

TRANSLATOR CERTIFICATION

Date: June 26, 2026

To whom it may concern:

I, Rocío Manfredi, a translator fluent in the Spanish and English languages, on behalf of Morningside Translations, do solemnly and sincerely declare that the following is, to the best of my knowledge and belief, a true and correct translation of the documents listed below in a form that reflects the intention and meaning of the original text.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code.

The document is designated as:

- #117435_extraccion-de-capsantina-a-partir-de-hojuelas-de-pimenton



Signature

Rocío Manfredi

Print

Questel Confidential: Limited External Use

4001 S 700 East, Suite 500 #B17
Salt Lake City, UT 84107

**UNIVERSITY OF CHILE
SCHOOL OF CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL SCIENCES**



**EXTRACTION OF CAPSANTHIN FROM PAPRIKA FLAKES
(*Capsicum annuum L.*) AND STABILIZATION BY
MICROENCAPSULATION**

**Thesis submitted to the University of Chile to obtain the degree of Master of
Science in Food Science**

MANUEL JESÚS PALMA ASTUDILLO

Thesis Director: Dra. Paz Robert Canales

Santiago, Chile

March 2013

UNIVERSITY OF CHILE
SCHOOL OF CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL SCIENCES

MASTER'S THESIS APPROVAL REPORT

The Directorate of the Graduate School of the School of Chemical and Pharmaceutical Sciences is informed that the Master's Thesis presented by the candidate:

MANUEL JESUS PALMA ASTUDILLO

has been approved by the Thesis Evaluation Committee as a requirement to obtain the degree of Master of Science in Food Science, during the public examination held on

Thesis Director:

Dra. Paz Robert Canales

Thesis Evaluation Committee:

Nalda Romero Palacios, MSc

Dra. Carmen Sáenz Hernández

Dr. Luis Puente Díaz

DEDICATION

To my family and friends

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to thank the following for their collaboration in the development of this thesis:

My family, especially my sister Patricia and Fernando, who were fundamental in this whole process.

To my supervising teacher, Paz Robert Canales, for her infinite patience and unconditional support. To the thesis committee: Carmen Sáenz, Nalda Romero and Luis Puente.

To my lab colleagues and friends: Paula García, Paula Jiménez, Andrés Bustamante and Juan Carlos Moreno for their constant help and welcome since the first day I arrived to work at the laboratory.

And to all those who in one way or another participated in the development of this thesis.

CONTENTS

	Page
1. INTRODUCTION	1
CHAPTER I	
1.1 LITERATURE REVIEW	
1.1.1 Characterization of Paprika	3
1.1.2 Structural Considerations of Capsanthin	4
1.1.3 Biological Importance of Capsanthin	5
1.1.4 Capsanthin Extraction	6
1.1.5 Microencapsulation	6
1.1.5.1 Spray Drying	7
1.1.5.2 Types of Encapsulants Used in Microencapsulation through Spray Drying	8
1.1.5.3 Microencapsulation of Paprika Oleoresin	9
1.2 Hypothesis	10
1.3 Objectives	10
1.3.1 General Objective	10
1.3.2 Specific Objectives	10
CHAPTER II	
2 MATERIALS AND METHODS	
2.1 Materials	
2.1.1 Sample	11
2.1.2 Materials	11
2.2 Methodology	
2.2.1 Identification of Carotenoid Pigments in Pelleted Paprika Flakes (<i>Capsicum annuum</i> L.) and Determination of Capsanthin	

Content	12
2.2.1.1 Thin-Layer Chromatography	12
2.2.1.2 Open Column	12
2.2.1.3 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	12
2.2.1.4 Standard Capsanthin Solution	13
2.2.2 Preparation of an Extract from Pelleted Paprika Flakes	13
2.2.3 Oleoresins Preparation	14
2.2.4 Characterization of Oleoresins	14
2.2.4.1 Capsanthin Content	14
2.2.4.2 Tocopherol Profile	14
2.2.5 Microencapsulation	15
2.2.5.1 Dispersions Preparation	15
2.2.5.2 Spray Drying	15
2.2.5.3 Statistical Design	15
2.2.5.4 Characterization of the Microparticles Obtained under Optimal Conditions	16
2.2.6 Capsanthin Stability Study	17
2.2.6.1 Kinetic Analysis	17
2.2.7 Statistical Analysis	18
CHAPTER III	
3 RESULTS AND DISCUSSION	
3.1 Identification of Carotenoid Pigments in Paprika Flakes (<i>Capsicum annuum</i> L.)	19
3.2 Paprika Flake Extract	22
3.3 Characterization of Oleoresins	24
3.4 Oleoresins Microencapsulation	25
3.5 Microparticles Obtained under Optimal Conditions	28

3.6	Capsanthin Stability Study	34
CHAPTER IV		
4	CONCLUSIONS	40
CHAPTER V		
5	LITERATURE	41
CHAPTER VI		
6	APPENDICES	48

INDEX OF FIGURES

	Page
FIGURE 1 Capsanthin Structure	4
FIGURE 2 Spray Dryer	8
FIGURE 3 Carotenoid Pigment Profile by HPLC in Paprika Flakes (<i>Capsicum Annuum L.</i>)	21
FIGURE 4 Kinetics of Capsanthin Extraction from Paprika Flakes (<i>Capsicum annuum L.</i>) by the Method of Extraction and Simultaneous Saponification	22
FIGURE 5 Capsanthin Content by Applying the Simultaneous Extraction and Saponification Method with Different Solvents (300 Minutes) and the Conventional Method	24
FIGURE 6 Estimated Response Surface Plot for the Face-Centered Central Composite Design	29
FIGURE 7 Estimated Response Surface Plot for the Face-Centered Central Composite Design for OSS-C System.	29
FIGURE 8 Particle Size Distribution of Microparticles from the OC-C (A), OS-C (B) and OSS-C (C) Systems Obtained under Optimal Conditions	32
FIGURE 9 SEM Microphotographs of Microparticles from the OC-Systems C (A); OS-C (B) and OSS-C (C), Obtained Under Optimal Conditions (Mag. 300 Kx).	33
FIGURE 10 Capsanthin Degradation Kinetics of Macroparticles from the OC-C (A), OS-C (B), OSS-C (C) Systems Obtained under Optimal Conditions	35
FIGURE 11 Isokinetic Line for Capsanthin Degradation	39

LIST OF TABLES

		Page
TABLE 1	Composition of the Main Fatty Acids of Sunflower Oil Used in the Production of Oleoresins	14
TABLE 2	Levels of the Independent Variables Used in the Experimental Design for the Encapsulation of the Saponified Oleoresin (OS) and Unsaponified Oleoresin (OSS) Systems.	16
TABLE 3	Open-Column Separation and Identification of Carotenoid Pigments in Paprika Flakes (<i>Capsicum annuum L.</i>) by HPLC and TLC.	19
TABLE 4	Capsanthin and α -Tocopherol Content in Paprika Flake Oleoresins.	25
TABLE 5	Capsanthin Encapsulation Efficiency according to the Face-Centered Central Composite Design for Capsul® Saponified Paprika Flake Extract Oleoresin (OS-C).	26
TABLE 6	Capsanthin Encapsulation Efficiency according to the Face-Centered Central Composite Design for Capsul® Unsaponified Paprika Flake Extract Oleoresin (OSS-C).	26
TABLE 7	Conditions and Characterization of the Microparticles Obtained under Optimal Conditions for OS-C, OSS-C and OC-C Systems.	30
TABLE 8	Moisture Content and Microparticle Size of OC-OS-C and OSS-C Systems, Obtained under Optimal Conditions	30
TABLE 9	Capsanthin Degradation Rate Constants (k) in Microparticles of the OSS-C, OS-C, OC-C Systems Obtained under Optimal Conditions, Stored at 40, 50 and 70°C.	36
TABLE 10	Arrhenius Parameters, Half-Life, and Thermodynamic Parameters of Capsanthin in the Microparticles of the OSS-C, OS-C and OC-C Systems, Obtained under Optimal Conditions.	38

INDEX OF APPENDICES

	Page
APPENDIX 1 Preparation of Capsanthin Extracts from Pelleted Paprika Flakes	48
APPENDIX 2 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	50
APPENDIX 3 Capsanthin Open-Column Separation and Standard Preparation	52
APPENDIX 4 Characterization of Oils by Gas Chromatography	53
APPENDIX 5 Tocopherol Determination by HPLC	54
APPENDIX 6 Dispersions Preparation for Microencapsulation	55
APPENDIX 7 Characterization of the Microparticles Obtained under Optimal Conditions	56
APPENDIX 8 Concentration of Saponified Capsanthin during the Simultaneous Extraction and Saponification Procedure	57
APPENDIX 9 Statistical Analysis	58
APPENDIX 9.1 Spray-drying Microencapsulation Design of Saponified Paprika Oleoresin (<i>Capsicum annuum L.</i>) Using Capsul® as an Encapsulating Agent.	58
APPENDIX 9.2 Spray-drying Microencapsulation Design of Unsaponified Paprika Oleoresin (<i>Capsicum annuum L.</i>) Using Capsul® as an Encapsulating Agent.	59
APPENDIX 9.3 Statistical Analysis of Simultaneous Extraction and Saponification of Capsanthin Using Different Extraction Solvents.	60
APPENDIX 9.4 Statistical Analysis to Compare Moisture Content in the Microparticles of the C-C, OS-C and OSS-C Systems Obtained under Optimal Conditions.	61
APPENDIX 9.5 Statistical Analysis of Surface Properties, Encapsulation Efficiency and Capsanthin Recovery from the Microparticles Obtained under Optimal Conditions in the C-C, OS-C and OSS-C Systems.	62
APPENDIX 9.6 Statistical Analysis for the Stability Study of Capsanthin at 40, 50 and 70°C.	63

APPENDIX	Statistical Analysis for Tocopherol Content in the	64
9.7	Saponified and Unsaponified Paprika Oleoresin and Isolated Capsanthin.	

RESUMEN

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

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

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

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

SUMMARY

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

1. INTRODUCTION

In recent years there has been an increased interest in developing food or food supplements based on functional ingredients of natural origin that provide benefits from both a human and animal health perspective. Among these ingredients is capsanthin extracted from red paprika (*Capsicum annuum* L.).

Capsicum species originated in Central and South America, from where they were introduced to Europe, being the first vegetables used as condiments, occupying second place both economically and productively in the world trade of condiments (Rodríguez *et al.*, 2007).

Paprika is traditionally used in powder form, obtained from grinding the dried pods or as concentrated oleoresin (liquid extract of paprika) obtained by solvent extraction, which, due to its intense red color, has been used as a colorant and/or antioxidant in the food, pharmaceutical and cosmetic industries, replacing other synthetic additives (Hornero-Méndez *et al.*, 2000; Restrepo, 2006).

In the food industry, paprika oleoresin is used as a coloring agent in meats, sausages, pickles and other processed foods (Shin *et al.*, 2001). The main advantage of paprika oleoresin over the powdered product is that the carotenoid content can be standardized. However, carotenoids in oleoresin can degrade and lose their stability due to factors such as temperature, oxygen, and light (Pérez-Gálvez and Mínguez-Mosquera, 2001; Burns *et al.*, 2003; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004). Furthermore, the stability of paprika oleoresin can be affected by the degree of esterification of the xanthophylls, the processing for its extraction and subsequent storage (Biacs *et al.*, 1989; Govindarajan, 1986; Biacs *et al.*, 1992; Pérez-Gálvez and Mínguez-Mosquera, 2002b).

There are few studies that evaluate the stability of paprika oleoresin in edible oils, in emulsions and in encapsulated form. In this context, it has only been established that the type of oil, storage temperature and the type of encapsulating agent would significantly influence the stability of the oleoresin (Beatus *et al.*, 1985, Biacs *et al.*, 1992; Pérez-Gálvez *et al.*, 2000; Pérez-Gálvez and Mínguez-Mosquera 2002b; Rascón *et al.*, 2011).

One of the mechanisms used to stabilize capsanthin is microencapsulation, which allows the incorporation of substances within a matrix or wall system in order to protect these compounds, preventing them from undergoing reactions due to light, humidity and/or oxygen and undesirable interactions with other components (Biacs *et al.*, 1992; Ramesh *et al.*, 2001; Pedroza, 2002). However, there are no studies that evaluate the effect of capsanthin esterification on the encapsulation efficiency and stability of encapsulated capsanthin.

1.1 Literature Review

1.1.1 Characterization of Paprika

Paprika peppers are characterized by having a wide range of carotenoids, with up to 30 of them being identified in the unsaponified extract (Schweiggert *et al.*, 2005). In their green state they possess different carotenoids, such as violaxanthin, neoxanthin, lutein and β -carotene, the latter with the function of provitamin A (Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez, 1994a; Matsufuji *et al.*, 1998; Landrun and Bone, 2001). During the ripening of red paprika, a series of changes occur, such as the transformation of chloroplasts into chromoplasts, the biosynthesis of carotenoids that were not present in green fruits, the disappearance of pigments such as lutein and neoxanthin, and an increase in the concentration of β -carotene, violaxanthin, capsanthin and capsorubin (Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez, 1994b). The synthesis and/or transformation of carotenoid pigments associated with the ripening of red paprika leads to their esterification and accumulation in plastoglobules (Matus *et al.*, 1991; Márkus *et al.*, 1999; Hornero-Méndez and Mínguez-Mosquera 2000; Marín *et al.*, 2004).

Fresh red paprika have high vitamin C content (Marín *et al.*, 2004), possess a low amount of γ -tocopherol, but high levels of α -tocopherol (Matsufuji *et al.*, 2007), and are a rich source of flavonoids and other phenolic components (Czinkotai *et al.*, 1989; Márkus *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2002). The polyphenols present correspond to luteolin and quercetin (Hasler, 1998; Sun *et al.*, 2007), which have no affinity with hydrophobic organic solvents and their evaluation is excluded in conventional methods (Marín *et al.*, 2004).

The intense red color of paprika is due to the pigments capsanthin and capsorubin, which are present exclusively in the genus *Capsicum*, their precursors being the yellow pigments zeaxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, β -cryptoxanthin, β -carotene and capsolutein. Depending on the stage of maturity, capsanthin accounts for approximately 30-60% of the total carotenoids in fully ripe fruits (Bekker *et al.*, 2001; Deli *et al.*, 2001). Ittah *et al.* (1993) estimated that capsanthin and capsorubin comprise between 70-80% of the total carotenoid content in paprika powder.

1.1.2 Structural Considerations of Capsanthin

Carotenoids are natural tetraterpenes derived from the union of 8 isoprene units, which give rise to a skeleton of 40 carbon atoms. In general, carotenoids are classified into two large groups: carotenoids and xanthophylls. The former are composed only of carbon and hydrogen, while xanthophylls also contain oxygen (Rodríguez, 1999). Carotenoids can have an acyclic or cyclic structure of five or six carbons at one or both ends of the molecule. Given the large number of double bonds in the central chain, carotenoids can exist in cis/trans conformations, although the most stable and therefore the most present in nature is the trans conformation (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2006).

Capsanthin, which contains 11 double bonds, a conjugated keto group and a cyclopentane ring (Fig. 1), is partially and/or totally esterified with fatty acids depending on the stage of maturity. The fatty acids that esterify capsanthin are mainly lauric (12:0), myristic (14:0) and palmitic (16:0) acids (Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez, 1994b). Esterified capsanthin accumulates more readily in the lipophilic globules of paprika chromoplasts, although the real significance of the esterified forms in the face of light and lipoxygenases is not yet clear (Biacs *et al.* 1989; Goda *et al.* 1997; Pérez-Gálvez and Mínguez-Mosquera, 2002a). Xanthophylls act as antioxidants (Hirayama *et al.*, 1994) and it is suggested that esterified capsanthin has a greater antioxidant action to trap free radicals with respect to β -carotene due to the conjugated keto group of the polyene chain in the molecule (Matsufuji *et al.*, 1998).

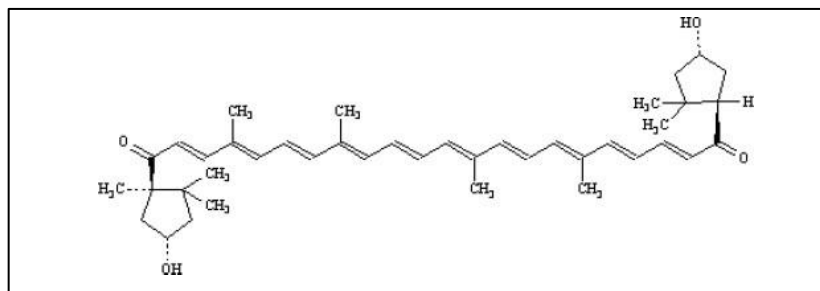
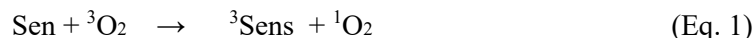


Fig. 1. Capsanthin Structure.

1.1.3 Biological Importance of Capsanthin

Capsanthin is a biological antioxidant that inactivates free radicals produced in the auto-oxidation of lipids and/or traps singlet oxygen in the photo-oxidation of lipids. The antioxidant activity of carotenoids is related to their structure, due to the presence of the extensive system of conjugated double bonds (Nachtigal, 2007). Carotenoids that have 9 or more double bonds provide the maximum protection (Rodriguez, 1999).

Capsanthin can act as a singlet oxygen scavenger ($^1\text{O}_2$) in the photo-oxidation of fatty materials. The $^1\text{O}_2$ is formed by energy transfer from an excited sensitizer (Sen) such as chlorophyll, to triplet oxygen ($^3\text{O}_2$) (Eq. 1). The $^1\text{O}_2$ is subsequently trapped by transferring its energy to the carotenoids, without producing oxidation compounds (Eq. 2). The triplet capsanthin returns to its basal state by the dissipation of energy in the form of heat, according to equation 3 (Nachtigall, 2007).



The chain reactions that give rise to hydroperoxide formation during the auto-oxidation of lipids can be interrupted by carotenoids through three possible mechanisms: electron transfer, hydrogen donation or by addition, as shown in equations 4, 5 and 6, respectively.



The protection of carotenoid pigments against cancer and other chronic diseases is due, in addition to their antioxidant properties, to their ability to filter UV light and their participation in the differentiation of epithelial cells (Stahl and Sies, 2003), either by inhibiting cell proliferation, improving cell differentiation and stimulating intercellular communication (Meléndez *et al.*, 2004). Along with the properties

mentioned before, Aizawa and Inakuma (2009) demonstrated that capsanthin intake significantly increases HDL cholesterol levels in rats in a dose-dependent manner.

1.1.4 Capsanthin Extraction

Traditional methods for extracting bioactive components from plants are steam distillation and organic-solvent extraction (maceration or Soxhlet technique).

Specifically, carotenoid pigments are fat-soluble compounds that are normally extracted with organic solvents such as: acetone, petroleum ether, benzene, hexane, diethyl ether, chloroform, ethanol and methanol (Park *et al.*, 2007). However, the use of solvents presents some disadvantages such as degradation and loss of bioactive components, use of large volumes of solvents, longer times, the high cost of supplies and labor (Sovová *et al.*, 2004). In addition, it is common to find solvent residues in the extracts. Interest in alternatives to conventional solvent extraction, such as supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) is increasing, since CO₂ is non-flammable and does not cause damage to the environment (Gao *et al.*, 2009).

The main parameters for selecting an extraction technology are the biochemical characteristics of the extracted molecules, speed, limitation of solvent use, reproducibility, extraction yield, selectivity, protection of the extracted molecules from chemical transformations and cost (Pasquet *et al.*, 2010).

1.1.5 Microencapsulation

Microencapsulation is a technique by which active agents (solids, liquids or gases) are introduced into a matrix or wall system of polymeric nature (encapsulating agent). In the food sector, microencapsulation allows the protection of bioactive compounds from environmental factors (oxygen, light and humidity, among others) and the control of the release of the active ingredient (Gibbs *et al.*., 1999; Desai and Park, 2005; Mozafari *et al.*., 2008).

Microencapsulation has important applications in the food industry to protect sensitive materials such as volatile compounds, essential oils and oleoresins, improving their stability. The microparticles formed have a wide size

range from 0.2 to 5000 μm , with multiple shapes depending on the material and methods used for their preparation (Shaikh *et al.*, 2006).

Encapsulation techniques include spray drying, extrusion, coacervation, ionic gelation, liposomes, lyophilization, cocrystallization, and emulsification, among others (Gibbs *et al.*, 1999; Desai and Park, 2005; Augustin and Hemar, 2009).

1.1.5.1 Spray Drying

Among the existing encapsulation methods, spray drying is the oldest and most widely used method for encapsulating heat-sensitive food ingredients (flavors, lipids, carotenoids) in an economical, simple, and continuous manner (Ré, 1998). In this method, the active compound was homogenized with the encapsulating material, usually in water. Then, the resulting fluid, which can be a solution, suspension or emulsion, is fed to a spray dryer (Fig. 2) and atomized by means of a rotating disc or a spray nozzle forming small droplets. The contact between the droplet and the hot air allows rapid evaporation of the solvent and the formation of a film (crust) on the surface of the particles, instantly obtaining a powder product (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Flores-Martínez *et al.*, 2004). The formation of this film is faster as the concentration of dissolved solids increases, due to the lower evaporation of water from the system. In this way, it is possible to obtain high encapsulation efficiencies, since the crust or film on the droplet selectively allows the diffusion of water but retains the active compound (Schwartz M., 1989). Once the microparticles are dry, they are transferred to a cyclone separator for collection and the resulting powder must meet certain quality characteristics, such as density, appropriate color, ease of reconstitution, minimal degradation of constituents, taste and aroma, among others (Gibbs *et al.*, 1999).

The main factors to be optimized in spray drying are the feed temperature, inlet and outlet air temperature, solids concentration and viscosity (Schwartz, 1989; Gharsallaoui *et al.*, 2007).



