

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Bioquímica y Farmacia

Evaluación del efecto de la cantidad de grasa dietaria sobre la bioaccesibilidad *in vitro* de β -caroteno de diferentes microencapsulados

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Bioquímica
Farmacéutica

Autoras:

Ana María León Ramírez

CI: 0104811625

Correo electrónico: anamarileonr@gmail.com

María Isabel Ordóñez Arnot

CI: 0107472136

Correo electrónico: isaornf@gmail.com

Tutora:

Dra. Silvia Johana Ortiz Ulloa, PhD

CI: 0301082897

Asesora:

Ing. Katty Cabezas, MSc.

CI: 1717748535

Cuenca-Ecuador

12-octubre-2022

RESUMEN

La deficiencia de vitamina A es un gran problema de salud pública que conlleva el reto de encontrar alternativas eficaces y seguras que permitan aminorarlo, especialmente en países en vías de desarrollo. En la búsqueda de productos alimenticios que suplan esta necesidad, es importante evaluar la bioaccesibilidad de los carotenoides precursores de vitamina A y su interacción con otros nutrientes, como las grasas, presentes en alimentos co-ingridos, para garantizar la biodisponibilidad de estos compuestos y su efectiva utilización en el organismo.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo de titulación fue determinar la bioaccesibilidad *in vitro* de β -caroteno microencapsulado obtenido a partir de cáscaras de mango. Se evaluó la influencia de acuerdo al tipo de método de extracción de los carotenoides contenidos en los microencapsulados (extracción por solventes vs. extracción por fluidos supercríticos) y de la cantidad de grasa presente en la leche co-ingrida con los microencapsulados. Esta evaluación se basó en un diseño experimental de tipo factorial desbalanceado 3 x 2, en el que se realizaron digestiones *in vitro* de los microencapsulados obtenidos por dos tipos de extracción con tres tipos de leche (entera, semidescremada y descremada). Los carotenoides presentes en los digeridos fueron separados mediante extracciones líquido-líquido para su posterior cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Palabras clave: β -caroteno. Bioaccesibilidad. *In vitro*. Microencapsulado. Extracción.

ABSTRACT

Vitamin A deficiency is a major public health problem that poses the challenge of finding effective and safe alternatives to reduce it, especially in developing countries. In the search for food products that meet this need, it is important to evaluate the bioaccessibility of vitamin A precursor carotenoids and their interaction with other nutrients, such as fats, present in co-ingested foods, to guarantee the bioavailability of these compounds and their effective utilization in the organism.

In this context, the objective of the present titration work was to determine the *in vitro* bioaccessibility of microencapsulated β -carotene previously obtained from mango peels. Specifically, the degree of influence on the bioaccessibility of β -carotene of the type of extraction method of the carotenoids contained in the microencapsulates (solvent extraction vs. supercritical fluid extraction) and the amount of fat present in the milk co-ingested with the microencapsulates was evaluated. This evaluation was based on a 3 x 2 unbalanced factorial experimental design, in which *in vitro* digestions of the carotenoid microencapsulates obtained by two types of extraction were carried out with three types of milk (whole, semi-skimmed and skimmed). The carotenoids present in the digests were separated by liquid-liquid extractions for subsequent quantification by high performance liquid chromatography (HPLC).

Keywords: β -carotene. Bioaccessibility. *In vitro*. Microencapsulation. Extraction.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
ÍNDICE.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
CLÁUSULAS	9
DEDICATORIA	13
AGRADECIMIENTOS	14
INTRODUCCIÓN	15
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos.....	16
1 MARCO TEÓRICO	17
1.1 Vitamina A.....	17
1.2 Carotenoides.....	17
1.3 Distribución de carotenoides en la naturaleza.....	18
1.4 Función de la vitamina A.....	19
1.5 Función de los carotenoides.....	20
1.6 Ingesta recomendada de vitamina A y carotenoides.....	20
1.7 Deficiencia de vitamina A.....	21
1.8 Bioaccesibilidad de carotenoides.....	22
1.9 Estrategias para prevenir la deficiencia de vitamina A.....	24
1.10 Modelos de digestión in vitro.....	26
1.11 Métodos de extracción de carotenoides.....	26
2 METODOLOGÍA.....	28
2.1 Diseño y tipo de investigación.....	28
2.2 Muestreo.....	28
2.3 Reactivos, materiales y equipos.....	29
2.3.1 Reactivos.....	29
2.3.2 Equipos.....	30

2.4	Métodos analíticos.....	31
2.4.1	<i>Preparación de estándares</i>	31
2.4.2	<i>Digestión in vitro</i>	31
2.4.3	<i>Extracción de carotenoides en microencapsulados y pellets</i>	33
2.4.4	<i>Extracción de carotenoides en sobrenadantes y filtrados</i>	35
2.4.5	<i>Cuantificación por HPLC</i>	36
2.4.6	Análisis de resultados.....	37
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.1	Influencia del contenido de grasa y proceso extractivo en la recuperación de β -caroteno.....	38
3.2	Influencia del contenido de grasa co-ingrida.....	39
3.3	Influencia del método de extracción.....	44
4	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
4.1	Conclusiones.....	49
4.2	Recomendaciones.....	49
	REFERENCIAS.....	50
	ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gradiente de concentración del método cromatográfico utilizado.....	36
Figura 2. Proceso digestivo de los carotenoides.....	39
Figura 3. Porcentaje de recuperación de β -caroteno según el tipo de leche (entera, semidescremada y descremada) en las muestras de filtrado.....	40
Figura 4. Porcentaje de recuperación de β -caroteno según el tipo de leche (entera, semidescremada y descremada) en las muestras de sobrenadante.....	40
Figura 5. Porcentaje de β -caroteno recuperado en las muestras de pellet según el porcentaje de grasa en la leche co-ingerida.....	44
Figura 6. Porcentaje de β -caroteno recuperado según el tipo de extracción de carotenoides (por fluidos supercríticos y por solventes) en todas las muestras (filtrado, sobrenadante y pellet) en función del tipo de leche (entera, semidescremada y descremada).....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables y niveles del diseño factorial desbalanceado 3 x 2.....	28
Tabla 2. Fases simuladas para digestión in vitro.....	32
Tabla. 3 Porcentaje de recuperación de β -caroteno según el tipo de extracción de carotenoides en diferentes tipos de leche (entera, semidescremada y descremada) para las muestras de sobrenadante, filtrado, pellet y total.....	38
Tabla 4. Influencia del contenido de grasa co-ingerido en el porcentaje de recuperación de β -caroteno.....	41
Tabla 5. Influencia del método de extracción en el porcentaje de recuperación de β -caroteno....	46

ÍNICE DE ANEXOS

ANEXO A. Cromatogramas para las muestras de sobrenadante, filtrado y pellet, de acuerdo a la extracción por fluidos supercríticos en diferentes tipos de leche (entera, semidescremada y descremada).....	58
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CLÁUSULAS

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Ana María León Ramírez en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación del efecto de la cantidad de grasa dietaria sobre la bioaccesibilidad *in vitro* de β -caroteno de diferentes microencapsulados", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 12 de octubre de 2022

Ana María León R

Ana María León Ramírez

C.I: 0104811625

Cláusula de Propiedad Intelectual

Ana María León Ramírez, autor/a del trabajo de titulación “Evaluación del efecto de la cantidad de grasa dietaria sobre la bioaccesibilidad *in vitro* de B-caroteno de diferentes microencapsulados”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 12 de octubre de 2022

Ana María León R

Ana María León Ramírez

C.I: 0104811625

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

María Isabel Ordóñez Arnot en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación del efecto de la cantidad de grasa dietaria sobre la bioaccesibilidad *in vitro* de β -caroteno de diferentes microencapsulados", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 12 de octubre de 2022



María Isabel Ordóñez Arnot

C.I: 0107472136

Cláusula de Propiedad Intelectual

María Isabel Ordóñez Arnot, autor/a del trabajo de "Evaluación del efecto de la cantidad de grasa dietaria sobre la bioaccesibilidad *in vitro* de β -caroteno de diferentes microencapsulados", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 12 de octubre de 2022



María Isabel Ordóñez Arnot

C.I: 0107472136

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a nuestra familia y a Dios por ser nuestro principal impulso y motivación.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, queremos agradecer a Dios por brindarnos salud, perseverancia y constancia durante este trayecto. A nuestras familias por su apoyo incondicional, su paciencia y su constante motivación. Asimismo, a nuestra tutora de tesis, Dra. Johana Ortiz, y a nuestra asesora de tesis, Ing. Katty Cabezas, por su compromiso en la realización de este trabajo de titulación, por ser un gran apoyo y compartirnos sin reserva alguna todos sus conocimientos, tiempo, paciencia y ser una guía constante durante toda esta etapa.

De igual manera queremos agradecer al Laboratorio de Alimentos y Nutrición, del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, por permitirnos realizar los análisis respectivos para completar nuestra tesis.

A la Universidad de Cuenca, por permitirnos desarrollarnos profesionalmente y a todos nuestros amigos y compañeros, por darnos muchos momentos de alegría durante toda la carrera universitaria.

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de vitamina A es una de las deficiencias de micronutrientes más importantes a nivel mundial. Esta carencia afecta alrededor del 21,1% de la población en edad preescolar y al 5,6% de las mujeres embarazadas (Kraemer et al., 2008). En Ecuador, en los últimos años se ha reportado un incremento en los casos de hipovitaminosis A en la población infantil (Ramos-Padilla et al., 2020). Se estima que el 17,1% de niños menores de 5 años en el país presentan deficiencia de vitamina A, con mayor prevalencia en menores de 36 meses, acentuándose en los menores de 1 año (Ramos-Padilla et al., 2020). Las consecuencias más importantes del déficit de vitamina A engloban manifestaciones oftálmicas graves como la destrucción de la córnea y ceguera, anemia, mayor susceptibilidad a las infecciones respiratorias y disminución en la velocidad del crecimiento en niños. Frente a esto, se ha comprobado que la administración de dosis controladas de este micronutriente, a temprana edad y en concentraciones adecuadas que garanticen su bioaccesibilidad, previene o ayuda en el la aparición de estas condiciones (Dávila & Fernandez, 2011).

La deficiencia de vitamina A se debe a ingestas dietéticas inadecuadas, trastornos de absorción y condiciones socioeconómicas bajas que dificultan el acceso a alimentos de calidad (Vaca, 2015). Al respecto, es importante considerar el tipo de vitamina A consumida, siendo esta vitamina preformada como el retinol en el caso de productos animales y carotenoides provitamina A en alimentos vegetales (National Institutes of Health, 2020). Estos últimos deberán sufrir un proceso metabólico para transformarse en vitamina A (Beltrán et al., 2012).

A diferencia de los países desarrollados, en Ecuador, el consumo de alimentos de origen animal es menor y la dieta se basa principalmente en alimentos de origen vegetal (Beltrán et al., 2012).

Algunos de los alimentos de origen vegetal que poseen vitamina A son las espinacas, hojas de remolacha, brócoli, zanahoria, camote y frutas como el melón, mango, naranja, tomate, entre otros (García, 2013). De todos ellos, el mango es considerado como una de las frutas más consumidas a nivel mundial y en especial en Ecuador (García-Mendoza et al., 2015). La cáscara del mango, por su lado, es una fuente rica de fibra dietaria y de compuestos fitoquímicos como polifenoles, carotenoides, enzimas, vitamina E, entre otros (Rubiano-Charry et al., 2019). En los últimos años, la cáscara de mango ha sido usada en la industria para la elaboración de nuevos

productos tanto alimenticios como farmacéuticos que permiten aprovechar sus propiedades funcionales y antioxidantes por parte de los consumidores (Rivera Vizuite, 2020; Murador et al., 2020; Tsegaye, 2021 & Leong et al., 2021). Por otro lado, la utilización de la cáscara de mango en el desarrollo de diversos subproductos con valor agregado disminuiría la preocupación recurrente en cuanto a la elevada generación de desechos y la contaminación ambiental actual (FAO, 2011).

En las industrias alimentaria y farmacéutica se han elaborado una serie de productos con el objetivo de proveer nutrientes como vitaminas y minerales de manera más eficaz, accesible y económica para la población (Hernández Torres et al, 2016). Una de las técnicas más empleadas en estas industrias es la microencapsulación (Nava Reyna et al., 2015). Dicho método ha sido empleado con la finalidad de mantener la estabilidad y viabilidad de ciertas sustancias bioactivas, permitiendo así protegerlas de factores ambientales como el calor, aire, humedad, entre otros (Hernández Torres et al, 2016). Al incluir los compuestos de interés en una matriz, se impedirá que sufran reacciones de oxidación, así como también facilitará su absorción y liberación (Hernández Torres et al, 2016 & Nava Reyna et al., 2015). Por lo expuesto, en el presente trabajo de titulación se planteó el análisis de carotenoides precursores de vitamina A a partir de microencapsulados de cáscara de mango, previamente obtenidos, con el objetivo de evaluar su bioaccesibilidad *in vitro* bajo condiciones de co-ingesta de alimentos grasos.

Objetivo General:

- Evaluar la influencia del i) método de extracción de carotenoides previo a la encapsulación y ii) la adición de grasa previo al consumo, en la bioaccesibilidad *in vitro* de β -caroteno microencapsulados.

Objetivos Específicos:

- Evaluar la influencia de la cantidad de grasa contenida en tres tipos de leche (entera, descremada y semidescremada) sobre la bioaccesibilidad del β -caroteno.
- Analizar la influencia de la extracción de carotenoides por solventes y por fluidos supercríticos previo a la encapsulación, en la bioaccesibilidad de β -caroteno contenido en microencapsulados.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Vitamina A

La vitamina A es un micronutriente liposoluble que desempeña un papel fundamental en varios procesos fisiológicos (Lorenzana, 2020; de Medeiros et al, 2018). Existen dos tipos de vitamina A, la vitamina A preformada (retinol, retinal y ácido retinoico) que se encuentra en alimentos de origen animal, y los precursores de vitamina A denominados carotenoides o provitamina A que son de origen vegetal (α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, β -criptoxantina) (Muñoz Cachago, 2018; Vitale et al., 2010). La absorción de la vitamina difiere considerablemente según su origen. La vitamina A de origen animal se absorbe casi por completo, mientras que la derivada de vegetales lo hace en una proporción considerablemente menor (10-30%) debido a la complejidad de la matriz vegetal, la variabilidad en el contenido de carotenoides y la bioconversión de los mismos (Carazo et al., 2021; Reboul, 2019).

