



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y formulación de sistemas liposomales como método de encapsulación

Magaly Elizabeth Tobar Delgado

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Administración
Departamento de Ingeniería
Palmira, Colombia

2022

Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y formulación de sistemas liposomales como método de encapsulación

Magaly Elizabeth Tobar Delgado

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de
Magister en ingeniería agroindustrial

Directora:

Ph.D Liliana Serna Cock

Codirectores:

Ph.D Harlen Torres Castañeda

M.Sc Cristhian Javier Yarce Castellanos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Administración
Departamento de Ingeniería
Palmira, Colombia

2022

A mis padres, Lilian Delgado y Libardo Tobar por su amor y su respaldo en cada nueva etapa, por educarme desde el ejemplo y brindarme las mejores oportunidades educativas a lo largo de mi proceso académico. A la memoria de mi abuelita Mimi, de quien recibí el ejemplo de perseverancia y valor por el trabajo, gracias por dejarme el mayor regalo de amor, mi familia.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre

Fecha 28/04/2022

Agradecimientos

Sistema General de Regalías y Fundación CEIBA por financiar y ejecutar el proyecto de becas "FORMACIÓN DEL TALENTO HUMANO DE ALTO NIVEL PARA EL FORTALECIMIENTO DE NECESIDADES ESTRATÉGICAS EN CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN EL DEPARTAMENTO NARIÑO" mediante el cual recibí el financiamiento académico.

Liliana Serna Cock, directora del trabajo de investigación y docente de la Universidad Nacional de Colombia, por el acompañamiento, disposición y asesoría en el desarrollo de la presente investigación.

Harlen Torres, codirector y docente de la Universidad Nacional de Colombia y Cristhian Yarce, codirector y docente de la Universidad ICESI por el apoyo y asesoría en el trabajo de investigación.

Constain Salamanca, docente de la Universidad de Antioquia por la asesoría en la formulación de sistemas de nanoencapsulación y liberación de compuestos activos.

Grupos de Investigación: Diseño y Formulación de Productos Químicos y Derivados de la Universidad ICESI, Investigación en Bacterias Ácido Lácticas y sus Aplicaciones Biotecnológicas e Industriales de la Universidad Nacional y Grupo de Apoyo a la Investigación y Desarrollo Agroalimentario de la Universidad de Nariño por el apoyo científico y las instalaciones donde se desarrolló la presente investigación.

Resumen

Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y formulación de sistemas liposomales como método de encapsulación

Los subproductos generados de la agroindustria alimentaria representan una fuente de fitonutrientes como los compuestos fenólicos, que pueden explorarse como bioactivos en la industria de productos naturales, generar valor agregado a los residuos y contribuir con las medidas de mitigación del impacto ambiental. Sin embargo, cuando los compuestos se extraen de la matriz de origen, son altamente susceptibles a la degradación por fenómenos fisicoquímicos. En este sentido, la presente investigación estudia la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos obtenidos a partir del cáliz de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y la formulación de sistemas liposomales como mecanismo de protección de la capacidad antioxidante. El desarrollo metodológico incluye la evaluación individual y optimización de los factores que intervienen en la extracción de compuestos fenólicos, extracción de flavonoles, evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* y cuantificación del flavonol rutina mediante HPLC. Por su parte, en el método de encapsulación, se optimizaron parámetros de formulación de sistemas liposomales respecto a las variables de respuesta diámetro de partícula y eficiencia de encapsulación, se realizó la caracterización de liposomas respecto índice de polidispersidad, potencial eléctrico, capacidad antioxidante (ORAC) y liberación *in vitro* de compuestos fenólicos.

La extracción durante 10 min con etanol acuoso (60%), el porcentaje de amplitud de onda (60%), la relación líquido sólido (40 mL/g) y el tamaño de partícula (210 μm) permitieron extraer flavonoles a partir del cáliz de *P. peruviana* (74.6 ± 1.4 mg ER/g), mientras que, en la optimización de la extracción de compuestos fenólicos, los factores: porcentaje de amplitud de onda (53%) relación líquido-sólido (32 mL/g) y tamaño de partícula (200 μm) maximizaron la respuesta (54.52 mg EAG/g). Se demostró la capacidad antioxidante del extracto mediante diferentes mecanismos de acción y se encontró una concentración de rutina de 18.932 mg/g.