Fig. 2. Spray Dryer.

1.1.5.2 Types of Encapsulants Used in Microencapsulation through Spray Drying

Depending on the compound to be encapsulated, natural and synthetic encapsulating materials can be selected. These must have good solubility, good emulsifying properties, and also possess low viscosity in concentrated solutions. Different encapsulating agents have been used for spray drying microencapsulation, including polysaccharides (starch, maltodextrins of different dextrose equivalent (DE), corn syrups), gums (gum arabic), lipids (stearic acid, mono- and diglycerides) and proteins (gelatin, casein, whey, soy and wheat), with maltodextrins being the most used (Krishnan *et al.*, 2005a b; Loksuwan, 2007; Saénz *et al.*, 2009). Maltodextrins allow for good retention and oxidative stability of oils, but have little emulsifying capacity (Gharsallaoui *et al.*, 2007), so they are usually mixed with proteins and gums.

Starch is a biopolymer synthesized by plants, composed of two units (amylose and amylopectin) and it is low cost, widely available and resists heat processing

(Kaplan, 1998). Some studies have used modified starch (octenyl succinate) as an alternative to totally or partially replace the more expensive gum arabic (Trubiano and Lacourse, 1988; Soottitantawat *et al.*, 2005; Shaikh *et al.*, 2006; Kanakdande *et al.*, 2007). Capsul® is a chemically modified starch, derived from waxy corn, which incorporates a lipophilic component into its structure. It has emulsifying properties, which is why it is useful for obtaining highly stable oil-in-water emulsions (Reineccius, 1991; Shahidi *et al.*, 1993; Marchal *et al.*, 1999; Finotelli and Rocha, 2005). Its low viscosity allows the preparation of emulsions with a high solids content, obtaining microparticles with high retention of the active compound (Kolanowski *et al.*, 2004; Jonsdottir *et al.*, 2005). Capsul has been used primarily in the encapsulation of flavors, aromas, vitamins and spices.

1.1.5.3 Microencapsulation of Paprika Oleoresin

The encapsulation of *Capsicum annuum L.* oleoresin has been carried out using different techniques, including spray drying with encapsulating agents such as gelatin, gum arabic, sodium caseinate, modified starch, maltose-dextrin mixtures and rice starch-gelatin (Beatus *et al.*, 1985; Xiang *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2005); coacervation using calcium alginate and an intermediate barrier composed of whey protein isolate (Rosenberg and Lee, 2004) and spray cooling with canola oil (Meunier *et al.*, 2007). These studies have focused mainly on evaluating the color losses of the oleoresin under different conditions of light, temperature and humidity (Beatus *et al.*, 1985), the encapsulation efficiency and percentage of recovery of the oleoresin (Xiang *et al.*, 1997), morphology and particle size (Santos *et al.* 2005), solubility of the microparticles with different solvents (Jung and Sung, 2000), oxidative stability of the encapsulated oleoresin (Rosenberg and Lee, 2004) and the release kinetics in the small intestine of pigs (Meunier *et al.*, 2007).

Considering the above background, this thesis focuses on the encapsulation of a saponified and unsaponified paprika oleoresin using Capsul as an encapsulating agent and spray drying as the encapsulation method, to evaluate the effect of capsanthin esterification on encapsulation efficiency and its stability during storage at different temperatures.

1.2 Hypothesis

The stability of capsanthin in esterified paprika oleoresin microparticles will be greater in relation to unesterified oleoresin microparticles and isolated capsanthin.

1.3 Objectives

1.3.1 General Objective

To study the effect of esterification of paprika oleoresin and isolated capsanthin on the oleoresin-encapsulating agent interaction and on stability during storage.

1.3.2 Specific Objectives

- 1.- To identify and quantify the main carotenoid pigments present in paprika flakes (*Capsicum annuum L.*) by HPLC.
- 2.- To extract the paprika pigments using different methodologies and isolate capsanthin using an open column.
- 3.- To study the oleoresin/encapsulating agent ratio and drying temperature (independent variables) on the encapsulation efficiency of capsanthin (dependent variable).
- 4.- To study the stability of capsanthin in microparticles of esterified, non-esterified oleoresin and isolated capsanthin at three temperatures (40, 50 and 70°C).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

2.1.1 Sample

- Pelletized paprika flakes (*Capsicum annuum* L.) with 6% moisture, provided by the Catholic University of Chile (obtained from Invertec Foods, Rengo, Chile).

2.1.2 Materials

- Capsul®, purchased from National Starch, USA.
- Sunflower oil (*Helianthus annuus*) (AG), refined, without synthetic antioxidants, Natura®
- Acetone, ethanol, petroleum ether, diethyl ether, methanol and hexane (analytical grade)
- Acetone and water (HPLC grade)
- Ultra-pure nitrogen, AGA, Santiago, Chile.
- Sodium sulfate (Na₂SO₄), analytical grade, Merck Darmstadt, Germany.
- Celite 545, Merck, Darmstadt, Germany.
- Magnesium Oxide, Merck, Darmstadt, Germany.
- Silica gel plate 20x20 cm, 0.5 mm thick (Merck).
- Tocopherol (α , β , γ , δ) Standards, Merck, Darmstadt, Germany.

2.2 Methodology

2.2.1 Identification of Carotenoid Pigments in Pelleted Paprika Flakes (*Capsicum annuum* L.) and Determination of Capsanthin Content.

The extraction of carotenoid pigments from paprika flakes was carried out according to the method described by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993) (Appendix 1).

The identification of carotenoids in paprika flakes was performed by thin-layer chromatography (TLC), open column chromatography (AC) and high-efficiency liquid chromatography (HPLC).

2.2.1.1 Thin-Layer Chromatography

The saponified extract of paprika flakes was applied onto a 20x20 cm and 0.5 mm thick silica gel plate (Merck). Petroleum ether:acetone (10.5:4.5) was used as mobile phase. The pigments obtained were chromatographed by HPLC according to the method described by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993). Carotenoids were identified based on their R_f value.

2.2.1.2 Open Column

The carotenoid pigments from the saponified extract of paprika flakes obtained according to the method described by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993) were separated using a glass column with a 25 cm length and a 3 cm diameter. Magnesium oxide-celite (1:1) was used as the stationary phase and ethyl ether, petroleum ether and acetone were used as the mobile phase of increasing polarity, which were mixed in different proportions (Rodríguez, 1999) (Appendix 3). Each fraction obtained was injected into the HPLC.

2.2.1.3 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Carotenoid analysis was performed by HPLC, using a Merck Hitachi D-600 instrument, with L-6200 Intelligent Pump, diode array detector (Waters 996), connected to Empower Pro software (Waters). A C-18 column was used (3 µm particle size, 4.6 ID x 15 cm, Atlantis, Waters). Acetone and water were used as the mobile phase in different proportions, with a flow rate of 1 mL/min and an injection volume of 20 µl (Appendix 2). Carotenoid pigments were detected at 450 nm. Capsanthin was identified by comparing the

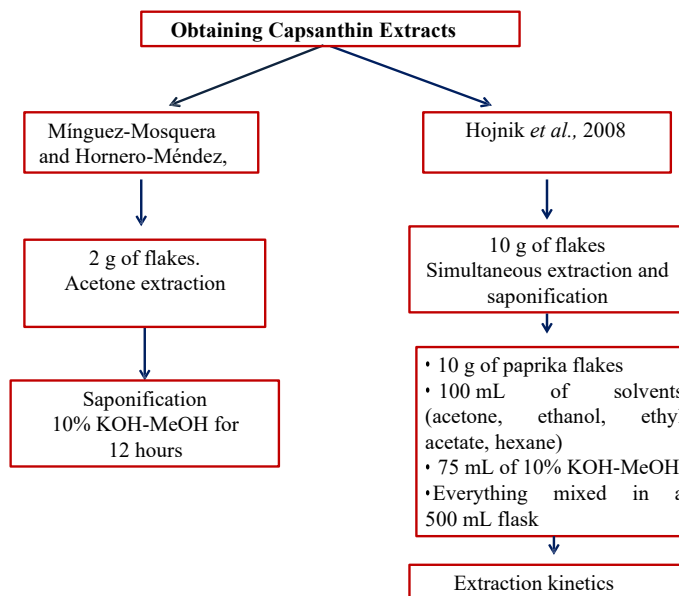
retention times with those of a standard and quantification was performed according to a capsanthin calibration curve (1.04–3.48 µg/mL, R^2 0.9956).

2.2.1.4 Standard Capsanthin Solution

Capsanthin was obtained from paprika flakes. The pigment was purified by open column chromatography with stationary phase MgO:Celite (1:1), according to the method described by Rodríguez-Amaya *et al.* (1999). The concentration of capsanthin was determined by spectrophotometry in a Unicam UV-3 instrument at 460 nm, using the extinction coefficient in acetone ($E^{1\%} = 2300$) (Rodríguez, 1999; Uquiche *et al.*, 2004).

2.2.2 Preparation of an Extract from Pelleted Paprika Flakes

The extraction of carotenoid pigments from paprika flakes was carried out using two methods: A) acetone extraction and subsequent saponification, according to the method described by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993) and B) extraction with simultaneous saponification according to the method described by Hojnik *et al.* (2008). With method B (Appendix 1), an extraction kinetics was also prepared.



2.2.3 Oleoresin Preparation

Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez's (1993) Method A was used to obtain carotenoid extracts from saponified and unsaponified paprika flakes. The isolated capsanthin was obtained by open column. Each extract was added independently to sunflower oil (AG), obtaining oleoresins with saponified extract (OS), unsaponified extract (OSS) and isolated capsanthin (OC). Table 1 presents the main fatty acids of sunflower oil, used for the preparation of oleoresins (the determination method is presented in Appendix 4).

Table 1. Composition of the Main Fatty Acids of Sunflower Oil Used in the Production of Oleoresins

Fatty Acids	Name	% Methyl esters $\pm$ SD
C16:0	Acid: Palmitic	6.5 $\pm$ 0.1
C18:0	Acid: Stearic	3.9 $\pm$ 0.01
C18:1 w9 cis	Acid: Oleic	26.2 $\pm$ 0.1
C18:2 w6	Acid: Linoleic	57.1 $\pm$ 0.3
TOTAL SATURATED		11.9 $\pm$ 0.02
TOTAL MONOUNSATURATES		28.4 $\pm$ 0.03
TOTAL POLYUNSATURATES		59.8 $\pm$ 0.08

2.2.4 Characterization of Oleoresins

2.2.4.1 Capsanthin Content

The capsanthin content for oleoresins with saponified extract (OS), unsaponified extract (OSS) and isolated capsanthin (OC) was determined by HPLC.

2.2.4.2 Tocopherol Profile

The determination of tocopherols present in the oil and in the oleoresins (OS, OSS and OC) was carried out according to the official method AOCS Ce 8-89 (AOCS, 1993), using an HPLC equipment consisting of a Merck-Hitachi L-6200 A pump, a Merck-Hitachi F-1050 fluorescence detector coupled to a computer with Clarity software (version 2.4.1.43, Merck, Darmstadt, Germany). A LiChrocart Superspher Si-60 column (5 μ m x 4 ID x 250 mm, Merck) was used. The mobile phase consisted of 2 propanol:hexane (0.5:99.5 v/v) with a flow rate of 1

mL/min. Identification and quantification were performed by comparison with tocopherol standards (Calbiochem) (Appendix 5).

2.2.5 Microencapsulation

2.2.5.1 Dispersions Preparation

Emulsions were prepared with Capsul®, water and oleoresin. Oleoresin/encapsulating agent ratios of 1:1 (10% oleoresin, 10% Capsul® and 80% water), 1:2 (10% oleoresin, 20% Capsul® and 70% water) and 1:3 (10% oleoresin, 30% Capsul® and 60% water) were used, corresponding to a theoretical content of 50%, 33% and 25% oleoresin in the powder obtained, respectively.

Capsul® was dissolved in water at 70°C, with constant stirring. Then it cooled to 30°C and the oleoresin was added. The resulting emulsion was homogenized in a Polytron PT 2100 homogenizer (Kinematica AG) and subsequently fed into a spray dryer to obtain the microparticles (Appendix 6).

2.2.5.2 Spray Drying

A mini Spray-Dryer B-290 (Büchi) dryer with parallel feed and drying airflow was used. The equipment operated at an air inlet temperature that fluctuated between 150°C-200°C. The air flow, feed rate, and atomization pressure were 600 L/h, 5 mL/min and 5 bar, respectively. The resulting microparticles were stored in polypropylene bags at -20°C until the time of use.

2.2.5.3 Statistical design

A face-centered central composite design was used (2^2), with a total of 10 experiments for each system (unsaponified extract oleoresin-Capsul® [OSS-C] and saponified extract oleoresin-Capsul® [OS-C]). The oleoresin/Capsul® ratio and the air temperature entering the dryer were evaluated as independent variables. The response or dependent variable corresponded to the encapsulation efficiency of capsanthin. Based on the optimal conditions obtained for OSS-C and OS-C, the microparticles of

isolated capsanthin oleoresin-Capsul (OC-C) were prepared. Table 2 presents the levels for the independent variables used in the experimental design.

Table 2. Levels of the Independent Variables Used in the Experimental Design for the Encapsulation of the Saponified Oleoresin (OS) and Unsaponified Oleoresin (OSS) Systems.

VARIABLES	LEVELS	
	-1	1
Oleoresin/Capsul®	1:1	1:3
Temperature (°C)	150	200

2.2.5.4 Characterization of Microparticles Obtained under Optimal Conditions

The microparticles obtained under optimal OS-C and OSS-C conditions and the OC-C microparticles were characterized according to their total capsanthin content, surface capsanthin, encapsulation efficiency, morphology and moisture content (Appendix 7).

- **Surface Capsanthin Content:** 100 mg of microparticles were weighed in a tube to which 3 mL of hexane:ethyl ether (50:50 v/v ratio) was added. It was shaken manually for 30 seconds and the supernatant was removed. The supernatant was saponified with 10% KOH in methanol for 12 hours and the surface capsanthin content was determined by HPLC.

- **Total Capsanthin Content:** 100 mg of microparticles were weighed in a tube, 1 mL of double-distilled water was added, and the mixture was homogenized in a vortex for 1 minute. Subsequently, a mixture of ethyl acetate: ethanol:hexane:double-distilled water (1:1:1:1 v/v) was used as the extraction solvent (10 mL). The mixture was shaken in a vortex and centrifuged at 3000 rpm. The supernatant was removed and this operation was repeated until no color was observed in the residual portion of the tubes. The collected supernatant was saponified with 10% KOH in methanol for 12 hours and the capsanthin content was determined by HPLC.

- **Encapsulation Efficiency (EEC):** It was determined according to equation 7:

$$EEC = \frac{\text{Total Capsanthin} - \text{Surface Capsanthin}}{\text{Total Capsanthin}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

- **Morphology:** The structure of the microparticles obtained under optimal conditions was studied by scanning electron microscopy (SEM). The samples were coated with gold/palladium using a Varian PS 10E vacuum evaporator and analyzed using a JEOL JSM 25-SII microscope (Jeol, Tokyo, Japan) operated at 30 kV. The images were obtained with a Mamiya Roll Film Holder (Model 2) camera attached to the microscope, using Kodak T-Max ISO 100 film.

- **Moisture Content:** It was determined in an oven at 105°C according to the AOCS method (Ai 2- 75, 1993).

2.2.6 Capsanthin Stability Study

The microparticles obtained under optimal conditions from the C-C, OS-C and OSS-C systems were stored at 40, 50 and 70 ± 1° C in an oven (Mettler BE 500, Germany) with temperature control and absence of light. 50 mg of powder were placed in 20 mm long glass tubes, without a cap. The tubes were removed at specific time intervals, in order to obtain 7 points for the construction of the capsanthin degradation curve. The tests were performed in duplicate and the total capsanthin content was determined by HPLC, according to the method described in section 2.2.1.3.

2.2.6.1 Kinetic Analysis

The degradation order was obtained by correlation fitting, for first-order kinetics (equation 8).

$$[C] = [C]_0 e^{-k t} \quad (\text{Eq. 8})$$

Where, C is the concentration at time t, C₀ is the initial concentration, t is time, and k is the rate constant.

Activation energy (*E_a*) and frequency factor (A) were determined from the Arrhenius equation (equation 9).

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

Where R is the gas constant and T is the temperature in Kelvin.

The activation enthalpy ($\Delta H^\ddagger$) and the activation entropy ($\Delta S^\ddagger$) were obtained from the Eyring equation (equation 10).

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

where k_B is the Boltzmann constant and h is the Planck constant.

2.2.7 Statistical Analysis

The optimal conditions for each system were obtained using the Response Surface Methodology (RSM). Linear regression was used to determine the capsanthin degradation rate constants. To determine statistical differences between the studied systems for degradation rate, activation energy, activation enthalpy, activation entropy, surface percentage, encapsulation efficiency, capsanthin recovery percentage, and α -tocopherol content constants, an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple range test were applied. All statistical analyses were performed using Statgraphics software version 7.0 (Manugistics Inc., Statistical Graphics Corporation, Rockville, MA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Identification of Carotenoid Pigments in Paprika Flakes (*Capsicum annuum* L.)

Table 3 presents the identification of carotenoid pigments in paprika flakes (*Capsicum annuum* L.) according to open column, HPLC (tr) and TLC (Rf) methods.

Table 3. Open-Column Separation and Identification of Carotenoid Pigments in Paprika Flakes (*Capsicum annuum* L.) by HPLC and TLC.

Pigments	Open column, elution solvent	HPLC tr (min)	TLC Rf
Capsorubin	5% Water in Acetone	4.574	0.21
Violaxanthin	5% Water in Acetone	4.831	0.27
Capsanthin	100% Acetone	6.757	0.32
Capsanthin 5,6-epoxide	70% Acetone/PE	7.957	0.27
<i>cis</i> -capsanthin	100% Acetone	9.549	0.27
Anteraxanthin	50% Acetone/PE	10.215	
Capsolutein	30% Acetone/PE	10.927	0.45
Zeaxanthin	20% Acetone/PE	11.548	0.58
<i>cis</i> -Zeaxanthin	30% Acetone/PE	12.280	
Cryptocapsin	30% Acetone/PE	14.378	0.72
β -Cryptoxanthin	10% Acetone PE	15.112	0.77
<i>cis</i> - β -Carotene	5% ET/PE	17.788	
β -Carotene	100% PE	17.888	0.87

PE: petroleum ether; ET: ethyl ether; tr: Retention time; R_f: Distance traveled by the compound

The carotenoid pigments capsolutein, *cis*-zeaxanthin and cryptocapsin have the same polarity and are separated with 30% acetone in PE using the open column separation technique. The same behavior was observed for capsanthin and *cis*-capsanthin that eluted together with 100% acetone. Capsanthin began to elute when the 70% acetone ratio was used in PE but in small amounts, being completely eluted with 100% acetone. To separate capsorubin and violaxanthin, it is necessary to increase the polarity, so water is added to the acetone. Some authors argue that the appearance of *cis*-zeaxanthin, *cis*-capsolutein and *cis*-capsanthin is due to degradation processes of the

carotenoid pigments that are produced by the effect of solvents and exposure to environmental conditions (Márkus *et al.*, 1999; Pérez-Gálvez and Mínguez-Mosquera, 2004; Pérez-Gálvez *et al.*, 2005).

The carotenoid pigments identified correspond to those found by other authors (Almela *et al.*, 1991; Mínguez-Mosquera and Hornero Méndez, 1993; Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez, 1994a and b; Markús *et al.*, 1999), indicating that the variation in carotenoid pigments in paprika flakes (*Capsicum annuum* L.) occurs mainly in their content and not in the type of pigments, regardless of the growing conditions and geographical area (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1994a; Pérez-Gálvez *et al.*, 2007). The presence of lutein and neoxanthin was not detected, since these disappear during the ripening process of the paprika and instead the content of violaxanthin and β -carotene increases and zeaxanthin, capsanthin, capsorubin, β -cryptoxanthin and capsolutein are biosynthesized (Márkus *et al.*, 1999; Deli *et al.*, 2001).

Capsanthin on the TLC plate appears as a large, bright red band, easily identifiable with an R_f of 0.27, which was lower than the R_f of 0.37 obtained by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993), due to differences in the elution phase. The R_f value varies according to the elution solvent used, the stationary phase, plate thickness and the degree of esterification of the carotenoids (Biacs *et al.*, 1989; Matsufuji *et al.*, 1998).

Figure 3 shows the chromatogram obtained by HPLC for the carotenoid pigments of paprika flakes (*Capsicum annuum* L.). The pigments identified were capsorubin, violaxanthin, capsanthin, capsanthin-5,6-epoxide, antheraxanthin, *cis*-capsanthin, capsolutein, zeaxanthin, *cis*-zeaxanthin, cryptocapsin, β -cryptoxanthin and β -carotene.

