsulas | luteína, zeaxantina, vitaminas y minerales | L2 Pharma | España | (Ele2pharma, 2016b) |
| Lutein 10 DHA | Capsulas | Vitaminas C, E, B3, B5, B1, B6, B2, B9, B8, B12, manganeso, cobre, zinc, extracto de caléndula 20% (50 mg), zeaxantina 10% , DHA | | | (Ele2pharma, 2016a) |
| Oclovit con DHA y Luteína | Capsulas | Aceite de Pescado (DHA - EPA), Luteína Floraglo (20%) | Diet med | España | (Amazon.es, 2016) |
| Leche Similac IQ 23 | Polvo Tarro 850 g | Leche, hierro, DHA, luteína, probioticos, prebióticos, nucleótidos | Abbott Nutrition | Estados Unidos | (Linio, 2016) |
| Lutéine 100% pure FloraGlo | Capsulas | luteína y zeaxantina (extracto de caléndula), aceite de girasol | Diet Horizon | Francia | (OBJECTIFS 84, 2014) |
| Total Vision | Tabletas | luteína, zeaxantina, arándano, zinc y vitamina A. | | | (Diet Horizon, 2016) |
| Sma Gold 1 | Polvo, Tarro 400 g | Leche, hierro, luteína, AA (ácido araquidónico), alfa-proteína | Wyeth | Estados Unidos | (comercializadora farmacéutica de chiapas, 2016b) |
| Leche Promil Gold 2 | Polvo, Tarro 400 g | Leche, hierro, luteína, AA (ácido araquidónico) | | | (comercializadora farmacéutica de Chiapas, 2016a) |

| | | | | | |
|--|-------------------------------|--|------------------------|----------------|---------------------------------|
| Nutrof Omega | Capsulas | DHA, vitaminas (E, C, B1, B2, B3, B6, B9, B12), luteína, zeaxantina, glutati3n, hidroxitirosol, oligoelementos (Se, Mn, Zn, Cu) | Laboratorios Thea | Espa1a | (FarmaCalabria, 2015) |
| Luteína & Zeaxantina | sobre, polvo | Con luteína y zeaxantina | Shel3 Nabel | M3xico | (Shelo NABEL, 2016) |
| Luteína & Zeaxantina | Polvo amarillo | Extracto en Polvo de Tagetes Erecta (Flor de cal3ndula) Naranja Amarillo | Hunan NutraMax Inc. | China | (Hunan Nutramax Inc., 2014) |
| Lutein eyes | Capsulas | mezcla de extracto de hoja de espinacas, extracto de fruto de ar3ndanos, extracto de hoja de romero, Luteína y zeaxantina (flor de cal3ndula), vitamina C | Solaray | Estados Unidos | (Herbonatura, 2012) |
| Bilberry, lutein & astaxanthin complex | Capsulas | vitaminas, minerales, nutrientes como taurina, N-acetilcisteína, luteína, astaxantina y plantas del Complejo Magnifood | Magnifood, terra nova | Estados Unidos | (terranova, 2014) |
| Vision Essentials | Capsulas | vitaminas A, C, E, B2, Luteína, Zeaxantina, Zinc, quercitina, taurina, L-Glutatione | Swanson | Estados Unidos | (Swanson Health Products, 2016) |
| Ultra Lutein | Capsulas | Luteína y zeaxantina (extraídas de la flor de cal3ndula), gelatina, aceite de semilla de soya | Nature´s Plus | Estados Unidos | (Nature´s Plus, 2016) |
| FloraGLO LUTEIN T3pica | Liquida- T3pica | Aceite de semilla de c3rtamo y extracto de flor de cal3ndula | Kemin Industries, Inc. | Estados Unidos | (Kemin, 2016) |
| FloraGLO LUTEIN | Capsulas Tabletas Polvo | luteína y zeaxantina | | | |
| Luteína 10% | Oral | Cal3ndula | Vía farma | Brasil | (Viafarma, 2013) |

Métodos de extracción de carotenoides

Extracción por solventes

Entre los diferentes métodos de extracción de carotenoides se encuentran algunos convencionales como extracción por Soxhlet, con solventes y agitación continúa, los cuales brindan un buen rendimiento en la extracción; pero se está evitando su uso por los problemas medioambientales que trae consigo su aplicación. También se encuentran extracciones asistida por ultrasonido, microondas o enzimas, con alta presión y por medio de fluidos supercríticos (Strati & Oreopoulou, 2014, 312) como alternativas y tecnologías emergentes para eliminar el uso de solventes.

Diferentes autores han estudiado métodos de extracción de luteína a partir de diferentes matrices vegetales, entre ellos están, la extracción de luteína desde los pétalos de flor de tagete naranja por dos métodos: extracción con acetona y posterior saponificación y extracción con saponificación simultáneos utilizando hexano (Arellano Corral, 2011, p. 24), como pigmento, por solventes como acetona, éter de petróleo (Irigoyen Cossío, Kioshi De Ugarte, & Soliz Torrico, n.d., 27), de hortalizas con el empleo de etanol, acetona, hexano y tetrahidrofurano, siendo el etanol el mejor solvente para más altos rendimientos de luteína (Manke Nachtigall et al., 2007, 186).

Extracción por fluidos supercríticos

La tecnología de fluidos supercríticos es un método de extracción natural y ecológico de productos, es considerado una alternativa a los métodos convencionales de separación, por ser más simple, rápido y eficiente; además, no requiere el consumo de grandes cantidades de disolventes orgánicos que son costosos y potencialmente

daños (Yen et al., 2012, 53), surgiendo como una alternativa para sustituir métodos convencionales como la extracción sólido-líquido o soxhlet (Mukhopadhyay, 2000, 3).

Los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer selectivamente compuestos químicos bajo la combinación de temperatura y presión de un solvente, típicamente dióxido de carbono (Herrero, Cifuentes, & Ibañez, 2006, 137). Una propiedad importante de un FSC es su densidad, los valores son cercanos a la densidad de líquidos y dependen de las condiciones de presión y temperatura. Cuando se trata de bajas temperaturas la densidad podrá estar entre 0.9 - 1.22 g/mL y cuando la presión es baja la densidad será mayor a 1.0 g/mL, de esta manera la densidad del disolvente puede aumentar desde valores de un gas hasta valores de un líquido (0.1 - 2.5 g/mL). En la región supercrítica de un fluido, la densidad se controla por medio de la presión y temperatura (Mukhopadhyay, 2000, 3). Los productos extraídos por fluidos supercríticos con dióxido de carbono (CO₂) se consideran generalmente reconocidos como seguros (GRAS por sus siglas en inglés) por la administración americana de fármacos y alimentos (Romo-Hualde, Yetano-Cunchillos, González-Ferrero, Sáiz-Abajo, & González-Navarro, 2012, 1045), el CO₂ en estado supercrítico es uno de los disolventes más utilizados en este tipo de tecnología, pues abunda en la naturaleza, es barato, fácil de transportar y no es tóxico. En la obtención de carotenoides es el gas más empleado debido al carácter lipofílico de los carotenoides, los cuales se solubilizan fácilmente en el CO₂ supercrítico permitiendo su extracción a bajas temperaturas evitando la degradación de estos compuestos termolábiles, además de una posible extracción selectiva al permitir el cambio de la densidad del CO₂ combinando adecuadamente los valores de presión y temperatura (Zhang & Han, 2009, 532).

Se ha extraído luteína con CO₂ y propano líquido usando supercríticos (Skerget, Bezjak, Makovšek, & Knez, 2010, p. 62), y a partir de flores de caléndula mediante el uso de esta tecnología (Boonnoun et al., 2013, p. 105), también a partir de flores de lirios del día obteniéndose luteína y zeaxantina, mediante fluidos supercríticos con CO₂ (Hsu, Tsai, Chen, Ho, & Lu, 2011, p. 1813).

Encapsulación

Es una tecnología de embalaje en pequeño de materiales sólidos, líquidos o gaseosos. También se consideran capsulas selladas que pueden liberar su contenido a tasas controladas bajo condiciones específicas (Fang & Bhandari, 2010, 510). El objetivo principal en el área de alimentos, es proteger componentes sensibles de la humedad, oxidación, calor, luz o condiciones extremas para aumentar su vida útil (Santos & Meireles, 2010). Mediante la encapsulación se pueden obtener diferentes tipos de preparados como liposomas, micro o nano partículas, esferas, y matrices. La encapsulación permite liberar el contenido incorporado de manera controlada y prolongada en el tiempo, a un sitio específico del organismo bajo ciertas condiciones (Santos & Meireles, 2010, 42; Valenzuela et al., 2013, 59), también representa un medio para mejorar las eficiencias biológicas tales como la vida útil, controlar la liberación de componentes activos y prevenir la aparición de efectos secundarios (Gonnet, Lethuaut, & Boury, 2010, 277).

Entre los materiales utilizados como recubrimiento se encuentran, biopolímeros como polisacáridos, proteínas, compuestos hidrofóbicos, y también polímeros artificiales (Valenzuela, Hernández, Rodríguez, & Carrillo, 2013, 58), estos materiales

varían según el método de encapsulación que se emplee. La selección del método depende de varios factores tales como los costos (bien sea de los equipos o de los materiales empleados), el tamaño de la cápsula, las propiedades físicas y químicas de los materiales, la aplicación y el mecanismo de liberación deseado; algunos de estos métodos son: secado por aspersion, enfriamiento por aspersion, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión, co-extrusión, extrusión-fusión, co-cristalización, coalescencia, inclusión molecular, encapsulación por liposomas (Aldana, Sandoval, & Aponte, 2004; Valenzuela et al., 2013). En la Tabla 3, se aprecia algunos de los métodos de encapsulación normalmente usados en la industria de alimentos, los factores a tener en cuenta para su aplicación, algunas ventajas y desventajas más relevantes de cada uno de los métodos. Entre las metodologías utilizadas para la protección de compuestos bioactivos en este trabajo se abordaran principalmente dos, secado por atomización y liposomas, aclarando que hay otras formas de encapsular.

Tabla 3. Métodos de encapsulación más comunes, ventajas y desventajas de su uso

| Métodos de encapsulación | Agentes encapsulantes | Principio activo | Factores a tener en cuenta | Ventajas | Desventajas | Referencias |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Secado por aspersión | Gomas (goma arábica), almidones modificados o hidrolizados y proteínas (gelatina) | Polifenoles, aceites, proteínas, carotenoides, probióticos, sabores, olores | Temperaturas, condiciones de operación del equipo, emulsiones, relación principio activo: encapsulantes | Rápido Bajos costos de operación Aumento de vida útil Fácil de operar y escalar Se puede controlar forma y tamaño | Compuesto a encapsular en la superficie, haciéndolo susceptible a la degradación Costoso equipo | (Dordevic et al., 2014; Ezhilarasi, Karthik, Chhanwal, & Anandharamakrishnan, 2013; Nedovic, Kalusevic, Manojlovic, Petrovic, & Bugarski, 2013) |
| Enfriamiento por aspersión | Basados en lípidos (sólidos o líquidos) | Vitaminas, proteínas, probióticos | Parámetros de operación del equipo, temperatura de fusión | Fácil de operar y escalar Rápido Seguro reproducible Económico Altos rendimientos | Expulsa el compuesto encapsulado durante el almacenamiento. El producto obtenido es insoluble en agua, limitando aplicación. | (Dordevic et al., 2014; Ezhilarasi et al., 2013; Yanniotis, Taoukis, Stoforos, & Karathanos, 2013) |
| Liofilización | -No Aplica- | Compuestos termo sensibles y aromas | Temperaturas y presiones | Alta retención de volátiles Rehidratación del producto seco rápida Mayor vida útil | Alto consumo de energía Largos tiempos de procesamiento Formación de estructuras porosas Costoso | (Dordevic et al., 2014; Ezhilarasi et al., 2013; Yanniotis et al., 2013) |
| recubrimiento por lecho fluidizado | Celulosa, almidones, proteínas y gomas. | Pigmentos, sabores, conservantes, vitaminas y | velocidad de pulverización, el contenido de agua, el | Flexibilidad con diferentes materiales a encapsular. | Requiere un proceso previo (partículas ya en polvo), esféricas y | (Ezhilarasi et al., 2013; Nedovic et al., 2013) |

| | | | | | | |
|------------------------------|--|--|--|---|---|--|
| | Alta viscosidad, térmicamente estables con capacidad de formación de película. | minerales | flujo, humedad y temperatura del aire | Trabaja a bajas temperaturas | con buena fluidez. Aglomeración de partículas | |
| Coacervación | Polímeros | Sales y alcoholes, compuestos hidrosolubles | Tipo y cantidad de polímeros | Fácil de elaborar Eficiente Usado para productos de alto valor agregado | Proceso costos Requiere de un proceso de secado previo | (Dordevic et al., 2014; Ezhilarasi et al., 2013; Yanniotis et al., 2013) |
| Liposomas | Lípidos (fosfolípidos) | Compuestos lipofílicos e hidrofílicos | Temperaturas de transición, tipo de lípido | Biodegradables Biológicamente inertes | Inestabilidad durante el almacenamiento Bajo rendimiento de encapsulación | (Ezhilarasi et al., 2013; Gonnet et al., 2010) |
| Emulsificación | Lípidos | Compuestos lipofílicos e hidrofílicos, aromas, sabores | Tipo de emulsión, velocidad de agitación | Encapsulan grandes concentraciones de compuestos. Alta estabilidad Tamaño de gotas pequeñas Se puede escalar | Puede requerir un proceso de secado. Proceso difícil de controlar Costoso | (Dordevic et al., 2014; Ezhilarasi et al., 2013; Yanniotis et al., 2013) |
| Extrusión | Polímeros con alta viscosidad | Compuestos hidrofílicos, bacterias, levaduras, enzimas | Parámetros de operación, viscosidad, tensión superficial | No usa temperaturas ni solventes económicos | Baja producción Poca estabilidad química y mecánica | (Escalona Lopez, 2004; Nedovic et al., 2013) |
| Fluidos supercríticos | Polímeros con ayuda del fluido supercrítico (CO ₂) | Compuestos termosensibles | Presión, temperatura | Bajas temperaturas Poco uso de solventes orgánicos | Rendimientos y eficiencias bajas, poco control de tamaño y morfología | (Dordevic et al., 2014; Santos & Meireles, 2010) |

Microencapsulación por atomización

Esta técnica es una de las más viable, económica y ampliamente usada por la industria de alimentos. Consiste en la adición del principio activo a una dispersión de un polímero formador de pared y un solvente (generalmente agua), formando un sistema fluido que luego es bombeado a una cámara de aspersión, donde el fluido es atomizado, por acción del aire en circulación a una temperatura de 150 - 200°C se produce la eliminación del disolvente y la formación de las micropartículas (Lopera C, Guzmán O, Cataño R, & Gallardo C, 2009, 56). El secado por atomización ha sido ampliamente utilizado para la producción comercial de frutas y vegetales secos, los polvos obtenidos tienen buenas características de reconstitución, baja actividad de agua y son adecuados para el transporte y almacenamiento. Además, es un proceso apropiado para los componentes sensibles al calor tales como carotenoides. Varios aditivos como maltodextrina, goma arábiga y gelatina puede servir para facilitar el secado. Actualmente, la maltodextrina es uno de los favorecedores de secado comunes para el secado por pulverización debido a su papel beneficioso como un portador o un agente de encapsulación en el aumento de la estabilidad de los carotenoides, razonablemente barato y comercialmente disponible. La adición de maltodextrina antes del secado por pulverización se ha reportado como eficaz en la preservación de carotenoides, como β -caroteno (Kha, Nguyen, & Roach, 2010, 365).