Se comprobó que los sistemas liposomales formulados protegieron la capacidad antioxidante del extracto de cáliz de *P. peruviana*. Los resultados de la optimización y caracterización de los liposomas evidenciaron sistemas con una distribución monodispersa y un diámetro medio de partícula en el rango nanométrico, se obtuvo una eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos de 68.32%, y porcentaje de liberación *in vitro* de 81.32%.

Palabras clave: Residuos agroalimentarios, lecitina de soja, capacidad antioxidante, extracción, rutina, metodologías sostenibles, encapsulación de antioxidantes, sistemas coloidales, nanotecnología

Abstract

Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from golden berry calyx (*Physalis peruviana* L.) and liposomal systems as encapsulation method

Food waste is a source of phytonutrients such as phenolic compounds, food waste can be explored as bioactive in the natural products industry, increase added value to waste and contribute to environmental impact mitigation measures. However, when the compounds are extracted from the original matrix, they are highly susceptible to degradation by physicochemical mechanisms. Accordingly, the present investigation studies the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) calyx and the formulation of liposomal systems as a mechanism to protect antioxidant capacity. The methodological development includes the individual evaluation and optimization of the factors involved in the extraction of phenolic compounds, extraction of flavonols, evaluation of the antioxidant capacity in vitro and quantification of rutin flavonol by HPLC. On the other hand, in the encapsulation method, formulation parameters of liposomal systems were optimized with respect to the response variables: particle diameter and encapsulation efficiency, in addition, the characterization of liposomes was performed regarding polydispersity index, electrical potential, antioxidant capacity. (ORAC) and in vitro release of phenolic compounds.

Extraction for 10 min with aqueous ethanol (60%), wave amplitude (60%), liquid-solid ratio (40 mL/g) and particle size (210 μm) were the initial conditions for the extraction of flavonols from of the calyx of *P. peruviana* (74.6 ± 1.4 mg RE/g), while, in the optimization of the extraction of phenolic compounds, the factors: wave amplitude (53%) liquid-solid ratio (32 mL/g) and particle size (200 μm) maximized the response (54.52 mg EAG/g). The antioxidant capacity of the extract was determined through different mechanisms of action and a rutin concentration of 18,932 mg/g was found.

In addition, liposomal systems protected the antioxidant capacity of the *P. peruviana* calyx extract. The results of the optimization and characterization of the liposomes showed

systems with a monodisperse distribution and an average diameter of particles in the nanometric range, encapsulation efficiency of phenolic compounds of 68.32%, and percentage of in vitro release of 81.32%.

Keywords: food waste, soybean lecithin, antioxidant capacity, extraction, rutin, sustainable methodologies, antioxidant encapsulation, colloidal systems, nanotechnology

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Introducción	17
Objetivos	21
1. Marco teórico	23
1.1 <i>Physalis peruviana</i> L	23
1.2 Compuestos fenólicos	23
Flavonol Rutina	25
1.3 Extracción solido-líquido.....	26
1.3.1 Mecanismo de difusión en la extracción solido-liquido	26
1.4 Extracción asistida por ultrasonido	28
1.5 Capacidad antioxidante	30
1.6 Generalidades de los sistemas coloidales	32
1.7 Sistemas liposomales.....	33
1.7.1 Clasificación de los sistemas liposomales	34
1.7.2 Formulación de sistemas liposomales	35
1.7.3 Método de inyección de etanol	38
2. Estado del arte	40
2.1.1 Actividad biológica del cáliz de uchuva	41
2.1.2 Sistemas liposomales utilizados en la protección de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos.....	42
3. Extracción de flavonoles a partir de cáliz <i>Physalis peruviana</i> L.: Influencia de los parámetros de proceso y evaluación de la capacidad antioxidante	57
3.1 Materiales y métodos	58
3.1.1 Preparación del material vegetal.....	59