1.2 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos liposolubles presentes en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos como raíces, flores y frutos (Maoka, 2020). Desde el punto de vista químico, los carotenoides son tetraterpenos constituidos por varias unidades de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos (García, 2016). Según su composición química, los carotenoides se clasifican en xantofilas, que presentan grupos funcionales oxigenados en su estructura como grupos alcoholes, epóxidos, aldehídos o cetonas, y carotenos que no presentan dichos átomos de oxígeno (Calderón, 2020).

El amplio grupo de carotenoides presentan la propiedad fundamental de ser compuestos altamente insaturados, por lo que son sensibles al oxígeno, metales, ácidos, peróxidos, calor, luz y a las lipoxigenasas (Jáuregui et al., 2011). Ciertos carotenoides tienen la capacidad de actuar como precursores de vitamina A, pudiendo en el proceso metabólico transformarse en este micronutriente y cumplir su papel en el organismo humano. Esto dependerá de la presencia de un anillo tipo β -ionona en su estructura, y la facultad de conversión en retinol por los animales (Lorenzana Rodríguez, 2020). El anillo sin grupos funcionales oxigenados de los carotenoides

deberá contener una cadena poliinsaturada con al menos 11 átomos de carbono (Jáuregui et al., 2011).

Aquellos compuestos presentes en la naturaleza con actividad provitamina A son α , β y γ -caroteno, y algunas xantofilas como la β -criptoxantina (Jáuregui et al, 2011). De ellos, el principal compuesto bioactivo es el β -caroteno, ya que gracias a la presencia de dos anillos β -ionona en su estructura presenta gran actividad provitamina A (Cruz, 2007; Fernández-García, 2012).

El β -caroteno tiene la capacidad de reducirse a retinol. Para ello, el camino metabólico consiste en una vía oxidativa que incluye un corte central de la molécula mediante enzimas oxigenasas, dando lugar a metabolitos con diferentes estructuras, para finalmente convertirse en vitamina A (Widjaja-Adhi & Golczak, 2020). Las enzimas responsables del proceso de conversión se encuentran localizadas en el citosol de las células y, en los mamíferos, su actividad se localiza principalmente en el intestino, por lo que, la absorción de estos compuestos liposolubles ocurre a nivel de los enterocitos. Para el caso del β -caroteno ingerido, únicamente el 60-70% se convertirá en retinol y el resto no será bioaccesible (Maoka, 2020, Fernández García et al., 2012; Jáuregui, 2011).

1.3 Distribución de carotenoides en la naturaleza

Los carotenoides están ampliamente distribuidos en la naturaleza en vegetales, bacterias, algas y hongos (García, 2016). La característica distintiva de los carotenoides es su extenso sistema de dobles enlaces conjugados, denominado cadena poliénica (García, 2016). Esta particularidad permite a estos compuestos bioactivos actuar como cromóforos y, por lo tanto, tener la capacidad de absorber la luz en la región visible y dar coloración a diferentes vegetales (Bianeth & Restrepo, 2013). El rango de colores que presentan estos compuestos va desde el rojo hasta el amarillo, y cuando forman complejos con proteínas producen coloraciones verdes y azules. Por ende, gran variedad de organismos del reino vegetal como animal contienen carotenoides, ya sean sintetizados in situ como en plantas superiores y organismos procariotas, o adquiridos a través de la dieta en el caso de los animales (Fernández García, 2010). La presencia de carotenoides en los animales se debe exclusivamente a su incorporación por la dieta, y debido a que ciertos carotenoides tienen actividad provitamina A, es vital el consumo de alimentos ricos en estos compuestos y que estos

sean bioaccesibles para cumplir su papel fundamental en el organismo humano (Bianeth & Restrepo, 2013; Fernández García, 2010).

En las verduras, el contenido en carotenoides se distribuye en los cloroplastos de todas las plantas superiores, siendo de mayor a menor cantidad la luteína, β -caroteno, violaxantina, neoxantina, zeaxantina, β -criptoxantina y anteraxantina (Calderón & Vera, 2018). También se encuentran en diversas frutas. Por ejemplo, en el tomate se encuentra gran cantidad de licopeno que constituye el 90% de su composición total de carotenoides; mientras que el fruto del pimiento contiene una mezcla más compleja de carotenoides, siendo el capsanteno el pigmento mayoritario (Fernández García, 2010). Acerca del mango, los pigmentos mayoritarios son β -caroteno y violaxantina, estos pueden variar según el tipo de mango, siendo abundante en el mango *Janardhan Pasand* (rojo) con alrededor del 92% de β -caroteno y en la variedad *Amrapali* (verde) con alrededor del 27%. En la cáscara de mango también se encuentra una gran cantidad de pigmentos carotenoides como la violaxantina, luteína y β -caroteno, siendo el β -caroteno aquel que se encuentra en mayor cantidad (Calderón & Vera, 2018).

Pese a que se han descrito más de 700 pigmentos carotenoides, no todas las fuentes naturales que los contienen están presentes en la dieta humana habitual. Se estima que únicamente 40 carotenoides pueden ser absorbidos, metabolizados y/o utilizados en el organismo humano e incluso el número se reduce a 5 si se considera el perfil carotenoide que generalmente se detecta en el plasma sanguíneo humano, siendo estos α y β - caroteno, licopeno, β -criptoxanteno, y luteína (Olmedilla & Estévez, 2017; Fernández García, 2010).

1.4 Función de la vitamina A

La vitamina A actúa modulando diferentes procesos fisiológicos y bioquímicos en el organismo (de Medeiros et al., 2018). Entre sus aportes principales se encuentran la prevención de problemas relacionados con la vista (xeroftalmía y ceguera), crecimiento corporal, diferenciación celular y gametogénesis, producción de glóbulos rojos, proliferación celular, fortalecimiento del sistema inmunológico, mantenimiento de la integridad epitelial, entre otros (Imdad et al., 2017; Lorenzana, 2020). La adecuada ingesta de vitamina A permite solucionar situaciones de desnutrición, enfermedades entéricas, mortalidad y morbilidad en la población infantil (de Medeiros et al., 2018). No obstante, los beneficios que aporta la vitamina A dependerán del entorno

del individuo, puesto que varios factores podrían influir y comprometer su actividad, tales como agentes patógenos e incluso antecedentes genéticos (de Medeiros et al., 2018).

Por otro lado, si bien es un micronutriente necesario para el organismo, el aumento en su ingesta durante un período extenso de tiempo trae como consecuencia daño al hígado (dado que su almacenamiento es principalmente hepático), alteraciones en huesos y articulaciones, aumento de la presión intracraneal, pérdida del cabello, mareos, vómitos y descamación de la piel (García-Casal, 2013).

1.5 Función de los carotenoides

La función de los carotenoides en los organismos fotosintéticos es la transferencia de energía en la fotosíntesis y la fotoprotección. Los carotenoides también son responsables de la coloración de diversas plantas, frutas y vegetales y contribuyen a la producción de fitohormonas. En los mamíferos, la principal función biológica de los carotenoides es su rol como precursores de la vitamina A y sus subsecuentes funciones en el organismo humano. Entre ellas se menciona su actividad antioxidante, potenciadora del sistema inmune, entre otras (Fernández García, 2010; de Medeiros et al., 2018).

Para que los carotenoides generen su actividad biológica se debe considerar ciertos factores como las propiedades físicas y químicas de su molécula. La geometría molecular de los carotenoides, referida como el tamaño de su cadena poliénica y sus grupos funcionales, es esencial para su localización, orientación correcta y garantizar su afinidad a las estructuras celulares (Aguilar Espinosa et al., 2017). El sistema de dobles enlaces conjugados, que son característicos de los pigmentos carotenoides, determina las propiedades fitoquímicas y la reactividad química que intervienen en las actividades biológicas de estos compuestos. Además, las interacciones específicas con otras moléculas son fundamentales para el funcionamiento correcto de los carotenoides al igual que un sinergismo de su función (Jáuregui, Carrillo & Romo, 2011).

1.6 Ingesta recomendada de vitamina A y carotenoides

Autores manifiestan que en niños mayores de 8 años el consumo recomendado se encuentra alrededor de 600-800 $\mu\text{g}/\text{día}$ de vitamina A, mientras que para mujeres y hombres adultos es de 800 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 900 $\mu\text{g}/\text{día}$ respectivamente (Gonçalves, Estevinho & Rocha, 2016). Durante el

embarazo y por las posibilidad de malformaciones congénitas asociadas a dosis excesivas de vitamina A, solo se debe consumir aproximadamente 700 $\mu\text{g}/\text{día}$, aunque esto dependerá de la edad de la mujer (Gonçalves, Estevinho & Rocha, 2016).

Las principales fuentes de precursores de vitamina A constituyen las frutas, verduras, hortalizas y productos de origen animal (lácteos, huevos, ciertos pescados y algunos mariscos) (Dias et al., 2017). Dependiendo del tipo de alimento consumido, su contenido de carotenoides se clasificará en: bajo (0-0,1 mg/100 g producto fresco), moderado (0,1-0,5 mg/100 g producto fresco), alto (0,5- 2 mg/100 g producto fresco) y muy alto (> 2 mg/100 g producto fresco) (Dias et al., 2017).

En el caso específico de carotenoides provenientes de alimentos de origen vegetal, son varios los factores que pueden alterar su contenido. Entre ellos se mencionan su estado de maduración, suelo, condiciones climáticas, manejo pre y poscosecha, tipo de procesamiento y condiciones de almacenamiento (Dias et al., 2017).

Actualmente, existe gran interés en el β -caroteno, el cual representa un 25-30% del contenido total de carotenoides en las plantas, y se puede hallar en productos como la zanahoria, mango, espinaca, rúcula, entre otros (Palazón Guillamón, 2018). En cuanto a su cantidad recomendada de consumo, no existe una recomendación cuantitativa específica (Dias et al., 2017; Olmedilla, 2001). Esto se debe principalmente a la variación tanto intra como interindividual en diferentes grupos poblacionales (Olmedilla, 2001). A pesar de ello, en varias revisiones y estudios realizados, se ha llegado a sugerir un consumo promedio de 6 mg/día (Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, 2000). Sin embargo, en comparación con otras evaluaciones, este valor ha llegado hasta los 18 mg/día (Dias et al. 2017). Finalmente, gracias a diversos estudios de intervención con cantidades controladas de carotenoides, se ha establecido que la ingesta podrá encontrarse en un rango entre 3-6 mg/día de carotenoides (Dias et al. 2017; Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, 2000).

1.7 Deficiencia de vitamina A

La deficiencia de vitamina A se encuentra conectada a entornos ecológicos y sociales desfavorecidos, ingestas dietéticas inadecuadas, trastornos de absorción y condiciones socioeconómicas bajas que dificultan el acceso a alimentos de calidad (Vaca, 2015; Imdad et al.,

2017). Las personas que presentan dicha deficiencia se encuentran expuestas a complicaciones severas como diarrea, sarampión y enfermedades respiratorias (Imdad et al., 2017). Además, problemas de metabolismo y su excreción excesiva, son factores incipientes para agotar sus reservas corporales y causar graves consecuencias (Imdad et al., 2017).

Entre las manifestaciones clásicas generadas como resultado de su deficiencia se encuentra principalmente la xeroftalmía, la cual podría terminar en ceguera nocturna, xerosis conjuntival y corneal, ulceración corneal y queratomalacia (Debelo et al., 2017). Otras manifestaciones incluyen manchas de Bitot, mayor riesgo de mortalidad en la población pediátrica y mujeres embarazadas, compromiso del sistema inmune ocasionando susceptibilidad a infecciones, entre otros (Debelo, 2017).

El consumo de alimentos de origen vegetal, a pesar de ser una gran fuente nutritiva, no logra proporcionar cantidades adecuadas de vitamina A aun cuando su ingesta dietética es normal (Imdad et al., 2017). Por lo que, ciertos estudios han mencionado que la suplementación oral con altas dosis de vitamina A coadyuvaría a la disminución de hasta un 23% la mortalidad de niños entre 6 meses y 5 años de edad (Allen et al, 2017). Asimismo, se ha sugerido que la suplementación con vitamina A o β -caroteno en mujeres embarazadas con deficiencia de este nutriente, reduciría la mortalidad materna en un 40% y 49% (Allen et al, 2017). Sin embargo, es necesario evaluar las dosis y el tiempo de empleo de esta suplementación para evitar complicaciones futuras (Imdad et al., 2017).

1.8 Bioaccesibilidad de carotenoides

Debido a que los carotenoides son sintetizados únicamente por organismos vegetales o procariotas, los animales y por ende los hombres, deben obtenerlos a partir de la dieta. No obstante, para que los carotenoides sean bioaccesibles, estos deberán liberarse de manera eficiente de la matriz alimentaria, ser micelarizados en el intestino delgado y absorbidos en los enterocitos para finalmente pasar al torrente sanguíneo (Chacón, Reinhold & Schweiggert, 2018; Jáuregui, 2011).

Para comprender el proceso de absorción, transporte y metabolismo de los carotenoides, se deben definir varios términos. La digestibilidad se conoce como la fracción de los alimentos que mediante la digestión se transformarán en materia potencialmente accesible en la luz intestinal (Schweiggert & Carle, 2015). La bioaccesibilidad hace referencia a la liberación de cualquier

compuesto activo que se encuentre dentro de una matriz alimentaria durante la digestión y que permite que se encuentren disponibles para su consiguiente absorción intestinal (Salvia-Trujillo et al., 2017). La asimilación se define como la captación del material bioaccesible a través del epitelio mediante un mecanismo de absorción transepitelial (Widjaja-Adhi, & Golczak, 2020). Por último, la biodisponibilidad, se conoce como la fracción del compuesto activo que después de múltiples procesos llega al sistema circulatorio (Widjaja-Adhi&Golczak, 2020).

Los carotenoides, por su naturaleza lipofílica, requieren de una primera fase de solubilización desde la matriz alimentaria y de una segunda fase de micelarización, en la que son incorporados en agregados moleculares para transportarse y ser potencialmente bioaccesibles (Zumbado, 2018).