Nanoencapsulación mediante liposomas

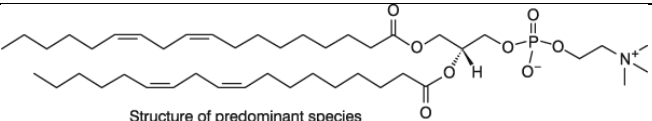
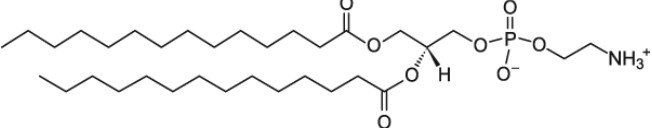
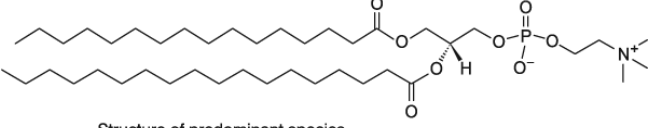
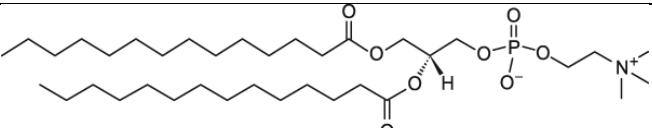
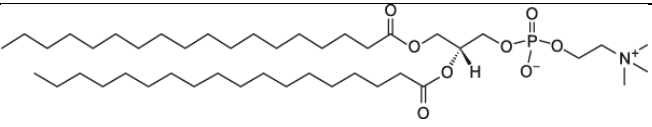
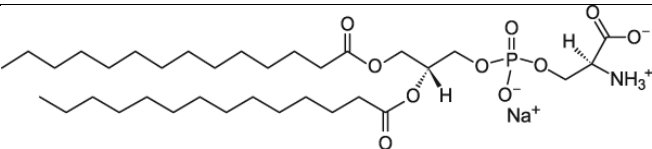
Los liposomas son vesículas esféricas que tienen un centro acuoso encerrado por uno o más capas de fosfolípidos (Patil & Jadhav, 2014, 8); están compuestos de

una bicapa lipídica con cadenas hidrofóbicas de lípidos y los grupos de las cabezas polares de los lípidos orientadas hacia la cavidad interior y en la solución extra vesicular (Edwards & Baeumner, 2006, 1432). Para su elaboración se utilizan fosfolípidos con o sin la incorporación de colesterol, tocoferol u otros materiales, introducidos en la bicapa lipídica con el fin de dotar a las vesículas de alguna propiedad particular como puede ser 1) carga superficial, 2) reducción de la permeabilidad de la membrana o 3) incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa (Ruano Aldea, 2013, 22) .

Los fosfolípidos empleados para la elaboración de liposomas se componen de una cabeza de grupo hidrofílico y dos cadenas largas hidrofóbicas (el cual las hace poco solubles en agua) auto ensamblándose en bicapas (Patil & Jadhav, 2014, 9; Lasic, 1998, 307). La cabeza y la cola garantizan, respectivamente, la solubilidad en el agua o en el disolvente orgánico (Gonzalez Perez, 2004, 9).

Algunos fosfolípidos que se utilizan en ensayos con liposomas, y de los cuales también depende su caracterización y su elaboración se encuentran en la Tabla 4

Tabla 4. Nombres y estructuras de algunos fosfolipidos naturales y sintéticos

| Nombre | Siglas | Temperatura de transición (°C) | Estructura |
|---|--------|--------------------------------|--|
| Asolecitina de Soya | Soy-PC | No reporta |  <p>Structure of predominant species</p> |
| 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphethanolamine | DMPE | 50 °C |  |
| L-α-phosphatidylcholine, hydrogenated (Egg Chicken) | HEPC | No reporta |  <p>Structure of predominant species</p> |
| 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine | DMPC | 24°C |  |
| 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine | DSPC | 55 °C |  |
| 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[Phospho-L-Serine] Sodium Salt | DMPS | 35 °C |  |

Los liposomas han sido reportados por su capacidad de prevenir la degradación de ingredientes activos desde la oxidación e hidrolisis resultando en una prolongación de la vida media de productos farmacéuticos (Saesoo, Sramala, Soottitantawat, Charinpanitkul, & Ruktanonchai, 2010, 436). Transportar sustancias quimioterapéuticas anticancerígenas hacia órganos específicos sin que afecten a otros órganos o tejidos corporales (Gonzalez Perez, 2004). Han sido empleados para encapsular compuestos

activos tales como fármacos, DNA y productos vegetales, por su capacidad de encapsular compuestos hidrofílicos y lipofílicos. Como su estructura es similar a la de las membranas con bicapas de fosfolípidos, tienen alta biocompatibilidad, mostrando ser no tóxicos, no inmunogénicos, no carcinogénicos, no trombogénicos (Torchilin, 2000, s85).

Clasificación de los liposomas

Los liposomas son frecuentemente clasificados por su tamaño (vesículas pequeñas, grandes y gigantes), número de bicapas (uni-, oligo- y multi- lamelares), y carga del fosfolípido (neutro, aniónico o catiónico)(Patil & Jadhav, 2014, 8).

Por tamaño y número de lamelas

se puede clasificar en: vesículas unilamelares pequeñas (SUV; 20–100 nm), vesículas unilamelares grandes (LUV; 50–400 nm) y vesículas multilamelares (MLV; 400–5000 nm) (Mayer, Bally, Hope, & Cullis, 1986; Chatterjee & Banerjee, 2002 y Loura & Almeida, 2004).

Por carga

La cabeza polar de los fosfolípidos es la que le confiere la carga al liposoma. Aniónicos (aquellos que tienen la cabeza polar cargada negativamente), catiónicos (cargada positivamente) (Storm & Crommelin, 1998, 20), zwitterionicos (puede tener carga tanto negativa como positiva dependiendo del medio) y no iónicos o neutros (no tienen carga) (Sabín Fernández, 2007, 13; Patil & Jadhav, 2014, 9).

Rendimiento de encapsulación

Por secado por atomización

Para determinar el rendimiento de encapsulación realizado por atomización, se emplea normalmente mezclas de solventes y agua, mediante agitación, con el fin de romper las cápsulas, con el agua, y liberar su contenido en una fase orgánica (Nunes & Mercadante, 2007, 895), por decantación (Rocha, Fávaro-Trindade, & Grosso, 2012, 38), métodos indirectos como filtración, cuantificando lo externo y por diferencia conocer el rendimiento (Rascón, Beristain, García, & Salgado, 2011, 551).

Por liposomas

Los métodos para determinar la cantidad de material encapsulado se basan en la destrucción de la capa lipídica con la subsecuente cuantificación del material liberado. En estas mediciones, la señal debida a los liposomas intactos es típicamente monitoreada previamente al rompimiento de la bicapa. Las técnicas usadas para su cuantificación dependen de la naturaleza del encapsulantes e incluyen espectrofotometría, espectroscopia de fluorescencia, métodos enzimáticos y técnicas electroquímicas (Edwards & Baeumner, 2006, 1437).

De acuerdo a varios investigadores, el rendimiento de la encapsulación puede ser expresado de varias formas como porcentaje de encapsulación, eficiencia de encapsulación o eficiencia de atrapamiento. De esta manera, los resultados se expresan como la cantidad total de encapsulante encontrada en la solución liposomal versus la cantidad inicial de solución encapsulante. Este valor depende de la habilidad de los liposomas para capturar las moléculas encapsulantes, de la composición

lípidos/buffer, tipo de liposoma (SUV, MLV o LUV), del procedimiento de preparación y de cantidad molar inicial del encapsulante (Edwards & Baeumner, 2006, 1438).

Metodología

Secado y molienda de material vegetal (repollo y lechuga)

Los excedentes de cosecha de lechuga y repollo (hojas exteriores), fueron recogidos en las horas de la mañana en la Central Mayorista de Antioquia; de allí, fueron llevados a la planta de alimentos de la Corporación Universitaria Lasallista, para ser lavados (agua corriente), desinfectados (con ácido peracético durante 20 min a una concentración de 1.3mL/L), cortados con un procesador de vegetales (Skymssen, Metalúrgica Siemens – Brasil) para facilitar su deshidratación y llevados a un secador de lecho fluidizado (modelo 0193, Actum, Rionegro, Antioquia – Colombia) a una temperatura máxima de 50°C, hasta obtener una humedad de menos del 10% en el producto final. Para obtener un tamaño de partícula más pequeño y homogéneo, el producto seco fue llevado a un molino de discos (Victoria – Colombia), obteniendo una harina de un tamaño de partícula de alrededor de 450 µm de cada producto. Estas harinas fueron mezcladas en una proporción lechuga: repollo (25:75), calculada de acuerdo al rendimiento en el proceso de secado y contenido de luteína presente en cada muestra, como se aprecia en la tabla 2. Se guardó la harina en bolsas en un cuarto de humedad controlada (40% humedad relativa) en oscuridad hasta su posterior uso en extracción y cuantificación por HPLC.

Tabla 5 Factores a tener en cuenta para cálculo de la proporción de harinas lechuga: repollo

| Harinas | Principales factores | | Puntuación | Mezcla de harina (%) |
|---------|---------------------------|--|------------|----------------------|
| | Rendimiento de secado (%) | contenido luteína (material seco mg/g) | | |
| Repollo | 21% | 21,81 | 4,58 | 75 |
| Lechuga | 6% | 26,62 | 1,60 | 25 |

Validación de la metodología para determinación de luteína por HPLC

Cromatografía

Se realizó la validación del método cromatográfico para la cuantificación de luteína a partir de matrices vegetales de lechuga y repollo. Los análisis fueron realizados usando un HPLC UltiMate™ 3000 con el software Chromeleon versión 7.2 (Dionex, Thermo Scientific, Estados Unidos), equipado con una bomba cuaternaria, un sistema desgasificador, automuestreador y un detector DAD.

Para obtener la separación de los compuestos, el flujo usado fue de 1mL/min y los análisis fueron realizados a 20°C. La columna empleada para la separación cromatográfica fue una YMC-Carotenoid™ (5 µm, 150 x 4.6 mm) (Allentown, PA, Estados Unidos). La fase móvil utilizada fue metanol (A) y acetona (B). El programa de gradiente fue de 0-30 segundos 100% de A, 30 s a 13 min 100% de B, de 13 a 14 min volvió a 100% A, corriendo a un flujo constante de 1mL/ min. El volumen de inyección en el sistema HPLC fue de 10µL. Los compuestos fueron separados y monitoreados a 450 nm, e identificados por comparación en los tiempos de retención y espectros con los estándares utilizados (luteína y β-caroteno). Todos los análisis fueron realizados por triplicado. Cada muestra fue inyectada dos veces.

Preparación de estándares y soluciones

La curva de calibración se preparó disolviendo el estándar de luteína grado P en cloroformo, de esta solución se prepararon las diluciones respectivas para los diferentes niveles de la recta en acetona (1, 3, 5, 10, 30 y 60 $\mu\text{g/mL}$). Se hizo por triplicado, para evaluar además el criterio de repetibilidad.

Para el criterio de selectividad se realizaron blancos matriz (muestra que no contiene el analito de interés) el mismo día, por dos personas del laboratorio; el cual constó en purificar 10 blancos, los cuales partieron de la mezcla de harinas lechuga: repollo, se pesó aproximadamente 10 mg de la harina, se adicionó 1,5 mL de hexano:diclorometano (1:1), se llevó durante 1 min a un vortex-mixer (Fisher Scientific, Estados Unidos), se sonicó por 10 min a 25 kHz, 99% de potencia y 25°C en un ultrasonido (serie DTY, Scientz, Ningbo- China), se centrifugó (mikro 120, Hettich, Alemania) a 14000 rpm por 15 min, se separó el sobrenadante en tubos de ensayo. Este proceso se realizó 3 veces más, el sobrenadante de cada extracción fue separado en tubos de ensayo y el residuo guardado. Luego estos fueron secados bajo corriente de nitrógeno y se reconstituye en 1 mL de acetona las últimas extracciones, para verificar la ausencia de luteína en la muestra. Para aceptar el parámetro de selectividad, si el valor de concentración de las muestras blanco es 30% menor que el valor de concentración del punto menor de la curva cumple como blanco. Con esto se puede definir si se puede realizar la curva en matriz o se deja la curva en solvente. Las extracciones realizadas fueron cuantificadas para conocer el valor máximo de luteína, aproximado que podía tener la matriz.

El residuo de la etapa anterior fue utilizado para determinar el porcentaje de recuperación. Se realizaron 3 niveles de enriquecimiento con el estándar en solvente,

a una concentración de 6, 18 y 42 ppm, preparadas de forma separada. A las muestras se les adicionó 50 µL de estas soluciones para cada nivel. Este análisis también se realizó con dos personas el mismo día, con el fin de determinar el parámetro de reproducibilidad.

Los límites LOD y LOQ se realizaron mediante las siguientes formulas

$$\text{LOD} = 2 t_{(1-\alpha;v)} \times S_o$$

$$\text{LOQ} = 10 S_o$$

Dónde:

t = t-Student

1-α= probabilidad b

v= Grados de libertad

So = Desviación estándar de las lecturas del blanco matriz (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010, 34).

Los atributos de validación realizados fueron selectividad, linealidad, exactitud y precisión (reproducibilidad interlaboratorio y repetibilidad), límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).

Cuantificación

Luego de validar este método, se procedió a la cuantificación del contenido de luteína en lechuga y repollo, para lo cual se guardó una pequeña muestra de estas harinas por separado para hacerles extracción por solventes de forma sucesiva. 30 mg de cada harina fue sometida a 3 extracciones con hexano:diclorometano como se hizo con la mezcla de las harinas. Los sobrenadantes se unieron, se secaron y fueron reconstituidos en 1 mL de acetona y se cuantifico por HPLC.

Extracción por FSC

Se planteó un diseño experimental de superficie de respuesta que permitiera conocer las mejores condiciones de extracción de luteína a partir de la mezcla de harina de lechuga: repollo, de dos factores (temperatura y presión) cada uno con tres niveles. Las temperaturas de extracción evaluadas fueron 65, 75 y 85°C; y las presiones de 350, 400 y 450 bar, con ayuda del programa Statgraphics Centurión versión 16.1. En la Tabla 6 se presenta el diseño realizado. Las extracciones se llevaron a cabo en un equipo de fluidos supercríticos a escala de laboratorio (Thar Process, Inc. Pittsburgh, PA, Estados Unidos), con un tanque extractor de un litro de capacidad y dos separadores. El equipo fue cargado con 140g de harina. El flujo del CO₂ y el tiempo de extracción se mantuvieron constantes en 100 g/min y 180 min respectivamente.

Tabla 6. Diseño de experimentos para las extracciones de luteína mediante FSC a partir de la mezcla de lechuga: repollo

| Temperatura (°C) | Presión (bar) |
|------------------|---------------|
| 75 | 400 |
| 85 | 450 |
| 75 | 450 |
| 75 | 400 |
| 85 | 350 |
| 85 | 400 |
| 75 | 400 |
| 65 | 450 |
| 75 | 350 |
| 65 | 350 |
| 65 | 400 |

Además se realizó una cinética de extracción de la luteína a partir de esta matriz, colocando 150 g de la mezcla de lechuga y repollo, a temperatura intermedia de 75°C y presión de 450 bar, con un flujo de CO₂ de 100 g/min. Las muestras se tomaron por 5 horas a diferentes tiempos. Se determinó el rendimiento de extracto y la cantidad de luteína presente en cada uno de los extractos obtenidos a los diferentes tiempos, con el fin de poder apreciar a que tiempo en las condiciones utilizadas empezaba a extraerse el mayor contenido de luteína y que fuera además el más conveniente en cuanto al consumo de CO₂ y tiempo.

Para la cuantificación de luteína en los extractos obtenidos por FSC, se pesaron 20 mg, se les adicionó 1 mL de acetona y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue tomado y llevado al HPLC.

Microencapsulación del extracto de FSC por medio de secado por atomización

Para escoger los agentes encapsulantes para el secado por atomización se creó un diseño de mezcla- Simplex-Centroide -, con el programa Statgraphics Centurión versión 16.1, el cual permitió analizar los efectos de 3 componentes (maltodextrina, goma arábica y almidón modificado) en 7 experimentos, tal como se muestra en Tabla 7. El diseño se ejecutó en un solo bloque y el orden de los experimentos fueron completamente aleatorizados, aportando protección contra el efecto de variables ocultas.

Tabla 7. Diseño de mezclas. Agentes encapsulantes para secado por atomización

| Formulaciones | % Maltodextrina | % Goma Arábica | % Almidón modificado |
|----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Formulación 1 | 0 | 100 | 0 |
| Formulación 2 | 50 | 0 | 50 |
| Formulación 3 | 33 | 33 | 33 |
| Formulación 4 | 0 | 50 | 50 |
| Formulación 5 | 0 | 0 | 100 |
| Formulación 6 | 50 | 50 | 0 |
| Formulación 7 | 100 | 0 | 0 |

Para encapsular el extracto de luteína, se pesó 0,3 g del extracto obtenido a las mejores condiciones de extracción, y se les adicionó 1,3 g de aceite cristal (USP, Protokimica, Medellín-Colombia), se homogenizó la suspensión mediante agitación por vortex, para lograr tener un vehículo que se pudiera dispersar más fácil en la emulsión. La relación extracto: agente encapsulante utilizados fue de 0,83:100 y reconstituidos en 300 mL de agua. Para lograr una mejor incorporación del extracto en la emulsión realizada se llevó a un ultraturrax (Modelo T 50 basic, IKA, Brasil) durante 10 min a

una velocidad de 6000 rpm. Las emulsiones fueron preparadas el mismo día del secado, con un contenido total de 10°Brix.

El secado se realizó en co-corriente a una temperatura de entrada de $185 \pm 5^\circ\text{C}$ y de salida de $100 \pm 5^\circ\text{C}$, un flujo de aire de $50 \text{ m}^3/\text{h}$ y un flujo de alimentación de $4 \text{ mL}/\text{min}$ utilizando un equipo a escala laboratorio LabPlant SD-05 (Huddersfield, Inglaterra), con una agitación magnética constante durante todo el secado. El producto obtenido fue recolectado del ciclón, empacado en bolsas con cierre hermético y guardadas en un cuarto con control de humedad y en oscuridad, hasta su posterior análisis.