3.1.2	Reactivos	60
3.1.3	Comportamiento de los factores que afectan la extracción de compuestos fenólicos	60
3.1.4	Cuantificación del contenido fenólico (TPC)	62
3.1.5	Extracción de flavonoles y capacidad antioxidante	62
3.1.5.1	Cuantificación de flavonoles	63
3.1.5.2	Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	63
3.2	Resultados y discusión	66
3.3	Conclusiones	79
4.	Optimización de parámetros de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz <i>P. peruviana</i>	82
4.1	Introducción	87
4.2	Materiales y métodos	89
4.2.1	Reactivos y materia prima	89
4.2.2	Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos	89
4.2.2	Identificación y cuantificación de Rutina mediante HPLC-DAD	90
4.3	Resultados y discusión	90
4.5	Conclusiones	100
5.	Encapsulación de un extracto fenólico de cáliz de <i>Physalis peruviana</i> L. en sistemas liposomales	105
5.1	Materiales y métodos	106
5.1.1	Reactivos y materias primas	107
5.1.2	Formulación de liposomas libres de material encapsulado	107
5.1.3	Formulación de sistemas liposomales cargados con extracto de <i>Physalis p</i>	109
5.1.5	Caracterización de liposomas cargados con el extracto de <i>Physalis p</i>	111
5.1.6	Ensayo de liberación <i>In vitro</i> de compuestos fenólicos	111
5.1.7	Evaluación preliminar de estabilidad	113
5.2	Resultados y discusión	113
5.3	Conclusiones	134
Anexos		142

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Morfología de <i>Physalis peruviana</i> L.	23
Figura 1-2. Clasificación general de compuestos fenólicos.....	25
Figura 1-3. Estructura química rutina.....	26
Figura 1-4. Componentes asociados al proceso de difusión de compuestos bioactivos.	27
Figura 1-5. Fenomeno de cavitación cerca de una superficie sólida.....	30
Figura 1-6. Clasificación de sistemas liposomales.....	35
Figura 1-8. Enfoques de formulación de sistema liposomales	38
Figura 3-1. Curva de extracción de compuestos fenólicos.....	67
Figura 3-2. Efecto del tiempo de sonicación, Amplitud, Relación líquido- sólido sobre el contenido fenólico	70
Figura 3-3. Efecto del tamaño de partícula, Tipo de solvente, Concentración de etanol sobre el contenido fenólico	70
Figura 3-4. Análisis de correlación	79
Figura 4-1. Superficie de respuesta. Comportamiento de las variables amplitud de onda y tamaño de partícula.....	94
Figura 4-2. Superficies de respuesta. Comportamiento de las variables relación líquido- sólido y amplitud de onda.....	95
Figura 4-3. Factores optimizados para en la extracción asistida por ultrasonido.....	96
Figura 4- 4. Cromatograma. Elución del compuesto Rutina (Qercetin 3-glucoside)	98
Figura 5-1. Potencial eléctrico y diámetro de partícula en la formulación de sistemas liposomales libres de material encapsulado	114
Figura 5-2. Superficie de respuesta. Comportamiento de los factores concentración de lecitina y concentración de extracto de <i>P. peruviana</i> en la formulación de sistemas liposomales	119

Figura 5-3. Superficie de respuesta. Comportamiento de los factores concentración de extracto de <i>P. peruviana</i> y tiempo de sonicación en la formulación de sistemas liposomales.....	120
Figura 5- 4. Superficie de respuesta. Comportamiento de los factores concentración de extracto de <i>P. peruviana</i> y concentración de lecitina en la formulación de sistemas liposomales.....	122
Figura 5- 5. Potencial eléctrico, diámetro medio de partícula e índice de polidispersidad	126
Figura 5-6. Intensidad de fluorescencia para el extracto de <i>P. peruviana</i> libre y encapsulado en sistemas liposomales	127
Figura 5-7. Comportamiento de liberación de compuestos fenólicos.....	130
Figura 5-8. Evaluación preliminar estabilidad al almacenamiento a 4 °C.....	132
Figura 5- 9. Comportamiento de la capacidad antioxidante durante 10 días de almacenamiento a 4 °C.....	134