Varios factores favorecen el proceso de solubilización, entre estos se mencionan el grado de procesamiento del alimento, la homogeneización mecánica, el tratamiento térmico y la adición de grasas (Fernández García et al, 2012; Zumbado, 2018). Estos factores modifican las estructuras subcelulares en las que se alojan los carotenoides, facilitando así su liberación y solubilización (Zumbado, 2018). La micelarización corresponde a la etapa de reducción del tamaño de las partículas lipídicas producidas en la etapa de solubilización y a la formación de micelas (Fernández García, 2010). Estas micelas son complejos moleculares de un tamaño entre 3 y 10 nm que van a albergar material lipídico de diferente tipo (Fernández García, 2010).

En la micelarización actúa también una serie de factores, como la secreciones biliares y pancreáticas, que modulan la bioaccesibilidad de los carotenoides. Acerca de las sales biliares, su función es favorecer la reducción del tamaño de la micela y su estabilización (Mercado Mercado et al., 2018). Las secreciones del páncreas también contribuirán con el proceso de micelarización, ya que al tener un contenido acuoso rico en bicarbonato y enzimas digestivas, neutralizan el pH del contenido duodenal y aportan lipasas pancreáticas que hidrolizan triacilglicéridos, ésteres de colesterol, y otro material lipídico. El factor clave en esta fase es la materia grasa ingerida, ya que su presencia va a estimular mayor cantidad de secreciones biliares y lipasas pancreáticas, lo que aumenta la capacidad de formación de micelas (Mercado Mercado et al., 2018). Estas micelas encapsulan los carotenoides, permitiendo así que queden disponibles para su absorción (Fernández García et al, 2012).

La incorporación de un alimento que contenga grasa facilita el proceso de digestión y la consecuente absorción de los carotenoides. Por ejemplo, mediante la co-ingesta de leche, batidos de frutas y bebidas con soya se ha evidenciado una mayor bioaccesibilidad de los carotenoides provitamina A (Cilla et al., 2012; Stinco et al., 2019; Meléndez-Martínez et al., 2017). Pese a la importancia que presenta el componente graso dentro de este proceso; la micelarización a su vez puede verse afectada tanto por la presencia de fibra soluble como de diferentes tipos de carotenoides en una misma matriz alimentaria. La fibra provocará disminución en la efectividad del proceso de digestibilidad, logrando que menor cantidad de carotenoides se encuentren biodisponibles. Igualmente, la diversidad de carotenoides en un alimento y su perfil de liposolubilidad, supondrá una diferencia durante su absorción (Fernández, 2010).

Finalmente, los carotenoides micelarizados son incorporados a células intestinales tras establecer contacto con la superficie de los enterocitos, y su liberación ocurre al darse su fraccionamiento (Zumbado, 2018). Tras ser incorporados a la mucosa intestinal, sufren una serie de procesos que permiten su empaquetamiento final en quilomicrones para ser transportados al sistema linfático, torrente sanguíneo y finalmente al hígado, en donde es llevado a cabo la conversión y acumulación de vitamina A (Zumbado, 2018).

La liposolubilidad de los carotenoides condiciona tales procesos metabólicos, al igual que factores dietéticos, fisiológicos, de unión a macromoléculas, tipo de matriz alimentaria en la que estén incorporados y características intrínsecas del individuo (López-Casero, 2019). De igual manera, la bioaccesibilidad de los carotenoides suele ser considerada baja debido a su naturaleza, estructura, gran capacidad de bioencapsulación y su escasa solubilidad en los jugos intestinales acuosos (Salvia-Trujillo et al., 2017). Por lo tanto, la cantidad consumida no representa la cantidad que llega al organismo para ser biodisponible. Es por esta razón que en la actualidad se ha analizado la posibilidad de nuevas matrices o técnicas que permitan aumentar la bioeficiencia de los carotenoides, tales como matrices lipofílicas y/o técnicas de microencapsulación (Boonlao, Rungsardthong & Kumar, 2022).

1.9 Estrategias para prevenir la deficiencia de vitamina A

Como estrategias para prevenir la deficiencia de vitamina A se incluyen: i) diversificación dietética, en donde el empleo de diversos alimentos contribuye con las cantidades necesarias de

diferentes micronutrientes de manera continua; ii) acciones de salud pública para fomentar buena salud, buenos servicios de atención en salud y educación en nutrición e higiene (Latham, 2002); iii) fortificación o enriquecimiento de los alimentos, considerada como una vía importante para controlar desórdenes originados por carencia de vitamina A (Latham, 2002).

Actualmente, las tecnologías de microencapsulación de alimentos son técnicas de gran acogida (Latham, 2002). Particularmente por su capacidad para desarrollar alimentos seguros, saludables y con mayores propiedades nutricionales. Debido al gran interés en incorporar componentes bioactivos a distintos alimentos para brindar un valor agregado, la industria alimenticia ha desarrollado técnicas de microencapsulación capaces de ofrecer protección a materiales sensibles como los carotenoides y producir ingredientes con propiedades adecuadas para aplicaciones alimentarias (de Freitas et al, 2021).

Existen varios factores a tomar en cuenta en estas técnicas de microencapsulación, tales como la poca solubilidad y la limitada estabilidad en agua de estos compuestos, la fácil degradación al contacto con el oxígeno, la luz, los ácidos y las altas temperaturas (Rodríguez-Amaya, 2001). Se ha demostrado en varios estudios que la exposición a la luz ultravioleta reduce la cantidad de β -caroteno en el producto en aproximadamente un 10% (Zhang et al., 2021). También se ha evidenciado que la presencia de oxígeno durante el almacenamiento de fruta deshidratada resulta en una pérdida de β -caroteno de aproximadamente 45% (Song et al., 2018; Berni, et al., 2015). Es debido a estos inconvenientes que la microencapsulación se ha convertido en una técnica muy utilizada que permite conservar y evitar la degradación de compuestos sensibles. Esta técnica se basa en cubrir el compuesto de interés con un material que actúe de pared o almacenarlo en una matriz polimérica, lo que da como resultado partículas sólidas o líquidas que son capaces de proteger el material encapsulado del ambiente externo a través de una barrera física (de Freitas et al., 2021).

Actualmente existen varias técnicas de micro y nanoencapsulación que se pueden aplicar a una variedad de compuestos bioactivos e ingredientes alimentarios. Entre estos están el secado por aspersión, el enfriamiento por aspersión, la polimerización in situ, la coacervación, el recubrimiento en lecho fluido, la liofilización y la emulsificación. La selección del método de encapsulación variará según varios factores como las propiedades del componente activo, la aplicación prevista del producto, la viabilidad y el costo (Tolve et al., 2016).

1.10 Modelos de digestión *in vitro*

Para el análisis de la bioaccesibilidad de los carotenoides se emplea la digestión *in vitro*, que consiste en una simulación del proceso digestivo *in vivo* en los seres humanos (fase oral, gástrica e intestinal) utilizando una serie de enzimas, compuestos químicos, tiempos y temperatura de incubación (Minekus, et al. 2014, Brodkorb, et al. 2019). La digestión *in vitro*, gracias a su costo, flexibilidad y reproducibilidad, es empleado ampliamente para conocer la bioaccesibilidad y digestibilidad de cualquier nutriente (González, 2016; Narita et al., 2022). Sin embargo, este proceso únicamente corresponde a una aproximación a lo que realmente sucede durante la digestión *in vivo*. Además, se debe considerar una variabilidad en los resultados dependiendo de la metodología utilizada en cada laboratorio (González, 2016; Narita et al., 2022). Entre las principales ventajas de la digestión *in vitro* están la simplicidad y facilidad de aplicarlo en un gran número de muestras, además de posibilitar la estimación del efecto, tanto de las condiciones de digestión como de otros factores ligados a la matriz alimentaria en la bioaccesibilidad de un nutriente en específico (Narita et al., 2022).

1.11 Métodos de extracción de carotenoides

Existe una gran variedad de métodos para la extracción de carotenoides. Entre los más destacados están la extracción con solventes por Soxhlet (método convencional), extracción asistida con microondas (MAE), asistida con ultrasonido (UAE), por fluidos supercríticos (SFE) y extracción con enzimas (EAE) (métodos no convencionales) (Saini & Keum, 2018).

La extracción con solventes es una técnica caracterizada por el empleo de un líquido capaz de disolver o extraer otras sustancias o componentes de interés de una matriz secundaria sin provocar modificaciones o cambios en la muestra (Saini & Keum, 2018). Para la extracción de carotenoides se puede emplear: acetona, cloroformo, hexano, isopropanol, metanol, cloruro de metileno y éter dietílico, al igual que combinaciones de éstos para favorecer el proceso extractivo (Saini & Keum, 2018). La elección de uno u otro dependerá de consideraciones tales como la polaridad del grupo funcional, matriz de la muestra, longitud de la cadena de los carotenoides, entre otros. No obstante, la acetona y el hexano son los más comúnmente empleados (Saini & Keum, 2018). En comparación con el método de fluidos supercríticos, la extracción con solventes es un proceso menos costoso, pero demanda tiempos prolongados de extracción; además es menos

selectivo y más contaminante por generar residuos orgánicos cuyo tratamiento posterior se vuelve complejo (Saini & Keum, 2018).

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es uno de los medios más eficaces para la obtención de componentes apolares termosensibles (Saini & Keum, 2018). Consiste en el empleo de CO₂ supercrítico como medio extractivo, favoreciendo así la obtención de compuestos con mayor nivel de pureza sin la producción de residuos contaminantes y nocivos para el ambiente u operario (Otálora-Orrego & Martin-G, 2020). Asimismo, el coeficiente de difusión que presenta el CO₂ supercrítico y su menor grado de viscosidad le permite tener mayor capacidad para ingresar en matrices complejas y mejorar por ende, la extracción de carotenoides (Saini & Keum, 2018). Además, los parámetros de temperatura, presión, densidad y flujo del CO₂ también influyen en la optimización del procedimiento al reducir la interacción de la matriz con el analito de interés (Saini & Keum, 2018).

Finalmente, la eficacia que presente cada procedimiento dependerá de la prevención en la pérdida de compuestos, disminución de procesos de oxidación y acortamiento en tiempos de obtención (Adadi et al, 2018). Conjuntamente, el contenido acuoso de la matriz es determinante para lograr una óptima extracción de carotenoides, dado que su propia hidrofobicidad, así como la naturaleza de los solventes dificultarán el transcurso del proceso extractivo. Por su parte, los métodos de deshidratación térmica pueden provocar la degradación e isomerización de los carotenoides, lo que genera la necesidad de buscar medidas que logren su protección total como la liofilización o la encapsulación (Saini & Keum, 2018). Por otro lado, el uso de neutralizadores (como el carbonato de magnesio, carbonato de calcio o carbonato de sodio) contribuye a una extracción más óptima pues evita las interferencias de compuestos secundarios sobre la integridad de los carotenoides; mientras que el uso de antioxidantes como el terc-butilhidroquinona (TBHQ) y la protección contra la radiación ultravioleta contribuyen a prevenir su fotoisomerización (Saini & Keum, 2018).

2 METODOLOGÍA

2.1 Diseño y tipo de investigación

En el presente trabajo se planteó un estudio analítico experimental de corte transversal basado en un diseño factorial desbalanceado 3 x 2 por triplicado, en el que se evaluó el efecto sobre la bioaccesibilidad de β -caroteno de dos factores: i) método de obtención del extracto de carotenoides contenido en microencapsulados, evaluado a dos niveles: extracción por solvente y extracción por fluidos supercríticos, y ii) cantidad de grasa presente en la leche, evaluado a tres niveles: leche entera (3%), leche semidescremada (1,5%) y leche descremada (0%) (Tabla 1). La variable respuesta fue la concentración de β -caroteno determinada luego de someter las combinaciones experimentales a una digestión *in vitro*, extracción de los carotenoides de los digeridos obtenidos y su cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Tabla 1. Variables y niveles del diseño factorial desbalanceado 3 x 2.

Experimento	Variables	
	X1:	X2:
	Tipo de leche ^a	Método de extracción de carotenoides ^b
1	LD	ES
2	LS	ES
3	LD	FSC
4	LE	ES
5	LE	FSC
6	LS	FSC

^a Tipo de leche: Leche descremada (LD), leche semidescremada (LS) y leche entera (LE).

^b Método de extracción de carotenoides: Extracción por solventes (ES) y extracción por fluidos supercríticos (FSC).

2.2 Muestreo

Las muestras de microencapsulados de carotenoides fueron provistos por el proyecto de investigación TEAM-VLIR “Improving Ecuadorian child nutrition by using mango by-products as potential sources of bioactive compounds” (Grant N° TEAM2017PR442 – 75644). Los carotenoides contenidos en los microencapsulados fueron extraídos a partir de cáscara de mango por extracción por solventes y fluidos supercríticos. Los microencapsulados fueron elaborados en

el Departamento de Ciencias de Alimentos y Biotecnología de la Escuela Politécnica Nacional (Quito, Ecuador), los mismos fueron provistos sin especificar las condiciones de elaboración. Los procedimientos, datos y rendimientos de los procesos extractivos son confidenciales de la Escuela Politécnica Nacional. Estas muestras fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en fundas metálicas herméticamente selladas hasta su uso.

2.3 Reactivos, materiales y equipos

Los materiales, reactivos, estándares y los equipos utilizados fueron provistos por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, como parte del mencionado proyecto de investigación TEAM-VLIR.