Caracterización de las micropartículas

Las variables respuesta obtenidas en el diseño planteado fueron: 1. Porcentaje de rendimiento, 2. porcentaje de encapsulación de luteína, 3. Tamaño, 4. Aw y 5. Humedad, con el fin de lograr hacer una caracterización de cada uno de los ensayos. De esta caracterización se parte para que a las dos mejores formulaciones se les haga microscopía óptica, SEM y un posterior estudio de estabilidad.

El rendimiento de secado para cada una de las formulaciones realizadas se determinó mediante la siguiente fórmula

$$\%RE = \frac{\text{Peso microcapsulas obtenidas por secado}}{\text{Total de agentes encapsulantes utilizados}} \times 100$$

Eficiencia de encapsulación

Para conocer la cantidad inicial de luteína a incorporar en las formulaciones, se tomó aproximadamente 10 mg de la mezcla del extracto y aceite cristal antes del

secado, se reconstituyó con 1 mL de acetona, se agitó en vortex por 3 min a 3000rpm, y se llevó al cromatógrafo para realizar la cuantificación.

Para determinar la eficiencia de encapsulación del producto obtenido por secado se pesaron aproximadamente 50 mg del producto encapsulado, al cual se le adicionaron 500µL de una mezcla hexano:diclorometano (1:1), llevando a agitación en vortex por 2 min a 3000rpm, posteriormente se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm y a 20°C, en una centrifuga con refrigeración (Consul 21 R, ortoalresa, Madrid - España). Se descartó el sobrenadante, para eliminar la luteína que no fue encapsulada. Posteriormente se adicionó 1mL de agua destilada, se llevó a agitación en vortex por 2 min a 3000rpm, se sonicó 3 min a 25kHz y 99% (con el fin de hidratar las gomas y facilitar la extracción de la luteína dentro de sus estructuras), luego se adicionaron 750 µL de hexano:diclorometano, los cuales fueron llevados a agitación en vortex por 2 min a 3000rpm y se centrifugaron durante 5 min a 4000 rpm, se repitió el proceso de agitación, sonicación y centrifugación a las condiciones anteriores y se separó el sobrenadante. Se repitió la extracción desde la adición de hexano:diclorometano y se unieron ambos los sobrenadantes, los cuales fueron secados bajo corriente de nitrógeno. Una vez secos se adicionaron 150µL de acetona para cuantificar el contenido incorporado por HPLC. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La eficiencia de encapsulación (%EE) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%EE = \frac{\text{Cantidad de luteína dentro de las microparticulas}}{\text{Cantidad de luteína adicionada antes del secado}} \times 100$$

Tamaño de partícula

Se pesaron aproximadamente 3 mg de la muestra del extracto encapsulado y se diluyó en 1 mL de agua destilada, se agitó en vortex durante 30 s y se adicionó la mezcla a una celda de vidrio para su lectura en un analizador de partícula zeta/nano (NanoPlus-3, micromeritics, Estados Unidos), con el método de dispersión de luz dinámica. En las condiciones utilizadas para la determinación de tamaño se utilizó agua como diluyente, con una viscosidad de 0,8878 cp y un índice de refracción 1,33. Se realizaron tres repeticiones cada una con toma de 30 datos, los cuales fueron promediados.

Determinación de la actividad de agua (A_w)

La determinación de actividad acuosa de las diferentes micropartículas obtenidas por secado por atomización, fue realizada en un AquaLab (serie 3, Decagon Devices Inc., Pullman, Estados Unidos), el cual, con un sensor de punto de rocío mediante la técnica del espejo enfriado y medición infrarroja de la temperatura de la muestra se calcula el valor de A_w ; para ello, fueron depositados en el portamuestras, cubriendo todo el fondo, aproximadamente 2 g de las muestras. Las lecturas se hicieron por triplicado.

Humedad

El contenido de humedad de las muestras secas, fue determinada mediante el método de Bustos-Garza, Yáñez-Fernández, & Barragán-Huerta, (2013, 642). En una balanza de humedad (Modelo HB43-S, Mettler Toledo International Inc.), previamente precalentada, se colocó aproximadamente 1 g de la muestra a analizar en un plato de

aluminio para la balanza de humedad, previamente tarado para iniciar la medición de la humedad. Las medidas se realizaron por triplicado para cada muestra.

Microscopia óptica

Las formulaciones fueron observados inicialmente a través de un microscopio digital binocular (DMWB1, Motic, Canadá, Estados Unidos) utilizando el software Motic Images Plus 2.0 para toma de imágenes.

Se siguió la metodología empleada por Flint (1996, 108), con una modificación en la tinción. Se depositaron aproximadamente 3 mg de la muestra en el centro de un portaobjetos, se añadió una gota de azul de lactofenol (Merk, Alemania), con el fin de mejorar el contraste de la muestra y se colocó un cubreobjetos para su observación en el microscopio empezando con un objetivo de 10x.

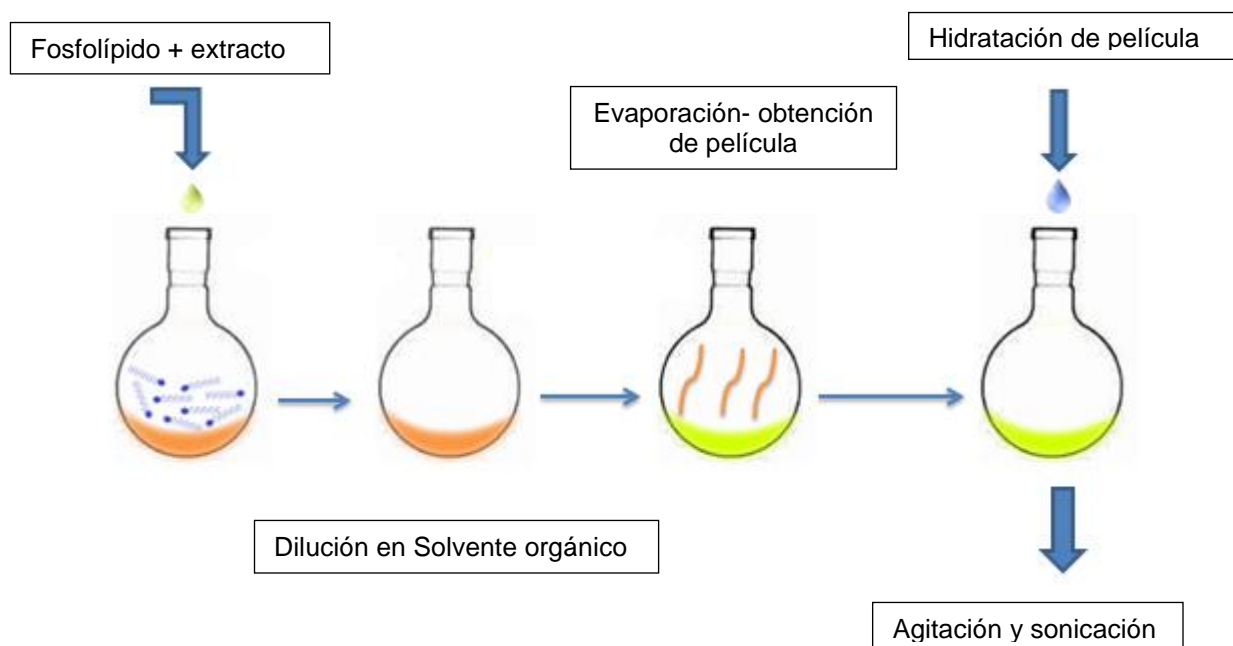
Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Esta medición se llevó acabo a las mejores formulaciones y sus respectivos agentes encapsulantes por separado, para determinar la morfología superficial; para esto, las muestras con una humedad inferior al 10% fueron fijadas en una cinta de grafito y recubiertas con oro (Au) mediante un equipo Denton Vacuum (Desk IV, Estados Unidos). Para su observación, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (Jeol, modelo JSM-6490 LV, Japón) en alto vacío, operado a 10 kV, con un detector de electrones secundarios que permite obtener imágenes en alta resolución en blanco y negro de la topografía de la superficie examinada.

Preparación de liposomas

Los liposomas fueron preparados según el método de hidratación de película (Latif & Bachhawat, 1984, 492), utilizando los fosfolípidos 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-Fosfocolina y L- α -Fosfatidilcolina, hidrogenada de huevo, DMPC y HEPC (Avanti Polar Lipids, Inc., Estados Unidos), con la presencia y sin la presencia de Luteína. Método que se describe en la **Figura 3**

Figura 3. Proceso de elaboración de liposomas por método de hidratación de película



Para la mejor relación de extracto de luteína y fosfolípido a utilizar y así poder asegurar que se trabaja con las proporciones óptimas, se realizaron formulaciones liposomales a diferentes concentraciones, dejando constante la concentración de luteína a 1mM y variando la del fosfolípido. Las concentraciones empleadas de fosfolípidos HEPC y DMPC fueron de 0.5, 1, y 2 mM.

Para la elaboración del sistema liposomal, las soluciones de fosfolípidos más luteína y sin luteína fueron evaporados en un rotavaporador (R114 Buchi, Alemania), con un baño de agua (B-480, Buchi, Alemania) a la temperatura de transición de cada fosfolípido (24°C DMPC y 40°C HEPC) y con una bomba de vacío (R 300, Boeco, Alemania) a 50 MPa, hasta evaporar completamente el solvente. Después de esto la película obtenida fue hidratada con buffer fosfato 10 mM pH 7,0. Posteriormente se sometió a 3 ciclos de agitación y calentamiento (vortex por 1 min, baño maría por 5 min a temperatura de transición). Finalizado este proceso, se verificó que la película estuviera completamente desprendida de la pared del balón, si esto no sucedía se repetían los ciclos de agitación y calentamiento antes de llevar a sonicación. Las muestras fueron sonicadas por 10 min a 40 KHz, 66% potencia (LDTD, 2006, 6)

Los liposomas preparados se llevaron a un proceso de extrusión en un mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Canadá- Estados Unidos) utilizando membranas de policarbonato (Whatman) de 0.4 μm y 0.2 μm .

Caracterización de los liposomas

Tamaño de partícula

Se tomaron 50 μl de la solución de liposomas preparados y se diluyeron en 1 mL de agua destilada, luego se agitó manualmente antes de adicionar la solución a la celda del analizador de partícula zeta/nano NanoPlus-3, el cual se operó bajo las mismas condiciones utilizadas en la determinación de tamaño de partícula de las microcápsulas obtenidas por secado por atomización.

Potencial z

Al igual que la determinación de tamaño, para el potencial Z se utilizó el NanoPlus-3, empleando el método de dispersión de luz electroforética. Se introduce la muestra en una celda de flujo rectangular, la cual es colocada sobre un soporte, que consta de dos electrodos, para permitir la lectura. Para esta determinación, 50 µl de solución liposomal fueron mezclados con 1 mL de agua ultrapura (tipo 1- miliQ) y se procedió a la lectura de cada muestra por triplicado.

Eficiencia de encapsulación por liposomas

Para cuantificar la cantidad de luteína encapsulada en liposomas, estos fueron llevados a centrifugación durante 15 min a 12000 rpm y refrigerados durante 2 horas. Nuevamente. Se centrifugó 5 min a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se adicionó buffer, se repitió el proceso (centrifugación, refrigeración, centrifugación).

Se realizó una solución de tween 20 al 1.5% con el fin de romper los liposomas. De esta solución se tween se adicionaron 200 µL al pellet obtenido (de la solución liposomal previamente centrifugada), se agitó en vortex a 3000 rpm durante 30 s; posteriormente se adicionaron 500 µL de cloroformo, se agitó en vortex durante 1 min a 3000 rpm, se llevó a centrifugación por 5 min a 4000 rpm, se tomó la parte orgánica y se secó con nitrógeno. Luego de esto se reconstituyó con 150 µL de acetona y se cuantificó el contenido de luteína en HPLC-DAD.

Para el cálculo del porcentaje de eficiencia de encapsulación se empleó la siguiente fórmula:

$$\%EE = \frac{\text{Cantidad de luteína dentro de los liposomas}}{\text{Cantidad de luteína adicionada}} \times 100$$

Estudio de estabilidad de los extractos encapsulados

Microcápsulas

Para las formulaciones que cumplieron con el porcentaje de encapsulación más alto, se procedió a realizar un estudio de vida útil a condiciones aceleradas de temperatura y humedad (40°C y 75% respectivamente). Para esto, 15 g de las muestras fueron dejadas en una caja de petri destapada dentro de una cámara climática (modelo 1151, Dies, Medellín - Colombia) durante un mes. Se tomaron 2 muestras en cada lectura, para determinar a diferentes días la pérdida de luteína que tienen las microcápsulas con respecto al valor inicial. Además se colocó un control, que fue 1g de extracto de luteína obtenido por FSC, como referencia para saber cuánto se degradaba en el tiempo y como era su protección con la microencapsulación.

Liposomas

Para averiguar cuánto tiempo pueden durar las soluciones liposomales trabajadas con el mismo tamaño de partícula y cuanto es la degradación porcentual de luteína dentro de los liposomas, se escogió la mejor relación fosfolípido/luteína para cada uno de los fosfolípidos estudiados. Se prepararon 10 mL de la solución liposomal (para cada fosfolípido), como se especificó anteriormente. Se realizó un duplicado de muestra y un blanco para cada fosfolípido. Las muestras fueron llevadas a refrigeración a 4°C, en tubos de vidrio, durante 20 días, muestreando cada cierto tiempo. Se determinó tamaño de partícula, potencial z y pérdida de luteína, en cada medición. Para esto, las soluciones eran agitadas en vortex durante 30 s, de allí se tomaron 1 mL para la cuantificación de luteína como se explicó anteriormente y 100 µL para determinación de tamaño y potencial Z. Se preparó una solución control, extracto

de luteína obtenido por FSC disuelto en cloroformo, para determinar a estas condiciones como era la protección que se daba encapsulando mediante liposomas

Resultados y discusiones

Validación de la metodología para determinación de luteína por HPLC.

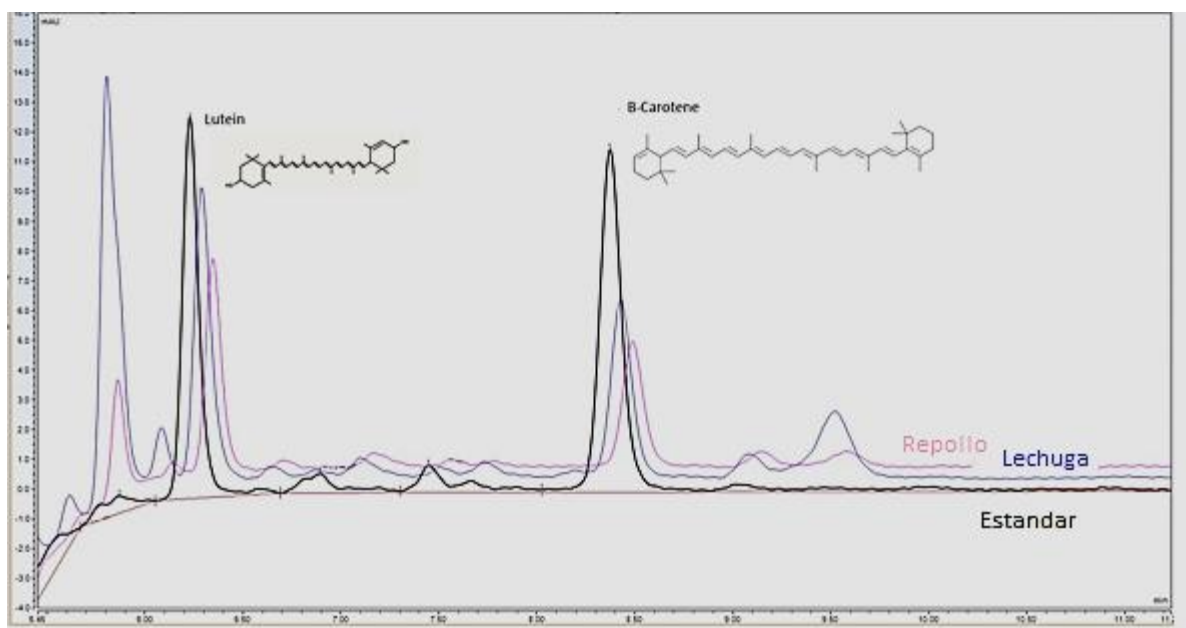
El blanco matriz utilizado en la validación de la metodología, no mostró interferencias que dificultaran la identificación del analito en la longitud de onda a la que se realizó la lectura, el coeficiente de variación de los blancos fue de 6,6% y fueron menores al 30% del primer valor de la curva, cumpliendo con el criterio de selectividad, además como el efecto matriz estuvo entre el rango de -15 a 15%, la curva puede ser cuantificable en solvente o matriz, por lo cual se optó por trabajar con la curva en matriz. El coeficiente de variación para la precisión fue <10%, el porcentaje de recuperación de las muestras enriquecidas en los 3 niveles cumplió con el criterio de aceptación de encontrarse entre el 70 y 110%. El LOD correspondió a 0.08 µg/mL y el LOQ fue de 0.29 µg/mL. El resultado obtenido de los parámetros de validación determinados se puede apreciar en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los parámetros de validación realizados en el método cromatográfico

| Parámetros | Criterio | Valor |
|--------------------------------|---|--|
| Selectividad/ especificidad | Confirmar la identidad del analito en base a <ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de retención • Espectro de absorción | Cromatograma de blanco matriz comparado con el estándar |
| LOD | $2 t_{(1-\alpha;v)} \times S_o$ $10 S_o$ | 0,08 ppm |
| LOQ | | 0,29 ppm |
| Linealidad | $r^2 > 0,995$, residuales <20% | Ecuación $Y = 0,1576X + 0,01293$, $r^2 > 0,998$, residuales entre 1-16% |
| Exactitud | Recuperación entre el 80 y 110%, para 3 niveles de enriquecimiento | Nivel 1 (6ppm) : 100,35% Nivel 2 (18ppm):89,10% Nivel 3 (42ppm):95,05% |
| Precisión | El coeficiente de variación <10%, para repetibilidad y precisión intermedia | Repetibilidad 2,92% Precisión intermedia 2,58% |

En la Figura 4 se aprecia el cromatograma de la caracterización química (identificación de luteína) que se le realizó a la lechuga y el repollo seco utilizado por el HPLC, mostrando que estas matrices son ricas no solo en luteína, sino también en β -caroteno. Posteriormente se procede a cuantificar la cantidad de luteína presente en las muestras.