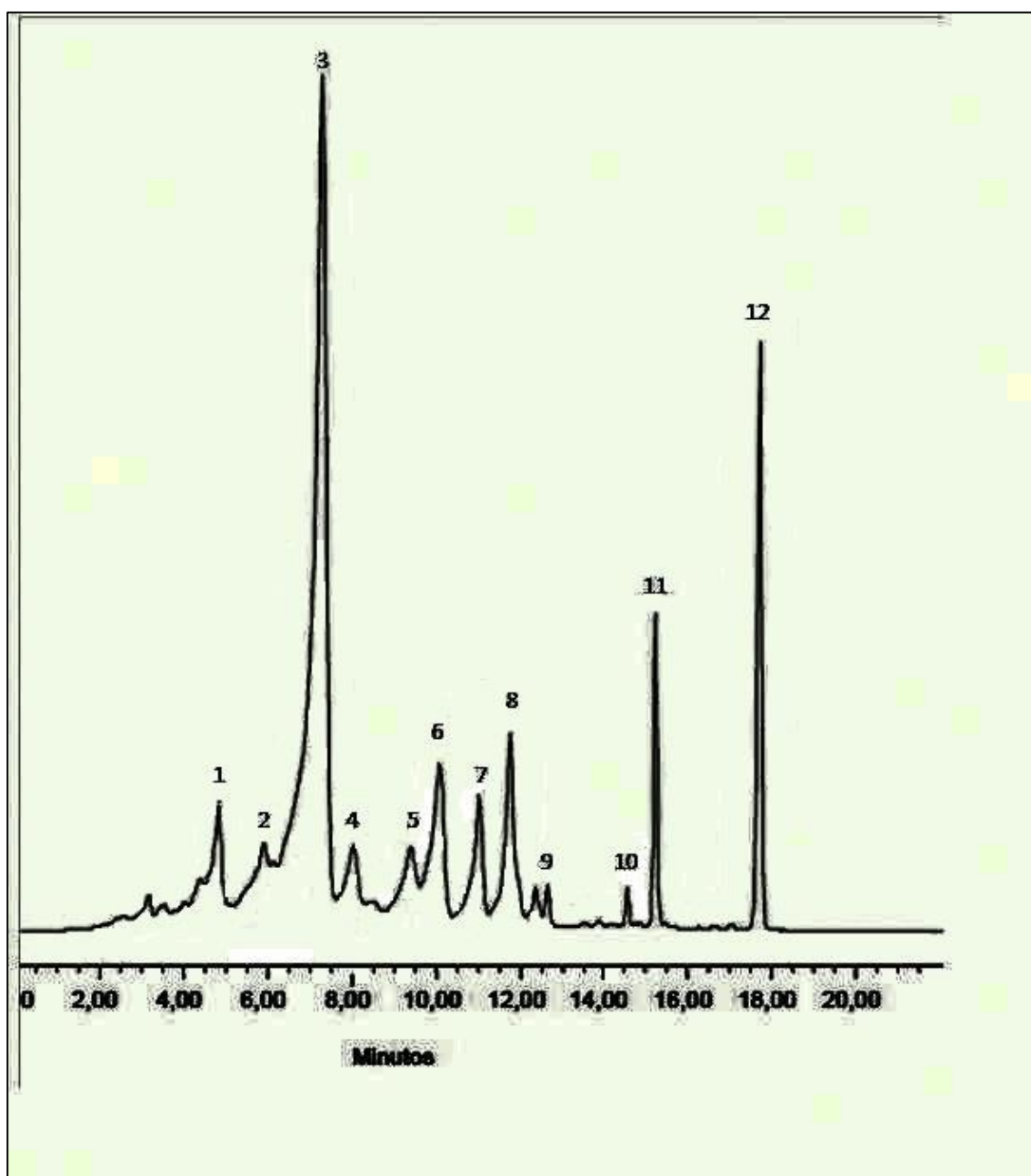


Figure 3. Carotenoid Pigment Profile by HPLC in Paprika Flakes (*Capsicum Annuum L.*)

(1) capsorubin; (2) violaxanthin; (3) capsanthin; (4) capsanthin 5,6 epoxide; (5) antheraxanthin; (6) *cis*-capsanthin; (7) capsolutein; (8) zeaxanthin; (9) *cis*-zeaxanthin; (10) cryptocapsin; (11) β -cryptoxanthin; (12) β -carotene.

3.2 Paprika Flake Extract

The extraction of paprika flakes was carried out by two methods (A) extraction with acetone and subsequent saponification (Rodriguez-Amaya, 1999) and (B) extraction with simultaneous saponification using acetone, ethyl acetate, ethanol and hexane (Hojnik *et al.*, 2008).

The influence of the type of solvent on the simultaneous extraction and saponification (method B) was studied while keeping the volume, concentration of the alkali solution and the extraction temperature (40°C) constant. The extracted capsanthin content was expressed as μg of capsanthin/g of paprika flake. The results are presented in Figure 4.

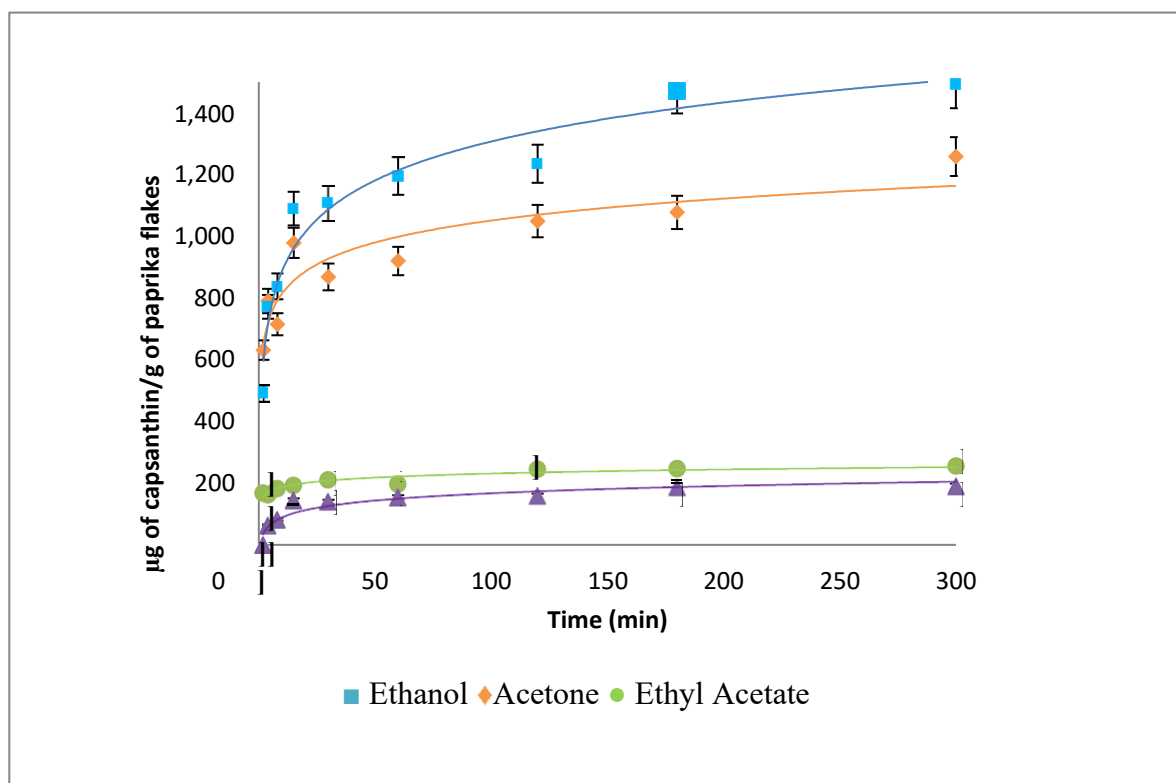


Figure 4. Kinetics of Capsanthin Extraction from Paprika Flakes (*Capsicum Annuum L.*) by the Simultaneous Extraction and Saponification Method. Ethanol (■), acetone (◆), ethyl acetate (●) and hexane (▲).

The graph for kinetics of capsanthin extraction from paprika flakes (Fig. 4) shows a limiting profile for all solvents studied. Both acetone and ethanol are excellent solvents for capsanthin extraction, achieving values of $1,259 \pm 57$ and $1,490 \pm 7$ $\mu\text{g/g}$ of paprika flakes at 300 min, respectively. This differs from hexane and ethyl acetate, where the maximum extraction of capsanthin at 300 minutes was 189 ± 6 and 255 ± 2 $\mu\text{g/g}$ of paprika flakes, respectively, values much lower than those achieved for acetone and ethanol (Appendix 8).

The effect of the solvent on the extraction of capsanthin from paprika flakes is due to the different physicochemical characteristics of each solvent used, such as: molecular weight, dynamic viscosity, ability to mix with water and degree of polarity, which, as it increases, also increases the amount of pigment extracted (Amaya *et al.*, 1997). Temperature is another variable that influences the process of pigment transfer to the solvent because it decreases the viscosity of the solvent along with changes in the cellular structure of the paprika's biological matrix. However, excessive temperature can cause browning of the material. A temperature of 40°C has been established as the optimal temperature for the extraction of pigments present in paprika (Rafajlovska *et al.*, 2007).

The capsanthin content in the saponified paprika flake extract using the conventional method (A) was $1,620 \pm 85$ $\mu\text{g/g}$ of paprika flakes, similar to the content reported by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1994c) and Pérez-Gálvez *et al.* (2007) in paprika powder ($1,590 \pm 61$ and $1,510 \pm 29$ $\mu\text{g/g}$ powder, respectively) and higher than the content reported by Mínguez-Mosquera *et al.* (1994a) in fresh paprika during the first harvest (635.78 $\mu\text{g/g}$ fresh paprika).

Figure 5 shows the capsanthin content in the paprika flake extract using the simultaneous extraction and saponification method (B) compared to the conventional extraction method (A). The capsanthin content in the paprika flake extract using the conventional method (A) was significantly higher ($p < 0.05$) than the extraction method (B) using acetone, ethyl acetate and hexane. However, no significant differences ($p > 0.05$) were found between the conventional method (A) and the method (B) with ethanol.

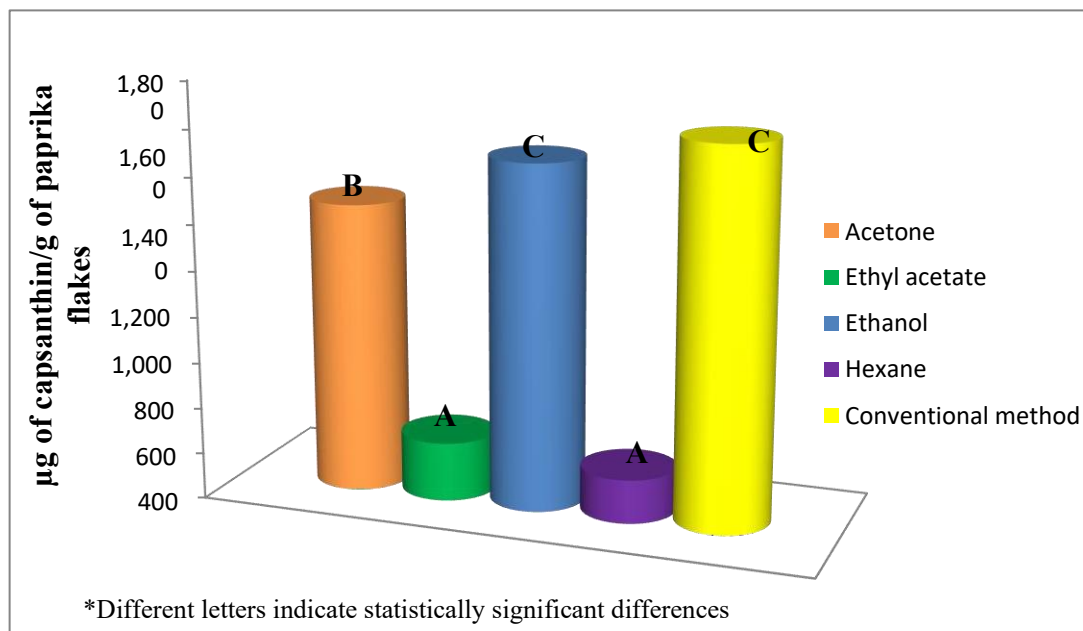


Figure 5: Capsanthin Content by Applying the Simultaneous Extraction and Saponification Method with Different Solvents (300 Minutes) and the Conventional Method.

In line with this study, Rafajlovska *et al.* (2007) and Martín *et al.* (2006) found that acetone was a good extraction solvent for unsaponified capsanthin from dried paprika, due to its high ability to mix with matrix water and its low dynamic viscosity which facilitates the extraction of carotenoid pigments. However, Santamaría *et al.* (2000) and Cardona *et al.* (2006) proposed using ethanol to extract capsaicinoids from dried peppers and lycopene from dried tomatoes, respectively, because ethanol has a higher yield due to the high solubility of fatty compounds and carotenoids, but other substances other than carotenoids are co-extracted, leading to a high yield in the extraction of the oleoresin.

According to the results, the conventional method (A) was selected, which although it is time-consuming, it allows for the extraction of capsanthin from a larger quantity of flakes and is economical due to the smaller amount of solvent to be used during the extraction.

3.3 Characterization of the Oleoresins

Table 4 shows the capsanthin and α -tocopherol (α -TOH) content in paprika flake oleoresins.

Table 4. Capsanthin and α -Tocopherol Content in Paprika Flake Oleoresins.

Oleoresin	α -tocopherol (mg/100 g of oleoresin)	Capsanthin (μ g/g oleor esin)
Sunflower oil	46 ± 0.4^c	ND
OC	46 ± 2.4^c	74.6 ± 0.03^c
OS	62 ± 0.5^a	92.9 ± 0.05^a
OSS	54 ± 0.3^b	85.9 ± 0.04^b

OS: Saponified Oleoresin; OSS: Unsaponified Oleoresin; OC: Isolated Capsanthin Oleoresin; ND: Not Detected;

*Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between oleoresins.

The α -TOH content in saponified (OS) and unsaponified (OSS) oleoresin was significantly higher compared to sunflower oil and isolated capsanthin extract oleoresin (OC) (Appendix 9.8). These are expected results because the open column separation procedure for capsanthin causes the loss of α -TOH, which is naturally present in paprika.

The amount of α -TOH present in the studied paprika extracts is higher than that reported for spinach, asparagus, red chili (Daood *et al.*, 1996) and paprika in fresh matter (Kanner *et al.*, 1979; Ching and Mohamed 2001).

3.4 Oleoresins Microencapsulation

Tables 5 and 6 show the results of the face-centered central composite design for the encapsulation of saponified (OS-C) and unsaponified (OSS-C) paprika flake extract oleoresins with Capsul[®] by spray drying. The results are presented as the percentage of surface capsanthin, encapsulation efficiency and capsanthin recovery.

Table 5. Capsanthin Encapsulation Efficiency according to the Face-Centered Central Composite Design for Saponified Paprika Flake Extract Oleoresin Encapsulated with Capsul® (OS-C).

Oleoresin/ Capsul® Ratio	Temperature (°C)	Surface Capsanthin (% ± SD)	Capsanthin Encapsulation Efficiency (% ± SD)	Capsanthin Recovery (% ± SD)
1:1	150	57.5 ± 2.6	42.5 ± 2.6	32.7 ± 1.3
1:1	175	64.9 ± 4.4	35.1 ± 4.4	31.9 ± 1.3
1:1	200	59.9 ± 0.4	40.1 ± 0.4	31.9 ± 0.2
1:2	150	33.3 ± 0.4	66.7 ± 0.4	54.6 ± 0.4
1:2	175	32.4 ± 4.9	67.6 ± 4.9	52.6 ± 1.7
1:2	175	33.6 ± 0.2	66.4 ± 0.2	50.2 ± 1.1
1:2	200	26.8 ± 4.7	73.2 ± 4.7	55.9 ± 1.3
1:3	150	16.0 ± 0.9	84.0 ± 0.9	74.5 ± 2.5
1:3	175	14.3 ± 1.5	85.7 ± 1.5	71.1 ± 0.3
1:3	200	16.9 ± 1.5	84.4 ± 3.3	74.5 ± 1.8

SD: Standard Deviation

Table 6. Capsanthin Encapsulation Efficiency according to the Face-Centered Central Composite Design for Unsaponified Paprika Flake Extract Oleoresin Encapsulated with Capsul® (OSS-C).

Oleoresin/C apsul® Ratio	Temperature (°C)	Surface Capsanthi n (% ± SD)	Capsanthin Encapsulation Efficiency (% ± SD)	Capsanthin Recovery (% ± SD)
1:1	150	47.0 ± 0.7	53.0 ± 0.7	28.6 ± 0.6
1:1	175	52.6 ± 2.8	47.4 ± 2.8	28.0 ± 0.5
1:1	200	61.9 ± 0.3	38.1 ± 0.3	29.6 ± 2.0
1:2	150	42.4 ± 0.6	57.6 ± 0.6	55.9 ± 0.1
1:2	175	32.3 ± 0.3	67.7 ± 0.3	54.6 ± 0.5
1:2	175	32.7 ± 1.2	67.3 ± 1.2	57.7 ± 2.5
1:2	200	30.5 ± 1.2	69.5 ± 1.2	58.4 ± 1.2
1:3	150	9.3 ± 0.3	90.7 ± 0.3	65.1 ± 2.5
1:3	175	10.7 ± 2.4	89.3 ± 2.4	69.6 ± 1.1
1:3	200	8.4 ± 0.4	91.6 ± 0.4	69.9 ± 2.5

SD: Standard Deviation

In the OS-C and OSS-C systems, the surface capsanthin content ranged from 14.3% to 64.9% and from 8.4% to 61.9%, respectively; the capsanthin encapsulation efficiency ranged from 35.1%-

85.7% and 38.1%-91.6%, respectively, and the recovery of capsanthin between 31.9%-74.5% and 28.0%-69.9%, respectively.

In the OS-C and OSS-C systems, as the encapsulating agent content increased, the percentage of surface capsanthin decreased, substantially improving encapsulation efficiency and capsanthin recovery. The higher content of encapsulating material increases the rate of crust formation on the surface of the droplets, allowing water diffusion from inside the microparticles and increasing the retention of carotenoid pigments (Sootitawatt *et al.*, 2005). Capsul[®] is a modified starch that has low viscosity, which allows for a high incorporation of solids into the solution to be dried, which would explain a better retention of the encapsulated compound (Reineccius, 1991).

When using spray drying, variable results are found in the encapsulation efficiency of carotenoid pigments depending on the encapsulating agent used. Encapsulation efficiency values of over 90% have been reported for lycopene with gum arabic and sucrose (Larroza and Mercandante, 2007) and for β -carotene with β and κ carrageenan copolymer (Laos *et al.*, 2007), while lower values than those obtained in this study have been reported for lycopene with gelatin and sucrose (Shu *et al.*, 2006) and for β -carotene with maltodextrin (DE 25) (Desobri *et al.*, 1997).

Capsanthin recovery after the drying process reached values of 31.9-74.5% and 28.0-69.9% in the OS-C and OSS-C systems, respectively. The drying temperature and the rate of crust formation are the main factors that affect the recovery of carotenoid pigments during the drying process (Gharsallaoui *et al.*, 2007). On the other hand, Capsul is a modified starch that can create a continuous network held together by hydrogen bonds, resulting in the formation of a gel that traps carotenoids (Loksuwan, 2007). Robert *et al.* obtained similar recoveries to that of this study (2003) by spray-drying a rosehip oleoresin using potato starch as an encapsulating agent, with recovery values of 71%, 54% and 57% for β -carotene, lycopene and rubixanthin, respectively. A recovery greater than the maximum of this study was obtained by encapsulating β -carotene by spray drying with modified tapioca starch (82.2%) (Loksuwan, 2007).

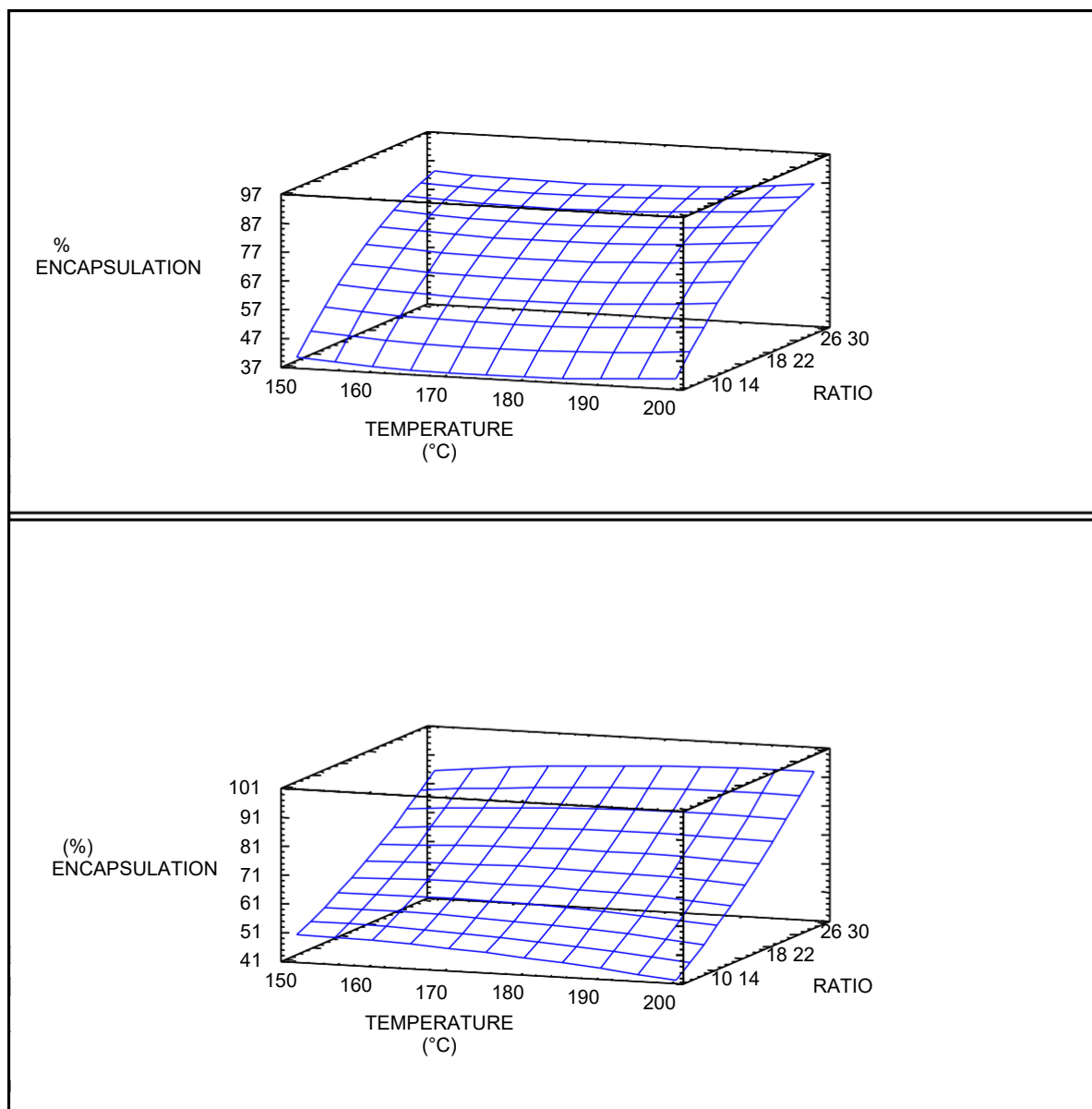
3.5 Microparticles Obtained under Optimal Conditions

The Response Surface Methodology was applied to optimize the encapsulation efficiency of capsanthin for the OS-C and OSS-C systems, considering the linear, quadratic and interaction forms of the independent variables (temperature and oleoresin/Capsul[®] ratio) for each system studied.