2.3.1 Reactivos

Fluidos gastrointestinales simulados

- Cloruro de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de potasio (Mallinckrodt Baker, Fieldsburg, NG)
- Fosfato de potasio monobásico (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)
- Bicarbonato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Magnesio cloruro hexahidrato para análisis (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Carbonato de amonio (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)

Digestión

- Cloruro de calcio dihidratado (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido clorhídrico fumante 37% (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Hidróxido de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Pepsina de la mucosa gástrica de porcino $\geq 400\text{ U/mg}$ proteína (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)
- Pancreatina de páncreas porcino 8 x USP (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)
- Lipasa de páncreas porcino 100-500 U/mg proteína (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)
- Extracto biliar de porcino (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)

Extracción de carotenoides

- Clara diastasa ≥ 35 U/mg (Sigma-Aldrich, Suiza)
- Cloruro de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- 2-tercbutilhidroquinona 97% (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)
- Pentano anhidro $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)
- Acetona para análisis (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Rapidasa (IMCD Benelux N.V, Mechelen, Bélgica)
- Carbonato de magnesio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Hidróxido de potasio (Merck, Darmstadt, Alemania)
- N-Hexano (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Estándar interno trans- β -apo-8'-carotenal $\geq 96\%$ (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)
- Estándar β -caroteno tip 2, sintético $\geq 95\%$ grado HPLC cristalino (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)
- Agua destilada
- Sulfato de sodio anhidro para análisis (Na_2SO_4) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Metanol grado gradiente para cromatografía líquida (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Acetonitrilo HPLC plus $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)
- Etilacetato para cromatografía líquida (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Trietilamina $\geq 99,5\%$ (Sigma-Aldrich, ST Louis, USA)
- Diclorometano (Merck, Darmstadt, Alemania)

2.3.2 Equipos

- Balanza electrónica de precisión (BOECO modelo BBL31, Alemania)
- Incubadora (Heidolph, Alemania)
- Agitador magnético (Fisher Scientific, USA)
- Potenciómetro (Mettler Toledo modelo Seven Easy S20, USA)
- HPLC 1200 Series (Agilent Technologies, USA)
- Generador de nitrógeno (Domnick Hunter, modelo G4510W, USA)
- Baño ultrasonido (Branson modelo 3510R-BTH, USA)

- Centrífuga (Hettich modelo Mikro 22OR, Alemania)
- Estufa (Mettler modelo INB-200, Alemania)
- Agitador vórtex (VelpScientifica modelo classic, Italia)
- Refrigeradora/congeladora (Fisher Scientific, España)
- Congeladora (DAIREI, Japón)
- Cámara de extracción de humos y vapores tóxicos (Novatech modelo CE-180EA, Canadá)
- Rotavapor (Heidolph, Alemania)
- Generador de nitrógeno (Domnick Hunter, USA)
- Columna YMC 30 (250 x 4,6 mm x 5 μ m) (Agilent Technologies, USA)
- Micropipetas automáticas capacidad 5-1000 L (Transferpette, USA)

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Preparación de estándares

Las soluciones madre de β -caroteno y trans- β -apo-8'-carotenal (estándar interno) se prepararon en diclorometano que contenía 1 g/L de TBHQ en concentraciones de 250 mg/L y 175 mg/L respectivamente (Grootaert et al., 2021). Las soluciones de trabajo se obtuvieron tras una dilución de las soluciones madre con una mezcla de diclorometano (1:10 v/v); las mismas se almacenaron a -20 °C (Grootaert et al., 2021). Para los estándares de baja concentración, se realizó una dilución 1/5 de las soluciones de trabajo. Para las curvas de calibración analizadas por HPLC se agregaron 0, 60, 120, 180 y 240 μ L de solución de trabajo de β -caroteno con 200 μ L de trans- β -apo-8' carotenal (estándar interno). Estas fueron secadas y posteriormente re-disueltas con 500 μ L de fase móvil A y 500 μ L de fase móvil B.

2.4.2 Digestión *in vitro*

Para determinar la bioaccesibilidad del β -caroteno de los microencapsulados se realizaron digestiones *in vitro* basadas en el método estandarizado INFOGEST (Minekus, et al. 2014, Brodkorb, et al. 2019), con ciertas adaptaciones para carotenoides (Rodríguez et al., 2017). Para evaluar la influencia de la cantidad de grasa presente en la leche sobre la bioaccesibilidad de β -caroteno, los microencapsulados fueron disueltos en leche entera, semidescremada y descremada.

Se simularon los primeros tres pasos de la digestión gastrointestinal adulta (la fase oral, la fase gástrica y la fase intestinal), seguidas de una centrifugación con la finalidad de separar el sobrenadante en la fracción digerida. Durante la digestión *in vitro* se utilizaron fluidos digestivos simulados, con las sales y concentraciones especificados en la Tabla 2. Los fluidos gástricos simulados de saliva (SSF), gástrico (SGF) e intestinal (SIF), fueron esterilizados y se almacenaron en refrigeración. Previo a su utilización en la digestión *in vitro*, el pH fue ajustado a 2 (SGF) y a 7 (SIF).

Tabla 2. Fases simuladas para digestión *in vitro*.

Composición	SSF Concentración en la solución (mM)	SGF: Concentración en la solución (mM)	SIF Concentración en la solución (mM)
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	13,6	25	85
NaCl	-	47,2	38,4
MgCl ₂	0,15	0,12	0,33
(H ₂ O) ₆			
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,06	0,5	-

Para realizar las digestiones *in vitro*, 5 mL de microencapsulado de carotenoides disuelto en leche (1,305 g de encapsulado por cada 5 mL de leche) fueron añadidos en un matraz cónico. Para simular el proceso de digestión de la fase oral, se añadió 4 mL SSF, 25 µL CaCl₂ y 300 µL de agua destilada, ajustando a un pH de 7. Esta mezcla se agitó durante 5 minutos. A continuación, se desarrolló la simulación de la fase gástrica, en donde se adicionó 8 mL SGF, 5 µL de CaCl₂, 500 µL de pepsina (196 mg/mL) y 500 µL de agua. Se ajustó el pH a 3 y se incubó a 37 °C a 200 rpm durante 2 horas, controlando el pH cada 30 minutos. La fase intestinal fue desarrollada adicionando 8 mL de SIF, 3 mL de pancreatina (16 mg/mL), 2 mL de lipasa (12 mg/mL), 3 mL de sales biliares (113,3 mg/mL), 40 µL de CaCl₂ y 2,5 mL de agua. Se ajustó el pH a 7 y se incubó a 37 °C a 200 rpm durante 2 horas. La mezcla se centrifugó a 6000 x g por 45 minutos y a 10 °C para obtener dos fracciones inmediatas del digerido, el pellet y el sobrenadante. El sobrenadante fue filtrado (tamaño de poro de 0,2 µm). Finalmente, se obtuvieron tres fracciones de trabajo: i) el pellet que representa todos los carotenoides que no fueron liberados o que no fueron solubilizados, ii) el sobrenadante que representa todos los carotenoides que sí se solubilizaron y iii) el filtrado

del sobrenadante, el cual simula los carotenoides que sí fueron solubilizados y que se encuentran en un tamaño de partícula hipotéticamente apto para ser absorbidos por los enterocitos y por ende representan los carotenoides potencialmente bioaccesibles (Salvia-Trujillo et al, 2017 & Fernández, 2010).

2.4.3 Extracción de carotenoides en microencapsulados y pellets

Para la extracción de los carotenoides de polvos encapsulados y pellets obtenidos de la digestión descrita en el apartado 2.4.2 se aplicó el método de Grootaert, (2021). Esta metodología aplica tres etapas: i) extracción enzimática, ii) saponificación y iii) lavados consecutivos. La primera fase consiste en el empleo de enzimas y solventes, incubación (30 °C, 30 min), centrifugación (10 min, 4000 x g, 4 °C), separación de fases y el secado con nitrógeno gaseoso. Posteriormente, con el fin de que se liberen los carotenoides de la matriz lipídica, el proceso de saponificación se realizó en una incubadora a 30 °C durante toda la noche. En la tercera etapa, se llevó a cabo la extracción con hexano, y lavados consecutivos de NaCl al 10% y de agua destilada. En el último paso de este método de extracción, se eliminó el agua mediante filtración con sulfato de sodio anhidro y el empleo de un rotavapor. A continuación, se describe cada etapa del proceso de extracción de los carotenoides.

- **Extracción de grasas:**

Para iniciar el proceso de extracción, se pesaron 200 mg de los microencapsulados y para los pellets re-disueltos, se tomó todo el contenido y se colocaron en un tubo de vidrio para centrífuga individualmente. Se añadieron las siguientes soluciones: 5 mL de NaCl saturado, 1 mL de TBHQ 2,5%, 2 mL clara de diastasa al 10%, 1 mL de rapidasa y 5 mL acetona: pentano (4:6 v/v). Los sistemas se agitaron con la ayuda de un vórtex y se incubó por 30 min a 30°C a 200 rpm. Una vez concluido el tiempo de incubación, se añadieron 10 mL de la solución de acetona:pentano al tubo, y se agitó por 1 minuto. Posteriormente, se llevó a la centrífuga por 10 minutos a 4000 g a 4 °C. Concluida la etapa, se transfirió la capa superior (fase orgánica), con una pipeta de vidrio a un balón volumétrico de 50 mL. La extracción con acetona:pentano se desarrolló por tres veces más en cada muestra. Para muestras con altas concentraciones (polvos microencapsulados, pellet por extracción por solventes, pellet por fluido supercrítico), se añadió pentano hasta completar el

volumen del matraz aforado y se transfirió 10 mL de la solución a un tubo de vidrio para su posterior secado con nitrógeno gaseoso.

- ***Saponificación:***

En los tubos de vidrio procedentes de la etapa previa, se adicionó 1 mL de MgCO_3 , 13 mL de etanol al 96% y 4 mL de KOH al 50%. Se agitó cada tubo con el vórtex hasta que el residuo estuvo completamente disuelto, y se colocaron los tubos en la incubadora a 30 °C durante toda la noche a 200 rpm.

- ***Extracción con hexano:***

En un embudo de separación se añadió la mezcla saponificada de los tubos. Se enjuagó el tubo con 20 mL de NaCl al 10% y se colocó en el embudo de separación. También se añadió 10 mL de hexano y 200 uL del estándar interno. Una vez adicionados los compuestos, se tapó y agitó por 30 segundos tres veces. Concluida la agitación, se separó la fase acuosa, (parte inferior del embudo) de la fase orgánica (parte superior), añadiendo la fase acuosa a un Erlenmeyer A, y la fase orgánica a un Erlenmeyer B. Luego, se transfirió el contenido del Erlenmeyer A al mismo embudo de separación, se enjuagó con 10 mL de hexano y se transfirió el contenido al embudo de separación. Se cerró el embudo y se agitó por 30 segundos tres veces más. De la misma manera, se separaron las fases acuosas y orgánicas y se repitió el proceso de lavado con hexano.

- ***Lavado con NaCl 10%:***

Para iniciar la etapa de lavado con NaCl al 10%, se transfirió el contenido del Erlenmeyer B al embudo de separación, se enjuagó con 10 mL de NaCl al 10% y se añadió al embudo de separación. Posteriormente, se tapó el embudo y se agitó por 30 segundos tres veces. De igual manera, se separó la fase acuosa (parte inferior del embudo) de la fase orgánica (parte superior) colocando la fase acuosa en el Erlenmeyer B y manteniendo dentro del embudo la fase orgánica. Se añadió 10 mL de NaCl al 10% al embudo de separación y se realizó nuevamente la etapa de agitación y separación dos veces más.

- ***Lavado con agua destilada:***

En el embudo de separación (que contiene la fase orgánica), se añadió 10 mL de agua destilada, se cerró el embudo y se agitó por 30 segundos tres veces. Una vez concluido, se separó la fase acuosa (parte inferior del embudo) de la fase orgánica (parte superior) colocando la fase acuosa en el Erlenmeyer B y manteniendo la fase orgánica en el embudo de separación. Se repitió la adición de agua, agitación y separación en dos ocasiones adicionales.

- **Remoción de agua:**

Una vez concluidas las etapas de lavados, se transfirió la fase orgánica a un balón con forma de pera, filtrando la solución a través de un papel filtro con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). Una vez filtrada la solución, se lavó el papel filtro con hexano hasta la remoción por completo del color anaranjado-amarillento del papel filtro. Posteriormente, se secó la solución en el frasco usando el rotavapor a 30 °C y a 150 rpm. Una vez seco el filtrado, se añadió mediante una pipeta de plástico hexano al frasco en forma de pera, se homogeneizó y se absorbió mediante una aguja, colocándolo en un tubo de vidrio. Se realizó la adición del hexano dos veces más. Con el filtrado obtenido en el tubo, se secó mediante el nitrógeno gaseoso. En cada tubo, se disolvió el residuo usando 500 μL de la fase móvil A y 500 μL de la fase B y se agitó mediante el vórtex. Una vez con la muestra en cada tubo, se filtraron (0,45 μm) las mismas y se colocó en un vial para su posterior cuantificación por HPLC.

2.4.4 Extracción de carotenoides en sobrenadantes y filtrados

Los sobrenadantes y los filtrados obtenidos del digerido fueron analizados por medio del método descrito por Biehler et al., (2011), con ciertas modificaciones. Inicialmente, se tomó 1 mL del digerido (sobrenadante o filtrado) y se agregó 1 mL de TBHQ 2,5% v/v en etanol, 4 mL de acetona: hexano (1:1 v/v) y 200 μL estándar interno (trans- β -apo-8'-carotenal). Esta mezcla se agitó en el vórtex y se centrifugó a 4000 x g durante 2 minutos para separar las fases. El sobrenadante (fase orgánica) se transfirió a un segundo tubo, y el remanente (fase acuosa) se re-extrajo con acetona: hexano (1:1 v/v) por 3 ocasiones más. La última extracción se realizó únicamente con hexano hasta que la fase orgánica quedara completamente transparente. Finalmente, se tomaron las combinaciones de hexano obtenidas durante cada extracción y se colocaron bajo un flujo de nitrógeno hasta secarlas completamente. Por último, se disolvió el

residuo usando 500 μL de la fase móvil A y 500 μL de la fase B y se agitó mediante el vórtex. La muestra, se filtró (tamaño de poro de 0,45 μm) y se colocó en un vial para su posterior cuantificación por HPLC.

2.4.5 Cuantificación por HPLC

Las condiciones de análisis se basaron en el método analítico desarrollado por Vandekinderen et al., (2009). La separación de los compuestos se realizó en una columna YMC 30 (250 x 4,6 mm x 5 μm) (YMC, USA) a 30 °C con una velocidad de flujo de la fase móvil de 1 mL/min. El volumen de inyección de la muestra fue 25 μL . Se aplicó un programa de gradiente que inició con 100% de fase móvil A (metanol:acetonitrilo 9:1 v/v) que fue disminuyendo linealmente hasta 40% de la fase móvil A, correspondiente al 60% de la fase móvil B (0,25% v/v de trietilamina en acetato de etilo) hasta completar 25 minutos. Luego se mantuvo en modo isocrático durante 5 minutos y finalmente regresar a condiciones iniciales (100% de la fase móvil A) hasta los 35 minutos. Finalmente, se mantuvo un período isocrático de 5 minutos para reequilibrar la columna (Figura 1). Los compuestos de interés fueron detectados por un detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 450 nm (Vandekinderen et al., 2009). Las muestras se mantuvieron a 4°C.