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1- 1. Análisis proximal y contenido mineral de subproductos de <i>P. peruviana</i>	24
Tabla 1- 2. Métodos de análisis de la capacidad antioxidante en relación al mecanismo de reacción asociado.....	32
Tabla 2-1. Estudios de actividad biológica del cáliz de <i>P. peruviana</i>	40
Tabla 2-2. Investigaciones realizadas en la formulación de sistemas liposomales para la encapsulación de compuestos fenólicos.....	41
Tabla 3-1. Diseños experimentales unifactoriales (DAC) para la extracción de compuestos fenólicos mediante ultrasonido	61
Tabla 3-2. Diseño experimental factorial para la extracción de compuestos flavonoles y capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	63
Tabla 3-3. Contenido de flavonoles en extractos de cáliz de <i>P. peruviana</i> . Efecto de la amplitud de onda, relación líquido-sólido y tamaño de partícula.....	73
Tabla 3- 4. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos de cáliz de <i>P. peruviana</i>	75
Tabla 4- 1. Diseño Box-Behnken para la optimización de la extracción de compuestos fenólicos mediante la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz <i>P. peruviana</i>	91
Tabla 4- 2. Concentración de Rutina en el extracto de cáliz de <i>P. peruviana</i>	99
Tabla 5- 1. Diseño experimental unifactorial (DAC).....	108
Tabla 5- 2. Diseño Box-Behnken para la encapsulación del extracto de <i>P. peruviana</i> en sistemas liposomales mediante la técnica de inyección de etanol.....	116
Tabla 5- 3. Valores promedio de deseabilidad prevista vs observada para las variables respuesta diámetro de partícula y eficiencia de encapsulación	124

Tabla 5- 4. Validación experimental bajo las condiciones óptimas de formulación de sistemas liposomales cargados con extracto de *P. peruviana* respecto al diámetro medio de partícula y la eficiencia de encapsulación 125

Introducción

Los objetivos de desarrollo sostenible de las Naciones Unidas buscan reducir a la mitad el desperdicio de alimentos para el año 2030 (FAO, 2022); en este sentido, diferentes líneas de investigación contribuyen a la búsqueda de alternativas sostenibles para el aprovechamiento de residuos, entre estas, la extracción de compuestos bioactivos mediante metodologías no convencionales y el diseño de métodos de encapsulación que protejan la actividad biológica de los compuestos son estrategias de gran pertinencia para la investigación en este campo (Etzbach *et al.*, 2018).

Los residuos agrícolas y alimentarios son el principal desperdicio orgánico generado en todo el mundo (Suang *et al.*, 2020). La cifra en volumen de desperdicio de alimentos a nivel mundial alcanzó 1.300-1.400 millones de toneladas en el año 2020, lo cual corresponde al 6%-10% de las emisiones antropogénicas de gases efecto invernadero (Teigiserova *et al.*, 2020). A nivel nacional, las cifras de residuos agroalimentarios en el año 2017 fueron de 9.76 millones de toneladas, de las cuales 3.55 millones se originaron en la comercialización de alimentos durante su clasificación o ajustes a normativas y 6.22 millones de toneladas se generaron en otras etapas de la cadena productiva (Gaviria, *et al.*, 2016).

Se estima que entre el 7%-13% del costo total de la producción agrícola se estaría desaprovechando por no generar valor agregado a materiales que resultan después de la cosecha o comercialización, entre estos, los residuos hortofrutícolas representan una oportunidad para la extracción de compuestos de interés industrial como los antioxidantes (Galanakis, 2012). La valorización de subproductos agroalimentarios en Colombia tiene relevancia por la amplia biodiversidad del país que permite el cultivo de frutales exóticos de alto valor nutricional y biocompuestos presentes en diferentes partes de la planta como raíz, hojas, piel y semillas (Contreras *et al.*, 2011).