Capsanthin degradation has been associated with temperature-induced oxidation and/or degradation reactions; however, the dryer inlet temperature in its linear and quadratic form and its interaction with the oleoresin/Capsul[®] ratio did not have a significant effect on the encapsulation efficiency of capsanthin ($p > 0.05$) for the two systems studied (OS-C and OSS-C) (Appendix 9.1 and 9.2).

On the other hand, the oleoresin/Capsul[®] ratio variable in its linear form showed a significant effect on the encapsulation efficiency of capsanthin ($p < 0.05$) for the OS-C and OSS-C systems (Appendix 9.1 and 9.2). Analyzing the Pareto chart shows that there is a positive effect of the oleoresin/Capsul[®] ratio on encapsulation efficiency. The quadratic component of the oleoresin/Capsul[®] ratio was only significant in the OS-C system. The adjusted r^2 value indicates that the model explains the 97.3% and 90.6% of the variability in encapsulation efficiency in the OS-C and OSS-C systems, respectively.

Figures 6 and 7 show the Estimated Response Surface plots for the face-centered central composite design for the OS-C and OSS-C systems, respectively. These figures show that as the oleoresin/Capsul ratio increases, the encapsulation efficiency of capsanthin improves. Temperature does not have a significant effect on encapsulation efficiency; however, at higher drying temperatures, capsanthin retention improves due to an increase in drying rate, reducing the residence time of carotenoid pigments (Rosenberg *et al.*, 1990).



of the previous systems.

Table 7. Conditions and Characterization of the Microparticles Obtained under Optimal Conditions for the OS-C, OSS-C and OC-C Systems.

Systems	Oleoresin/Capsul® Ratio	Inlet Temperature (°C)	Surface Capsanthin (%) $\pm$ SD)	Capsanthin Encapsulation Efficiency (%) $\pm$ SD)	Capsanthin Recovery (%) $\pm$ SD)
OS-C	1:3	200	16.9 ± 1.5^a	83.1 ± 1.5^c	74.5 ± 1.8^a

OSS-C	1:3	200	8.4 ± 0.3^c	91.6 ± 0.3^a	69.9 ± 2.5^a
OC-C	1:3	200	11.2 ± 0.4^b	88.8 ± 0.4^b	68.2 ± 0.2^a

OS-C: Saponified Oleoresin-Capsul®; OSS-C: Unsaponified Oleoresin-Capsul®; OC-C: Isolated Capsanthin Oleoresin-Capsul®. *Different letters in columns indicate significant differences ($p \leq 0.05$)

The recovery percentage showed no significant differences ($p > 0.05$) between the systems studied, because the microparticles were prepared using the same optimal oleoresin/Capsul conditions and dryer inlet temperature, with the effect of the type of oleoresin being the main effect to be evaluated. Thus, the results show that the systems where capsanthin was free (OS-C and OC-C) presented a significantly lower encapsulation efficiency ($p < 0.05$) with respect to the OSS-C system (Appendix 9.5), showing that the fatty acids that esterify capsanthin in the OSS-C system favor its interaction with the hydrophobic sites of Capsul®, decreasing the percentage of surface areas.

Table 8 presents the moisture content and microparticle size of the OC-C, OS-C and OSS-C systems obtained under optimal conditions.

Table 8. Moisture Content and Microparticle Size of OC- OS-C and OSS-C Systems, Obtained under Optimal Conditions.

System	Humidity (% $\pm$ SD)	Particle Size D(3,2) (μ m)
OC-C	5.3 ± 0.10^a	3.9
OSS-C	5.6 ± 0.20^a	3.9
OS-C	3.4 ± 0.09^b	4.4

OS-C: Saponified Oleoresin-Capsul®; OSS-C: Unsaponified Oleoresin-Capsul®; OC-C: Isolated Capsanthin Oleoresin-Capsul®. *Different letters indicate significant differences between systems ($p < 0.05$).

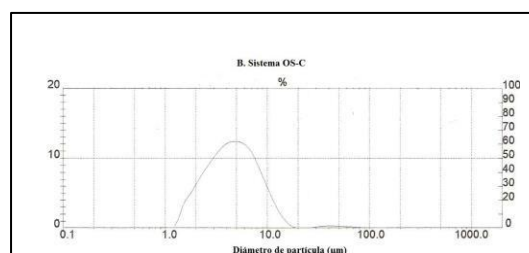
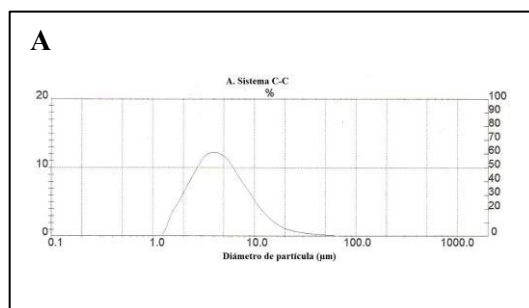
The moisture content ranged from 3.4 to 5.6% (Appendix 9.4), which is within the expected range for microparticles made using spray drying as an encapsulation method, thus ensuring the microbiological quality of the microparticles.

As shown in Table 8, the size of the microparticles produced under optimal conditions is presented according to the D value (3,2), which fluctuated between 3.9 and 4.4 μ m and is within the ranges reported in the literature in spray drying processes (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Particle sizes within the range found in this study have been reported for

black pepper oleoresin microparticles with modified starch (Shaikh *et al.*, 2006) and lycopene with a mixture of gelatin and sucrose (Shu *et al.*, 2006), with ranges of 1.38-24 μm , 5-15 μm and 2-15 μm , respectively. Wider particle size ranges were found in paprika oleoresin microparticles with porous rice starch/gelatin granules (2-60 μm) and with gum arabic (2-50 μm) (Santos *et al.*, 2005); β -carotene with modified tapioca starch (75-150 μm), native tapioca starch (106-250 μm) and maltodextrin (DE 24) (106-250 μm) (Loksuwan, 2007); d-limonene with gum arabic, maltodextrin and mixtures of both using sucrose ester, polyglycerol ester and sugar beet pectin as emulsifiers (13.8-35.1 μm) (Paramita *et al.*, 2010).

Figure 8 (A, B, C) shows the size distribution curves for the microparticles of the OC-C, OS-C and OSS-C systems obtained under optimal conditions, respectively. The size distribution for the three systems studied was unimodal, with particles in only one size range.



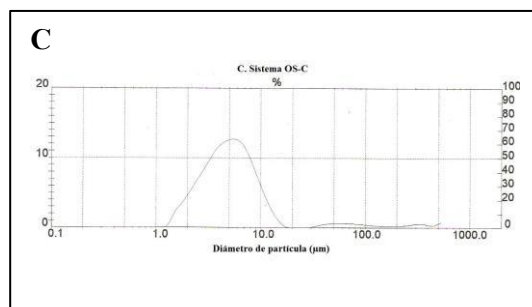
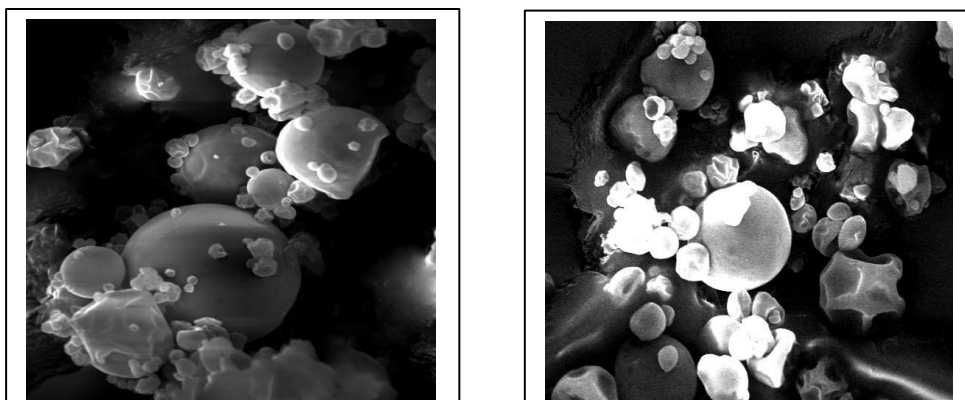


Figure 8: Particle Size Distribution of Microparticles from the OC-C (A), OS-C (B) and OSS-C (C) Systems Obtained under Optimal Conditions.

Figure 9 (A, B and C) shows the scanning electron microscopy (SEM) photographs of the microparticles of the OC-C, OS-C and OSS-C systems, obtained under optimal conditions, respectively.

In all three systems, microparticles with a spherical shape and smooth walls are observed, along with microparticles with a contracted surface. Both types of microparticles have continuous walls and apparently no cracks or fissures. The formation of dented microparticles is a common characteristic of spray drying. Particle shrinkage during the drying process can occur at low or high dryer inlet temperatures (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005). At low temperatures, there is less water diffusion and the particles have more time to shrink, while at high temperatures, the rapid evaporation of water and the high pressure inside the particles also produce shrinkage.



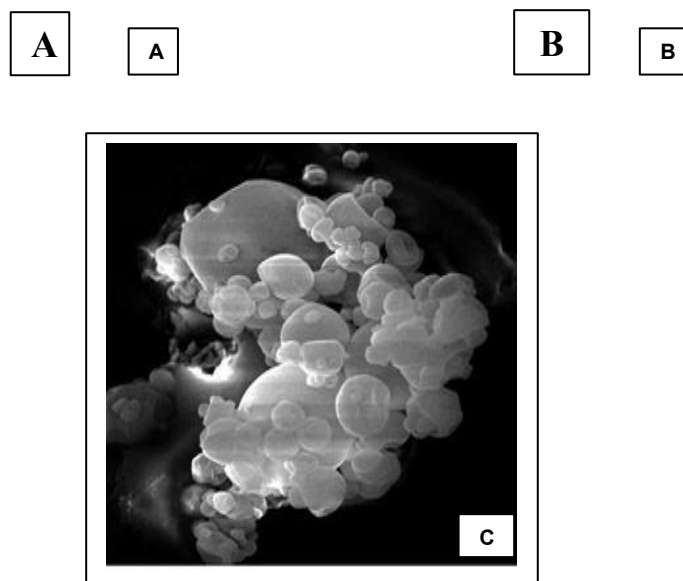


Figure 9. SEM Microphotographs of Microparticles from the OC-C (A); OS-C (B) and OSS-C (C) Systems, Obtained under Optimal Conditions (Mag. 300 Kx).

A similar morphology was observed in microparticles of β -carotene with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin (24 DE) as encapsulating agents (Loksuwan, 2007) of lycopene with Capsul (Rocha *et al.*, 2012), cumin oleoresin with gum arabic, maltodextrin (18 DE) and modified starch (Hi Cap-100) (Kanakdande *et al.*, 2007), l-menthol with Capsul® and Hi Cap-100 (Soottitantawat *et al.*, 2005) and black pepper oleoresin with gum arabic and Hi Cap-100 (Shaikh *et al.*, 2006).

Unlike what was found in this study, Santos *et al.* (2005) and Soottitantawat *et al.* (2005) reported that microparticles prepared with gum arabic showed greater dents than microparticles obtained with Capsul®, Hi Cap-100 and rice starch. Furthermore, Krishnan *et al.* (2005b) found that the microparticles prepared with rice starch-gelatin have interstices and pores, because the gelatin does not form a continuous film on the surface, compromising its ability to act as a barrier material, similar to that reported in the encapsulation of cardamom oleoresin using Hi Cap-100 and maltodextrin.

The morphology of the microparticles depends on different parameters involved in drying, such as dryer feed temperature, dryer inlet air temperature and solvent used, among other factors (Kosaraju *et al.*, 2006).

3.6 Capsanthin Stability Study

The kinetics of capsanthin degradation was monitored during the storage of microparticles from the OC-C, OS-C and OSS-C systems obtained under optimal conditions at 40, 50 and 70°C. The reaction order, rate constants, half-life and thermodynamic parameters were determined.

Figure 10 (A, B, C) shows the natural logarithm of the percentage of capsanthin retention versus time (h) for the microparticles of the OC-C, OS-C and OSS-C systems obtained under optimal conditions, stored at 40, 50 and 70°C. From the slope of these graphs, the capsanthin degradation rate constants were obtained for each system and temperature studied.

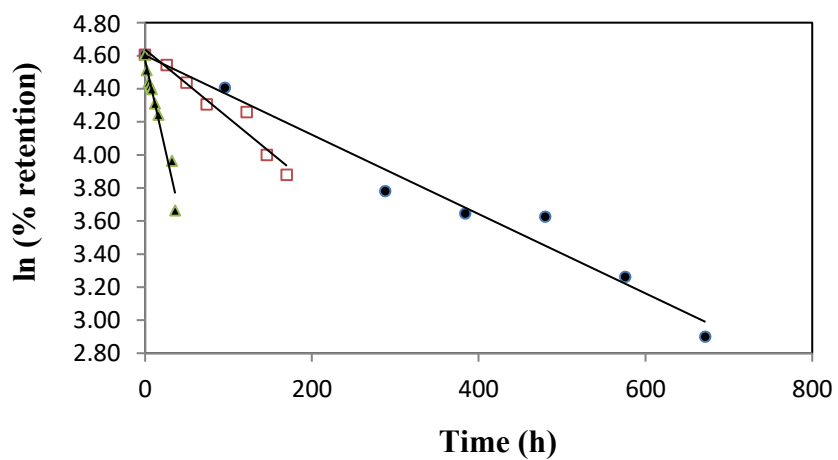
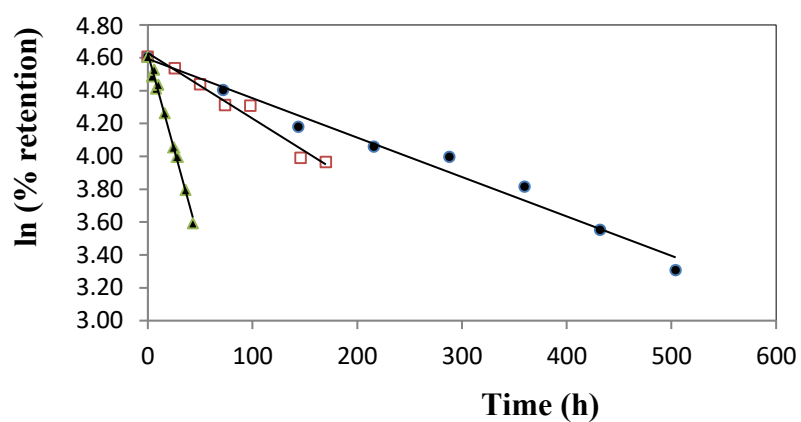
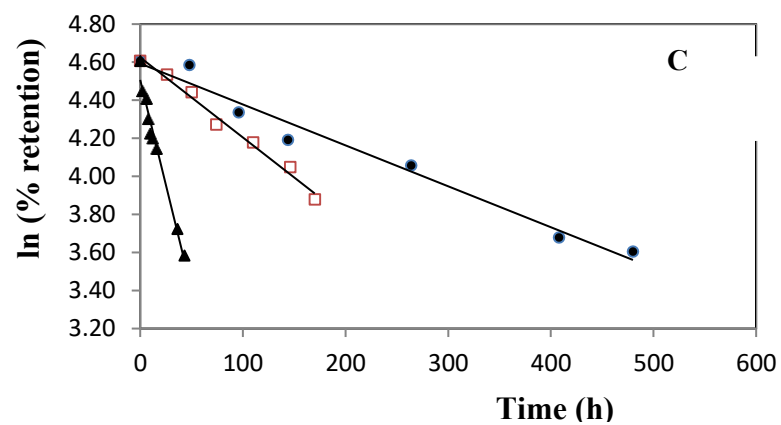


Figure 10. Capsanthin Degradation Kinetics for Microparticles of the OC-C (A), OS-C (B), OSS-C (C) Systems, Obtained under Optimal Conditions ● (40°C), □ (50°C) and ▲ (70°C).

The coefficient of determination (R^2) was used as a criterion to determine the reaction order. La degradación de capsantina en los tres sistemas siguió una cinética de primer orden a las tres temperaturas estudiadas. Similar results were reported for paprika oleoresin (Jarén-Galán and Mínguez Mosquera, 1999; Rascón *et al.*, 2011), paprika extract dissolved in water (Shin *et al.*, 2001) and standard solution of esterified and non-esterified capsanthin (Pérez-Gálvez and Mínguez-Mosquera, 2002b). The same degradation kinetics were reported for β -carotene (Ramoneda *et al.*, 2011) and for *trans*- β -carotene, *trans*-lycopene and *trans*-rubixanthin (Robert *et al.*, 2003). Conversely, in microencapsulated paprika oleoresin, a second-order carotenoid degradation kinetics was found (Beatus *et al.*, 1985).

Table 9 shows the capsanthin degradation rate constants (k) in the microparticles of the OSS-C, OS-C and OC-C systems obtained under optimal conditions, stored at 40, 50 and 70°C.

Table 9. Capsanthin Degradation Rate Constants (k) in Microparticles of the OSS-C, OS-C, OC-C Systems Obtained under Optimal Conditions, Stored at 40, 50 and 70°C.

SYSTEMS			
Temperature (°C)	OSS-C k (h ⁻¹) $\pm$ SD	OS-C k (h ⁻¹) $\pm$ SD	OC-C k (h ⁻¹) $\pm$ SD
40	$2.4 \times 10^{-3} \pm 0.9 \times 10^{-4a}$	$2.4 \times 10^{-3} \pm 2.8 \times 10^{-4a}$	$2.0 \times 10^{-3} \pm 2.8 \times 10^{-4a}$
50	$4.0 \times 10^{-3} \pm 3.5 \times 10^{-4b}$	$4.0 \times 10^{-3} \pm 2.8 \times 10^{-4b}$	$4.2 \times 10^{-3} \pm 1.4 \times 10^{-4b}$
70	$2.3 \times 10^{-2} \pm 1.6 \times 10^{-3c}$	$2.3 \times 10^{-2} \pm 1.6 \times 10^{-3c}$	$2.2 \times 10^{-2} \pm 2.1 \times 10^{-4c}$

OC-C: Oleoresin Capsanthin-Capsul; OS-C: Saponified Oleoresin-Capsul; OSS-C: Unsaponified Oleoresin-Capsul. Different letters indicate significant differences

An increase in storage temperature led to an increase in the degradation rate constant (k) of capsanthin in the three systems studied. The degradation rate of capsanthin found is lower than that indicated for other carotenoids such as rubixanthin, lycopene and β -carotene encapsulated with starch and gelatin (Robert *et al.*, 2003), suggesting that the stability of carotenoid pigments depends on their chemical structure and the nature of the polymer used as an encapsulating agent.

No isomerization of capsanthin was observed during the stability study of the microparticles of the three systems at the three temperatures studied, in agreement with what was found by Wagner and Warthesen (1995) for α and β -carotene encapsulated with hydrolyzed starch stored at temperatures between 37 and 65°C.

The degradation rate of capsanthin in microparticles with isolated (OC-C), saponified (OS-C) and unsaponified (OSS-C) capsanthin showed no statistically significant differences ($p > 0.05$) at each of the temperatures studied (Appendix 9.6), indicating that the esterification of capsanthin does not influence the stability of this pigment. In studies with other carotenoids esterified with polyunsaturated fatty acids, an increase in the degradation rate constant was observed because a more oxidative environment would accelerate the degradation of the pigments when compared to the non-esterified forms (Pérez-Galvez and Mínguez-Mosquera, 2002a). These differences could be attributed to the type of fatty acid that esterifies capsanthin, since in paprika, capsanthin is preferentially esterified with saturated fatty acids.

Studies on the effect of esterified and non-esterified carotenoids on lipid oxidation are controversial. Goda *et al.* (1997) and Matsufuji *et al.* (1998) reported that esterified and non-esterified capsanthin inhibits oxidation by the same mechanism, suggesting that capsanthin's ability to trap free radicals is not influenced by esterification, but rather is primarily due to the presence of the keto group in its structure. However, Biacs *et al.* (1989) reported that esterified capsanthin is more stable towards seed lipoxygenases than non-esterified capsanthin. Whereas Jarén-Galán and Mínguez-Mosquera (1997) found that diesterified capsanthin and β carotene are more unstable than non-esterified capsanthin.

Table 10 presents the Arrhenius parameters, half-life and thermodynamic parameters for capsanthin of the microparticles in the three systems studied (OC-C, OS-C, OSS-C) stored at 40, 50, and 70°C. Figure 10 shows the isokinetic line of capsanthin degradation.