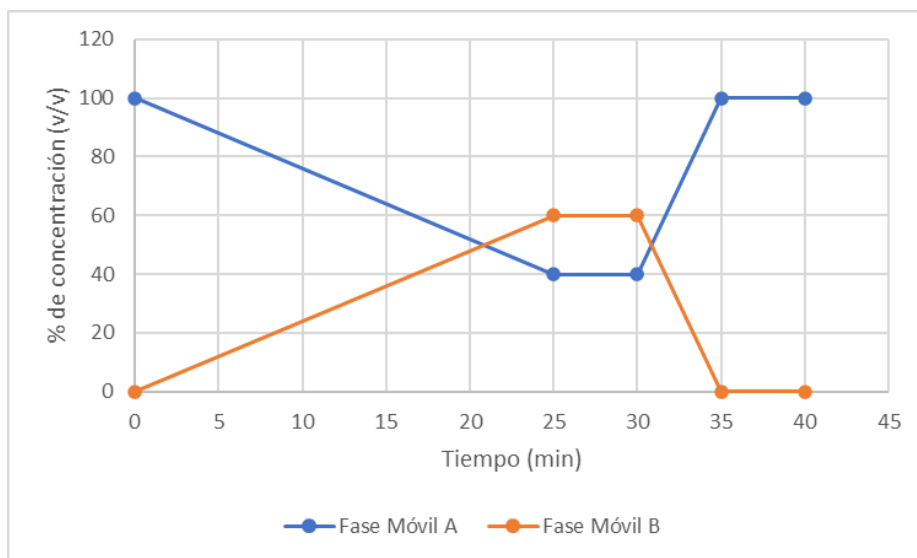


Figura 1. Gradiente de concentración del método cromatográfico utilizado.

Para la cuantificación mediante HPLC, se realizó una curva de calibración en cada lote de análisis. Para las muestras tanto de microencapsulados como los pellets (extracción por solvente y fluido supercríticos), sobrenadantes y filtrados obtenidos por el método de extracción por solventes se utilizó el estándar interno y el estándar de β -caroteno de alta concentración (17,5 $\mu\text{g/mL}$ y 20 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Mientras que para los sobrenadantes y filtrados obtenidos por el método de fluidos supercríticos se utilizaron los estándares de baja concentración (3,5 $\mu\text{g/mL}$ y 4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente).

2.4.6 Análisis de resultados

Para analizar los resultados cromatográficos se construyeron las curvas de calibración con cinco puntos de β -caroteno y estándar interno, analizadas conjuntamente con cada lote de análisis. Los picos cromatográficos se reconocieron por comparación con los tiempos de retención tanto del estándar interno como del β -caroteno y los cálculos se realizaron siguiendo el método de estandarización interna utilizando las áreas bajo la curva de los picos cromatográficos. Se aplicaron pruebas de ANOVA de un factor para evaluar la diferencia según el contenido de grasa entre leche entera, semidescremada y descremada; ANOVA multifactorial para evaluar la influencia del contenido de grasa de la leche (entera, semidescremada y descremada), método de extracción de carotenoides (por solventes y fluidos supercríticos) y tipo de muestra (filtrado, sobrenadante, pellet y total). Además, se aplicó una prueba T test pareada para evaluar de manera general la diferencia según el método de extracción de carotenoides (por solventes vs. por fluidos supercríticos). Todos los análisis estadísticos se efectuaron en el programa RStudio, con un nivel de significancia del 5%.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Influencia del contenido de grasa y proceso extractivo en la recuperación de β -caroteno

En el presente trabajo de titulación, se analizó la bioaccesibilidad del β -caroteno microencapsulado bajo la influencia del contenido de grasa de un alimento co-ingerido y del proceso extractivo de los carotenoides previo a la microencapsulación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. El estudio se realizó en diferentes tipos de muestras, las cuales representan las etapas que atraviesan los carotenoides para ser bioaccesibles (Figura 2).

Tabla. 3: Porcentaje de recuperación de β -caroteno según el tipo de extracción de carotenoides en diferentes tipos de leche (entera, semidescremada y descremada) para las muestras de sobrenadante, filtrado, pellet y total.

% β -caroteno	Extracción por solventes			Extracción por fluidos supercríticos		
	LE ^a	LS ^a	LD ^a	LE ^a	LS ^a	LD ^a
Filtrado	41 ± 3,8	20,1 ± 3,1	7,4 ± 0,6	64,7 ± 1,8	38,8 ± 1,2	45,1 ± 1,7
Sobrenadante	61,5 ± 1,7	47,3 ± 4,2	25,9 ± 0,4	75,5 ± 11,8	52,4 ± 4,7	48,1 ± 4,5
Pellets	22,4 ± 0,7	30,8 ± 2,2	49,9 ± 6,4	18,4 ± 1,8	39,8 ± 2,3	33,7 ± 3,4
Total	83,8 ± 2,2	78,1 ± 3,7	75,7 ± 6,6	93,9 ± 13	92,2 ± 2,5	81,8 ± 3,4

^aLE: Leche entera, LS: Leche semidescremada, LD: Leche descremada.

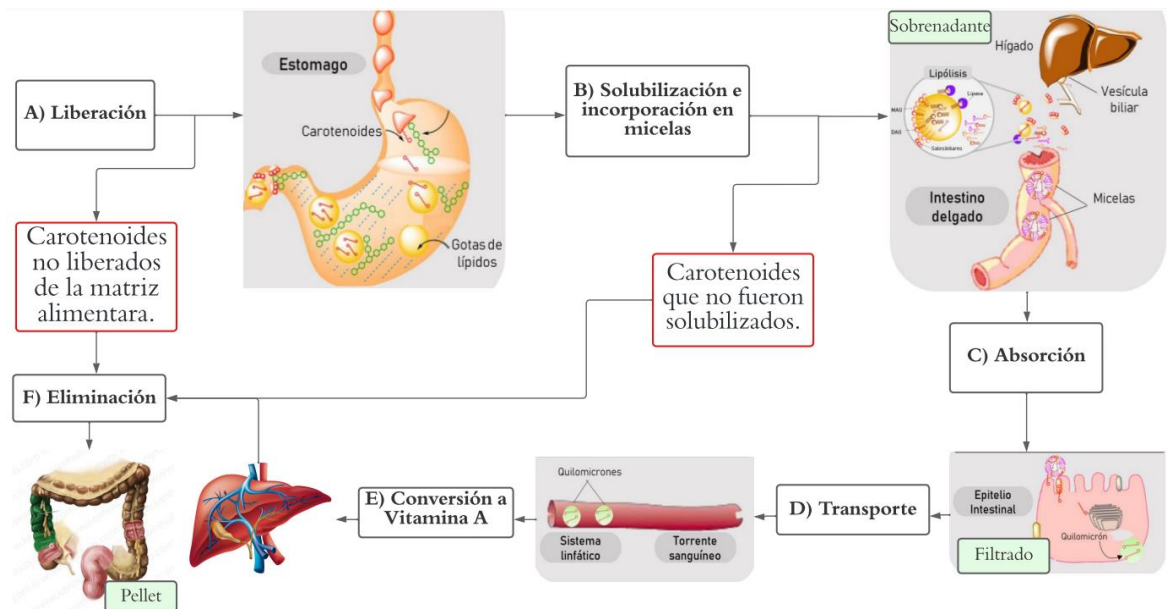


Figura 2. Proceso digestivo de los carotenoides. Adaptado de Zumbado, C., (2018). Repositorio SIBDI-UCR. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/>

3.2 Influencia del contenido de grasa co-ingrida

Tras evaluar la influencia del contenido de grasa en la leche sometida conjuntamente con los microencapsulados a la digestión *in vitro*, se evidenció que el contenido de grasa fue un factor determinante para la bioaccesibilidad del β -caroteno en las diferentes muestras analizadas de filtrado (Figura 3) y sobrenadante (Figura 4).

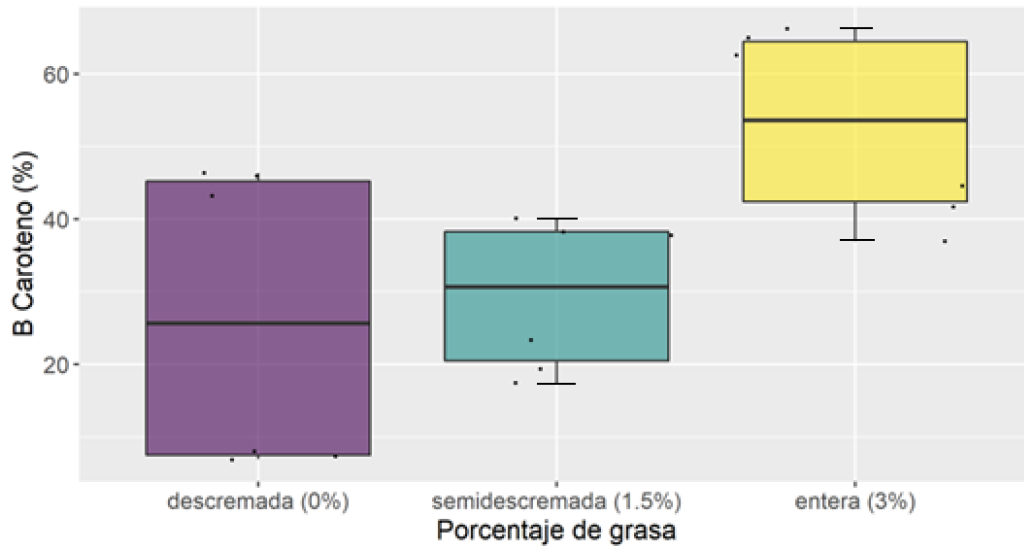


Figura 3. Porcentaje de recuperación de β -caroteno según el tipo de leche (entera, semidescremada y descremada) en las muestras de filtrado.

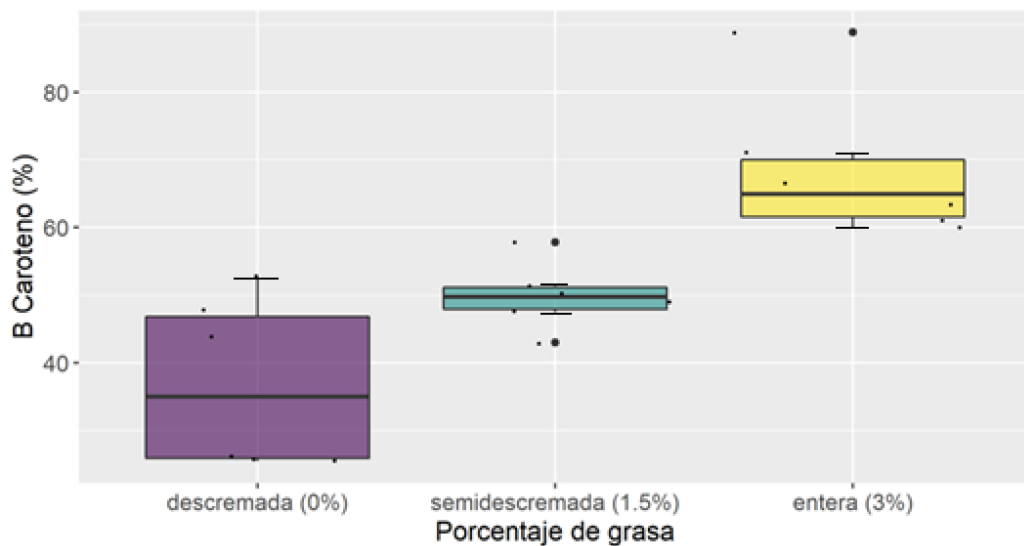


Figura 4. Porcentaje de recuperación de β -caroteno según el tipo de leche (entera, semidescremada y descremada) en las muestras de sobrenadante.

Al comparar los resultados obtenidos en el análisis de ANOVA de un factor entre los tres tipos de leche con diferente contenido de grasa (Tabla 4), la leche entera (3%) contribuyó a obtener una bioaccesibilidad de β -caroteno estadísticamente superior en comparación con la leche semidescremada (1,5%) y descremada (0%), tanto para las muestras de filtrado ($p=0,018$) como para las de sobrenadante ($p=0,0002$). Cabe recalcar que, lo que se denomina “filtrado” representa

a los carotenoides que sí fueron solubilizados y que se encuentran en un tamaño de partícula apto para ser absorbidos y por ende son bioaccesibles; mientras que el “sobrenadante” representa a los carotenoides que se solubilizaron pero que no necesariamente pueden ser absorbidos por el intestino (Dinella et al, 2007).

Tabla 4. *Influencia del contenido de grasa co-ingenido en el porcentaje de recuperación de β -caroteno.*

% β -caroteno	Extracto por solventes			Extracto por fluidos supercríticos			Valor de p
	LE ^a	LS ^a	LD ^a	LE ^a	LS ^a	LD ^a	
Filtrado	41 ± 3,8	20,1 ± 3,1	7,4 ± 0,6	64,7 ± 1,8	38,8 ± 1,2	45,1 ± 1,7	0,018
Sobrenadante	61,5 ± 1,7	47,3 ± 4,2	25,9 ± 0,4	75,5 ± 11,8	52,4 ± 4,7	48,1 ± 4,5	0,0002
Pellets	22,4 ± 0,7	30,8 ± 2,2	49,9 ± 6,4	18,4 ± 1,8	39,8 ± 2,3	33,7 ± 3,4	0,0002
Total (pellet + sobrenadante).	83,8 ± 2,2	78,1 ± 3,7	75,7 ± 6,6	93,9 ± 13	92,2 ± 2,5	81,8 ± 3,4	0,132

^aLE: Leche entera, LS: Leche semidescremada, LD: Leche descremada.