Figura 4. Cromatograma de identificación de luteína y B-caroteno en lechuga y repollo



La cantidad de luteína encontrada en el repollo y la lechuga fue de 3,41 y 1,37 mg/ 100g de producto fresco; diferentes autores reportan que el contenido de luteína en lechuga varía entre 1 – 4,8 mg luteína/ 100g de producto en fresco (Abdel-Aal et al., 2013, 1173), Singh, Upadhyay, Prasad, Bahadur, & Rai, (2007, 108) reportaron que en los 18 cultivos de repollo, se encontraron que contenían en promedio 0,14 mg de luteína /100 g de material fresco, mientras que Holden et al., (1999, 177, 180) reportó de repollo 0,31 mg de luteína+zeaxantina /100 g y de lechuga 0,35 mg/ 100 g de

producto fresco. Perry, Rasmussen & Johnson (2009, 13) reportaron entre 0.17-3.8 mg de luteína/100 g frescos dependiendo la variedad de lechuga. (Maiani et al., 2009, S196) para repollo 0,45 mg/100 g producto fresco y lechuga con un rango de 1- 4,78 mg/ 100 g producto fresco. La diferencia de la cantidad de luteína, reportada por los diferentes autores, presente en las muestras frescas de lechuga y repollo, varia debido a la especie y a las condiciones ambientales, dado que la respuesta a factores de estrés ambiental, se muestra como un aumento en el contenido de metabolitos secundarios (Jansen, Hectors, O'Brien, Guisez, & Potters, 2008, 449).

Extracción por FSC

En la Tabla 9, se muestra las diferentes corridas del diseño planteado para la extracción de luteína a partir de los excedentes secos de lechuga y repollo en FSC, con sus respectivos rendimientos totales y de luteína. De acuerdo a esto, se encontró que las mejores condiciones de extracción fueron de 75 °C y 350 bar para un rendimiento total de extracto correspondiente al 6,14 %, similar a las condiciones aplicadas en extracciones de paprika por FSC en un equipo semi-industrial (Gil Garzon et al., 2012, 91). Por otro lado, comparado con respecto al rendimiento de luteína que fue de 9,42 mg \pm 0,40 por gramo, las mejores condiciones de extracción fueron a 65 °C y 350 bar.

Se coincide con que la condición de extracción que menos favorece tanto el rendimiento total del extracto como el de luteína, fue aquel que se llevó a la condición más alta tanto de temperatura y de presión (85°C y 450 bar), que corresponden a un rendimiento total de 2,31% y un rendimiento de luteína de 1,99 \pm 0,12 mg/g.

Tabla 9. Diseño de experimentos para las extracciones variables de respuesta rendimiento total y cantidad de luteína

| Temperatura (°C) | Presión (bar) | Rendimiento Total (%) | Luteína (mg / g) ±S.D. |
|------------------|---------------|-----------------------|------------------------|
| 75 | 400 | 3,87 | 6,77 ± 0,66 |
| 85 | 450 | 2,31 | 1,99 ± 0,12 |
| 75 | 450 | 4,87 | 7,07 ± 0,21 |
| 75 | 400 | 4,25 | 3,86 ± 0,02 |
| 85 | 350 | 3,70 | 4,49 ± 0,07 |
| 85 | 400 | 4,32 | 8,17 ± 0,20 |
| 75 | 400 | 2,37 | 6,64 ± 0,03 |
| 65 | 450 | 4,39 | 5,38 ± 0,32 |
| 75 | 350 | 6,14 | 6,07 ± 0,41 |
| 65 | 350 | 3,25 | 9,42 ± 0,40 |
| 65 | 400 | 3,05 | 6,48 ± 0,26 |

Un modelo polinomial de segundo orden fue ajustado a los datos experimentales para el rendimiento total (%) y la cantidad de luteína extraída (mg/g), los cuales se aprecian en las Ecuación 1

Ecuación 2 prediciendo el comportamiento de manera empírica entre el las variables respuesta, con respecto a las variables independientes, temperatura (°C) y presión (bar). El r^2 del diseño fue del 98,17%, indicando que este representa adecuadamente las relaciones observadas entre los parámetros de extracción seleccionados, el valor $p < 0,05$ muestra que exististe diferencia significativa entre los factores.

Ecuación 1.

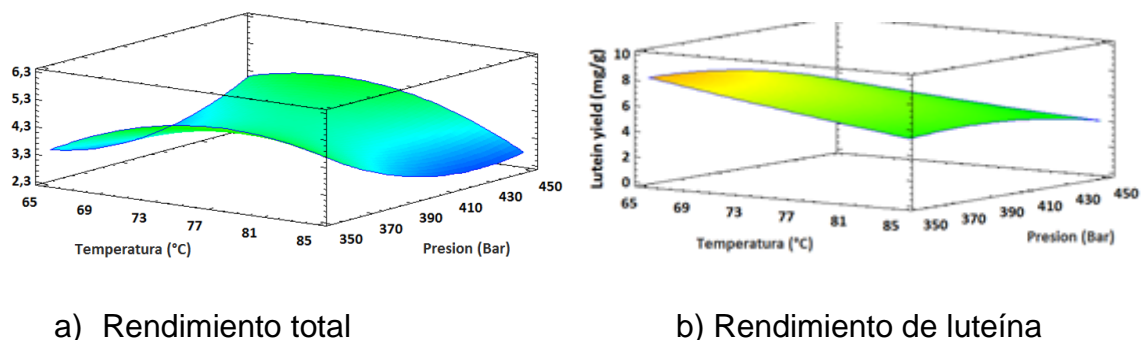
$$\text{Rendimiento Total} = -36,72 + 2,02 * ^\circ\text{C} - 0,17 * \text{Bar} - 1,01 \times 10^{-2} * ^\circ\text{C}^2 - 1,27 \times 10^{-3} * ^\circ\text{C} * \text{Bar} + 3,23 \times 10^{-4} * \text{Bar}^2.$$

Ecuación 2.

$$\text{Rendimiento de Luteína } \frac{\text{mg}}{\text{g}} = 7,03 - 0,55 * \text{ }^\circ\text{C} + 0,14 * \text{ Bar} + 8,5 \times 10^{-4} * \text{ }^\circ\text{C}^2 + 7,70 \times 10^{-4} * \text{ }^\circ\text{C} * \text{ Bar} - 2,68 \times 10^{-4} * \text{ Bar}^2.$$

El diseño estadístico, mediante la metodología de superficie de respuesta, utilizada para mostrar los efectos de a temperatura y la presión en el rendimiento total y rendimiento luteína (Figura 5), fue capaz de proporcionar información sobre la importancia estadística de los factores individuales. Por lo tanto se puede corroborar que en efecto a temperatura y presión baja se obtienen mejores rendimientos de luteína.

Figura 5. Superficies de respuesta de la extracción de luteína por fluidos supercríticos



Diferentes autores han reportado rendimientos de extracto entre el 5,04% y el 5,46%. a partir de otras fuentes de luteína como pétalos de caléndula (*Tagetes erecta*) extraídos con CO₂ supercrítico a presión constante de 300 bar y temperaturas de 40 y 80 °C, respectivamente (Skerget et al., 2010, 62). Por otra parte, algunos autores encontraron que el etanol es un buen co-solvente para mejorar la eficiencia de la extracción en la operación SFE, obteniendo 2,21 mg de luteína/ g del alga

Scenedesmus cultivada en un fotobiorreactor, usando una relación molar entre el etanol/ CO₂ del 30% a condiciones de 400 bar y 70 ° C (Yen et al., 2012, 56), dicho rendimiento fue similar al obtenido en este trabajo a las condiciones de extracción de 400 bar y 85 ° C, utilizando solamente CO₂.

Hsu, Tsai, Chen, Ho, & Lu, (2011, 1816) extrajeron luteína de dalia del día (*Hemerocallis disticha*), utilizando CO₂ supercrítico encontrando la extracción óptima de luteína de 8,12% de rendimiento total y 3,01 mg / g de luteína a 80 °C y 600 bar, y con las condiciones de 65°C y 400 bar, el rendimiento total fue de 5,99%. Resultado que es dos veces mayor a las que se encuentran en el extracto a partir de la mezcla de lechuga y repollo en las mismas condiciones de extracción.

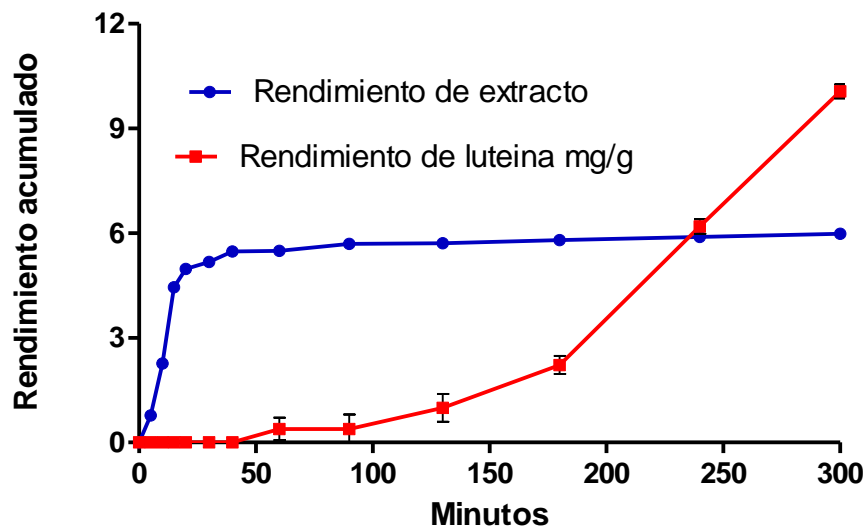
Comúnmente, se recomiendan temperaturas por debajo de 40 °C para la extracción clásica de carotenoides debido a la degradación térmica que se produce. Sin embargo, con el uso de temperaturas de hasta 70 °C también se ha encontrado que aumentan los rendimientos de los carotenoides, por lo que es importante considerar la degradación térmica en el proceso (Sovova, Stateva, & Galushko, 2001, 195).

Terminadas las extracciones del diseño experimental, se continuó con la cinética de extracción, que permitiría determinar si el tiempo empleado para la extracción fue adecuado, o no. Durante toda la cinética de extracción se estuvo identificando el tiempo en el cual empezaba a aparecer luteína principalmente en el extracto, lo que permitió realizar una cinética de extracción de luteína, como se aprecia en la

Figura 6, donde puede ver que en los primeros 20 min la extracción tuvo un aumento significativo en el rendimiento total, pero a partir de 90 min el aumento no fue significativo, lo que podría haber sugerido que la extracción solo se llevara hasta ese tiempo; sin embargo, cuando la cantidad de luteína presente en cada gramo de extracto se compara con el rendimiento total, se puede observar que la luteína comienza a extraerse después del minuto 50, mostrando un crecimiento exponencial.

Este crecimiento podría sugerir que es posible reducir el flujo de CO₂ en los primeros 40 minutos, cuando otro producto diferente a la luteína como el agua y/o los ácidos grasos de cadena corta aparecen y podría ser descartados, después de este tiempo el flujo de CO₂ se podría aumentar y empezar a recoger el extracto que sólo contiene luteína, lo que implica un ahorro en el consumo de CO₂. Aravena Contreras, (2011, 20) en su tesis explicó que el agua presente en la matriz retrasa el proceso de extracción con CO₂, obteniendo curvas sigmoideas. Además, el agua reduce la solubilidad de los carotenoides en CO₂ lo que se traduce a un aumento en el consumo de CO₂ con el mismo rendimiento. Este aspecto reafirma la necesidad de tener una matriz con la menor humedad posible para que el agua no actúe como co-solvente, retrasando el proceso de extracción.

Figura 6. Cinética de extracción de oleorresina y de luteína a partir de lechuga: repollo en el tiempo



Microencapsulación del extracto por secado por atomización.

En la Tabla 10, se muestran los resultados obtenidos de la caracterización realizada a las diferentes formulaciones secadas por atomización. El rendimiento en el secado de luteína estuvo entre el 9,9 y el 32,7%, siendo relativamente bajo a los

reportados por Kuang et al. (2015, E359) del 90,4% al encapsular luteína con maltodextrina y azúcar; y a los de Bustos-Garza et al., (2013, 644) en secados de astaxantina con agentes encapsulantes como la goma arábica, maltodextrina, proteína de soya e inulina. El rendimiento obtenido pudo deberse a que secar con flujos de alimentación altos, ocasiona rendimientos del proceso más bajos, debido a la lenta transferencia de calor y masa que se produce cuando se lleva a cabo con altos caudales de alimentación, haciendo que no se logre atomizar (Tonon, Brabet, & Hubinger, 2008, 414).

Para el mejor agente encapsulante, formulación 1 (goma arábica), (Bustos-Garza et al., 2013, 644), obtuvieron con la astaxantina un 58,65% de rendimiento; para la mezcla de goma arábica y maltodextrina utilizados por dichos autores para la astaxantina, obtuvieron un rendimiento de 50,95%, ambos rendimientos mayores a los obtenidos con la luteína en este ensayo.

El porcentaje de encapsulación varió entre el 2,38 y el 91,94%, donde se pudo observar que los menores rendimientos se obtuvieron con la formulación 5 (almidón modificado y maltodextrina); siendo las mejores formulaciones en términos de porcentaje de encapsulación la 1 (goma arábica) y la 3 (mezcla de goma arábica: maltodextrina: almidón modificado), donde se obtuvo 91,94 y 65,72%, respectivamente; estos porcentajes fueron similares a los obtenidos por Wang et al. (2011, 158) del $92,6 \pm 1,7$ % al encapsular luteína con una mezcla de gelatina y almidón.

Tabla 10. Caracterización de formulaciones realizadas por secado por atomización

| Formulación | % Rendimiento | % Encapsulación ±S.D | Tamaño (µm)±S.D | Aw ±S.D | % Humedad ±S.D |
|---------------|---------------|----------------------|-----------------|---------------|----------------|
| Formulación 1 | 32,70 | 91,94 ± 6,88 | 3,40 ± 1,49 | 0,33 ± 0,03 | 6,35 ± 2,57 |
| Formulación 2 | 28,48 | 56,06 ± 6,72 | 14,20 ± 1,62 | 0,175 ± 0,03 | 5,68 ± 0,10 |
| Formulación 3 | 23,72 | 65,72 ± 0,93 | 8,50 ± 2,35 | 0,220 ± 0,07 | 4,21 ± 2,17 |
| Formulación 4 | 18,85 | 36,77 ± 0,01 | 11,90 ± 3,56 | 0,120 ± 0,01 | 4,94 ± 1,26 |
| Formulación 5 | 9,94 | 2,38 ± 0,26 | 11,88 ± 4,63 | 0,325 ± 0,01 | 9,01 ± 1,73 |
| Formulación 6 | 21,00 | 31,82 ± 9,56 | 4,37 ± 1,27 | 0,320 ± 0,01 | 8,45 ± 0,17 |
| Formulación 7 | 21,31 | 6,03 ± 0,71 | 1,64 ± 0,06 | 0,185 ± 0,013 | 5,55 ± 0,76 |

Autores como Pu, Bankston, & Sathivel, (2011,123) secaron otras xantofilas tales como la astaxantina utilizando una temperatura de entrada de $180 \pm 2^{\circ}\text{C}$, aproximada a la que se utilizó en este trabajo, obteniendo una eficiencia de encapsulación del 84,8% con caseinato de sodio y lactosa; y Gil Garzon, Londoño-londoño, Gonzalez Hurtado, Millán Cardona, & Sanabria Rincon (2012, 95), una eficiencia del 86% en la microencapsulación de oleorresina de paprika con maltodextrina: almidón modificado (25:75), a una temperatura de entrada parecida.