Table 10. Arrhenius Parameters, Half-Life, and Thermodynamic Parameters of Capsanthin in the Microparticles of the OSS-C, OS-C and OC-C Systems, Obtained under Optimal Conditions.

Systems	Activation Energy (kcal/mol)	Intercept (ln A)	R ₂	Average Life Calculated at 25°C (days ± SD)	Activation Enthalpy (kcal/mol)	Activation Entropy (cal/mol K)	R ₂
OC-C	17.3 ± 0.86 ^a	21.5 ± 1.26 ^a	0.99	62	16.6 ± 0.86 ^a	-20.9 ± 2.51 ^a	0.99
OS-C	16.5 ± 0.28 ^a	20.5 ± 0.34 ^a	0.98	53	15.9 ± 0.28 ^a	-22.9 ± 0.68 ^a	0.98
OSS-C	15.9 ± 0.41 ^a	19.5 ± 0.69 ^a	0.98	48	15.3 ± 0.42 ^a	-24.8 ± 1.37 ^a	0.98

OC-C: Oleoresin Capsanthin-Capsul; OS-C: Saponified Oleoresin-Capsul; OSS-C: Unsaponified Oleoresin-Capsul.

The activation enthalpy ($\Delta H^\ddagger$) and activation entropy ($\Delta S^\ddagger$) were obtained from the slope and intercept, respectively, of the $\ln(k/T)$ vs $1/T$ plot. Statistical analysis showed no significant differences for activation energy, activation enthalpy and activation entropy between the studied systems (OC-C, OS-C and OSS-C) (Appendix 9.7). Pérez-Galvez *et al.* (2000) reported the same activation energy for the red fraction of paprika oleoresin; however, the activation enthalpy was higher and the activation entropy lower than that reported in this study, because capsorubin was included in the red fraction and it is more stable than capsanthin.

The estimated half-life of capsanthin at 25°C is longer than that reported for encapsulated rosehip oleoresin microparticles (Robert *et al.*, 2003), β -carotene (7-27 days at 25°C) (Desobry *et al.*, 1997) and chili pepper oleoresin carotenoids (18-25 days at 35°C) (Rodriguez – Huezos *et al.*, 2004), all using spray drying as the encapsulation method.

On the other hand, it is possible to observe that with greater enthalpy, activation entropy decreases; the existence of this inversion implies an isokinetic point that could mathematically lead to a linear relationship between enthalpy and activation entropy as a compensation effect (Labuza, 1980).

Figure 11 shows the activation enthalpy versus activation entropy graph ($r^2 = 0.999$), which suggests that capsanthin, regardless of its form, is degraded by a similar mechanism (Ulgen and Ozilgen, 1991). The same effect was reported by Henry *et*

al. (1998) on the oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, 9-*cis* and *trans*- β -carotene in saffron oil.

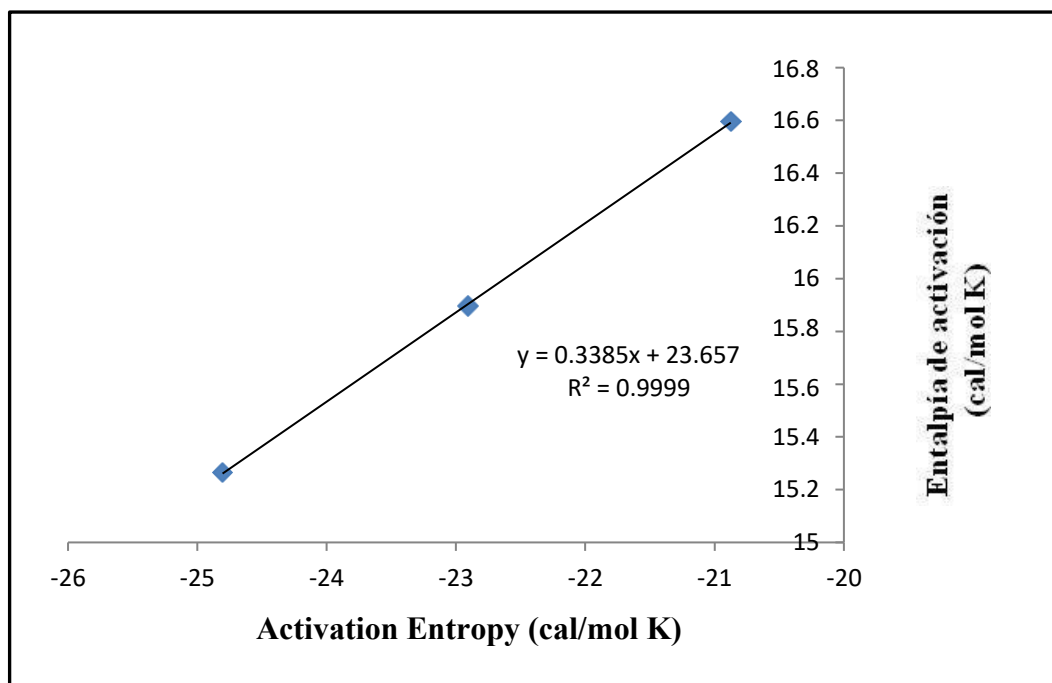


Figure 11. Isokinetic Line for Capsanthin Degradation.

4. CONCLUSIONS

In this work, the effect of capsanthin esterification on the encapsulation efficiency and stability of capsanthin was studied. The results obtained showed that the hypothesis and objectives set were met.

1. In the encapsulation of paprika flake oleoresins, the oleoresin/capsul ratio variable had a significant effect on the encapsulation efficiency of capsanthin, which increased with the greater incorporation of Capsul in the formulation.
2. Microparticles with paprika flake oleoresin where capsanthin is esterified (OSS-C) showed a higher encapsulation efficiency compared to those microparticles with unesterified capsanthin (OS-C and OC-C), suggesting that the fatty acids esterifying capsanthin in the OSS-C system favor its interaction with the hydrophobic sites of Capsul®.
3. The capsanthin degradation rate constants were the same for the three microparticle systems (OSS-C, OS-C and OC-C) studied, showing that the esterification of capsanthin does not affect its stability.

The results obtained in this work would allow the development of paprika flake oleoresin microparticles with potential application as functional ingredients.

5. LITERATURE

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

Biosynthesis of carotenoids in red paprika. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 1517–1523, 2001.

18. DESAI, K. and PARK, H. Recent development in microencapsulation of foods ingredients. Drying Technology. 23 (7): 1361-1394, 2005.
19. DESOBRI, S; NETTO, F; LABUZA, T. Comparison of spray-drying and freeze drying for Beta-carotene encapsulation and preservation. Journal of Food Science. 62: 1158-1162, 1997.
20. FINOTELLI, P. and ROCHA-LEAO, M. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsule using spray drying. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering. 1-11, 2005.
21. FLORES-MARTÍNEZ, H., OSORIO, G., GALLARDO, T. Optimal spray-drier encapsulation process of orange oil, Drying. Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004). Sao Paulo, Brazil, August 22-25, 2004, vol A, pp. 621-627, 2004.
22. GAO, Y., NAGY, B., LIU, X., SIMANDI, B., WANG, Q. Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from Marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound. The Journal of Supercritical Fluids. 49: 345-350, 2009.
23. GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an review. Food Research International. 40: 1107-1121, 2007.
24. GIBBS, B., KERMASHA, S., ALLI, I., MULLIGAN, N. Encapsulation in the food industry: a review. International Journal of Food Science and Nutrition. 50: 213-224, 1999.
25. GODA, Y., NAKAMURA, H., SAKAMOTO, S., ISHIKAWA, K., MAITANI, T., YAMADA, T. Photostability of coloring constituents in paprika color. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 38: 240-247, 1997.
26. GÓMEZ-LADRÓN DE GUEVARA, R., GONZÁLEZ, M., GARCÍA-MESEGUER, M., NIETO, J., AMO, M., VARÓN, R. Effect of adding natural antioxidants on color stability of paprika. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82: 1061-1069, 2002.
27. GOVINDARAJAN, VS Capsicum Production, Technology, Chemistry, and Quality-Part II. Processed Products, Standards, World Production and Trade. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 23: 207-288, 1986.
28. HASLER, C.M. Functional foods: their role in disease prevention and health. Food Technology. 52, 63–69, 1998.
29. HENRY, L., CATIGNANI, G., SCHWARTZ, S. Oxidative degradation kinetics of Lycopene, Lutein, and 9-cis and all-trans β -Carotene. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75 (7): 823-829, 1998.
30. HIRAYAMA, O., NAKAMURA, K., HAMADA, S., KOBAYASHI, Y. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. Lipids. 29: 149-150, 1994.
31. HOJNIK, M., SKERGET, M., KNEZ, Z. Extraction of lutein from Marigold flower petals. Experimental kinetics and modelling. Food Science and Technology. 41 (10): 2008-2016, 2008.
32. HORNERO-MÉNDEZ, D. and MÍNGUEZ-MOSQUERA, I. Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplast of *Capsicum annum* ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (5): 1617-1622, 2000.

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

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

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

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

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

6. APPENDICES

APPENDIX 1

PREPARATION OF CAPSANTHIN EXTRACTS FROM PELLETTED PAPRIKA FLAKES

Extraction 1 (Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez Method, 1993)

1. For the extraction, 2 g of dehydrated paprika flakes were weighed and ground in a mortar. 2 g of Celite® were added to facilitate grinding.
2. Once ground, they were placed in a funnel with filter paper and acetone was added, which was collected in a flask along with the pigments, until no color was observed in the ground flakes.
3. Subsequently, the pigments that remained in the acetone used in step 2 were transferred to ethyl ether in a separatory funnel, performing successive washes with distilled water to remove the acetone and impurities. Once the pigments were transferred to ethyl ether, the mixture was treated several times with anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) to remove all the water.
4. The ether phase, which contains the pigments in different states of esterification with fatty acids, was saponified with 10% KOH-Methanol solution for 12 hours in the dark (ether phase ratio: the ratio of KOH-Methanol at 10% was 50:50).
5. Subsequently, the organic phase, which contains the saponified pigments, was washed several times with distilled water until a neutral pH was reached.
6. Finally, the sample was filtered by passing it through Na_2SO_4 , collected and stored at -20°C until analysis.

Extraction 2 (Hojnik *et al.* method, 2008)

1. The extraction of carotenoid pigments combined extraction with simultaneous saponification.

2. Hexane, ethanol, acetone or ethyl acetate (analytical grade) was used as a solvent (solvent/paprika flake raw material ratio: 1 L/100 g) and 10% w/v potassium hydroxide solution (alkali solution/paprika flake raw material ratio: 7.5 mL/g).
3. The ground paprika flakes solvent, and saponification solution were placed simultaneously in a flask, keeping the sample under constant agitation and at a temperature of 40°C.
4. 1 mL of extract was taken from the flask at 2, 4, 8, 15, 30, 60, 120, 180 and 300 minutes, for the elaboration of the extraction kinetics of saponified capsanthin.
5. The samples obtained in step 4 were successively washed with distilled water, filtered through filter paper, and dried using nitrogen.
6. The samples were kept frozen at -20°C until analysis.
7. The extracts were analyzed by HPLC, bringing them to a volume of 5 ml, 10 ml and 25 ml so that the areas obtained were within the calibration curve and the concentration of saponified capsanthin was calculated.

APPENDIX 2

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

A MERCK HITACHI D-600 equipment was used, with an L-4250 UV visible detector and an L-6200 Intelligent Pump, connected to a microprocessor and a computerized recorder. A MERCK RP-18 3 μm column was used.

The working conditions were a wavelength of 450 nm; the mobile phase is presented in Table 1.

Table 1. Mobile Phase in HPLC Equipment

Time (min)	% Acetone	% Water
0	75	25
5	75	25
10	95	5
17	95	5
22	100	0
27	75	25
37	75	25

The flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 20 μL .

Concentration Calculation

The capsanthin concentration was calculated according to the following formula, using the extinction coefficient in acetone ($E^{1\%} = 2,300$).

$$X (\mu\text{g}) = \frac{A * y (\text{mL}) * 10^6}{A^{1\%}_1 * 100}$$

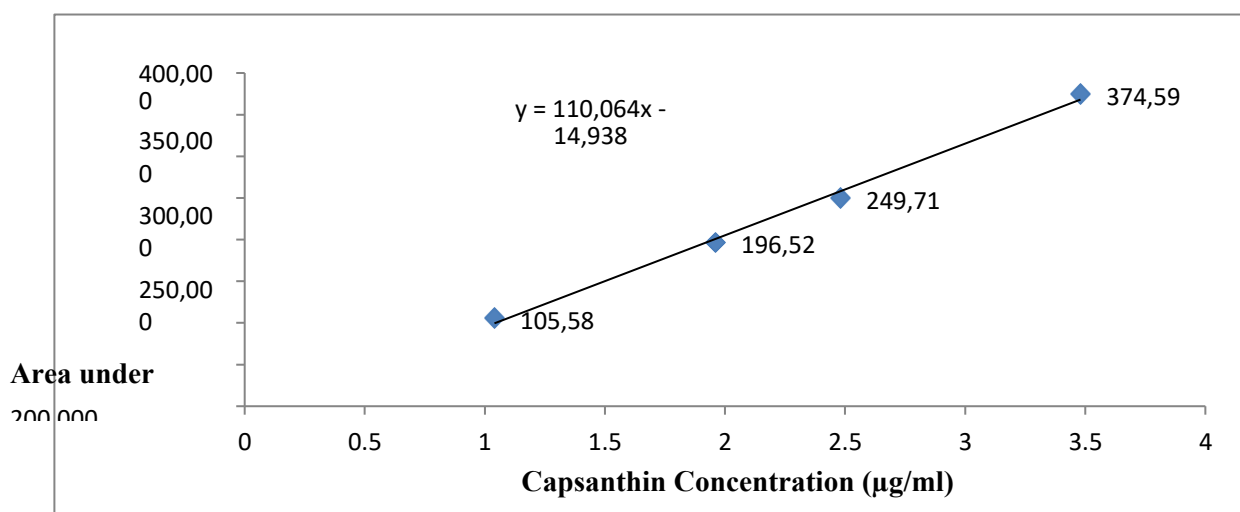
$$X (\mu\text{g/g}) = \frac{x (\mu\text{g})}{\text{sample weight (g)}}$$

Where X is the concentration of capsanthin, A is the absorption and $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ is the specific absorption coefficient.

Calibration Curve

1. The capsanthin calibration curve was prepared from capsanthin isolated by open column, using a UV-Vis spectrophotometer at 460 nm. The concentration was estimated using the extinction coefficient in acetone ($E^{1\%} = 2,300$).

2. The stock solution had a concentration of 3.48 ug/ml of capsanthin and a series of dilutions were prepared from this. The capsanthin curve was constructed using dilutions of 1.04, 1.96, 2.48, 3.48 ug/ml. Then linear regression was performed by plotting the area under the curve versus the capsanthin concentration. A correlation coefficient $R^2 = 0.9956$ and the equation $Y = 110,064x - 14,938$ were obtained.



APPENDIX 3

CAPSANTHIN OPEN-COLUMN SEPARATION AND STANDARD PREPARATION

1. The carotenoids obtained according to the method described by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993) were separated using a glass column with a 25 cm length and a 3 cm diameter.
2. The column was attached to a metal support using clamps and vacuumed.
3. A mixture of Mg oxide:Celite (1:1) was placed in the column until it reached a height of 12 cm, then 2 cm of Na₂SO₄ anhydrous were added.
4. The initiation mobile phase (petroleum ether, analytical grade) was added until it was evenly distributed throughout the column before adding the sample with the pigments.
5. Once the sample was added, the mobile phase was changed in increasing polarity to achieve adequate separation of the carotenoid pigments.
6. The solvents used were: 100% petroleum ether (PE), 5% ethyl ether in PE, 5-70% acetone in PE, 100% acetone, 5% water in acetone.
7. The solvent was evaporated from each fraction in a rotary evaporator and the fractions were injected for identification in an HPLC system using the method described by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993).

APPENDIX 4

CHARACTERIZATION OF OILS BY GAS CHROMATOGRAPHY

A Hewlett Packard (HP) 5890 series II chromatograph with FID detector, a HP 3395 integrator, with SP-2560 column, 100 m x 0.25 μ m film x 0.20 ID was used (Supelco, USA). The methyl esters were prepared using the AOCS Ce-2 66 method, according to the following protocol:

1. 100 mg of esterified, non-esterified capsanthin extract and isolated capsanthin were weighed
2. 5 mL of 0.5 N NaOH solution was added
3. Heated for 5 minutes, then cooled.
4. 5 mL of boron trifluoride in methanol was added and then heated for 3 minutes.
5. Cooled and saturated NaCl was added
6. 1.5 mL of hexane was added and stirred gently.
7. Activated carbon was added to this solution and the hexane phase was removed by filtering it through a funnel with filter paper and collecting it in a capped tube. This process was repeated 3 times.

Then 0.5 microliters of the hexane phase were injected into the gas chromatograph. The initial oven temperature was 160°C for three minutes, then programmed to increase by 2°C/min until reaching 200°C. The injector and detector temperatures were 240°C.

The carrier gas was hydrogen. The identification of each fatty acid was carried out by determining the absolute and relative retention times of each fatty acid, compared with pure Calbiochem standards (Merck, Darmstadt, Germany).

APPENDIX 5

TOCOPHEROL DETERMINATION BY HPLC

Reagents

- 1-. Hexane (HPLC)
- 2-. Tocol standards.

Procedure:

100 mg of filtered and anhydrous oil were weighed into a 10 mL amber volumetric flask, and filled to the mark with hexane (HPLC). 20 µl of the above solution were injected into the HPLC equipment with fluorescence detector, according to the AOCS Ce 8-89 method. The HPLC equipment consisted of a Merck-Hitachi L-6200 A pump (Merck, Darmstadt, Germany), a Rheodyne 7725i injector, a 20 µL loop, and a Merck-Hitachi F-1050 fluorescence detector coupled to a computer with Clarity software. The peaks were detected at 290 nm (excitation wavelength) and 330 nm (emission wavelength). A LiChrocart Superspher Si60 column (250 x 4 ID, 5µm Merck, Germany) was used. The mobile phase consisted of 2-propanol in hexane (0.5:99.5 v/v) with a flow rate of 1 mL/min. The identification and quantification of tocopherols was performed using a Calbiochem standard (Merck, Darmstadt, Germany).

Identification and quantification were performed by comparison with tocopherol standards of known concentration, using the following formula:

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

a= Peak area of the tocol in the sample

C= Tocol concentration in the standard

(ug/ml) V= Volume of the volumetric flask
(ml)

D = Dilution factor (if applicable) A =

Peak area of the tocol in the standard P =

Sample weight (g)

APPENDIX 6

DISPERSIONS PREPARATION FOR MICROENCAPSULATION

1. A 250 ml beaker was used to prepare 100 g of emulsion. Emulsions containing Capsul®, water and oleoresin were prepared, using an oleoresin/encapsulating agent ratio of 1:1 in the experiments (10% oleoresin, 10% Capsul® and 80% water); 1:2 (10% oleoresin, 20% Capsul® and 70% water) and 1:3 (10% oleoresin, 30% Capsul® and 60% water), corresponding to a theoretical content of 50%, 33% and 25% oleoresin in the powder obtained, respectively.
2. The emulsion was prepared by heating the water to 70°C and slowly adding Capsul® until it was completely dissolved, which took approximately 30 minutes, and during that time it was kept in constant agitation with a rotating magnet.
3. Once the encapsulant was dissolved, the Capsul® solution was cooled by placing the beaker in cold water until it reached room temperature. The magnet was removed from the beaker and the oleoresin was then added uniformly over the Capsul® solution and water.
4. The resulting emulsion was homogenized in an IKA model 750 homogenizer, Germany, under the following conditions:
 - 15,000 revolutions per minute (rpm) for 2 minutes
 - 19,000 rpm for 2 minutes.
 - 22,000 rpm per minuteand was fed into a spray dryer.

APPENDIX 7

CHARACTERIZATION OF MICROPARTICLES OBTAINED UNDER OPTIMAL CONDITIONS

Surface Capsanthin Content

For the determination of surface capsanthin, 100 mg of microparticles were weighed into a capped tube, to which 3 mL of hexane:ethyl ether (50:50) analytical grade were added. It was shaken manually for 30 seconds. Once the powder settled, the supernatant, which contained the surface capsanthin, was removed with a Pasteur pipette and dried with liquid nitrogen. Subsequently, this supernatant was dissolved in ethyl ether and saponified according to the method described by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993). The determination of capsanthin content was performed by HPLC according to the method described by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993).

Total Capsanthin Content

For the determination of total capsanthin, 100 mg of powder were weighed into a capped tube, 1 mL of double-distilled water was added, and it was homogenized in a Vortex® electric shaker (Cenco Instrument BV Breda, Netherlands) for 1 minute. Subsequently, 2.5 mL of ethyl acetate, 2.5 mL of ethanol, 2.5 mL of hexane and 2.5 mL of double-distilled water were added, the mixture was homogenized manually and the tubes were centrifuged at 3000 rpm for 2 minutes. The supernatant was then removed with a Pasteur pipette and deposited into a heart-shaped flask. This operation was repeated until no color was observed in the residue remaining in the tube. Subsequently, the solvent from the heart flask was evaporated in a rotary evaporator at 40°C and the dried sample was dissolved in ethyl ether and saponification was carried out according to the method described by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993). The determination of capsanthin content was performed by HPLC according to the method described by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993).

APPENDIX 8

SAPONIFIED CAPSANTHIN CONCENTRATION DURING THE SIMULTANEOUS EXTRACTION AND SAPONIFICATION PROCEDURE

Table 1. Saponified Capsanthin Concentration during the Simultaneous Extraction and Saponification Process from Dehydrated Paprika Flakes.