Acerca del papel que cumple la grasa en la bioaccesibilidad de los carotenoides, varios autores establecen que beneficia fundamentalmente el proceso de solubilización y micelarización de estos compuestos bioactivos, permitiendo una mayor biodisponibilidad y, así, un mejor aprovechamiento nutricional (Boonlao, Rungsardthong & Kumar, 2022; Salvia-Trujillo et al., 2017; Stinco et al, 2019). La co-ingesta de un alimento graso junto a los carotenoides, interviene y beneficia el proceso de varias maneras: i) proporcionan un ambiente lipofílico que facilita la extracción de los carotenoides de la matriz del alimento que los contiene, ii) intervienen en la formación de la emulsión que solubiliza los carotenoides en los fluidos gástricos del estómago, iii) promueven la acción de lipasas pancreáticas y estimula la secreción de las sales biliares para incrementar la formación de micelas, iv) promueven la formación de las micelas mixtas, y v) aumentan la acumulación intracelular de los carotenoides contenidos en quilomicrones, por lo que aumenta su absorción (Lin et al., 2018; Shilpa et al., 2020).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con un estudio similar realizado por Cilla et al (2012); en el que se comparó la bioaccesibilidad de los carotenoides en batidos de fruta con leche entera (3,5% de grasa), descremada (0,3% de grasa) y leche de soya (1,8% de grasa) procesadas con tratamientos térmicos y en altas presiones, en la cual la mayor bioaccesibilidad se obtuvo con la leche entera (88,6% - 96,3% para cada procesamiento) en comparación con las otras bebidas utilizadas (Cilla et al 2012). Asimismo, Yao et al., (2021) evaluaron el impacto del contenido graso de alimentos sobre los carotenoides presentes en hortalizas, concluyendo que existió mayor biodisponibilidad y bioaccesibilidad al aumentar el contenido lipídico del alimento (28%), en comparación con un consumo moderado (11%) y bajo en grasa (5%).

El empleo de la leche como alimento co-ingerido en la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos ha sido bien estudiada; no solo por su costo en comparación con otros alimentos como la carne, sino también por ser una fuente de lípidos y micronutrientes importantes en la dieta humana (Zumbado, 2018). De acuerdo con Conboy et al., (2021), la composición de la leche en grasa (65% de ácidos grasos saturados, 32% de ácidos grasos monoinsaturados y 3% de ácidos grasos poliinsaturados) permite aumentar la estabilidad de los carotenoides y su absorción intestinal (Conboy et al., 2021). Se ha observado que, las matrices alimentarias basadas en productos lácteos mejoran la bioaccesibilidad de los carotenoides entre un 23,5-47,5% (Conboy et al., 2021). Por ejemplo, Garcia-Cayuela, et al., (2018) evaluaron la bioaccesibilidad *in vitro* de carotenoides en la fruta caqui a partir de productos lácteos formulados con leche entera (3,6%) y desnatada (0,25%). Los resultados mostraron que el mayor contenido graso de la leche entera en comparación con la desnatada, ejerce una influencia significativa sobre la bioaccesibilidad de los carotenoides, con un aumento del 21% al utilizar la leche entera; confirmando de esta manera que el contenido de grasa láctea mejora la eficiencia de la micelarización (Garcia-Cayuela, et al., 2018). Otros estudios dan a conocer que la presencia de lípidos es obligatoria para la micelarización de carotenoides, no solo porque facilitan su solubilización previo a su absorción, sino también porque la grasa ayuda a retrasar el vaciado gástrico (Odorissi et al., 2019). Esto sugiere que se originarán más productos de la digestión de lípidos, los cuales también contribuirán a la obtención de más micelas, así como de quilomicrones capaces de transportarlos para su posterior uso (Odorissi et al., 2019). Por último, es importante mencionar que también deberán considerarse otros factores que puedan influir en el proceso absorptivo de los carotenoides, tales como el pH gastrointestinal,

variación en enzimas, presencia de fibra soluble, entre otros (Xia et al., 2017). En particular, la fibra provocará una disminución en la efectividad del proceso de digestibilidad, haciendo que una menor cantidad de carotenoides se encuentren biodisponibles. Igualmente, la diversidad de carotenoides en un alimento y su perfil de liposolubilidad, supondrá una diferencia durante su absorción (Fernández, 2010).

Asimismo, en el análisis de ANOVA un factor, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el uso de leche semidescremada y descremada en el filtrado ($p=0,932$), sobrenadante ($p=0,095$) y pellet ($p=0,240$), concluyéndose que únicamente un alimento con mayor porcentaje graso, 3 % en este caso, resulta beneficioso para la bioaccesibilidad del β -caroteno. A partir de este resultado, y según la literatura, se establece que la ingesta de 5 g de contenido graso por día o más favorecerán el proceso de solubilización y micelarización del β -caroteno (Priyadarshani, 2015; Mercado, 2002). Al respecto, Jiang et al. (2015) & Odorissi et al., (2019) mostraron que existe una mayor bioaccesibilidad cuanto mayor es la cantidad y mayor la cadena de ácidos grasos insaturados presentes en el alimento. Por ende, la leche entera será aquella que promueva dicho proceso ya que presenta una mayor cantidad de ácidos grasos (Jiang et al., 2015 & Odorissi et al., 2019).

Con relación a la muestra del pellet (Figura 5), se obtuvo también diferencias significativas con respecto al porcentaje de grasa ($p= 0,0002$) (Tabla 4). El pellet, que representa a todos los carotenoides que no fueron liberados de la matriz o que no fueron solubilizados (Dinella et al, 2007), presentó un porcentaje menor de recuperación de β -caroteno. Esto está conforme a la literatura, ya que con el uso de un alimento alto en contenido graso como la leche entera, se obtendrá una mejor bioaccesibilidad en las muestras de filtrado y sobrenadante; de manera que el porcentaje restante de β -caroteno será retenido en el pellet (Xia et al., 2017; Grootaert et al; 2021).

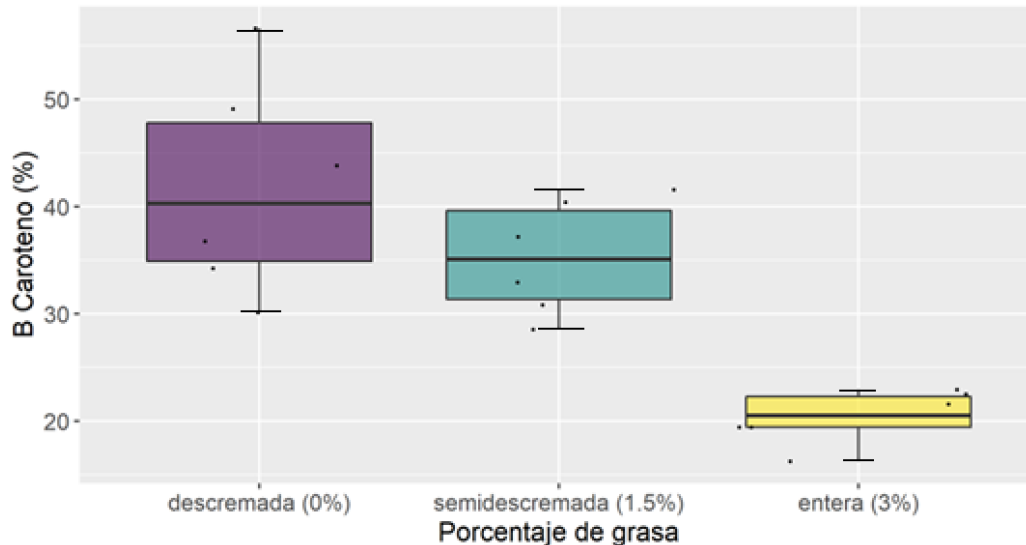


Figura 5. *Porcentaje de β -caroteno recuperado en las muestras de pellet según el porcentaje de grasa en la leche co-ingrida.*

Finalmente, referente al porcentaje de grasa, se obtuvo como resultado que no existen diferencias significativas ($p=0,259$) cuando se analiza todas las muestras en conjunto, sino únicamente cuando se dividen en filtrado, sobrenadante y pellet respectivamente. Esto se respalda en el estudio realizado por Dinnella et al., (2007), en donde se evidenció la importancia de la centrifugación tras realizar el proceso digestivo *in vitro*, debido a que mediante esta separación se obtendría la fracción bioaccesible. Por ende, en el sobrenadante y filtrado se recogerá los compuestos que son bioaccesibles en el intestino delgado y los compuestos recogidos en el residuo, pertenecerán a la fracción que llega al intestino grueso para su posterior eliminación (Dinnella et al., 2007). Cabe mencionar que estudios recientes sugieren que posiblemente la muestra del filtrado obtenido a partir de un poro de $0,2 \mu\text{m}$, permitiría que estos compuestos sean capaces de atravesar la mucosa intestinal una vez hayan sido micelarizados para su posterior absorción (Yuang et al., 2019). Por ello, el filtrado es considerado una mejor representación de la bioaccesibilidad real de los carotenoides (Yuang et al., 2019; Gomez et al., 2019; Yi, 2014).

3.3 Influencia del método de extracción

En este estudio se evaluaron microencapsulados de cáscara de mango a partir de dos métodos de extracción, extracción por solventes y fluidos supercríticos.

El porcentaje de recuperación (bioaccesibilidad) de β -caroteno fue estadísticamente diferente entre las muestras de microencapsulados obtenidas a partir del método de extracción convencional por solventes y la extracción por fluidos supercríticos ($p=0,047$) (Figura 6); siendo mayor en las muestras correspondientes a la extracción por fluidos supercríticos (Tabla 5). En particular, se observaron diferencias estadísticamente significativas según el método de extracción entre todas las muestras de filtrado en función del tipo de leche (leche entera $p=0,004$; semidescremada $p=0,014$ y descremada $p=0,0004$).

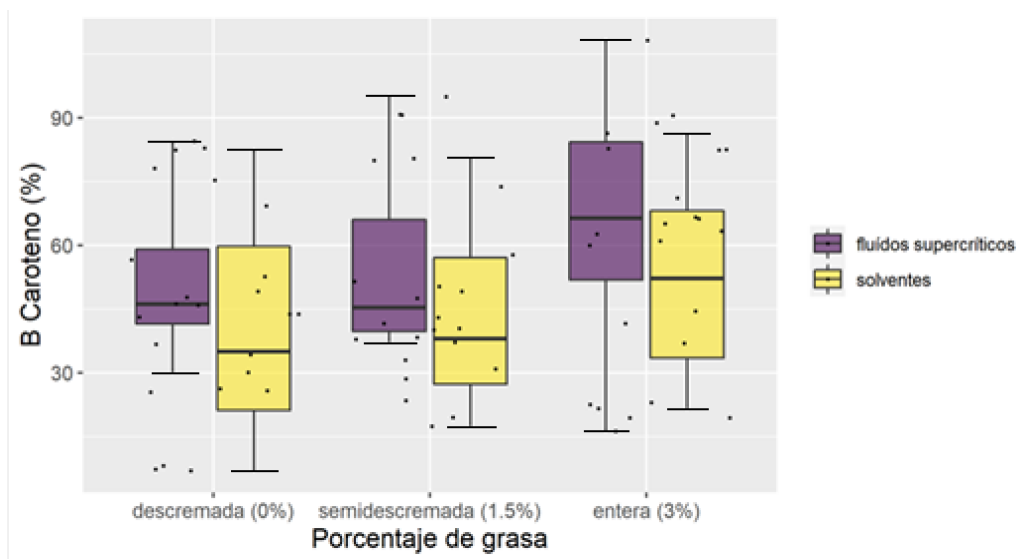


Figura 6. Porcentaje de β -caroteno recuperado según el tipo de extracción de carotenoides (por fluidos supercríticos y por solventes) en todas las muestras (filtrado, sobrenadante y pellet) en función del tipo de leche (entera, semidescremada y descremada).

Tabla 5. *Influencia del método de extracción en el porcentaje de recuperación de β -caroteno.*

% β -caroteno	ES ^a	FSC ^a	Valor p	ES ^a	FSC ^a	Valor p	ES ^a	FSC ^a	Valor p
	LE ^b	LE ^b		LS ^b	LS ^b		LD ^b	LD ^b	
Filtrado	41 ± 3,8	64,7 ± 1,8	0,004	20,1 ± 3,1	38,8 ± 1,2	0,014	7,4 ± 0,6	45,1 ± 1,7	0,0004
Sobrenadante	61,5 ± 1,7	75,5 ± 11,8	0,19	47,3 ± 4,2	52,4 ± 4,7	0,26	25,9 ± 0,4	48,1 ± 4,5	0,014
Pellets	22,4 ± 0,7	18,4 ± 1,8	0,10	30,8 ± 2,2	39,8 ± 2,3	0,06	49,9 ± 6,4	33,7 ± 3,4	0,10
Total (pellet + sobrenadante).	83,8 ± 2,2	93,9 ± 13	0,36	78,1 ± 3,7	92,2 ± 2,5	0,015	75,7 ± 6,6	81,8 ± 3,4	0,32

^aES: Extracto por solventes, FSC: Fluidos supercríticos.

^bLE: Leche entera, LS: Leche semidescremada, LD: Leche descremada.

La técnica de extracción por fluidos supercríticos presenta varias ventajas y su eficacia es superior a la extracción por solventes (Macías-Sánchez et al., 2005; de Andrade Lima et al., 2019). Por ejemplo, se ha demostrado que mediante esta técnica se pueden extraer carotenoides de una muestra mixta de matrices de frutas y hortalizas, con altos niveles de recuperación (74 % a 99 % p/p) (Andrade Lima et al., 2019). En la actualidad, el uso de dióxido de carbono en condiciones supercríticas ha constituido una tecnología emergente en términos de impacto ambiental (Macías-Sánchez et al., 2010). Entre sus ventajas se puede destacar su atoxicidad, inercia química, bajo costo y fácil disponibilidad (Macías-Sánchez et al., 2005). Mediante esta técnica, la generación de interferencias o impurezas de terceros tiende a ser mínima o casi nula, y el empleo mayoritariamente de CO₂ en condiciones controladas y estandarizadas puede lograr que se obtenga un extracto de alta calidad y pureza. Además, esta técnica protege al material en estudio, ya que no utiliza calentamiento excesivo, que suele ser perjudicial sobre compuestos termolábiles, como los carotenoides. Por otro lado, gracias a su baja polaridad, esta metodología resulta a su vez más eficaz (Giuffrida et al., 2018). Es importante también recalcar que, parámetros como la densidad del flujo, presión y temperatura, también serán determinantes para lograr una separación efectiva (Giuffrida et al., 2018; Macías-Sánchez et al., 2010).