Se lograron obtener bajos contenidos de humedad, entre 4,21-9,01%, lo cual puede deberse a que a altas temperaturas de entrada existe un gradiente de temperatura mayor entre la temperatura de alimentación atomizada y el aire de secado, resultando en una mayor fuerza para la evaporación de agua (Tonon, Brabet, & Hubinger, 2008, 414), lo cual implica un buen proceso de secado y que por el bajo contenido de humedad, puede durar mucho más tiempo. Se reportó en el secado de astaxantina con goma arábica valores de Aw y humedad de $0,35 \pm 0,01$ y $11,17 \pm 0,16$, respectivamente (Bustos-Garza et al., 2013, 644), porcentajes mayores a los obtenidos en este estudio. Sin embargo a la variable que se le dio más peso para la elección de la mejor formulación fue el porcentaje de encapsulación.

Las formulaciones 1 y 6, presentaron un tamaño de partícula similar entre ellas, pero la mezcla de goma arábica: maltodextrina: almidón modificado (Formulación 3), presentó un tamaño de partícula mayor; así cuando se encapsula solamente con maltodextrina, se obtiene el tamaño de partícula más pequeño ($1,64 \pm 0,06 \mu\text{m}$), mientras que con la mezcla de almidón: maltodextrina, se obtiene el de mayor tamaño de partícula ($14,20 \pm 1,62 \mu\text{m}$), esto puede deberse a la presencia dentro de su composición del almidón modificado. Las formulaciones que contienen almidón modificado, presentan mayor tamaño de partícula en comparación con las que no lo tienen; este aspecto es importante tener en cuenta para pensar en las adecuadas incorporaciones de los encapsulados en diferentes matrices alimenticias, dado que entre más pequeño su tamaño, mejor sería la homogenización.

Para el diseño de mezclas aplicado en la selección de agentes encapsulantes, se determinó que el modelo cuadrático es el que más se ajusta para este análisis, con un r^2 del 99.98%; dado que el valor-P para este modelo es menor que 0,05, se puede decir que existe una relación estadísticamente significativa entre la eficiencia de encapsulación y cada uno de los agentes encapsulantes utilizado, con un nivel de confianza del 95%.

Morfología de micropartículas

A las dos mejores formulaciones 1 (goma arábica) y 3 (mezcla goma arábica: maltodextrina: almidón modificado), escogidas por tener mayor eficiencia de encapsulación de luteína, se les realizó una caracterización morfológica, en la cual en las Imagen 1 se pueden observar las partículas vistas por microscopio óptico

(izquierda) y por SEM (derecha) de los agentes encapsulados antes del secado por atomización, y en la

Imagen 2 las mejores formulaciones.

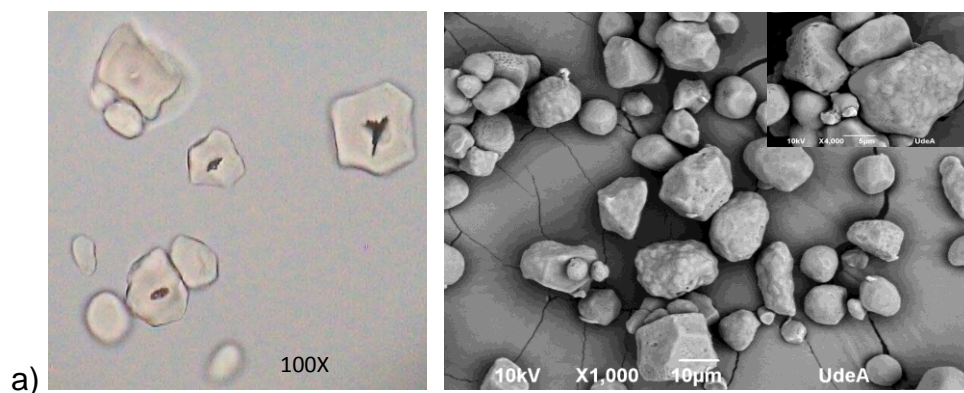
En la Imagen 1, se aprecian claramente las diferencias y particularidades que tiene cada uno de los agentes encapsulantes empleados, desde su forma, superficie y tamaño. En la

Imagen 2 se puede observar partículas esféricas y de diferentes tamaños, que son típicamente obtenidas cuando se hace un secado por atomización.

En la goma arábica se aprecia que el paso por el spray con el extracto de luteína logra modificar su aspecto físico, haciéndole tener una apariencia más definida. En la ampliación de la

Imagen 2 a), se ve una forma más redondeada que la obtenida en la b), lo que se podría sugerir, que tiene menor solubilidad, con respecto a la última por poseer una forma más amorfa que la otra.

Imagen 1. Agentes encapsulantes vistos por microscopía óptica (izquierda) y por SEM (derecha). a) Almidón Modificado, b) Goma arábica y c) maltodextrina



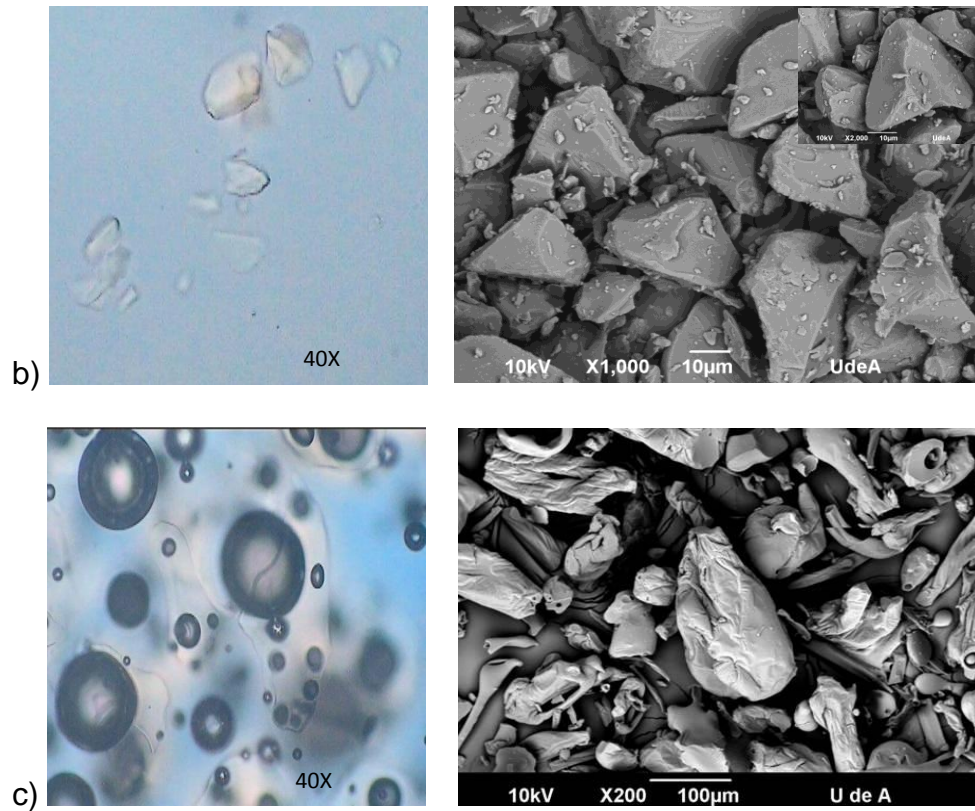
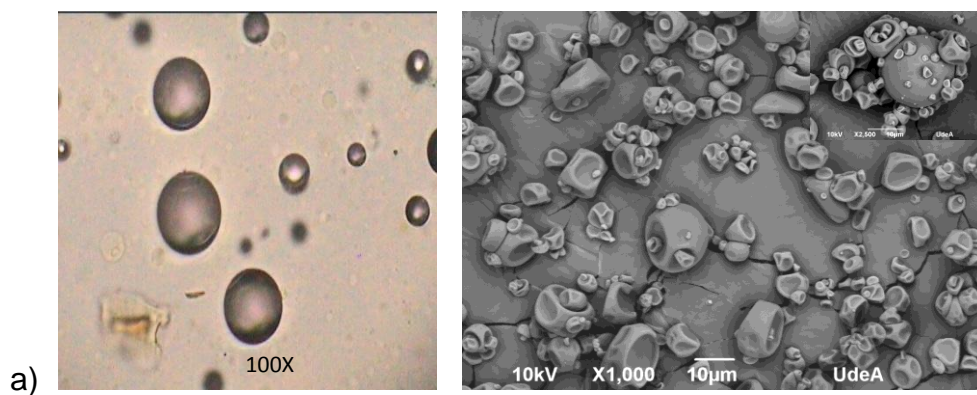
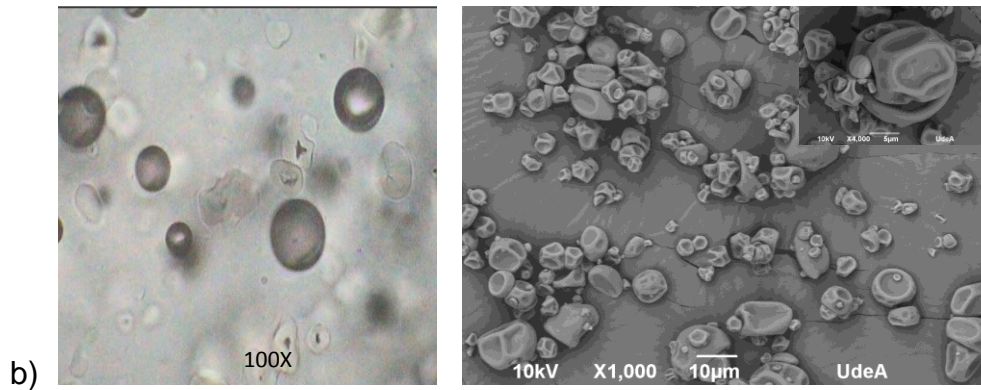


Imagen 2. Mejores formulaciones de encapsulación de luteína en secado por atomización vistas por microscopia óptica (izquierda) y por SEM (derecha). a) Formulación 1 y b) formulación 3





La morfología apreciada por SEM muestra que las microcápsulas tienen una forma amorfa y arrugada, pero al ser observadas por el microscopio óptico, se ven esféricas. Dicha diferencia puede deberse a la presión de vacío ejercida por el microscopio electrónico de barrido sobre las microcápsulas, haciéndolas contraer. Otra razón por la cual cambia la morfología de las microcápsulas es el aumento de la temperatura de entrada al secador por aspersión, ya que acelera la velocidad de secado de las gotitas, promoviendo la formación rápida de la corteza exterior de partículas. Como esta corteza se expande rápidamente debido a la gran tasa de generación de vapor, también puede causar daños en la superficie de las partículas produciéndoles fisuras, roturas o contracciones (Birchal, Passos, Wildhagen, & Mujumdar, 2005, 627; Bustos-Garza et al., 2013, 645; Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009, 619; Koç et al., 2011, 148).

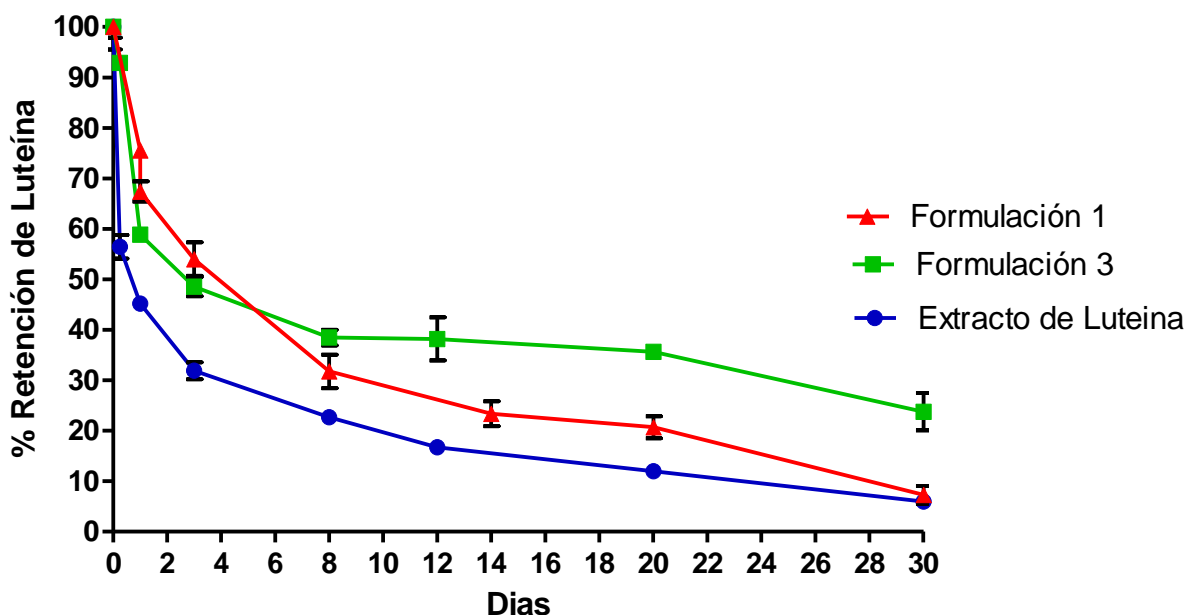
Estudio de estabilidad micropartículas

En la Figura 7 se puede observar que el extracto de luteína obtenida por FSC, cuando es encapsulado es más estable que el extracto sin encapsular, sin embargo, comparando con otras investigaciones, el extracto obtenido por FSC presenta mayor

estabilidad que los extraídos por solventes, ya que el uso de dichos solventes aumentan la velocidad de degradación, mientras que el extracto obtenido por FSC contiene el β -caroteno, que ayuda a su protección. El extracto de luteína de FSC, tuvo una tendencia de disminución similar a la que obtuvieron Shi & Chen, (1997, 39) a 25°C, con el estándar de luteína con adición de ácido ascórbico. Ante una temperatura de 25°C y en oscuridad, la degradación completa de carotenoides como el β -caroteno se da a los 10 días (Corralo Spada, Zapata Noreña, Ferreira Marczak, & Tessaro, 2012, 1168), mientras que en este proyecto, la degradación de la luteína en el extracto se da a los 30 días. Sin embargo, se puede apreciar que al tercer día, el extracto había perdido aproximadamente el 70% de la luteína inicial, después la degradación se da de una forma paulatina, perdiendo al octavo día un 10% más del contenido de luteína y el día 20 perdió otro 10% adicional.

Con las formulaciones 1 y 3, se puede observar que ambas encapsulaciones van perdiendo de manera similar su capacidad de protección, sin embargo a pesar de que la formulación 1 tiene mayor porcentaje de encapsulación, la formulación 3 presenta mayor protección para la luteína, esto es probablemente debido a que la amilosa presente en el almidón posee una alta capacidad de formación de película y sus altos niveles pueden conducir a la formación rápida de corteza, previniendo la pérdida de este compuesto durante el proceso de secado, ya que la amilasa tiende a formar una red mediante sus enlaces de OH (Corralo Spada et al., 2012, 1169).

Figura 7. Estabilidad de las formulaciones 1 y 3 obtenidas por secado por atomización y extracto obtenido por FSC a condiciones de a 40°C y 75% humedad relativa



Al terminar el estudio, en el día 30, se observó que tanto el extracto de luteína sin encapsular, como el extracto encapsulado con goma arábica coincidieron con el mismo porcentaje de pérdida de luteína con respecto al cálculo inicial (Más del 90% de pérdida de luteína). Según la prueba estadística de comparación múltiple de Newman-Keuls, donde el valor $p < 0,05$, se encuentran diferencias significativas el día 20 entre todas las muestras, también al día 30 entre la formulación 3 y la formulación 1 y el extracto de luteína hay diferencias, pero no hay diferencia entre el la formulación 1 y el extracto de luteína. Lo que nos podría sugerir que se puede asegurar una protección con las dos formulaciones hasta el día 20; y que la formulación 1 ya en el día 30 no es adecuada seguirla trabajando a las condiciones de almacenamiento trabajadas en este ítem.