Saponified Capsanthin Concentration (ug/g of paprika flakes)				
Extraction Solvents				
Time (min)	Acetone	Ethanol	Hexane	Ethyl acetate
0	0	0	0	0
2	631.39 ± 29.20	490.85 ± 6.43	0	167.88 ± 5.74
4	790.45 ± 72.38	771.59 ± 40.33	62.90 ± 2.36	162.70 ± 20.49
8	715.17 ± 54.37	837.97 ± 40.33	81.63 ± 0.31	182.27 ± 0.12
15	979.00 ± 63.82	1,090.01 ± 6.40	143.64 ± 11.46	192.64 ± 10.23
30	868.55 ± 46.41	1,105.82 ± 16.35	139.18 ± 8.61	209.76 ± 2.10
60	920.12 ± 16.90	1,194.44 ± 33.59	153.21 ± 5.07	196.72 ± 10.69
120	1,049.50 ± 61.17	1,235.37 ± 27.87	158.25 ± 2.68	243.67 ± 14.64
180	1,077.64 ± 38.46	1,472.05 ± 41.64	186.28 ± 5.92	246.60 ± 1.56
300	1,258.68 ± 56.77	1,489.87 ± 6.56	189.29 ± 5.65	254.69 ± 2.08

APPENDIX 9

STATISTICAL

ANALYSIS

9.1 Spray Drying Microencapsulation Design of Saponified Paprika Oleoresin (*Capsicum annuum L.*) Using Capsul® as an Encapsulating Agent.

Table 1. Analysis of Variance for Capsanthin Encapsulation Efficiency in the Saponified Oleoresin of *Capsicum annuum L.*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A: temperature	3.30042	1	3.30042	0.33	0.5942
B: ratio	3102.65	1	3102.65	314.18	0.0001
AA	15.5746	1	15.5746	1.58	0.2775
AB	2.08803	1	2.08803	0.21	0.6695
BB	111.781	1	111.781	11.32	0.0282
Total Error	39.5013	4	9.87533		
Total (corr.)	3264.22	9			

R-squared = 98.7899 percent
R-squared (adjusted for df) = 97.2772 percent
Standard Error of the Est. = 3.1425
Absolute Error of the Mean = 1.65607
Durbin-Watson Statistic = 2.62514 (P = 0.8310)
Residual Autocorrelation Lag 1 = 0.319961

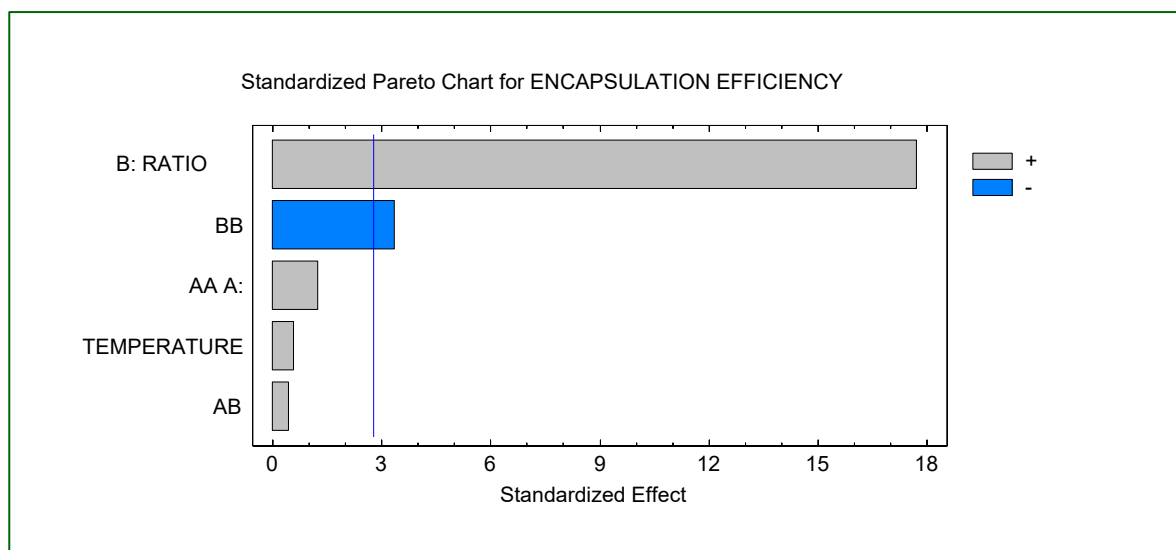


Fig. 1. Standardized Pareto Chart for Capsanthin Encapsulation Efficiency of Saponified Paprika Oleoresin Microparticles.

Table 2. Optimal Conditions for Obtaining Microparticles in Saponified Paprika Oleoresin.

System	Oleoresin/Capsule Ratio	Temperature (°C)
OS-C	1:3	200

9.2 Spray Drying Microencapsulation Design of Unsaponified Paprika Oleoresin (*Capsicum annuum* L.) Using Capsul® as an Encapsulating Agent.

Table 3. Analysis of Variance for Capsanthin Encapsulation Efficiency in the Unsaponified Oleoresin of *Capsicum annuum* L.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Reason	P-Value
A: temperature	0.749067	1	0.749067	0.02	0.8876
B: ratio	2,951.27	1	2,951.27	89.35	0.0007
AA	6.78306	1	6.78306	0.21	0.6739
AB	61.4656	1	61.4656	1.86	0.2442
BB	22.7136	1	22.7136	0.69	0.4536
Total Error	132.127	4	33.0318		
Total (corr.)	3,171.7	9			

R-squared = 95.8342 percent

R-squared (adjusted for df) = 90.6269 percent

Standard Error of the Est. = 5.74733

Absolute Mean Error = 2.988

Durbin-Watson Statistic = 1.70023 (P = 0.887)

Residual Autocorrelation Lag 1 = 0.0759568

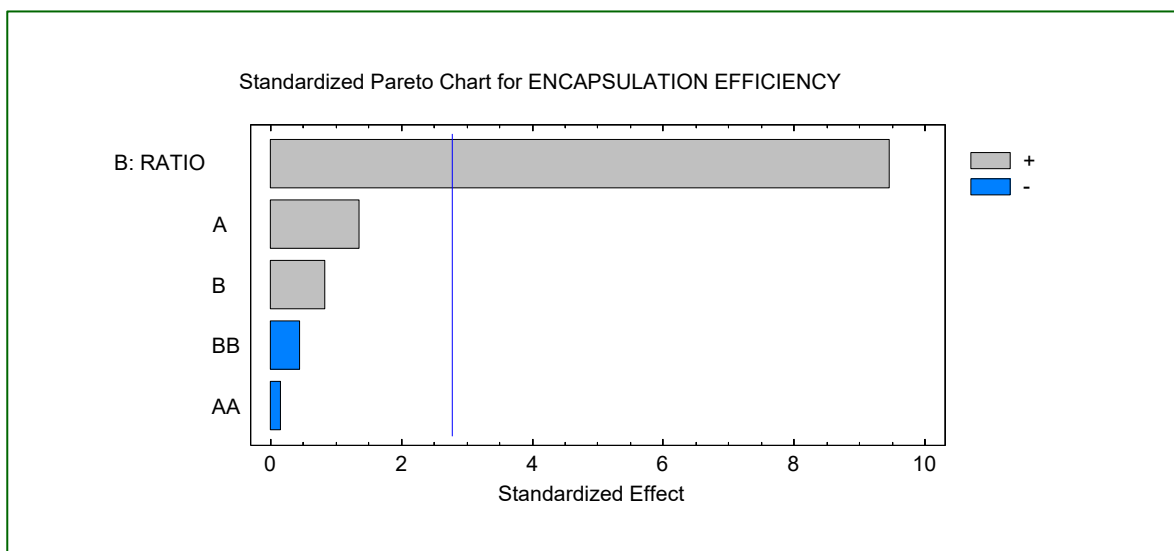


Fig. 2. Standardized Pareto chart for capsanthin encapsulation efficiency of unsaponified paprika oleoresin microparticles.

Table 4. Optimal conditions for obtaining microparticles in unsaponified paprika oleoresin.

System	Oleoresin/Capsule Ratio	Temperature (°C)
OSS-C	1:3	200

9.3 Statistical Analysis of the Simultaneous Extraction and Saponification of Capsanthin Using Different Extraction Solvents

Table 3. Analysis of Variance for the Different Solvents Used in the Simultaneous Extraction and Saponification of Capsanthin at 300 Minutes of Extraction and Comparison with the Conventional Method.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-value
Between groups	3.80018E6	4	950044.	453.33	0.0000
Within groups	10,478.6	5	2,095.72		
Total (Corr.)	3.81065E6	9			

Table 4. Tukey Test Comparing the Different Solvents Used in the Simultaneous Extraction and Saponification of Capsanthin at 300 Minutes of Extraction and Comparison with the Conventional Method.

Solvents	Cases	Mean	Homogeneous Groups
Hexane	2	189.295	A
Ethyl acetate	2	254.69	A
Acetone	2	1,258.68	B
Ethanol	2	1,489.87	C
Conventional Method	2	1,620.0	C

Different letters indicate significant differences

9.4 Statistical Analysis to Compare Moisture Content in the Microparticles of the C-C, OS-C and OSS-C Systems Obtained under Optimal Conditions

Table 5. Analysis of Variance of Moisture Content in the Microparticles of the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	6.06573	2	3.03287	154.74	0.0009
Within groups	0.0588	3	0.0196		
Total (Corr.)	6.12453	5			

Table 6. Tukey Test to Compare the Moisture Content in the Microparticles Obtained under Optimal Conditions in the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Systems	Cases	Mean	Homogeneous Groups
OS-C	2	3.35	A
C-C	2	5.28	B
OSS-C	2	5.64	B

Different letters indicate significant differences

9.5 Statistical Analysis of Surface Properties, Encapsulation Efficiency and Capsanthin Recovery from the Microparticles Obtained under Optimal Conditions in the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Table 7. Analysis of Variance for the % of Surface Capsanthin of the Microparticles Obtained under Optimal Conditions in the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	73.9429	2	36.9714	45.18	0.0058
Within groups	2.45485	3	0.818283		
Total (Corr.)	76.3977	5			

Table 8. Tukey Test to Compare the Differences in the % of Surface Capsanthin of the Microparticles Obtained under Optimal Conditions in the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Systems	Cases	Mean	Homogeneous Groups
OSS-C	2	8.42	C
C-C	2	11.19	B
OS-C	2	16.855	A

Different letters indicate significant differences

Table 9. Analysis of Variance for the % of Capsanthin Encapsulation Efficiency of the Microparticles Obtained under Optimal Conditions in the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	64.5274	2	32.2637	117.74	0.0014
Within groups	0.82205	3	0.274017		
Total (Corr.)	65.3495	5			

Table 10. Tukey Test to Compare the Differences in the % of Capsanthin Encapsulation Efficiency of the Microparticles Obtained under Optimal Conditions in the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

System	Cases	Mean	Homogeneous Groups
OS-C	2	83.665	A
C-C	2	88.81	B
OSS-C	2	91.58	C

Different letters indicate significant differences

Table 11. Analysis of Variance of the % of Capsanthin Recovery of the Microparticles Obtained under Optimal Conditions in the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	43.1923	2	21.5961	6.63	0.0792
Within groups	9.7657	3	3.25523		
Total (Corr.)	52.958	5			

9.6 Statistical Analysis for the Stability Study of Capsanthin at 40, 50 and 70°C

Table 12. Analysis of Variance of the Degradation Rate of Capsanthin in Microparticles Obtained under Optimal Conditions of the C-C, OS-C and OSS-C Systems Maintained at 40°C.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	2.8E-7	2	1.4E-7	2.63	0.2193
Within groups	1.6E-7	3	5.33333E-8		
Total (Corr.)	4.4E-7	5			

Table 13. Analysis of Variance of the Degradation Rate of Capsanthin in Microparticles Obtained under Optimal Conditions of the C-C, OS-C and OSS-C Systems Maintained at 50°C

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	4.33333E-8	2	2.16667E-8	0.29	0.7678
Within groups	2.2E-7	3	7.5E-8		
Total (Corr.)	2.68333E-7	5			

Table 14. Analysis of Variance of the Degradation Rate of Capsanthin in Microparticles Obtained under Optimal Conditions of the C-C, OS-C and OSS-C Systems Maintained at 70°C.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	0.0000014633	2	7.31667E-7	0.41	0.6956
Within groups	0.000005345	3	0.00000178167		
Total (Corr.)	0.00000680833	5			

Table 15. Analysis of Variance of Capsanthin Activation Energy in Microparticles of the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	1.77103	2	0.885517	2.69	0.2144
Within groups	0.98845	3	0.329483		
Total (Corr.)	2.75948	5			

Table 16. Analysis of Variance of Capsanthin Activation Enthalpy in Microparticles of the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	1.77053	2	0.885267	2.7	0.2131
Within groups	0.98215	3	0.327383		
Total (Corr.)	2.75268	5			

Table 17. Analysis of Variance of Capsanthin Activation Entropy in Microparticles of the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	15.4514	2	7.72572	2.68	0.2153
Within groups	8.6633	3	2.88777		
Total (Corr.)	24.1147	5			

Table 18. Analysis of Variance of Capsanthin Half-Life in Microparticles of the C-C, OS-C and OSS-C Systems.

Source	Sum of Squares	dF	Mean Square	F-Reason	P-Value
Between groups	350.661	2	175.331	5.96	0.0902
Within groups	88.3179	3	3.29.4393		
Total (Corr.)	438.979	5			

9.7 Statistical Analysis for Tocopherol Content in Saponified, Unsaponified Paprika Oleoresin and Isolated Capsanthin

Table 19. Analysis of Variance for the Tocopherol Content Present in the Saponified, Unsaponified Olerresin of *Capsicum Annuum L.* and Isolated Capsanthin.

Source	Sum of	dF	Mean	F-Reason	P-Value
--------	--------	----	------	----------	---------

	Squares		Square		
Between groups	248.111	2	124.055	59.24	0.0039
Within groups	6.28185	3	2.09395		
Total (Corr.)	254.392	5			

Table 20. Tukey Test Comparing the Tocopherol Content Present in Saponified and Unsaponified Capsicum annum L. Oleoresins and Isolated Capsanthin.

Oleoresins	Cases	Mean	Homogeneous Groups
Isolated Capsanthin	2	45.9	A
Unsaponified	2	53.965	B
Saponified	2	61.65	C

*Different letters indicate significant differences

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



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

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

MANUEL JESÚS PALMA ASTUDILLO

Director de Tesis: Dra. Paz Robert Canales

Santiago, Chile

Marzo, 2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

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

MANUEL JESUS PALMA ASTUDILLO

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

Director de Tesis:

Dra. Paz Robert Canales

Comisión Evaluadora de Tesis:

M.S.c Nalda Romero Palacios

Dra. Carmen Sáenz Hernández

Dr. Luis Puente Díaz

DEDICATORIA

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la colaboración en el desarrollo de esta tesis a:

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

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

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

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

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

TABLA DE CONTENIDOS

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

capsantina	12
2.2.1.1 Cromatografía en placa	12
2.2.1.2 Columna abierta	12
2.2.1.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	12
2.2.1.4 Solución estándar de capsantina	13
2.2.2 Preparación de un extracto de hojuelas de pimentón peletizado	13
2.2.3 Elaboración de las oleorresinas	14
2.2.4 Caracterización de las oleorresinas	14
2.2.4.1 Contenido de capsantina	14
2.2.4.2 Perfil de tocoferoles	14
2.2.5 Microencapsulación	15
2.2.5.1 Preparación de las dispersiones	15
2.2.5.2 Secado por atomización	15
2.2.5.3 Diseño estadístico	15
2.2.5.4 Caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas	16
2.2.6 Estudio de estabilidad de capsantina	17
2.2.6.1 Análisis cinético	17
2.2.7 Análisis estadístico	18
CAPÍTULO III	
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Identificación de pigmentos carotenoides en hojuelas de pimentón (<i>Capsicum annuum</i> L.)	19
3.2 Extracto de hoja de pimentón	22
3.3 Caracterización de las oleorresinas	24
3.4 Microencapsulación de las oleorresinas	25
3.5 Micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas	28

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

INDICE DE FIGURAS

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

INDICE DE TABLAS

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

INDICE DE ANEXOS

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

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

RESUMEN

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

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

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

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

SUMMARY

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

1. INTRODUCCION

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

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

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

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

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

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

1.1 Revisión bibliográfica

1.1.1 Caracterización de los pimentones

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

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

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

1.1.2 Consideraciones estructurales de la capsantina

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

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

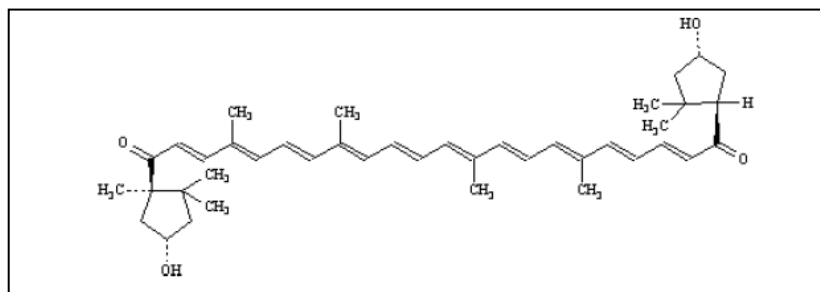
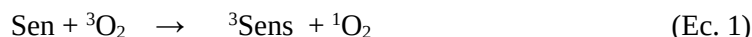


Fig. 1. Estructura de capsantina.

1.1.3 Importancia biológica de la capsantina

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

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



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



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

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

1.1.4 Extracción de capsantina

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

Específicamente, los pigmentos carotenoides son compuestos liposolubles que normalmente se extraen con solventes orgánicos tales como: acetona, éter de petróleo, benceno, hexano, éter dietílico, cloroformo, etanol y metanol (Park *et al.*, 2007). Sin embargo, el uso de solventes presentan algunas desventajas como: la degradación y pérdida de los componentes bioactivos, utilización de grandes volúmenes de solventes, el tiempo requerido, el alto costo de los insumos y la mano de obra (Sovová *et al.*, 2004). Además, es frecuente encontrar residuos de solventes en los extractos. El interés en alternativas a la extracción con solventes convencionales, tales como el dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) es cada vez mayor, ya que el CO₂ no es inflamable y no ocasiona daño al medio ambiente (Gao *et al.*, 2009).

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

1.1.5 Microencapsulación

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

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

de tamaño que va de 0,2 a 5000 μm , con múltiples formas dependiendo del material y métodos utilizados para su preparación (Shaikh *et al.*, 2006).

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

1.1.5.1 Secado por atomización

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

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



Fig. 2. Secador spray.

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

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

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

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

1.1.5.3 Microencapsulación de la oleorresina de pimentón

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

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

1.2 Hipótesis

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

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

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

1.3.2 Objetivo específicos

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

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Muestra

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

2.1.2 Materiales

- Capsul®, adquirido en National Starch, USA.
- Aceite de girasol (*Helianthus annuus*) (AG), refinado, sin antioxidantes sintéticos, Natura®
- Acetona, etanol, éter de petróleo, éter dietílico, metanol y hexano grado p.a.
- Acetona y agua grado HPLC.
- Nitrógeno ultra puro, AGA, Santiago, Chile.
- Sulfato de sodio (Na_2SO_4) p.a., Merck Darmstadt, Alemania.
- Celite 545, Merck, Darmstadt, Alemania.
- Óxido de Magnesio, Merck, Darmstadt, Alemania.
- Placa de sílica gel 20 x20 cm, 0,5 mm de espesor (Merck).
- Estándares de tocoferoles (α , β , γ , δ) Merck, Darmstadt, Alemania.

2.2 Metodología

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

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

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

2.2.1.1 Cromatografía en placa

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

2.2.1.2 Columna abierta

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

2.2.1.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

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

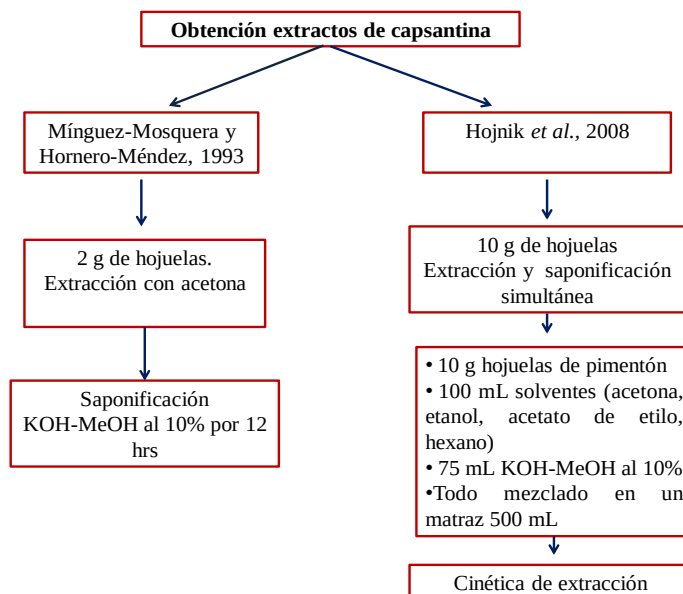
tiempos de retención con los de un estándar y la cuantificación se realizó de acuerdo a una curva de calibración de capsantina (1,04 – 3,48 µg/mL, R^2 0,9956).

2.2.1.4 Solución estándar de capsantina

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

2.2.2 Preparación de un extracto de hojuelas de pimentón peletizado

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



2.2.3 Elaboración de las oleorresinas

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

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

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

2.2.4 Caracterización de las oleorresinas

2.2.4.1 Contenido de capsantina

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

2.2.4.2 Perfil de tocoferoles

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

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

2.2.5 Microencapsulación

2.2.5.1 Preparación de las dispersiones

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

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

2.2.5.2 Secado por atomización

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

2.2.5.3 Diseño estadístico

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

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

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

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

2.2.5.4 Caracterización de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas

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

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

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

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

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

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

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

2.2.6 Estudio de estabilidad de capsantina

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

2.2.6.1 Análisis cinético

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

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

Donde, C es la concentración a tiempo t, C₀ es la concentración inicial, t tiempo y k la constante de velocidad.