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) es un frutal exótico originario de Sur América, y, mayormente cultivado en países como Brasil, Colombia, Perú India y Nueva Zelanda (Etzbach *et al.*, 2018). *P. peruviana* tiene un amplio potencial económico debido a las características nutricionales del fruto que se destaca por su actividad biológica y beneficios para la salud tales como antiinflamatorios, inmunomoduladores, hepatoprotectores, antiglicémicos y anticolesterolémicos (Olivares *et al.*, 2016; Puente *et al.*, 2011; Ramadan,

2011). Lo anterior es de interés en la investigación relacionada con las condiciones de cultivo, extracción y caracterización de biocompuestos. En este sentido, se evidencia una tendencia creciente el número de publicaciones relacionadas con *P. peruviana* durante los últimos años desde diferentes áreas de estudio (Abou Baker & Mohammed, 2022; Avendaño *et al.*, 2022; El-Sawi *et al.*, 2022; Gad *et al.*, 2022; Krstić *et al.*, 2023)

En Colombia, la cadena productiva de la uchuva es una de las líneas hortofrutícolas con mayor crecimiento, cuenta con un área total cultivada de 1.700 ha con rendimientos de producción de 12.4 ton/ha (MADR, 2019). Estas cifras ubican al país como el primer exportador de uchuva con un volumen anual de 6.000 Ton exportadas (MADR, 2019; Popova *et al.*, 2021). Morfológicamente, los frutos *P. peruviana* están cubiertos por un cáliz formado por sépalos que los protegen de amenazas externas y se debe retirar para cualquier fin comercial, por lo tanto, representa un residuo agroalimentario.

El cáliz de *P. peruviana* corresponde al 7% del peso total del fruto, lo cual genera aproximadamente 0.5 toneladas de cáliz por cada hectárea cultivada. El cáliz y otras partes no comestibles de la planta se reconocen en la medicina tradicional por diferentes actividades biológicas. Investigaciones como la de (Ballesterro *et al.*, 2019a; Olivares *et al.*, 2016) demostraron que el cáliz de *P. peruviana* es una fuente importante de compuestos bioactivos como ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres de sacarosa, terpenoides, fitosteroles vitamina E. Otros estudios evaluaron la actividad antiinflamatoria del cáliz en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (Cardona *et al.*, 2021; Castro *et al.*, 2015). Sin embargo, la extracción de los compuestos bioactivos a partir de cáliz de *P. peruviana* continúa siendo a través de tecnologías convencionales con solventes contaminantes, se evidencia escasa investigación en el desarrollo de sistemas de encapsulación y su aplicación industrial es limitada. Como se conoce, los compuestos experimentan procesos de degradación a causa del del oxígeno, el calor, la luz, y la humedad cuando se extraen de su matriz de origen, sumado a esto, la incorporación directa de los compuestos a otras matrices como las alimentarias, pueden producir defectos fisicoquímicos y organolépticos del producto final (Kowalska *et al.*, 2017).

De otro lado, los liposomas son una herramienta potencial para desarrollar sistemas de entrega de ingredientes activos con el objetivo de proteger la actividad biológica facilitar la

incorporación en aplicaciones posteriores (Dasgupta *et al.*, 2015). La encapsulación en liposomas puede mejorar la estabilidad y rendimiento funcional debido a la característica anfipática propia de los fosfolípidos que conforman estructura liposomal facilitando el atrapamiento de compuestos hidrofílicos y lipofílicos (Harwansh *et al.*, 2019; Villena de Francisco & García, 2018). En efecto, aunque los liposomas surgieron como un método de entrega de fármacos, a la fecha se evidencian gran interés de estudio en el sector alimentario (Liu *et al.*, 2020) y cosmético (Figueroa *et al.*, 2021), los liposomas se consideran sistemas estables y adecuados para encapsular vitaminas, antioxidantes, conservantes o nutracéuticos, además se pueden formular con ingredientes de origen natural como las lecitinas, cuya característica los hace seguros y biocompatibles. (Singh *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta el potencial bioactivo del cáliz de uchuva, su disponibilidad y fácil acceso, se convierte en una fuente de extracción sostenible de fitonutrientes, por lo tanto, es necesario investigar en la formulación de sistemas de encapsulación que aseguren la actividad biológica del extracto y aporte como alternativa para posteriores aplicaciones industriales. Además, recuperar compuestos fenólicos presentes en el cáliz de *P. peruviana* a través de una técnica de extracción emergente, no solo brinda una alternativa al uso inexplorado de este material, sino que también, se promueve la dinamización de la cadena productiva, beneficiando a productores primarios, industria y consumidores, se genera oportunidad de participación en el mercado de productos saludables, producción de nuevos sistemas con valor agregado y se contribuye a reducir el impacto ambiental ocasionado tanto por los residuos agroindustriales como por solventes tóxicos utilizados en procesos de extracción convencionales.