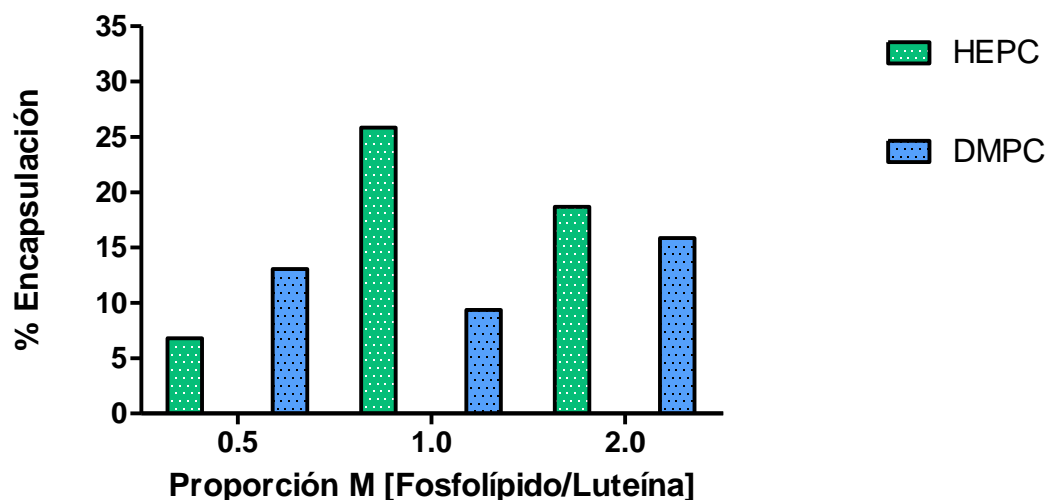
Encapsulación por liposomas y caracterización:

En la

Figura 8, se observa que en las proporciones molares fosfolípido/luteína trabajadas, el porcentaje de encapsulación para el HEPC, varía de un 5 a un 25%, donde la relación que mayor porcentaje de encapsulación presenta para este fosfolípido natural es la de 1:1. Para DMPC, el porcentaje de encapsulación varió de un 10 a un 15%, siendo un rango de encapsulación más estrecho que el que presenta el HEPC. Por su parte, el fosfolípido sintético (DMPC), presenta una mejor encapsulación en la concentración de 2:1.

El HEPC presentó el menor porcentaje de encapsulación a una relación molar de fosfolípido/luteína de 0.5 y para el DMPC la relación más baja fue a 1.

Figura 8. Proporción molar de fosfolípido utilizados/luteína vs % Encapsulación



En otras investigaciones la luteína encapsulada con EYPC (Egg Yolk phosphatidylcholine), a una concentración de 1.5 molar (carotenoide/ lípido) presenta una eficiencia de encapsulación del 67.2%, un alto rendimiento que puede explicarse por el espacio de distribución disponible en el liposoma y la incorporación de la luteína en dos orientaciones diferentes, perpendiculares y paralelas al plano de la membrana

(Shafaa et al., 2007, 116). La incorporación de luteína en una pequeña concentración (1 y 2 %) puede aumentar la microviscosidad, disminuyendo la fluidez de la membrana (Tan et al., 2013, 8180), lo que hace que en fosfolípidos como el HEPC, se pueda saturar más fácil la membrana, haciéndola más rígida y no permitiendo que encapsule más.

Con respecto a los resultados de tamaño de partícula observados en la Tabla 11, de los dos fosfolípidos utilizados a las diferentes concentraciones, se puede deducir que el DMPC presenta un menor tamaño que los elaborados con HEPC, esto se puede deber a que probablemente al ser el DMPC un fosfolípido sintético, se pueda predecir mejor su comportamiento que el de uno natural, como lo es el HEPC, en el cual su estructura química no se encuentra completamente definida, pudiendo ser más susceptible a condiciones externas que el otro, sin embargo se obtuvo lo esperado en este caso, pues todas las concentraciones tienen la mayor población de partículas de tamaño inferior a los 200 nm, que es lo deseado para una aplicación farmacéutica con ambos fosfolípidos (Patil & Jadhav, 2014, 9).

Tabla 11. Tamaño de partículas de las diferentes proporciones molares (0,5, 1 y 2) con los fosfolípidos HEPC y DMPC

| FOSFOLIPIDO | Proporción Fosfolip/Luteína | 0,5:1 | 1:1 | 2:1 |
|-------------|--------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | | Tamaño(nm) ±S.D. | Tamaño (nm) ±S.D. | Tamaño (nm) ±S.D. |
| HEPC | Muestra | 193,3 ±3,20 | 199,3±0,75 | 131,2±2,55 |
| | Blanco | 188,9±2,76 | 189,1±2,82 | 127,4±2,25 |
| DMPC | Muestra | 174,6±4,46 | 176,5±3,84 | 179,6±3,02 |

| | | | | |
|--|---------------|------------|------------|------------|
| | Blanco | 170,0±2,24 | 142,4±3,18 | 144,3±0,63 |
|--|---------------|------------|------------|------------|

En cuanto a los resultados de potencial Z para las diferentes formulaciones (Tabla 12) se aprecia que hay mayor estabilidad en los blancos que en las muestras, lo que podría sugerir que la incorporación del extracto de luteína dentro de los fosfolípidos altera la estructura del liposoma, dándole mayor inestabilidad, también esto se puede deber a que se encuentra una interacción en las membranas formadas por los liposomas, donde el fosfolípido y el extracto generan una mayor fluidez de la membrana. La mayor estabilidad con respecto al valor de potencial z fue para la formulación de HEPC:Luteína (1:1), dado que tiene -30,04 mV, para el DMPC:Luteína la mejor formulación corresponde a la de 2:1 dado que tiene un valor -35.02 mV, mientras las otras formulaciones, son inferiores a los -20mV, valor que ya genera gran inestabilidad, pues se sabe que las partículas con potenciales zeta más negativos que -30 mV son considerados físicamente estables, y alrededor de -20 mV sólo proporcionan una estabilidad a corto plazo (Mitri et al., 2011, 271; Mishra et al., 2009, 187).

De acuerdo a lo anterior y haciendo una correlación entre el tamaño, el potencial z y el porcentaje de encapsulación, se puede reconfirmar que las formulaciones adecuadas para realizar el ensayo de estabilidad para los liposomas en el tiempo es para DMPC 2:1 y HEPC 1:1.

Tabla 12. Potencial Z de las diferentes proporciones molares (0,5, 1 y 2) con los fosfolípidos HEPC y DMPC

| | Proporción | 0,5:1 | 1:1 | 2:1 |
|--|-------------------|--------------|------------|------------|
|--|-------------------|--------------|------------|------------|

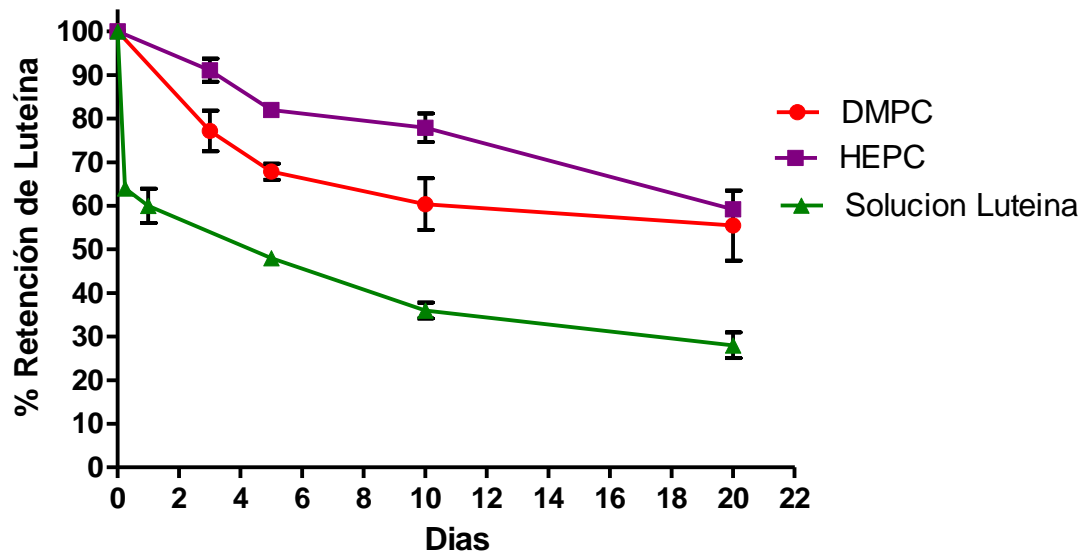
| FOSFOLIPIDO | Fosfolip/Luteína | Potencial Z (mV) ± S.D. | Potencial Z (mV) ± S.D. | Potencial Z (mV) ± S.D. |
|-------------|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| HEPC | Blanco | -20,95 ± 0,16 | -40,56 ± 2,47 | -25,36 ± 0,66 |
| | Muestra | -15,36 ± 1,44 | -30,04 ± 0,12 | -17,66 ± 1,03 |
| DMPC | Blanco | -40,93 ± 0,28 | -43,56 ± 2,0 | -39,05 ± 0,76 |
| | Muestra | -20,18 ± 0,96 | -20,18 ± 0,26 | -35,02 ± 0,92 |

Estudio de estabilidad de liposomas

Como se esperaba, la solución de luteína se disminuye notablemente en el tiempo, cuando no está protegida por ningún agente encapsulante. La disminución de un 40% de luteína se da en menos de un día, a condiciones de refrigeración de 4°C (Figura 9). Entre las formulaciones con el fosfolípido natural y el sintético, se observó que la mejor protección a estas condiciones en los primeros 3 días fue para el HEPC. Para el día 20 tanto DMPC y HEPC presentan diferencias significativas con la solución de luteína, sin embargo entre ellas no hay ninguna, lo que sugeriría que en este punto cualquiera de los dos fosfolípidos permite una protección de luteína similar. Pero analizando el día 10, todas las relaciones entre el DMPC, HEPC y la solución de luteína son estadísticamente diferentes, por lo cual si se quisiera hacer una solución liposomal que protegiera más la luteína y se fuera almacenar hasta 10 días, se podría escoger el HEPC, valor $p < 0,05$, con la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

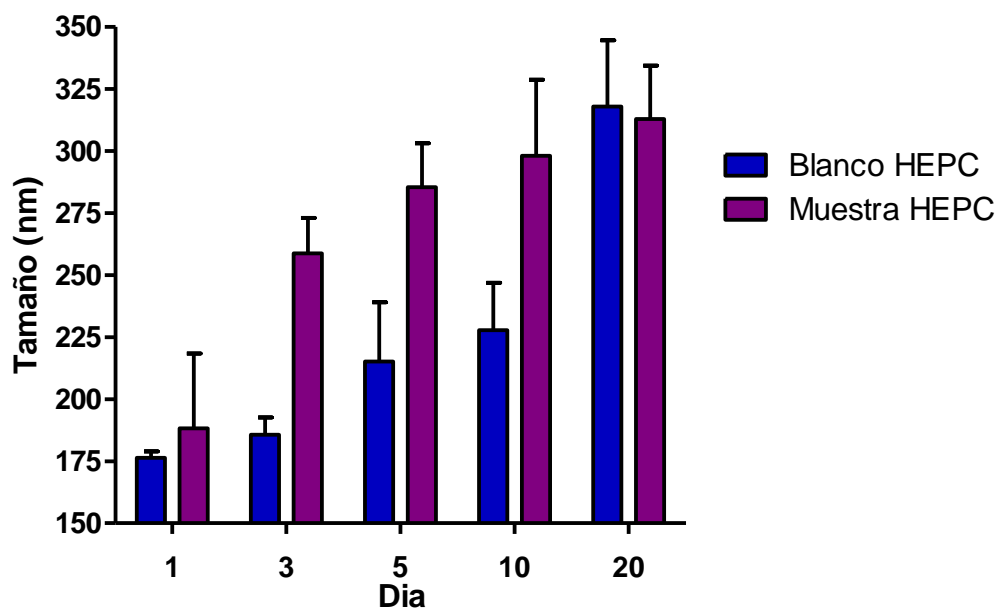
Otros investigadores han reportado que las bajas temperaturas retardan la degradación de la luteína, sin embargo cuando se prepara una solución de luteína con ácido ascórbico, al ser almacenada a diferentes temperaturas, esta se degrada completamente al tercer día a 50°C, al séptimo día a 25°C y a los 75 días a 8°C. (Shi & Chen, 1997, 40).

Figura 9. Estabilidad de liposomas con luteína y solución de luteína sin encapsular a 4°C a través de tiempo



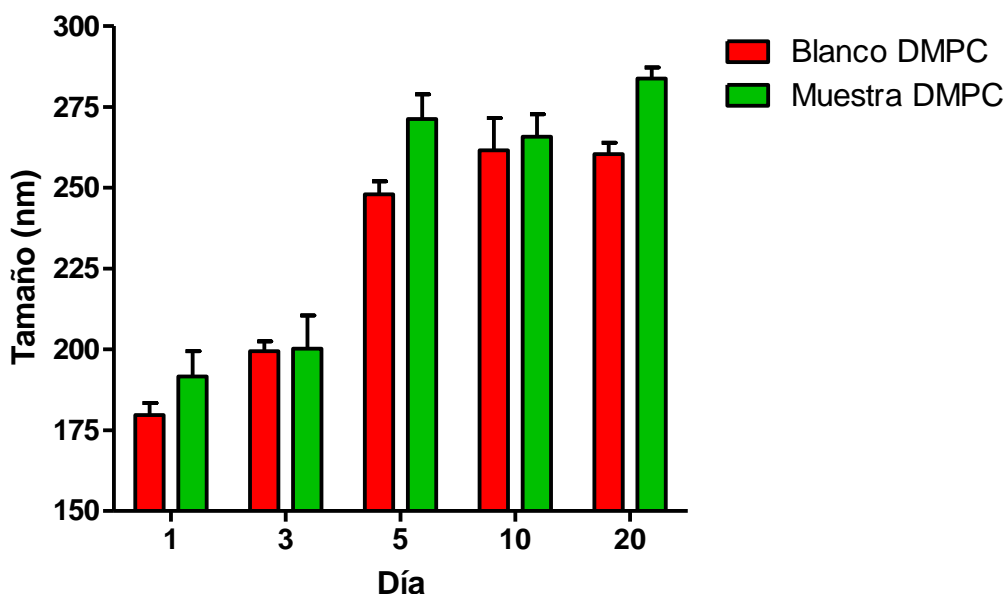
Para el tamaño de partícula de los liposomas elaborados con HEPC, en la Figura 10, se puede observar que a partir del día 10, se da un incremento en el tamaño de partícula, porque se observa que más del 50% de la población es mayor de 200nm, mostrando mayor inestabilidad en el tiempo y tendencias a aglomerarse. Después del día 20, hay presencia de una pequeña población de mayor tamaño que se puede deber a la aglomeración de las partículas por el debilitamiento de las fuerzas ejercidas por cada una de ellas.

Figura 10. Estabilidad de tamaño de liposomas de HEPC en el tiempo a condiciones de refrigeración



Por otra parte, en la Figura 11, se observa que el tamaño de partícula durante todo el ensayo para el DMPC, no presenta un cambio considerable con el tiempo, como sí ocurrió con el HEPC, debido a su naturaleza sintético explicada anteriormente. Pero para el blanco del DMPC al día 20, se aprecia la aparición de una nueva población de menor tamaño que al contrario del HEPC, no es un aglomerado, sino que puede ser una probable desintegración de los fosfolípidos.

Figura 11. Estabilidad de tamaño de liposomas de DMPC en el tiempo a condiciones de refrigeración



Algunos investigadores han reportado aumentos insignificantes en el tamaño de partícula, en nanopartículas sólidas con polímeros, después de un mes de almacenamiento a 4°C (menos de 40 nm) (Mitri et al., 2011, 271). Esto indica que en esta nanosuspensión podría haber ocurrido una ligera agregación, la cual se puede considerar como no ser relevante para el uso en productos de dérmicos (Mishra, Shaal, Müller, & Keck, 2009, 185). Después de 30 días Liang, Shoemaker, Yang, Zhong, & Huang, (2013, 1253), reportaron un aumento de hasta 100 nm, con respecto al tamaño inicial en las nanoemulsiones de β -caroteno, a 4°C.

En las Tabla 13 y Tabla 14 se puede ver el potencial z de los liposomas elaborados con HEPC y DMPC, tendiendo a un mismo comportamiento de disminución de potencial, siendo más notorio para HEPC, lo que implica mayor estabilidad para los liposomas elaborados con dicho fosfolípido. En este caso el HEPC, dentro de su estudio de estabilidad pasa de un potencial z de -40 mV (en el día 1) a -18 mV (en el día 20), mostrando una reducción de potencial z, y aumentando la inestabilidad en los

liposomas. Para el DMPC, al inicio del estudio el valor del potencial z, fue de -29 mV, y finaliza con un potencial de -10 mV; indicándonos una mayor disminución en el potencial z en el HEPC.