La energía de activación (E_a) y factor de frecuencia (A) se determinaron a partir de la ecuación de Arrhenius (ecuación 9).

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

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

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

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

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

2.2.7 Análisis estadístico

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

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

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

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

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

EP: éter de petróleo; ET: éter etílico; tr: Tiempo de retención;
Rf: Distancia recorrida por el compuesto

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

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

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

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

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

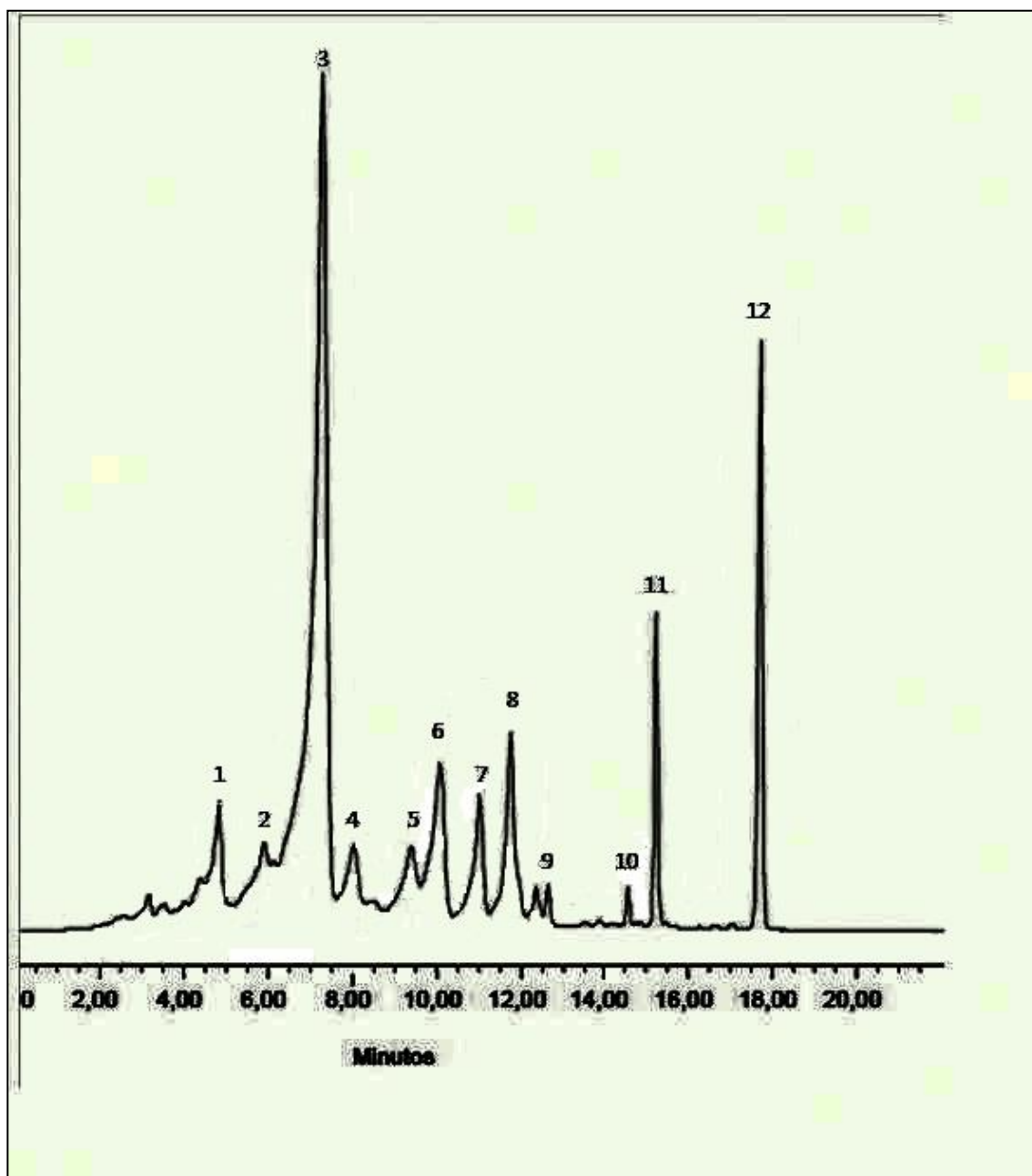


Figura 3. Perfil de pigmentos carotenoides por HPLC en las hojuelas de pimentón (*Capsicum annuum* L.)

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

3.2 Extracto de hojuelas de pimentón

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

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

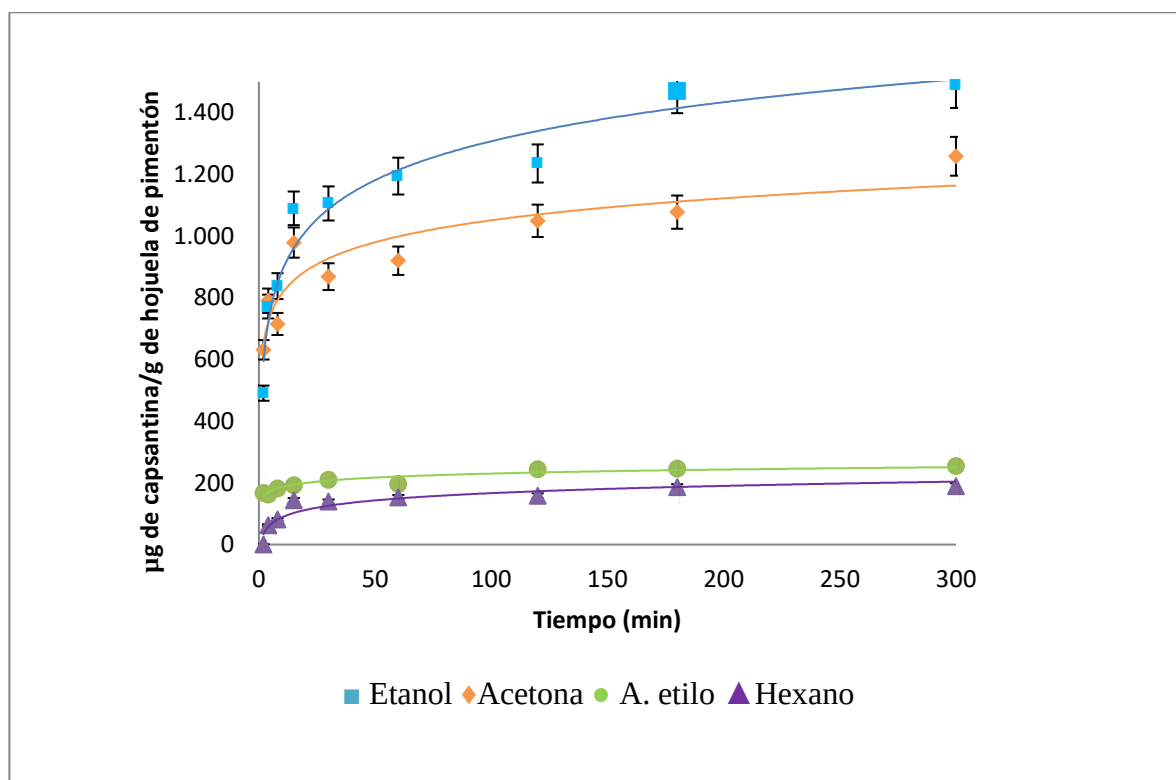


Figura 4. Cinética de extracción de capsantina desde hojuelas de pimentón (*Capsicum annuum* L.) por el método de extracción y saponificación simultánea. Etanol (■), acetona (◆), acetato de etilo (●) y hexano (▲).

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

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

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

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

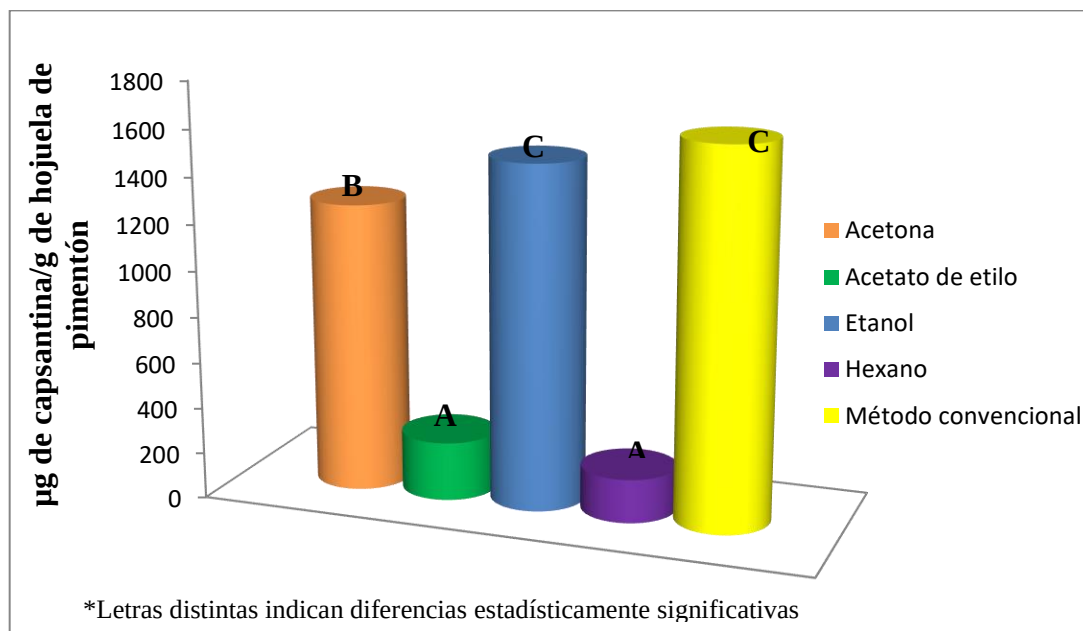


Figura 5: Contenido de capsantina aplicando el método de extracción y saponificación simultánea con distintos solventes (300 minutos) y el método convencional.

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

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

3.3 Caracterización de las oleorresinas

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

Tabla 4. Contenido de capsantina y α -tocoferol en las oleorresinas de hojuelas de pimentón.

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

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

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

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

3.4 Microencapsulación de las oleorresinas

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

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

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

DE: desviación estándar

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

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

DE: desviación estándar

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

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

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

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

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

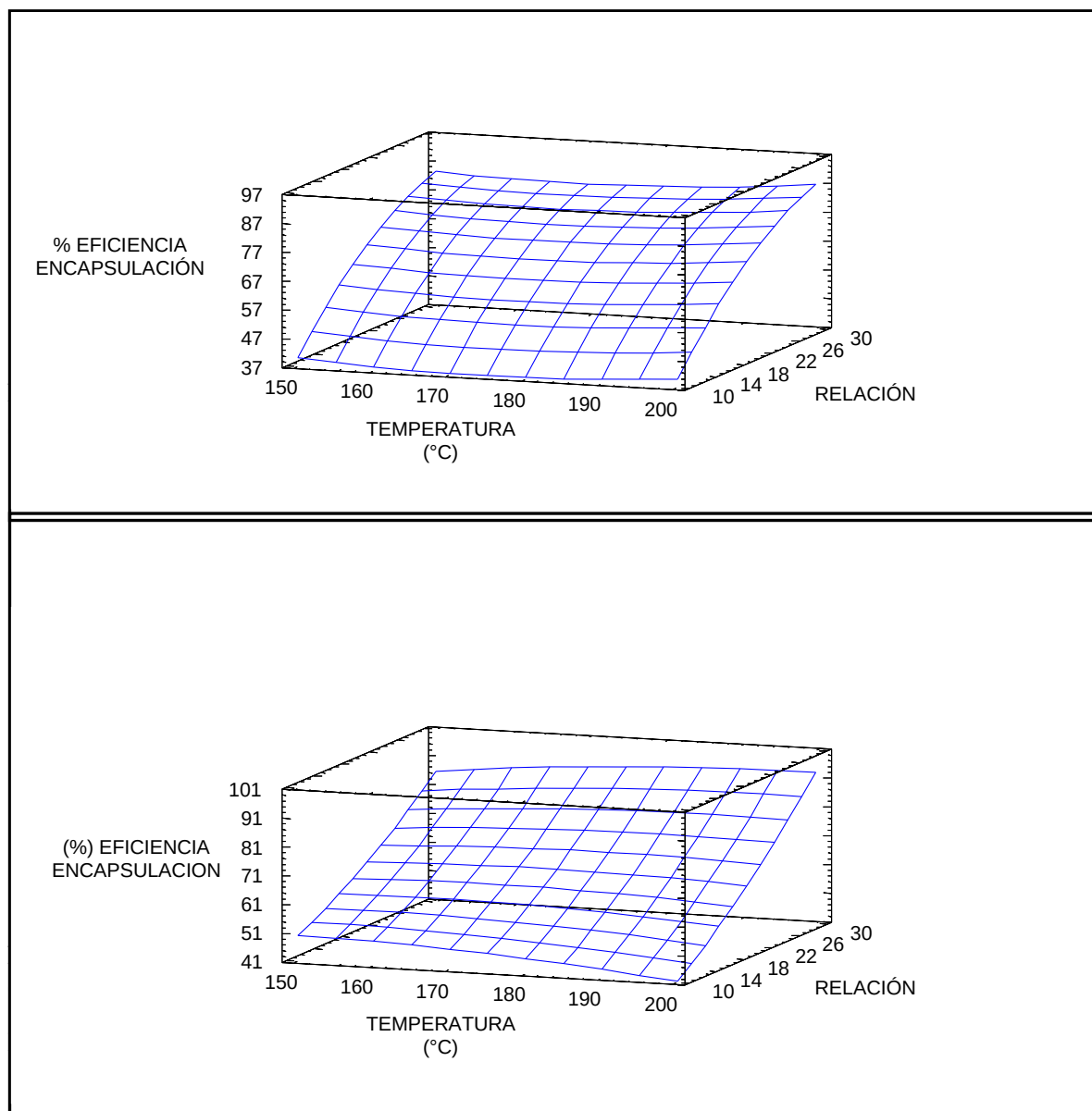
3.5 Micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas

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

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

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

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



de los sistemas anteriores.

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

Sistemas	Relación Oleorresina/ Capsul®	Temperatura de entrada (° C)	Capsantina superficial (% ±DE)	Eficiencia Encapsulación de capsantina (% ± DE)	Recuperación de capsantina (% ± DE)
OS-C	1:3	200	16,9 ± 1,5 ^a	83,1 ± 1,5 ^c	74,5 ± 1,8 ^a

OSS-C	1:3	200	8,4 ± 0,3 ^c	91,6 ± 0,3 ^a	69,9 ± 2,5 ^a
OC-C	1:3	200	11,2 ± 0,4 ^b	88,8 ± 0,4 ^b	68,2 ± 0,2 ^a

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

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

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

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

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

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

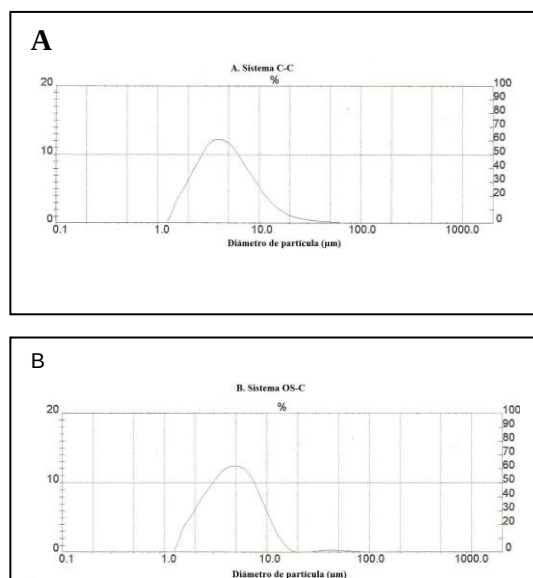
La humedad presentó un rango de 3,4 a 5,6% (Anexo 9.4), que se encuentra dentro del rango esperado para micropartículas elaboradas utilizando secado por atomización como método de encapsulación, permitiendo asegurar la calidad microbiológica de las micropartículas.

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

Tamaños de partícula dentro del rango encontrado en este estudio se han reportado para

micropartículas de oleoresina de pimienta negra con almidón modificado (Shaikh *et al.*, 2006) y licopeno con una mezcla de gelatina y sacarosa (Shu *et al.*, 2006), con rangos de 1,38-24 μm , 5-15 μm y 2-15 μm , respectivamente. Rangos de tamaño de partícula más amplios se encontraron en micropartículas de oleoresina de pimentón con gránulos porosos de almidón de arroz/gelatina (2-60 μm) y con goma arábiga (2-50 μm) (Santos *et al.*, 2005); β -caroteno con almidón de tapioca modificado (75-150) μm , almidón de tapioca nativo (106-250 μm) y maltodextrina (DE 24) (106-250 μm) (Loksuwan, 2007); d-limoneno con goma arábiga, maltodextrina y mezclas de ambas utilizando como emulsificante éster de sacarosa, éster de poliglicerol y pectina de remolacha azucarera (13,8-35,1 μm) (Paramita *et al.*, 2010).

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



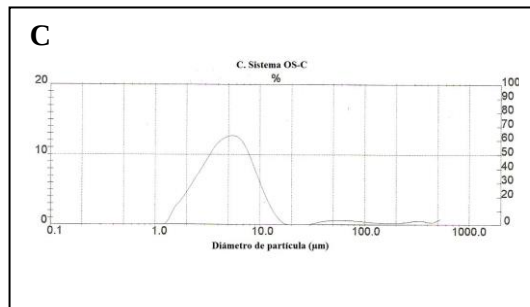
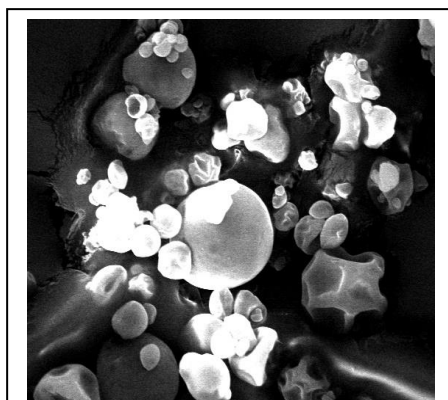
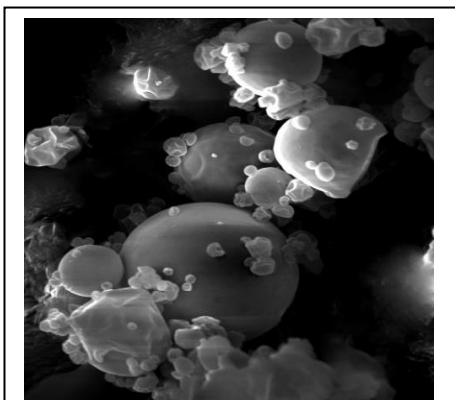


Figura 8: Distribución de tamaño de partícula para las micropartículas de los sistemas OC-C (A), OS-C (B) y OSS-C (C) obtenidas bajo condiciones óptimas.

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

En los tres sistemas se observan micropartículas con forma esférica y paredes lisas, junto a micropartículas con superficie contraída. Ambos tipos de micropartículas presentan paredes continuas y aparentemente sin presencia de fisuras o grietas. La formación de micropartículas con abolladuras es una característica usual del secado por atomización. El encogimiento de las partículas durante el proceso de secado se puede producir a bajas o altas temperaturas de entrada al secador (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005). A bajas temperaturas, existe una menor difusión del agua y las partículas tienen más tiempo para encogerse, mientras que a altas temperaturas, la rápida evaporación del agua y la alta presión en el interior de las partículas, también produce encogimiento.



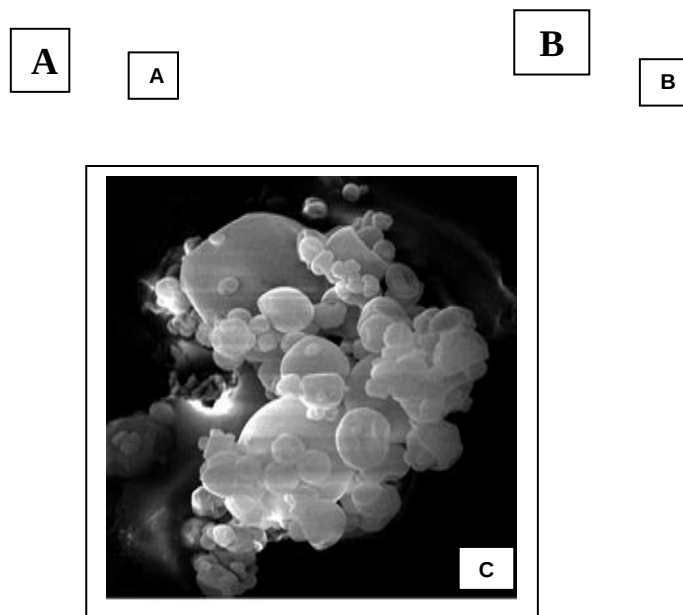


Figura 9. Microfotografías SEM para las micropartículas de los sistemas OC-C (A); OS-C (B) y OSS-C (C), obtenidas bajo condiciones óptimas (Mag. 300 Kx).