En este estudio, el extracto microencapsulado obtenido a partir de fluidos supercríticos presentó una concentración inicial de β -caroteno menor (13,52 $\mu\text{g/g}$) al microencapsulado obtenido por extracción con solventes (76,57 $\mu\text{g/g}$), por lo que la fase experimental tuvo que ajustarse para que los resultados sean comparables. A pesar de que la concentración inicial fue menor en el primer caso, este factor no repercutió en los resultados, ya que la calidad y la pureza del método de extracción es posiblemente superior al método de extracción con solvente. Estos resultados están en línea con un estudio en el que también se comparan extractos obtenidos por fluidos supercríticos y extracción por solventes de diez diferentes vegetales con distinta matriz y con diferente concentración inicial de β -caroteno (Marsili & Callahan, 1993). Los autores evidenciaron que la bioaccesibilidad del β -caroteno fue superior en un 23% en el método de fluidos supercríticos (Marsili & Callahan, 1993).

Según Macías-Sánchez et al., (2005), la extracción con solventes es un método convencional que presenta varias limitaciones tales como periodos de tiempo extensos, múltiples pasos de extracción y grandes cantidades de solventes orgánicos. Además, la extracción con solventes suele ser una técnica costosa y potencialmente dañina. Se ha evidenciado en varios

estudios que, a partir de materia vegetal o subproductos agroindustriales, la eficiencia del proceso de extracción es baja (Adadi et al., 2018). Dado que no es un método selectivo, una vez finalizado el proceso, se obtendrá el compuesto objetivo de estudio, pero también componentes o metabolitos secundarios con similar polaridad que no son de interés (Adadi et al., 2018). Asimismo, al ocupar solventes orgánicos (como hexano, etanol, entre otros) que, si bien facilitarán el proceso, estos podrán ser causa de contaminación de los extractos obtenidos, por ende, los mismos tendrán que someterse a procesos secundarios para su recuperación (Adadi et al., 2018).

En otro estudio se analizó la diferencia en la obtención de los carotenoides presentes en la fruta *Bactris gasipaes* por dos métodos diferentes (extracción convencional por solventes y asistida por líquidos iónicos) y cómo afectaba a bioaccesibilidad, concluyendo que la extracción por solventes no es la más idónea para estos compuestos bioactivos (Souza Mesquita et al., 2021). Por lo expuesto, se puede sugerir que el empleo de uno u otro método dependerá considerablemente de su eficiencia, la complejidad de la matriz alimentaria y de la propia naturaleza del compuesto a extraer.

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

El presente estudio tuvo como fin determinar la bioaccesibilidad in vitro del β -caroteno previamente obtenido a partir de cáscaras de mango y contenido en microencapsulados. Específicamente, se evaluó el efecto sobre la bioaccesibilidad del β -caroteno de: i) método extractivo de los carotenoides contenidos en los microencapsulados (extracción por solventes vs. extracción por fluidos supercríticos) y ii) la cantidad de grasa presente en la leche co-ingerida.

En base a la experimentación se concluye que el porcentaje de grasa y el tipo de extracción de carotenoides son factores que intervienen en la bioaccesibilidad del β -caroteno microencapsulado. El mayor porcentaje de grasa co-ingerida mejora la bioaccesibilidad del β -caroteno en las muestras de filtrado y sobrenadante. Por lo tanto, se sugiere que un porcentaje de grasa igual o superior al de la leche entera (3%) puede considerarse como un factor que beneficie el proceso de solubilización y miceralización del compuesto bioactivo. Este hallazgo podría aplicarse a la co-ingesta de otros alimentos grasos, considerando que porcentajes menores de grasa no ejercerán acción sobre los mismos. Por lo tanto, se debería optar por alimentos ricos en grasa para que la bioaccesibilidad del β -caroteno sea superior. Además, se concluye que el proceso extractivo de fluidos supercríticos favorece la bioaccesibilidad del β -caroteno, lo que se atribuye a su alta eficacia y a la calidad y pureza de los extractos.

4.2 Recomendaciones

A partir del presente trabajo de titulación, se recalca la importancia de trabajar con muestras que simulen las diferentes etapas del proceso digestivo tales como el filtrado, sobrenadante y pellet, ya que de esta manera se podrá obtener resultados más específicos, de donde se evidencie que el filtrado es la muestra más representativa de la bioaccesibilidad del β -caroteno.

Además, se resalta la importancia de incluir el concepto de bioaccesibilidad en el diseño de nuevas formulaciones alimentarias, ya que siempre existirán diversos factores que permitan la optimización del proceso de digestión, absorción y transporte de compuestos activos, que permitan mejorar la efectividad nutricional del compuesto en interés.

REFERENCIAS

- Adadi, P., et al. (2018). "Selected Methods of Extracting Carotenoids, Characterization, and Health Concerns: A Review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(24): 5925-5947.
- Aguilar-Espinosa, M., Alcalde, M. J., Alonso, G. L., Álvarez, R., Angaman, D. M., Arhazem, O., ... & Zorrilla-Lopez, U. (2017). *Carotenoides en agroalimentación y salud*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Allen, L. H., et al. (2017). "*Guías para la fortificación de alimentos con micronutrientes*."
- Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S., & Olmedilla Alonso, B. (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A: utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutrición hospitalaria*, 27(4), 1334-1343.
- Bianeth, C., & Restrepo, L. (2013). Compuestos fenólicos y carotenoides en la papa: revisión. *Actual. nutr*, 25-32.
- Carazo, A., et al. (2021). "Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity." *Nutrients* 13(5): 1703.
- Chacón-Ordóñez, Tania; Carle, Reinhold; Schweiggert, Ralf (2018). Bioaccessibility of carotenoids from plant and animal foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99 (7). doi:10.1002/jsfa.9525
- Cervantes-Paz, B., et al. (2017). "Effects of pectin on lipid digestion and possible implications for carotenoid bioavailability during pre-absorptive stages: A review." *Food Res Int* 99(Pt 2): 917-927.
- Cilla, A., Alegría, A., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Plaza, L., ... & Barberá, R. (2012). Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk-and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7282-7290.
- Conboy, S., Ross, R., & Stanton, C. (2021). Carotenoides en la leche y el potencial de los alimentos funcionales a base de lácteos. *Alimentos (Basilea, Suiza)*, 10 (6), 1263. <https://doi.org/10.3390/foods10061263>
- Dávila, I. A. & Fernández, F. (2011). *Normas, protocolos y consejería para la suplementación con micronutrientes*: 92.

- Dayane de Freitas Santos, Priscila & Rubio, Fernanda & Silva, Marluci&Pinho, Lorena & Favaro-Trindade, Carmen. (2021). Microencapsulation of carotenoid-rich materials: A review. *Food Research International*. 147. 10.1016/j.foodres.2021.110571.
- De Jesús Hernández-Torres., et al. (2016). La microencapsulación de bioactivos para su aplicación en la industria. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 12-19.
- De Medeiros, P., et al. (2018). "Modulation of Intestinal Immune and Barrier Functions by Vitamin A: Implications for Current Understanding of Malnutrition and Enteric Infections in Children." *Nutrients* 10(9): 1128.
- de Souza Mesquita, L. M., et al. (2021). "Bioaccessibility and Cellular Uptake of Carotenoids Extracted from *Bactris gasipaes* Fruit: Differences between Conventional and Ionic Liquid-Mediated Extraction." *Molecules* 26(13).
- Debelo, H., et al. (2017). "Vitamin A." *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 8(6): 992-994.
- Dias, M. D. G., et al. (2017). *Carotenoides en agroalimentación y salud"Tabla de contenido en carotenoides de alimentos iberoamericanos."* (Cap.18): 354-429.
- Dinnella, C., et al. (2007). Bioaccessibility and Antioxidant Activity Stability of Phenolic Compounds from Extra-Virgin Olive Oils during in Vitro Digestion. *J. Agric. Food Chem*, 55, 8423–8429
- Disalvo, L., et al. (2019). "Vitamin A deficiency and associated factors in preschoolers from the outskirts of La Plata, Buenos Aires." *Arch Argent Pediatr* 117(1): 19-25.
- Eggersdorfer, M., & Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of biochemistry and biophysics*, 652, 18-26.
- Estevez-Santiago, R., et al. (2016). "Bioaccessibility of provitamin A carotenoids from fruits: application of a standardised static in vitro digestion method." *Food Funct* 7(3): 1354-1366.
- FAO. (2011). *Global food losses and food waste – extent, causes and prevention*. Rome. <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf>.
- Fernández, G.E. (2010). *Bioaccesibilidad in vitro de carotenoides desde matrices lipofílicas e hidrofílicas. competitividades y sinergias.* (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- García-Casal, M. N. (2013). Valores de referencia de vitamina A para la población venezolana. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63(4), 321.

- Garcia-Cayuela, T., et al. (2018). "In vitro bioaccessibility of individual carotenoids from persimmon (*Diospyros kaki*, cv. Rojo Brillante) used as an ingredient in a model dairy food." *J Sci Food Agric* 98(9): 3246-3254
- Garcia-Mendoza, M. P., et al. (2015). "Extracts from mango peel by-product obtained by supercritical CO₂ and pressurized solvent processes." *LWT-Food Science and Technology* 62(1): 131-137.
- Gomes, G. V. L., et al. (2019). "beta-carotene and alpha-tocopherol coencapsulated in nanostructured lipid carriers of murumuru (*Astrocaryum murumuru*) butter produced by phase inversion temperature method: characterisation, dynamic in vitro digestion and cell viability study." *J Microencapsul* 36(1): 43-52.
- Gonçalves, A., et al. (2016). "Microencapsulation of vitamin A: A review." *Trends in Food Science & Technology* 51: 76-87.
- Grootaert, C., Vansteenland, M., Vandemoortele, A., Van Camp, J., & De Meulenaer, B. (2021). Method for beta-carotene extraction from processed baby foods as a model for plant-based fatty food products. *Food Research International*, 144, 110332.
- Imdad, A., et al. (2017). "Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from six months to five years of age." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017(11).
- Institute of Medicine Panel on Dietary, A. and C. Related (2000). *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. Washington (DC), National Academies Press (US) Copyright 2000 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.
- Jáuregui, M. E. C., Carrillo, M. D. L. C. C., & Romo, F. P. G. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 61(3), 233-241.
- Kehili, M., et al. (2017). "Supercritical CO₂ extraction and antioxidant activity of lycopene and β-carotene-enriched oleoresin from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) peels by-product of a Tunisian industry." *Food and Bioproducts Processing* 102: 340-349.
- Kopec, R. E. and M. L. Failla (2018). "Recent advances in the bioaccessibility and bioavailability of carotenoids and effects of other dietary lipophiles." *Journal of Food Composition and Analysis* 68: 16-30.

- Kraemer, K., et al. (2008). "Are low tolerable upper intake levels for vitamin A undermining effective food fortification efforts?" *NutritionReviews* 66(9): 517-525.
- Latham, M. C. (2002). *Nutrición humana: en el mundo en desarrollo* (Vol.29). New York, NY, USA:FAO.
- Leong, H. Y., et al. (2021). "Waste biorefinery towards a sustainable circular bioeconomy: a solution to global issues." *Biotechnology for Biofuels* 14(1).
- Lin, Q., Liang, R., Williams, P. A., & Zhong, F. (2018). Factors affecting the bioaccessibility of β -carotene in lipid-based microcapsules: Digestive conditions, the composition, structure and physical state of microcapsules. *Foodhydrocolloids*, 77, 187-203.
- López-Casero, I.I. (2019). *Determinación de Carotenoides en suero mediante HPLC*. (Trabajo de fin de grado). Universidad Complutense, Madrid, España.
- Lorenzana Rodríguez, S. (2020). *Funciones de la vitamina A y disfunciones relacionadas con su carencia*. (Trabajo de fin de grado). Universidad de Valladolid, Valladolid.
- Lyu, Y., et al. (2021). "Bioaccessibility of carotenoids and antioxidant capacity of seed-used pumpkin byproducts powders as affected by particle size and corn oil during in vitro digestion process." *FoodChem*343: 128541.
- Macías-Sánchez, M. D., Fernandez-Sevilla, J. M., Fernández, F. A., García, M. C., & Grima, E. M. (2010). Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chemistry*, 123(3), 928-935.
- Macias-Sánchez, M. D., Mantell, C., Rodriguez, M., de La Ossa, E. M., Lubián, L. M., & Montero, O. (2005). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsisgaditana*. *Journal of Food Engineering*, 66(2), 245-251.
- Marsili, R.; Callahan, D. (1993). Comparison of a Liquid Solvent Extraction Technique and Supercritical Fluid Extraction for the Determination of β - and α -Carotene in Vegetables. *Journal of Chromatographic Science*, 31(10), 422–428. doi:10.1093/chromsci/31.10.422
- Martínez García, R. M. (2016). "Suplementos en gestación: últimas recomendaciones." *NutriciónHospitalaria*, 33 (4): 3-7.
- Martinez-Torres, J., et al. (2014). "Prevalence and demographic factors associated with vitamin A deficiency in Colombian children aged 12-59 months." *Endocrinol Nutr* 61(9): 460-466.