Tabla 13. Cambio del potencial Z de liposomas de HEPC con luteína en el tiempo

| Días | BLANCO HEPC Potencial Z (mV) ± S.D. | MUESTRA HEPC Potencial Z (mV) ± S.D. |
|-------------|--|---|
| 1 | -41,57 ± 3,10 | -30,04 ± 0,47 |
| 3 | -30,42 ± 1,73 | -27,05 ± 1,59 |
| 5 | -24,45 ± 1,97 | -14,86 ± 1,56 |
| 10 | -18,23 ± 0,76 | -13,58 ± 0,76 |
| 20 | 13,18 ± 2,67 | 18,18 ± 9,74 |

El blanco obtiene una mayor estabilidad que la muestra de HEPC, pueda deberse a que la incorporación de luteína dentro de la membrana del fosfolípido en la cantidad trabajada no genere la estabilidad que se esperaría, debido a la ubicación de esta dentro de la membrana y ocasionando que sea más susceptible a aglomerados en el tiempo. Sin embargo la incorporación del extracto dentro del liposoma elaborado con DMPC, genera mucha mayor estabilidad que el que no lo tiene, dado que los carotenoides generan cambios en la estructura del liposoma (Xia et al., 2015, 172), otorgando mayor estabilidad al sistema.

Tabla 14. Cambio del potencial Z de liposomas de DMPC y luteína en el tiempo

| Días | BLANCO DMPC Potencial Z (mV) ± S.D. | MUESTRA DMPC Potencial Z (mV) ± S.D. |
|-------------|--|---|
| 1 | -32,23 ± 2,74 | -29,42 ± 0,64 |
| 3 | -16,83 ± 0,67 | -21,41 ± 0,68 |
| 5 | -14,69 ± 0,79 | -20,91 ± 0,34 |
| 10 | -11,45 ± 0,29 | -20,33 ± 0,66 |
| 20 | -8,28 ± 0,45 | -10,26 ± 0,64 |

El potencial z también se puede relacionar con el tamaño de partícula y la formación de aglomerados, de tal manera que en el almacenamiento de las soluciones liposomales los cambios estructurales de la fase lipídica que puedan ocurrir, conducen a la reducción del potencial zeta y el crecimiento de las partículas, para lo cual el principio de la aglomeración en dispersiones se encuentra en un rango de potencial zeta de -20 mV a -11 mV (Freitas & Müller, 1998, 226).

A medida que el valor absoluto del potencial zeta aumenta, los sistemas dan dispersiones generalmente estables debido a repulsión electrostática entre partículas; sin embargo, como el potencial zeta se aproxima a cero, la estabilidad se reduce en la dispersión dándose el proceso de agregación (Potential & Analyzer, n.d., 3). Lo que se produce al comparar el potencial z con el tamaño en las gráficas anteriores, un aumento de tamaño con la disminución del potencial.

Conclusiones

La obtención de luteína a partir de excedentes de cosecha de lechuga y repollo, se puede considerar como una alternativa para la generación de productos de alto valor agregado; promoviendo así opciones de tener compuestos bioactivos o inclusive colorantes naturales, que pueden ser utilizados en diferentes industrias, como se pudo determinar al comparar la cantidad de luteína de estas matrices con respecto a otras matrices como la caléndula o vegetales de hojas verde de otras regiones del mundo

En el proceso de extracción de luteína, por fluidos supercríticos, se obtuvo el mayor rendimiento total de 6,14% y una concentración de luteína de 6,07 mg/g a una temperatura de 75°C y 350 bar, pero la mejor concentración de luteína fue de 9,42mg/g a las condiciones de 65°C y 350 bar y con un rendimiento total de 3,25%, permitiendo determinar que a las menores condiciones de presión y temperatura empleadas se obtenía mayor cantidad de luteína en el extracto.

Mediante la cinética de extracción de luteína a partir de la mezcla lechuga: repollo, se pudo determinar que a partir del minuto 50 comenzaba la extracción de esta y continúa hasta el minuto 300, donde se presentó la mayor cantidad de luteína extraída.

El mejor agente encapsulante para el secado por aspersion fue la goma arábica, ya que con esta se obtuvo el mayor porcentaje de encapsulación (91,94%), seguido de la mezcla goma arábica: maltodextrina: almidón modificado (65,7%), sin embargo, de acuerdo al estudio de estabilidad realizado, esta última proporciona mayor protección al extracto de luteína obtenido por FSC.

De los fosfolípidos trabajados DMPC y HEPC, la proporción molar (fosfolípido/luteína) que mayor contenido de luteína encapsuló fue de 2:1 y 1:1, con un porcentaje de encapsulación del 15,8 y 25, 8%, respectivamente.

De acuerdo al estudio de estabilidad se encontró que el HEPC, brinda mayor protección del extracto de luteína, con respecto al DMPC, porque con este se logra menores pérdidas de luteína en el tiempo, sin embargo, con respecto al tamaño de partícula, el HEPC, presenta mayor variabilidad a medida que pasa el tiempo, mientras que el DMPC, se mantiene mucho más estable.

La encapsulación de luteína por atomización y liposomas es una alternativa de protección que puede ser empleada en diferentes industrias que deseen tener dentro de su portafolio de productos la luteína, en diferentes presentaciones, asegurando su funcionalidad, dado que según los diferentes estudios de estabilidad realizados, cuando este compuesto no está encapsulado se pierde notablemente a velocidades mucho mayores que las formulaciones investigadas.

Referencias

- Abdel-Aal, E.-S. M., Akhtar, H., Zaheer, K., & Ali, R. (2013). Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*, 5(4), 1169–85. <http://doi.org/10.3390/nu5041169>
- Ajila, C. M., Naidu, K. a., Bhat, S. G., & Rao, U. J. S. P. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105(3), 982–988. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.052>
- Aldana, A. S., Sandoval, E. R., & Aponte, A. A. (2004). Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. *Ingeniería Y Competitividad*, 5(2), 73–83.
- Alzate Tamayo, L. M. (2013). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales: una aproximación desde la nutrición animal (trabajo de maestría)*. Universidad de Antioquia, Medellín.
- Alzate, L. M., González, D., & Londoño-Londoño, J. (2013). Recovery of carotenoids from agroindustrial by-products using clean extraction techniques: supercritical fluid extraction and ultrasound assisted extraction. In *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids* (p. 7). Colombia.
- Amazon.es. (2016). Oclovit. Recuperado de <https://www.amazon.es/Oclovit-luteina-aceite-pescado-DietMed/dp/B00NC7353W>
- Amway Europa. (2016). Arándanos con Luteína NUTRILITE™. Recuperado de <https://www.amway.es/product/8007,arandanos-con-luteina-nutriline#.VztVEeSLDXg>
- Aravena Contreras, R. I. (2011). *Haematococcus pluvialis usando CO2 supercrítico (Trabajo de maestría)*. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile.
- Arellano Corral, C. A. (2011). *Extracción de luteína a partir de flores de Tagete (Tagete erecta) y estabilización por microencapsulación*. Universidad de Chile.
- Aruna, G., Mamatha, B. S., & Baskaran, V. (2009). Lutein content of selected Indian vegetables and vegetable oils determined by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(7-8), 632–636. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.03.006>
- Augusta, A., Odorissi, X., & Mercadante, Z. (2012). Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. *Quim. Nova*, 35(10), 2057–2062.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Wasim Siddiqui, M., ... & González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866–1874. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>
- Beltrán, B., Cuadrado, C., Estévez, R., Jiménez, S., & Olmedilla, B. (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutrición Hospitalaria*, 27 (4), 1334–1343.

- Birchal, V., Passos, M. L., Wildhagen, G., & Mujumdar, A. (2005). Effect of Spray-Dryer Operating Variables on the Whole Milk Powder Quality. *Drying Technology*, 23(3), 611–636. <http://doi.org/10.1081/DRT-200054153>
- Boonnoun, P., Nerome, H., Machmudah, S., Goto, M., & Shotipruk, A. (2013). Supercritical anti-solvent micronization of marigold-derived lutein dissolved in dichloromethane and ethanol. *The Journal of Supercritical Fluids*, 77, 103–109. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.02.026>
- Boticae. (2016a). DeVision. Recuperado de <http://www.boticae.com/DeVision-30-Capsulas?search=DeVisi%C3%B3n>
- Boticae. (2016b). DeVision Retinox. Recuperado de <http://www.boticae.com/DeVision-Retinox>
- Bovier, E. R., Lewis, R. D., & Hammond, B. R. (2013). The relationship between lutein and zeaxanthin status and body fat. *Nutrients*, 5(3), 750–7. <http://doi.org/10.3390/nu5030750>
- Bustos-Garza, C., Yáñez-Fernández, J., & Barragán-Huerta, B. E. (2013). Thermal and pH stability of spray-dried encapsulated astaxanthin oleoresin from *Haematococcus pluvialis* using several encapsulation wall materials. *Food Research International*, 54(1), 641–649. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.061>
- Canovas, R., Cypel, M., Farah, M. E., & Belfort Jr., R. (2009). Pigmentos maculares. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 72(6), 839–844.
- Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, M. de la C., & Pérez-gil Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3), 233–241.
- Chatterjee, S., & Banerjee, D. K. (2002). Preparation, Isolation, and Characterization of Liposomes Containing Natural and Synthetic Lipids. In S. Basu & M. Basu (Eds.), *Methods in Molecular Biology: Liposome Methods and Protocols* (V 199, pp. 3–16). Humana Press.
- comercializadora farmacéutica de Chiapas. (2016a). Leche Promil Gold. Recuperado de <http://www.fahorro.com/leche-promil-gold-c-luteina-400-g.html>
- comercializadora farmacéutica de Chiapas. (2016b). Leche Sma Gold. Recuperado de <http://www.fahorro.com/leche-sma-gold-c-luteina-400-g.html>
- consumer Healthcare - pfizer. (2016). centrum silver. Recuperado de <http://www.centrum.cl/productos/multivitaminico-centrum-silver.php>
- CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). (2006). *El Cultivo de las Crucíferas Brócoli, Coliflor, Repollo, Repollo, Col China*. (J. E. Jaramillo N. & C. A. Díaz D, Eds.) (20th ed.). Rionegro, Antioquia.
- Corralo Spada, J., Zapata Noreña, caciono P., Ferreira Marczak, L. D., & Tessaro, I. C. (2012). Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydrate Polymers*, 89(4), 1166–1173. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.090>
- Dane. (2012). *Resultados Encuesta Nacional Agropecuaria Ena. Revista ib* (Vol. 3).

Bogotá.

- Del Campo, J. a, Rodríguez, H., Moreno, J., Vargas, M. a, Rivas, J., & Guerrero, M. G. (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 848–54. <http://doi.org/10.1007/s00253-003-1510-5>
- Dias, M. G., Camões, M. F. G. F. C., & Oliveira, L. (2014). Carotenoid stability in fruits , vegetables and working standards – Effect of storage temperature and time. *Food Chemistry*, 156, 37–41.
- Diet Horizon. (2016). DH082 - Total Vision. Recuperado de <http://www.diet-horizon.com/index.php?page=5&ref=DH082>
- Dietetica online. (2013). Visio - Luteina - Salud Ocular. Recuperado de <http://www.dieteticaonline.es/dietetica/ojos-y-vista/6418-visio-luteina-salud-ocular-30-capsulas-super-diet.html>
- Dordevic, V., Balanc, B., Belcak-Cvitanovic, A., Levic, S., Trifkovic, K., Kalusevic, A., ... Nedovic, V. (2014). *Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. Food Engineering Reviews* (Vol. 7). <http://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>
- Doz.pl. (2016). Zuma, kapsułki. Recuperado de https://www.doz.pl/apteka/p56579-Zuma_kapsulki_30_szt.
- Drogueria Inti. (2016). Opti-Vimin. Recuperado de <http://www.inti.com.bo/productos/inti/opti-vimin-47i03q1j/>
- Edwards, K. a, & Baeumner, A. J. (2006). Analysis of liposomes. *Talanta*, 68(5), 1432–41. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.031>
- Ele2pharma. (2016a). Lutein 10 DHA. Recuperado de <http://www.ele2pharma.es/tienda/ofthalmologia-1/lutein-10-dha>
- Ele2pharma. (2016b). LuteinGold. Recuperado de <http://www.ele2pharma.es/tienda/ofthalmologia-1/luteingold-30-capsulas>
- Erdman, J. W., Ford, N. a, & Lindshield, B. L. (2009). Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 229–35. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2008.10.022>
- Escalona Lopez, S. E. (2004). *Encapsulados de luteína-enocianina y su aplicación en alimentos*. Universidad de Chile.
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628–647. <http://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
- FarmaCalabria. (2015). Nutrof Omega. Recuperado de <http://www.farmaciacalabria.com/producto/nutrof-omega-luteina-36-capsulas>

- Fernández-Sevilla, J. M., Acién Fernández, F. G., & Molina Grima, E. (2010). Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), 27–40. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2420-y>
- Flint, O. (1996). *Microscopía de los alimentos Manual de métodos prácticos utilizando la microscopía óptica*. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S.A.
- Freitas, C., & Müller, R. H. (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN®) dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 168(2), 221–229. [http://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00092-1](http://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00092-1)
- Fu, W., Paglia, G., Magnúsdóttir, M., Steinarsdóttir, E. A., Gudmundsson, S., Pálsson, B., ... Brynjólfsson, S. (2014). Effects of abiotic stressors on lutein production in the green microalga *Dunaliella salina*. *Microbial Cell Factories*, 13(3), 1–9.
- Fuxion Prolife. (2014). Vitaenergía de Fuxion Prolife. Recuperado de <http://fuxionprolife-team.com/vitaenergía-de-fuxion-prolife-el-plus-de-vitaminas-y-energía-que-estabas-necesitando/>
- FuXion PrOLife. (2016a). FLX TE FUXION PROLIFE. Recuperado de <http://fuxionprolifeproductos.blogspot.com.co/2012/06/flx-te-fuxion.html>
- FuXion PrOLife. (2016b). PROBAL FUXION PROLIFE. Recuperado de <http://fuxionprolifeproductos.blogspot.com.co/2012/12/probal-fuxion-prolife.html>
- FuXion PrOLife. (2016c). vita energía. Recuperado de http://fuxionprolifeproductos.blogspot.com.co/2012/06/vita-energía-xtra-t-fuxion_03.html
- Gao, Y., Liu, X., Xu, H., Zhao, J., Wang, Q., Liu, G., & Hao, Q. (2010). Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) with vegetable oils as continuous co-solvents. *Separation and Purification Technology*, 71, 214–219. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.11.024>
- Gil Garzon, M. A., Londoño-londoño, J., Gonzalez Hurtado, M. I., Millán Cardona, L. de J., & Sanabria Rincon, C. C. (2012). Aplicación de la paprika extraída por fluidos supercríticos y microencapsulada por spray-drying en un producto embutido . Una alternativa como colorante natural. *Revista Lasallista de Investigacion*, 9(2), 87–101.
- Gong, Y., Plander, S., Xu, H., Simandi, B., & Gao, Y. (2011). Supercritical CO₂ extraction of oleoresin from marigold (*Tagetes erecta* L.) flowers and determination of its antioxidant components with online HPLC-ABTS(·+) assay. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(15), 2875–81. <http://doi.org/10.1002/jsfa.4537>
- Gonnet, M., Lethuaut, L., & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 146(3), 276–90. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.037>
- Gonzalez Perez, M. (2004). Los liposomas : usos y perspectivas. *Revista Cubana de Quimica*, XVII(1), 8–33.
- Guadarrama-Lezama, A. Y., Dorantes-Alvarez, L., Jaramillo-Flores, M. E., Pérez-Alonso, C., Niranjana, K., Gutiérrez-López, G. F., & Alamilla-Beltrán, L. (2012).

- Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli (*Capsicum annum* L.) and their microencapsulates obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 112(1-2), 29–37. <http://doi.org/10.1016/j.foodeng.2012.03.032>
- Healthaid. (2016). Eye-Support. Recuperado de <http://www.healthaid.co.uk/Health-Categories/Eye-Support>
- healthy-america. (2015). Occus. Recuperado de <http://healthy-america.com.co/tienda/categorias/ocular/occus/>
- Herbonatura. (2012). Lutein eyes. Recuperado de <http://herbonatura.es/lutein-eyes-luteina-zeaxantina-18mg-30-c%C3%A1psulas-solaray>
- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. *Food Chemistry*, 98, 136–148.
- Holden, J. M., Eldridge, A. L., Beecher, G. R., Buzzard, M., Bhagwat, S., Davis, C. S., ... Haytowitz, D. (1999). Carotenoid Content of U.S. Foods: An Update of the Database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 169–196.
- Hsu, Y.-W., Tsai, C.-F., Chen, W.-K., Ho, Y.-C., & Lu, F.-J. (2011). Determination of lutein and zeaxanthin and antioxidant capacity of supercritical carbon dioxide extract from daylily (*Hemerocallis disticha*). *Food Chemistry*, 129(4), 1813–1818. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.116>
- Hunan Nutramax Inc. (2014). La luteína y la zeaxantina Extract Powder Tagetes Erecta Naranja Amarillo. Recuperado de http://es.nutramaxextract.com/china-la_luteina_y_la_zeaxantina_extract_powder_tagetes_erecta_naranja_amarillo-p41935.html
- iHerb Inc. (2016). Eye Support. Recuperado de http://www.iherb.com/Dr-Mercola-Premium-Supplements-Eye-Support-with-Lutein-30-Capsules/39926?gclid=Cj0KEQjwvOC5BRCb_8yNmZ_Is9IBeiQACTz8vpdZtMhDrmrqu5mkXbeEWzXnkUgaTMkHcaWisMK9FT8aAtQz8P8HAQ
- Instituto de Salud Publica de Chile. (2010). *validacion de metodos y determinacion de la incertidumbre de la medicion: Aspectos generales sobre la validacion de metodos*. (B. Duffau, F. Rojas, I. Guerrero, L. Roa, L. Rodríguez, M. Soto, ... "Se, Eds.) (Año 2010). Santiago.
- Irigoyen Cossío, M. J., Kioshi De Ugarte, C., & Soliz Torrico, T. (n.d.). " LICO JUICE " JUGO RICO EN LUTEÍNA Y LICOPENO. *Journal Boliviano de Ciencias*, 26–28.
- Jansen, M. A. K., Hectors, K., O'Brien, N. M., Guisez, Y., & Potters, G. (2008). Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Science*, 175(4), 449–458.
- Kemin. (2016). Products. Recuperado de <https://www.kemin.com/en/north-america/products?title=LUTEIN>
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 385–392. <http://doi.org/10.1016/j.foodeng.2010.01.016>

- Khalil, M., Raila, J., Ali, M., Islam, K. M. S., Schenk, R., Krause, J., ... Rawel, H. (2012). Stability and bioavailability of lutein ester supplements from Tagetes flower prepared under food processing conditions. *Journal of Functional Foods*, 4, 602–610.
- Koç, M., Koç, B., Susyal, G., Yilmazer, M. S., Ertekin, F. K., & Bağdatlıoğlu, N. (2011). Functional and physicochemical properties of whole egg powder: Effect of spray drying conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 141–149. <http://doi.org/10.1007/s13197-010-0159-1>
- Kuang, P., Zhang, H., Bajaj, P. R., Yuan, Q., Tang, J., Chen, S., & Sablani, S. S. (2015). Physicochemical Properties and Storage Stability of Lutein Microcapsules Prepared with Maltodextrins and Sucrose by Spray Drying. *Journal of Food Science*, 80(2), E359–E369. <http://doi.org/10.1111/1750-3841.12776>
- Kuhnen, S. (2012). Brazilian Maize Landraces Silks as Source of Lutein: An Important Carotenoid in the Prevention of Age-Related Macular Degeneration. *Food and Nutrition Sciences*, 03(11), 1609–1614. <http://doi.org/10.4236/fns.2012.311210>
- Kumar Tiwary, B., Kumar, A., Kumar Nanda, A., & Chakraborty, R. (2014). A Study on Optimization of Marigold Petal Yield , Pure Lutein , and Formulation of Free-Flowing Lutein Esters. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 17(3), 175–181.
- lamberts Plus. (2016). Lutein Plus. Recuperado de <http://www.lamberts.es/lutein-plus>
- Lasic, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16(7), 307–21.
- Latif, N., & Bachhawat, B. K. (1984). Liposomes in immunology. *Journal of Biosciences*, 6(4), 491–502. <http://doi.org/10.1007/BF02703901>
- LDTD (Laboratorio de Diseño de estrategias de Targeting de Drogas). (2006). Primera escuela de nanotecnología Farmaceutica. (Universidad Nacional de Quimes, Ed.) *Liposomas En Latinoamérica* 2, 6.
- Lin, J., Lee, D., & Chang, J. (2014). Lutein in specific marigold flowers and microalgae. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 000, 1–5.
- Linio. (2016). LECHE SIMILAC IQ. Recuperado de <https://www.linio.com.co/p/leche-similac-iq-etapa-2-x-850-grm-vaazb5>
- Liverpool. (2016). Bebidas para la vista Good 4 You. Recuperado de <http://www.liverpool.com.mx/tienda/paquete-de-8-bebidas-para-la-vista-good-4-you/prod1350017?skuld=sku680015>
- Londoño-Londoño, J., Lima, V. R. De, Lara, O., Gil, A., Pasa, T. B. C., Arango, G. J., & Pineda, J. R. R. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 119(1), 81–87. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.075>
- Lopera C, S. M., Guzman O, C., Cataño R, C., & Gallardo C, C. (2009). Desarrollo y caracterización de micropartículas de ácido fólico formadas por secado por aspersión , utilizando goma arábica y maltodextrina como materiales de pared. *Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmaceutica*, 16(1), 55–65.

- Loura, L. M. S., & Almeida, R. F. M. de. (2004). *Tópicos de Biofísica de Membranas*. (Lidel, Ed.). Porto: Lidel, Edicoes Técnicas Lda.
- Macías-Sánchez, M. D., Fernandez-Sevilla, J. M., Fernández, F. G. A., García, M. C. C., & Grima, E. M. (2010). Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chemistry*, 123(3), 928–935. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.076>
- Maiani, G., Periago Castón, M. J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., ... Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 Suppl 2, S194–218. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200800053>
- Manke Nachtigall, A., Stringheta, P. C., Cardoso Fidelis, P., & Manke Nachtigall, F. (2007). Determinação do teor de luteína em hortaliças. *B.ceppa, Curitiba*, 25(2), 181–192.
- Matos, C. M., Schweigert, F., Sintes, G. S., Rodríguez, G. P., & Hurtienne, A. (2002). Carotenoides séricos y su relación con la dieta en un grupo de adultos cubanos, 16(2), 105–113.
- Mayer, L. D., Bally, M. B., Hope, M. J., & Cullis, P. R. (1986). Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes I. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40, 333–345.
- Micromeritics. (2015). *Zeta Potential and Nano Particle Analyzer* (No. P09/42700/00). Norcross, Estados Unidos.
- Ministerio De Agricultura y desarrollo Rural. (2012). *Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2007-2011 y sus calendarios de siembras y cosechas: Resultados evaluaciones agropecuarias municipales 2011*. (Editorial JL Impresores LTDA, Ed.) (Noviembre). Bogota.
- Mishra, P. R., Shaal, L. a., Müller, R. H., & Keck, C. M. (2009). Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1-2), 182–189. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.030>
- Mitri, K., Shegokar, R., Gohla, S., Anselmi, C., & Müller, R. H. (2011). Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 414(1-2), 267–75. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.008>
- Mukhopadhyay, M. (2000). *Natural extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*. (Taylor & Francis Group, Ed.). LLC, New York: CRC Press.
- Naturallife. (2016). Good'N Natural Luteína 20mg. Recuperado de http://www.naturallife.com.uy/bienestar_y_salud/luteina_20mg/
- Naturbite. (2013). Luteina 10 mg. Recuperado de <http://www.naturbite.es/catalogo-de-productos/preparados-herbales/item/luteina-10-mg.html>
- Nature Essential. (2010). dha-luteina-615-mg. Recuperado de <http://www.herbonatur.com/dha-luteina-615-mg-50-perlas-nature-essential.html>
- Nature's Bounty Inc. (2016). Eye Health. Recuperado de

- <https://www.naturesbounty.com/health-categories/eye-health/>
- Nature's Plus. (2016). Ultra Lutein (Luteína). Recuperado de <http://www.naturefarma.com/ultra-lutein-luteina-60-perlas-nature-s-plus.html>
- Nawirska-Olszańska, A., Biesiada, A., Sokół-Letowska, A., & Kucharska, A. Z. (2011). Content of bioactive compounds and antioxidant capacity of pumpkin puree enriched with japanese quince, cornelian cherry, strawberry and apples. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 10(1), 51–60.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Petrovic, T., & Bugarski, B. (2013). Chapter 13 Encapsulation Systems in the Food Industry. In *Advances in Food Process Engineering Research and Applications* (p. 687). <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-7906-2>
- Nunes, I. L., & Mercadante, A. Z. (2007). Encapsulation of Lycopene Using Spray-Drying and Molecular Inclusion Processes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(September), 893–900.
- O'Connell, O. F., Ryan, L., & O'Brien, N. M. (2007). Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutrition Research*, 27(5), 258–264. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2007.04.002>
- OBJECTIFS 84. (2014). LUTEINE 100% PURE DIET HORIZON. Recuperado de <http://www.objectifs84.com/vision/1573-luteine-100-pure-diet-horizon.html>
- omnilife. (2016). omniviu. Recuperado de <http://omnialud.org/omniviu-omnilife/>
- Patil, Y. P., & Jadhav, S. (2014). Review Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8–18. <http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>
- Perry, A., Rasmussen, H., & Johnson, E. J. (2009). Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(1), 9–15. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.006>
- Productos Herbalife. (2016). Arándano con Vitaminas, Minerales y Luteína. Recuperado de <http://suplementosherbalife.mex.tl/s/p/arandano-con-vitaminas--minerales-y-luteina.html#!prettyPhoto>
- Pu, J., Bankston, J. D., & Sathivel, S. (2011). Developing microencapsulated flaxseed oil containing shrimp (*Litopenaeus setiferus*) astaxanthin using a pilot scale spray dryer. *Biosystems Engineering*, 108, 121–132. <http://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2010.11.005>
- Rao, A. V, & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 55(3), 207–16. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012>
- Rascón, M. P., Beristain, C. I., García, H. S., & Salgado, M. a. (2011). Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 549–557. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.021>
- Ribeiro da Silva, L. M., Teixeira de Figueiredo, E. A., Silva Ricardo, N. M. P., Pinto Vieira, I. G., Wilane de Figueiredo, R., Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014).

- Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398–404. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>
- Rocha, G. A., Fávoro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2012). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioprocess Processing*, 90(1), 37–42. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.001>
- Rodriguez-amaya, D. B. (2001). *A Guide to carotenoid analysis in foods*. (ILSI Human Nutrition Institute, Ed.) (1st ed.). Campinas, Brasil: OMNI Research.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., & Costa, H. S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3), 97–111. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.004>
- 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(3), 1045–1049. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.062>
- Ruano Aldea, M. (2013). *Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Sabín Fernández, J. D. (2007). *Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Saéñz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616–622. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.095>
- Saesoo, S., Sramala, I., Soottitantawat, A., Charinpanitkul, T., & Ruktanonchai, U. R. (2010). Enhanced stability and in vitro bioactivity of surfactant-loaded liposomes containing Asiatic Pennywort extract. *Journal of Microencapsulation*, 27(5), 436–446. <http://doi.org/10.3109/02652040903447686>
- Sangeetha, R. K., & Baskaran, V. (2010). Carotenoid composition and retinol equivalent in plants of nutritional and medicinal importance: Efficacy of β -carotene from *Chenopodium album* in retinol-deficient rats. *Food Chemistry*, 119(4), 1584–1590. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.047>
- Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2010). Carotenoid Pigments Encapsulation : Fundamentals , Techniques and Recent Trends. *The Open Chemical Engineering Journal*, 4, 42–50.
- Schieber, A., Stintzing, F. ., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 401–413. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00012-2](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00012-2)
- Shafaa, M. W. I., Diehl, H. a, & Socaciu, C. (2007). The solubilisation pattern of lutein, zeaxanthin, canthaxanthin and beta-carotene differ characteristically in liposomes, liver microsomes and retinal epithelial cells. *Biophysical Chemistry*, 129(2-3), 111–

9. <http://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.05.007>
- Sharma, K. D., Karki, S., Thakur, N. S., & Attri, S. (2012). Chemical composition, functional properties and processing of carrot-A review. *Journal of Food Science and Technology*, *49*(1), 22–32. <http://doi.org/10.1007/s13197-011-0310-7>
- Shelo NABEL. (2016). Luteína & Zeaxantina. Recuperado de <http://shelonabelpro.com/producto/luteina-zeaxantina/>
- Shi, X. M., & Chen, F. (1997). Stability of lutein under various storage conditions. *Nahrung/Food*, *41*(1), 38–41. <http://doi.org/10.1002/food.19970410110>
- Silva, L. M. R. da, Figueiredo, Evania Altina Teixeira de Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., Figueiredo, R. W. de, Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, *143*(0), 398–404. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>
- Singh, J., Upadhyay, a. K., Prasad, K., Bahadur, A., & Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*(2), 106–112. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.002>
- Skerget, M., Bezjak, M., Makovšek, K., & Knez, Z. (2010). Extraction of Lutein Diesters from *Tagetes Erecta* using Supercritical CO₂ and Liquid Propane. *Acta Chimica Slovenica*, *57*(1), 60–5.
- Sovova, H., Stateva, R. P., & Galushko, A. A. (2001). Solubility of α -carotene in supercritical CO₂ and the effect of entrainers. *Journal of Supercritical Fluids*, *21*, 195–203.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, *24*, 345–351. [http://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](http://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
- Storm, G., & Crommelin, D. J. (1998). Liposomes: quo vadis? *Pharmaceut Sci Technol Today*, *1*(1), 19.
- Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2014). Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review. *Food Research International*, *65*(2014), 311–321. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.032>
- Suplementos Solgar. (2016). Luteína Licopeno y Caroteno Complex Cápsulas vegetales. Recuperado de http://www.solgarsuplementos.es/nav/productos/productos/p_BetaCaroteno/Luteina_Licopeno_Caroteno_Complex.html
- Swanson Health Products. (2016). Vision Essentials. Recuperado de <http://www.swansonvitamins.com/swanson-condition-specific-formulas-vision-essentials-120-veg-caps?otherSize=SWC097>
- Tan, C., Xia, S., Xue, J., Xie, J., Feng, B., & Zhang, X. (2013). Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(34), 8175–84. <http://doi.org/10.1021/jf402085f>
- terranova. (2014). Bilberry, lutein & astaxanthin complex. Recuperado de

<http://terranovahealth.com/eye-support-complex/>

- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88(3), 411–418. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029>
- Torchilin, V. P. (2000). Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(Suppl 2), S81–S91.
- Valenzuela, C., Hernández, V., Rodríguez, F., & Carrillo, R. (2013). Tecnología de Encapsulación y su Aplicación en Ciencias. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 28(2), 58–75.
- Viafarma. (2013). Luteina 10%. Recuperado de <http://viafarmanet.com.br/wp-content/uploads/2015/07/LUTE--NA-10-.pdf>
- Vitabiotics Ltd. (2016). visionace plus. Recuperado de <http://www.vitabiotics.com/visionace/plus>
- Vitale, A. A., Bernatene, E. A., Pomilio, A. B., & Químicas, C. (2010). Carotenoides en quimiopreención: Licopeno Carotenoids in chemoprevention: Lycopene. *Bioquímica Clínica*, 44(2), 195–238.
- Wang, Y., Ye, H., Zhou, C., Lv, F., Bie, X., & Lu, Z. (2011). Study on the spray-drying encapsulation of lutein in the porous starch and gelatin mixture. *European Food Research and Technology*, 234(1), 157–163. <http://doi.org/10.1007/s00217-011-1630-6>
- Wang, Y., Ye, H., Zhou, C., Lv, F., Bie, X., & Lu, Z. (2012). Study on the spray-drying encapsulation of lutein in the porous starch and gelatin mixture. *European Food Research and Technology*, 234(1), 157–163. <http://doi.org/10.1007/s00217-011-1630-6>
- Xia, S., Tan, C., Zhang, Y., Abbas, S., Feng, B., Zhang, X., & Qin, F. (2015). Modulating effect of lipid bilayer–carotenoid interactions on the property of liposome encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 172–180. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.004>
- Xiao-ying, Q., Zhi-ping, Z., & Jian-Guo, J. (2011). Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1596–1603. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.006>
- Xin-yu, J., Long-sheng, C., & Chun-shan, Z. (2005). Lutein and lutein esters in marigold flowers by high performance chromatography. *Journal of Central South University*, 12(3), 306–308.
- Yanniotis, S., Taoukis, P., Stoforos, N. G., & Karathanos, V. T. (2013). Advances in Food Process Engineering Research and Applications, 687. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-7906-2>
- Yen, H.-W., Chiang, W.-C., & Sun, C.-H. (2012). Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(1), 53–57.

<http://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.07.010>

Zhang, J., & Han, B. (2009). Supercritical CO₂-continuous microemulsions and compressed CO₂-expanded reverse microemulsions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 531–536. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.08.014>

Zhao, C., Cheng, H., Jiang, P., Yao, Y., & Han, J. (2014). Preparation of lutein-loaded particles for improving solubility and stability by Polyvinylpyrrolidone (PVP) as an emulsion-stabilizer. *Food Chemistry*, 156, 123–128. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.086>