Una morfología similar se observó en micropartículas de β -caroteno con almidón de tapioca modificado, almidón de tapioca nativo y maltodextrina (24 DE) como agentes encapsulantes (Loksuwan, 2007), de licopeno con Capsul (Rocha *et al.*, 2012), de oleorresina de comino con goma arábica, maltodextrina (18 DE) y almidón modificado (Hi Cap-100) (Kanakdande *et al.*, 2007), de l-mentol con Capsul® y Hi Cap-100 (Soottitantawat *et al.*, 2005) y de oleorresina de pimienta negra con goma arábica y Hi Cap-100 (Shaikh *et al.*, 2006).

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

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

3.6 Estudio de estabilidad de capsantina

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

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

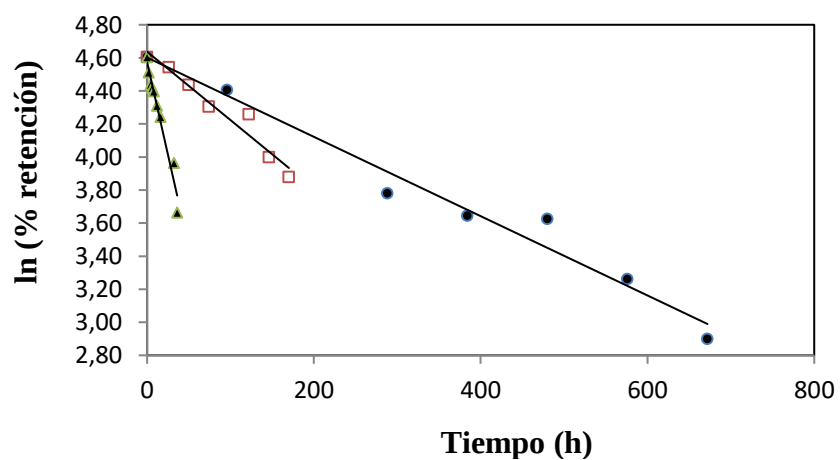
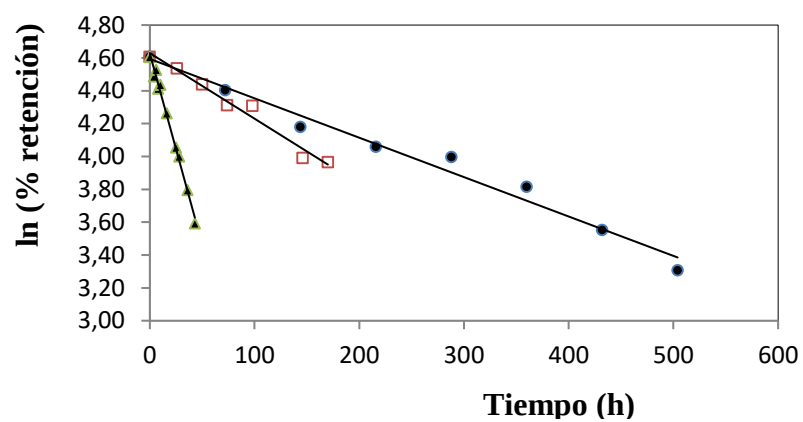
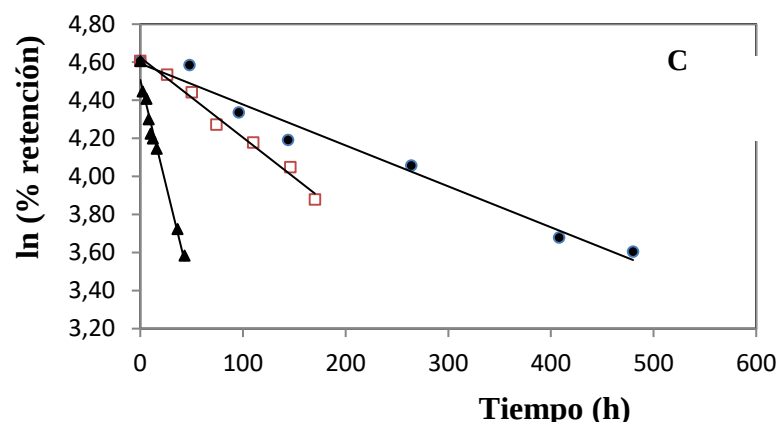


Figura 10. Cinética de degradación de capsantina para las micropartículas de los sistemas OC-C (A), OS-C (B), OSS-C (C) obtenidas bajo condiciones óptimas ●(40°C), □ (50°C) y ▲(70°C) .

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

al. (1998) en la cinética de degradación oxidativa de licopeno, luteína, 9-*cis* y *trans*- β -caroteno en aceite de azafrán.

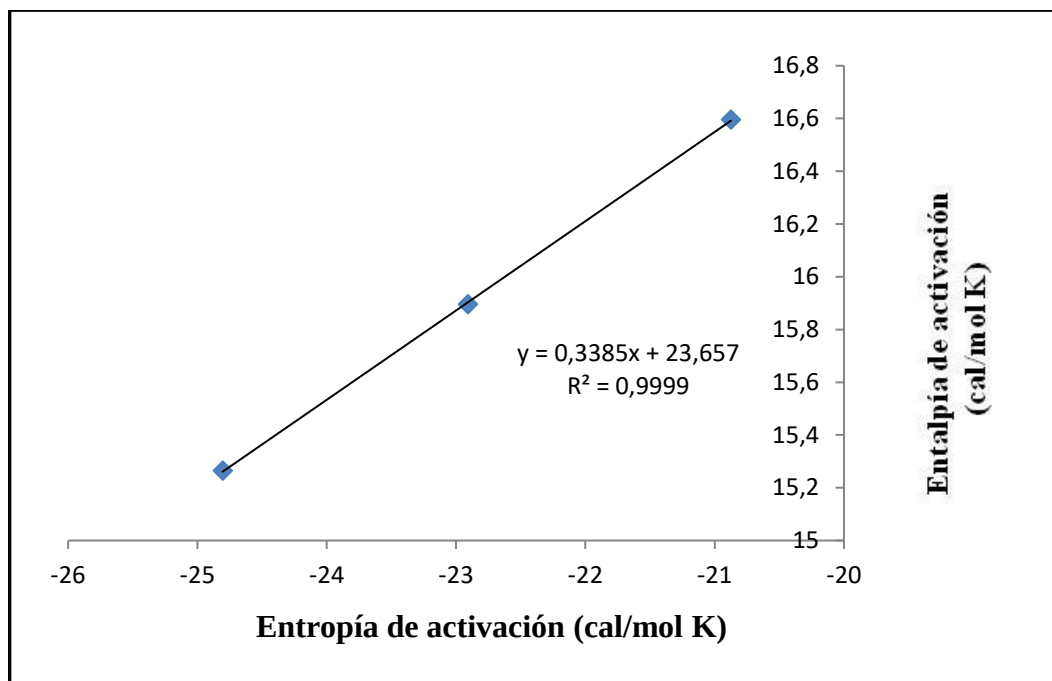


Figura 11. Línea isocinética para degradación de capsantina.

4. CONCLUSIONES

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

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

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

5. BIBLIOGRAFÍA

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

biosynthesis of carotenoids in red paprika. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 1517–1523, 2001.

18. DESAI, K. y PARK, H. Recent development in microencapsulation of foods ingredients. Drying Technology. 23 (7): 1361-1394, 2005.
19. DESOBRI, S; NETTO, F; LABUZA, T. Comparison of spray-drying and freeze drying for Beta-carotene encapsulation and preservation. Journal of Food Science. 62: 1158-1162, 1997.
20. FINOTELLI, P. y ROCHA-LEAO, M. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray drying. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering. 1-11, 2005.
21. FLORES-MARTÍNEZ, H., OSORIO, G., GALLARDO, T. Optimal spray-drier encapsulation process of orange oil, Drying. Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004). Sao Paulo, Brazil, 22-25 August 2004, vol A, pp. 621-627, 2004.
22. GAO, Y., NAGY, B., LIU, X., SIMANDI, B., WANG, Q. Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from Marigald (Tagetes erecta L.) enhanced by ultrasound. The Journal of Supercritical Fluids. 49: 345-350, 2009.
23. GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an review. Food Research International. 40: 1107-1121, 2007.
24. GIBBS, B., KERMASHA, S., ALLI, I., MULLIGAN, N. Encapsulation in the food industry: a review. International Journal of Food Science and Nutrition. 50: 213-224, 1999.
25. GODA, Y., NAKAMURA, H., SAKAMOTO, S., ISHIKAWA, K., MAITANI, T., YAMADA, T. Photostability of coloring constituents in paprika color. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 38: 240-247, 1997.
26. GÓMEZ-LADRÓN DE GUEVARA, R., GONZÁLEZ, M., GARCÍA-MESEGUER, M., NIETO, J., AMO, M., VARÓN, R. Effect of adding natural antioxidants on color stability of paprika. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82: 1061-1069, 2002.
27. GOVINDARAJAN, V.S. Capsicum Production, Technology, Chemistry, and Quality-Part II. Processed Products, Standards, World Production and Trade. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 23: 207-288, 1986.
28. HASLER, C.M. Functional foods: their role in disease prevention and health. Food Technology. 52, 63–69, 1998.
29. HENRY, L., CATIGNANI, G., SCHWARTZ, S. Oxidative degradation kinetic of Lycopene, Lutein, and 9-cis and all-trans β -Carotene. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75 (7): 823-829, 1998.
30. HIRAYAMA, O., NAKAMURA, K., HAMADA, S., KOBAYASHI, Y. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. Lipids. 29: 149-150, 1994.
31. HOJNIK, M., SKERGET, M., KNEZ, Z. Extraction of lutein from Marigold flower petals. Experimental kinetics and modelling. Food Science and Technology. 41 (10): 2008-2016, 2008.
32. HORNERO-MÉNDEZ, D. y MÍNGUEZ-MOSQUERA, I. Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplast of Capsicum annum ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (5): 1617-1622, 2000.

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

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

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

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

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

6. ANEXOS

ANEXO 1

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

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

1. Para la extracción se pesaron 2 g de hojuelas de pimentón deshidratado, las que fueron molidas en un mortero. Se agregaron 2 g de Celite® para facilitar la molienda.
2. Una vez molidas, se colocaron en un embudo con papel filtro y se fue agregando acetona p.a, la que fue recolectada en un matraz junto con los pigmentos, hasta que no se observó color en las hojuelas molidas.
3. Posteriormente los pigmentos que quedaron en la acetona utilizada en el paso 2, fueron transferidos a éter etílico en un embudo de decantación, realizando sucesivos lavados con agua destilada para eliminar la acetona e impurezas. Una vez traspasados los pigmentos a éter etílico, la mezcla fue tratada varias veces con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para remover toda el agua.
4. La fase éter, que contiene los pigmentos en diferentes estados de esterificación con ácidos grasos, fue saponificada con solución de KOH-Metanol al 10% por 12 horas en la oscuridad (relación fase éter: KOH-Metanol al 10% fue de 50:50).
5. Posteriormente, la fase orgánica, que contiene los pigmentos saponificados, fue lavada varias veces con agua destilada hasta pH neutro.
6. Finalmente, la muestra fue filtrada haciéndola pasar por Na_2SO_4 , recolectada y almacenada a -20°C hasta su análisis.

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

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

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

ANEXO 2

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

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

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

Tabla 1. Fase móvil en equipo HPLC

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

El flujo fue de 1 mL/min y el volumen de inyección de 20 µL.

Cálculo de la concentración

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

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

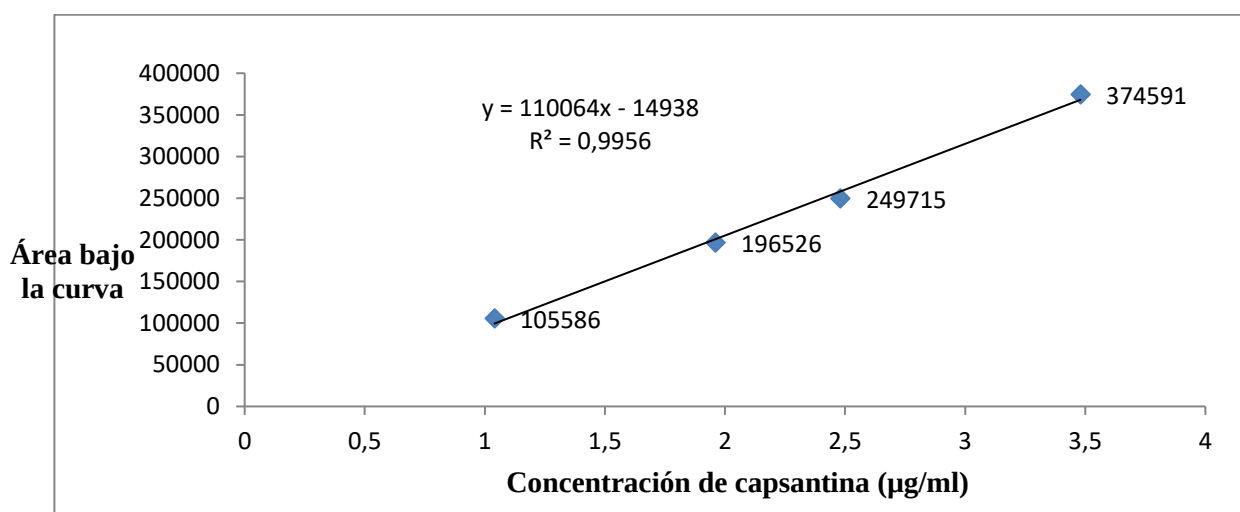
$$X (\mu\text{g/g}) = \frac{x (\mu\text{g})}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

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

Curva de calibración

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

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



ANEXO 3

SEPARACIÓN DE CAPSANTINA POR COLUMNA ABIERTA Y PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR

1. Los carotenoides obtenidos según el método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993) se separaron utilizando una columna de vidrio de 25 cm de largo y 3 cm de diámetro.
2. La columna se sujetó a un soporte metálico mediante pinzas y se aplicó vacío.
3. En la columna se colocó una mezcla de óxido de Mg:Celite (1:1) hasta alcanzar una altura de 12 cm, enseguida se añadieron 2 cm de Na₂SO₄ anhidro.
4. Se agregó la fase móvil de iniciación (éter de petróleo p.a.) hasta que se distribuyó uniformemente en toda la columna antes de agregar la muestra con los pigmentos.
5. Una vez añadida la muestra se fue cambiando la fase móvil en polaridad creciente para lograr una adecuada separación de los pigmentos carotenoides.
6. Los solventes utilizados fueron: 100% éter de petróleo (EP), 5% éter etílico en EP, 5-70% de acetona en EP, 100% acetona, 5% agua en acetona.
7. A cada fracción se le evaporó el solvente en un evaporador rotatorio y fueron inyectadas para su identificación en un equipo HPLC utilizando el método descrito por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993).

ANEXO 4

CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

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

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

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

ANEXO 5

DETERMINACIÓN DE TOCOFEROLES POR HPLC

Reactivos

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

Procedimiento:

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

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

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

a= Área del peak del tocol en la muestra

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

V= Volumen del matraz aforado (ml)

D= Factor de dilución (si correspondiera)

A= Área del peak del tocol en el estándar

P= Peso de la muestra (g)

ANEXO 6

PREPARACIÓN DE LAS DISPERSIONES PARA MICROENCAPSULACIÓN

1. Para preparar 100 g de emulsión se utilizó un vaso de precipitado de 250 ml. Se prepararon emulsiones que contenían Capsul®, agua y oleorresina, empleando en los experimentos una relación oleorresina/agente encapsulante 1:1 (10% de oleorresina, 10% de Capsul® y 80% de agua); 1:2 (10% de oleorresina, 20% de Capsul® y 70% de agua) y 1:3 (10% de oleorresina, 30% de Capsul® y 60% de agua), correspondiente a un contenido teórico de un 50%, 33% y 25% de oleorresina en el polvo obtenido, respectivamente.
2. La emulsión se preparó calentando el agua hasta 70° C y se fue agregando lentamente el Capsul ® hasta su completa disolución que demoró aproximadamente 30 minutos y durante ese tiempo fue mantenida en agitación constante con un imán rotatorio.
3. Una vez disuelto el encapsulante, se enfrió la solución de Capsul®, colocando el vaso precipitado en agua fría, hasta que alcanzó la temperatura ambiental. Se retiró el imán del vaso precipitado y posteriormente se añadió la oleorresina en forma uniforme sobre la solución de Capsul ® y agua.
4. La emulsión resultante se homogeneizó en un homogenizador IKA modelo 750, Alemania según las siguientes condiciones:
 - 15000 revoluciones por minuto (rpm) por 2 minutos
 - 19000 rpm por 2 minutos.
 - 22000 rpm por 1 minutoy fue alimentada a un secador “spray”.

ANEXO 7

CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS OBTENIDAS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS

Contenido de capsantina superficial

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

Contenido de capsantina total

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

ANEXO 8

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

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

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

ANEXO 9

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

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

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

R-cuadrado = 98,7899 por ciento

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

Error Estándar de Est. = 3,1425

Error absoluto de la media = 1,65607

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

Autocorrelación residual Lag 1 = 0,319961

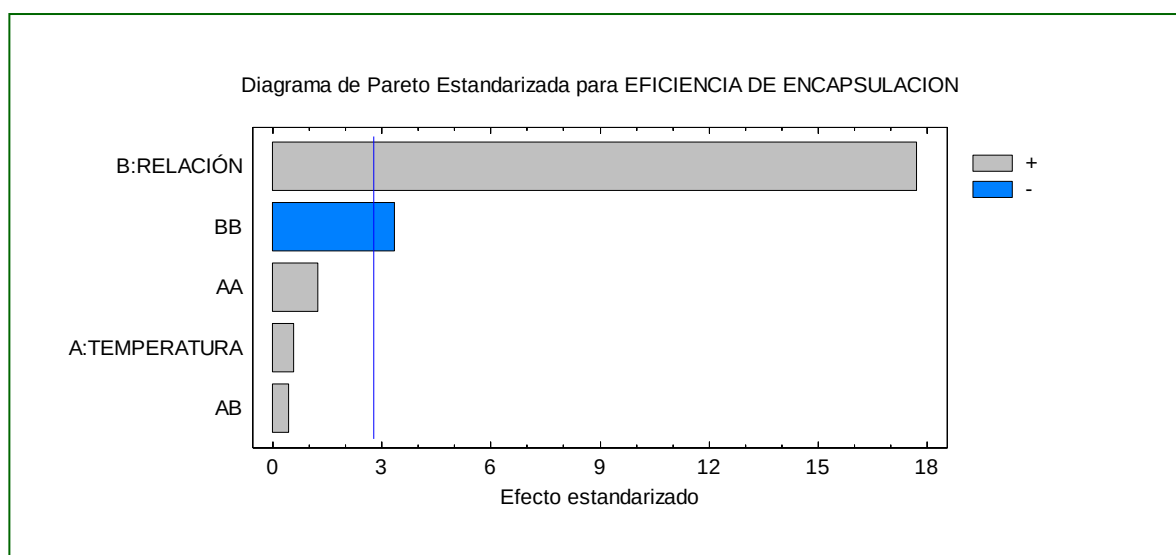


Fig. 1. Gráfico de Pareto estandarizado para eficiencia de encapsulación de capsantina de micropartículas de oleorresina de pimentón saponificado.

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

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

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

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

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

R-cuadrado = 95,8342 por ciento

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

Error Estándar de Est. = 5,74733

Error absoluto de la media = 2,988

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

Autocorrelación residual Lag 1 = 0,0759568

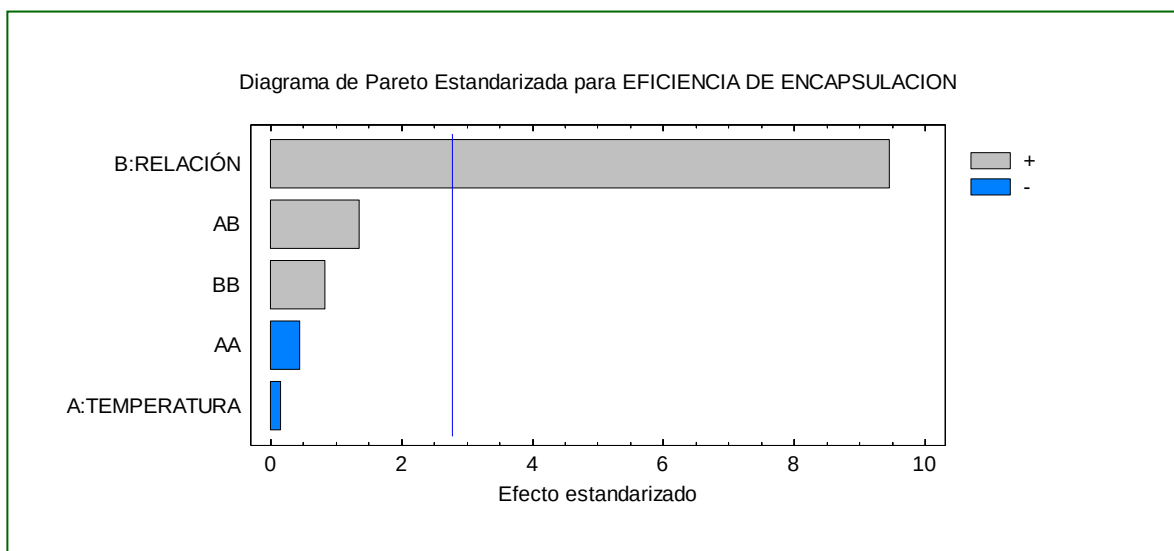


Fig. 2. Gráfico de Pareto estandarizado para eficiencia de encapsulación de capsantina de micropartículas de oleorresina de pimentón sin saponificar.

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

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

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

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

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

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

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

Letras distintas indican diferencias significativas

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

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

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

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

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

Letras distintas indican diferencias significativas

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

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

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

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

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

Letras distintas indican diferencias significativas

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

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

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

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

Letras distintas indican diferencias significativas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Letras distintas indican diferencias significativas