- McCauley, M. E., et al. (2015). "Vitamin A supplementation during pregnancy for maternal and newborn outcomes." *Cochrane Database Syst Rev* 2015(10): Cd008666.
- Meléndez Martínez, A. J., Vicario Romero, I., & Heredia Mira, F. J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 3.
- Mercado Mercado, G., López Teros, V., Montalvo González, E., González Aguilar, G. A., Álvarez Parrilla, E., & Sáyago Ayerdi, S. G. (2018). Efecto de la extracción asistida por ultrasonido en la liberación y bioaccesibilidad in vitro de carotenoides, en bebidas elaboradas con mango (*Mangifera indica* L.) 'Ataulfo'. *Nova scientia*, 10(20), 100-132.
- Muñoz Cachago, M. D. (2018). *Evaluación de sistemas de deshidratación del fruto de dos variedades de Carica papaya: Solo sunrise (hawaiana) y Tainung, para la obtención de carotenoides totales considerando como fuente de colorantes naturales*. [Tesis de pregrado]. Repositorio Digital de la Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15172>
- Murador, D. C., et al. (2021). "Bioaccessibility and cellular uptake by Caco-2 cells of carotenoids and chlorophylls from orange peels: A comparison between conventional and ionic liquid mediated extractions." *Food Chem* 339: 127818.
- National Institutes of Health. (14 de febrero de 2020). *Datos sobre la vitamina A y carotenoides*. Recuperado el 20 de noviembre de 2021 de <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminA-DatosEnEspañol/> Datos sobre la Vitamina A
- Nava Reyna, E., et al. (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 66, 64-70.
- Odorissi, X.A.A. & A. Z. Mercadante (2019). "The bioaccessibility of carotenoids impacts the design of functional foods." *Current Opinion in Food Science* 26: 1-8.
- Olmedilla, A., & Estévez, S. (2017). Estimación de la ingesta de carotenoides en la dieta. En Pilar Tapia (Ed.), *Carotenoides en agroalimentación y salud*. (430-443). Editorial Terracota, SA de CV.
- Olmedilla, A., et al. (2001). *Carotenoides y salud humana*. Fundación Española de la Nutrición (FEN). <https://www.fen.org.es/storage/app/media/imgPublicaciones/1522007542.pdf>

- Otálora-Orrego, D. and D. A. Martin G (2020). "Técnicas emergentes de extracción de β -caroteno para la valorización de subproductos agroindustriales de la zanahoria (*Daucus carota* L.): una revisión." *Informador Técnico* 85(1).
- Palazón-Guillamón, M., et al. (2018). "Estimación de la ingesta diaria de carotenoides en adolescentes españoles (10-17 años)." *RevEspNutr Comunitaria* 24(2)
- Priyadarshani, AMB (2015). Una revisión de los factores que influyen en la bioaccesibilidad y la bioeficacia de los carotenoides. *Reseñas críticas en ciencia de los alimentos y nutrición*, 57(8),1-33. doi:10.1080/10408398.2015.1023431
- Ramos-Padilla, P., et al. (2018). "Tipologías nutricionales en población infantil menor de 5 años de la provincia de Chimborazo, Ecuador." *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética* 22(4): 287.
- Ribaya-Mercado, J. D. (2002). Influence of dietary fat on b-carotene absorption and bioconversion into vitamin A. *Nutr. Rev.* 60(4):104– 110
- Rivera Vizuete, V. (2020). *Evaluación de la actividad antioxidante de los carotenoides presentes en tres variedades de cáscara de mango (Mangifera indica L.)*. [Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Químico Farmacéutico]. Repositorio digital de la Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22049>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods (Vol. 71)*. Washington: ILSI press.
- Rubiano-Charry, K. D., et al. (2019). "Aprovechamiento de los subproductos del mango, como fuente de compuestos bioactivos, para la elaboración de rollos comestibles." *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 22(2).
- Saini, R. K. and Y. S. Keum (2018). "Carotenoid extraction methods: A review of recent developments." *FoodChem* 240: 90-103.
- Calderón, S., & Vera, E. (2018). Extracción de Carotenos de Cáscara de Mango (*Mangifera indica*) con mezclas de Solventes y Extracción Asistida. *Revista Bionatura*, 1(1), 1-21
- Shilpa, S., Shwetha, H. J., Raju, M., & Lakshminarayana, R. (2020). *Factors affecting bioaccessibility and bio-efficacy of carotenoids*. In *Carotenoids: Properties, processing and applications* (pp. 41-73). Academic Press.

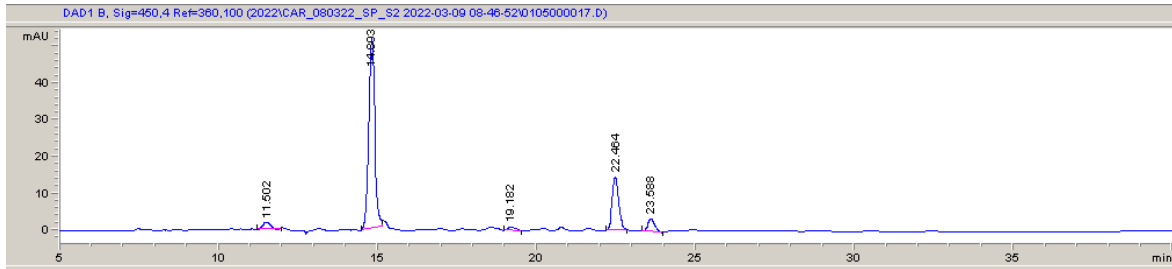
- Tan, Y., Zhang, Z., Zhou, H., Xiao, H., McClements, D.J. (2020). Factors impacting lipid digestion and β -carotene bioaccessibility assessed by standardized gastrointestinal model (INFOGEST): oil droplet concentration. *Food & Function*, 11 (suplemento 2), 10.1039/D0FO01506G-. doi:10.1039/D0FO01506G
- Tsegaye, B., et al. (2021). "Food Waste Biorefinery: Pathway towards Circular Bioeconomy." *Foods* 10(6): 1174.
- Vaca, J.A.M. (2015). *Políticas y programas implementadas en Ecuador para tratar las deficiencias de micronutrientes en los últimos 15 años*. (Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención de Licenciatura en Nutrición Humana). Universidad San Francisco de Quito, Ecuador
- Velderrain, R.G.R. (2013). *Frutos tropicales durante un modelo de digestión in vitro*. (Tesis como requisito para obtener el grado de maestría en ciencias). Centro de Investigación en alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora.
- Vitale, A. A., et al. (2010). Carotenoides en quimioprevención: Licopeno. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 44(2), 195-238.
- Xia, Z., et al. (2017). "Influence of Lipid Content in a Corn Oil Preparation on the Bioaccessibility of beta-Carotene: A Comparison of Low-Fat and High-Fat Samples." *J Food Sci* 82(2): 373-379.
- Widjaja-Adhi, M., & Golczak, M. (2020). The molecular aspects of absorption and metabolism of carotenoids and retinoids in vertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11), 158571.
- Yuan, X., et al. (2019). "The gastrointestinal behavior of emulsifiers used to formulate excipient emulsions impact the bioavailability of beta-carotene from spinach." *Food Chem* 278: 811-819.
- Yao, K., et al. (2021). "In vitro and in vivo study of the enhancement of carotenoid bioavailability in vegetables using excipient nanoemulsions: Impact of lipid content." *Food Res Int* 141: 110162.
- Yi, J., et al. (2014). "The physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of beta-carotene in oil-in-water sodium caseinate emulsions." *Food Hydrocolloids* 35: 19-27.

- Yi, J., et al. (2015). "Effects of Lipids on in Vitro Release and Cellular Uptake of beta-Carotene in Nanoemulsion-Based Delivery Systems." *J Agric Food Chem* 63(50): 10831-10837.
- Zhang, R., et al. (2016). "Encapsulation of β -carotene in Nanoemulsion-Based Delivery Systems Formed by Spontaneous Emulsification: Influence of Lipid Composition on Stability and Bioaccessibility." *FoodBiophysics* 11(2): 154-164.
- Zumbado, C. (2018). *Efecto de diferentes fuentes y concentraciones lipídicas sobre labioaccesibilidad de los carotenoides en una matriz modelos de papaya y leche*. (Tesis de pregrado). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

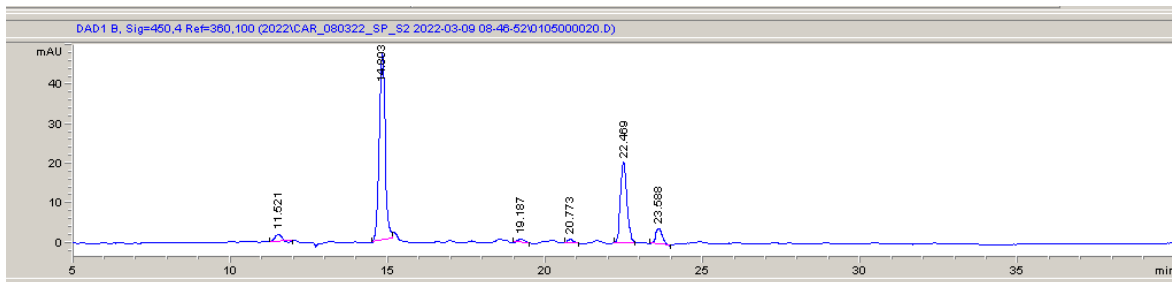
- ANEXOS

ANEXO A. Cromatogramas para las muestras de sobrenadante, filtrado y pellet, de acuerdo a la extracción por fluidos supercríticos en diferentes tipos de leche (entera, semidescremada y descremada).

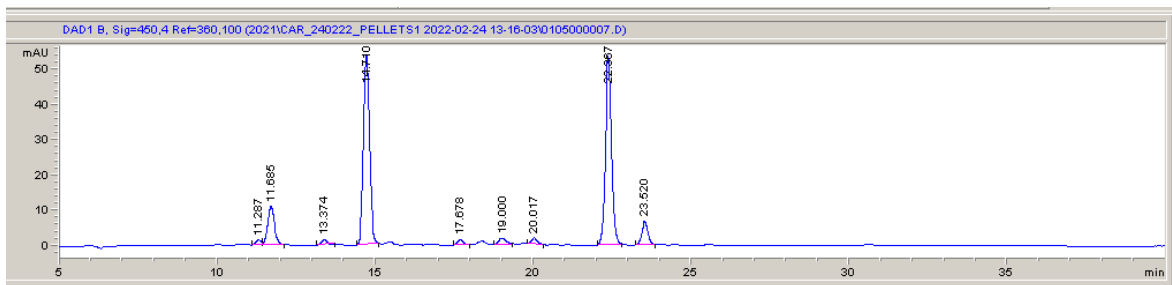
ANEXO A.1. Cromatograma leche entera, extracto por solventes, filtrado.



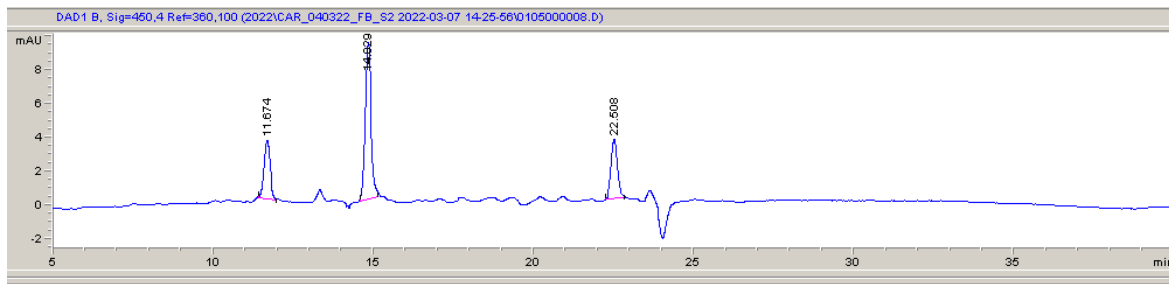
ANEXO A.2. Cromatograma leche entera, extracto por solventes, sobrenadante.



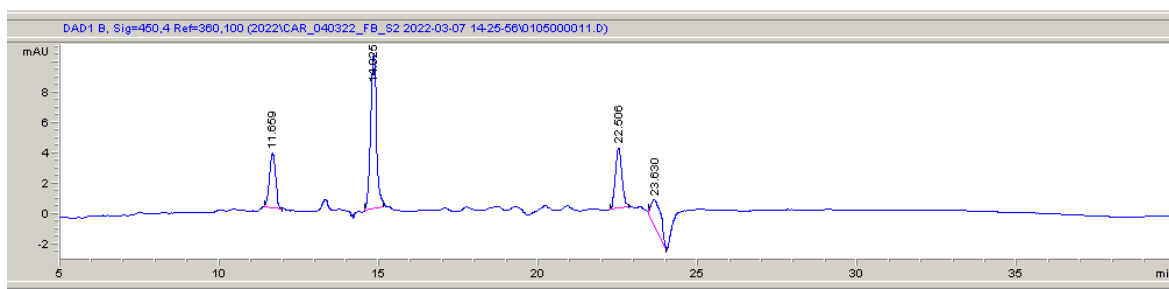
ANEXO A.3. Cromatograma leche entera, extracto por solventes, pellet.



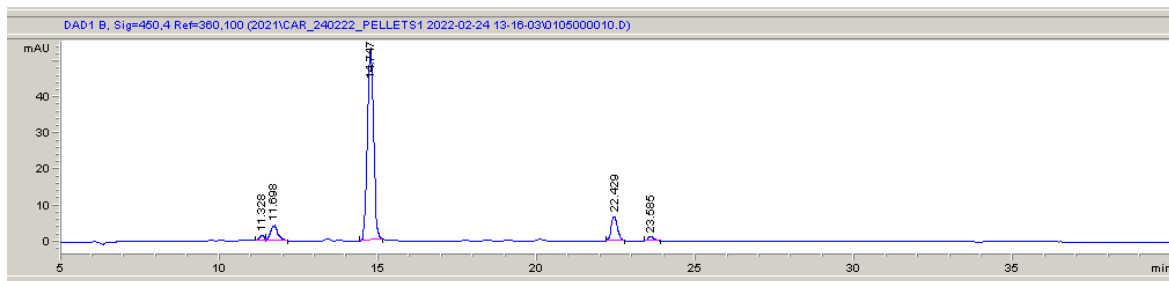
ANEXO A.4. Cromatograma leche entera, extracto fluidos supercríticos, filtrado.



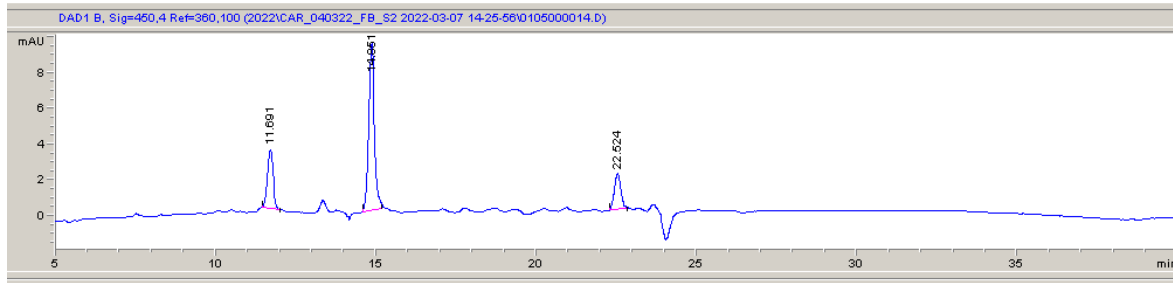
ANEXO A.5. Cromatograma leche entera, extracto fluidos supercríticos, sobrenadante.



ANEXO A.6. Cromatograma leche entera, extracto fluidos supercríticos, pellet.



ANEXO A.7. Cromatograma leche semidescremada, extracto fluidos supercríticos, filtrado.



ANEXO A.8. Cromatograma leche descremada, extracto fluidos supercríticos, filtrado.