En este contexto, la presente investigación estudia la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáliz de *P. peruviana* utilizando la metodología asistida por ultrasonido y la formulación de sistemas liposomales como medio de protección de la actividad antioxidante.

Para abordar la temática anteriormente descrita, este documento comprende cinco capítulos. En los capítulos 1 y 2 se presenta el marco teórico y estado del arte, escritos con base en la búsqueda bibliográfica de actualidad para el tema de estudio. En el capítulo 3 se presenta un acercamiento general hacia el comportamiento de las variables

implicadas en la extracción de compuestos fenólicos asistida por ultrasonido, para ello, se presenta un análisis del comportamiento individual mediante diseños unifactoriales de las variables que intervienen en el proceso tales como: tiempo de sonicación, amplitud de onda, relación líquido-sólido, tamaño de partícula, tipo y concentración de solvente), posteriormente se realizó la extracción de compuestos flavonoles y la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* mediante los análisis DPPH, ABTS, FRAP, ORAC. En el capítulo 4 se presenta la optimización de los parámetros de extracción de compuestos fenólicos obtenidos a partir de cáliz de *P. peruviana* y la identificación y cuantificación del flavonol rutina mediante análisis HPLC-DAD. Finalmente, en el capítulo 5 se describe la encapsulación del extracto vegetal en sistemas liposomales y su caracterización respecto al diámetro medio de partícula, índice de polidispersidad, potencial eléctrico, capacidad antioxidante y liberación *in vitro* de compuestos fenólicos.

Objetivos

Objetivo general

Determinar condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáliz de *P. peruviana* L. y evaluar sistemas liposomales para la protección de la actividad antioxidante del extracto obtenido.

Objetivos específicos

- Extraer y cuantificar compuestos flavonoles a partir de cáliz de *P. peruviana* empleando la metodología asistida por ultrasonido y evaluar la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP, ORAC).
- Optimizar el proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz de *P. peruviana* respecto a las condiciones del sólido (tamaño de partícula) y variables de operación (porcentaje de amplitud de onda, relación líquido-sólido).
- Proteger la actividad antioxidante de compuestos fenólicos extraídos de cáliz de *P. peruviana* mediante la encapsulación en sistemas liposomales.

Hipótesis

- La metodología asistida por ultrasonido permite la extracción de flavonoles con capacidad antioxidante a partir del cáliz de *P. peruviana*
- La optimización de los factores: porcentaje de amplitud de onda, relación líquido-sólido y tamaño de partícula en la metodología asistida por ultrasonido permite maximizar la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáliz de *P. peruviana*
- La encapsulación de sistemas liposomales protege la actividad antioxidante del extracto de *P. peruviana*.

1. Marco teórico

1.1 *Physalis peruviana* L.

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) es originaria de los Andes suramericanos, principalmente de Perú, Colombia y Ecuador, pertenece a la familia de las *Solanaceae* y el género *Physalis* (Nuñez *et al.*, 2014). Inicialmente la planta crece de forma herbácea y posteriormente, forma un arbusto perenne, se adapta a zonas ubicadas sobre 1500 msnm, temperaturas entre los 12 °C y 18 °C y condiciones de humedad promedio de 70% a 80% (Bravo *et al.*, 2011). La planta produce un fruto jugoso de color amarillo anaranjado de 1 cm a 2 cm de diámetro encerrado en un cáliz formado por cinco sépalos, este material cubre completamente el fruto durante su etapa de desarrollo y representa una fuente de compuestos bioactivos, como flavonoides y ácidos grasos (Medina *et al.*, 2017; Monkad *et al.*, 2017).

Figura 1-1. Morfología de *Physalis peruviana* L. Imagen reportada por el Departamento de Botánica Fanerogámica del Museo Sueco de Historia Natural <http://linnaeus.nrm.se/botany/fbo/p/physa/physper.html>



La búsqueda bibliográfica relacionada con los frutos de *P. peruviana* evidencia importante actividad biológica derivada de compuestos como kaempferol, quercetina di y triglicósidos (Stein *et al.*, 2019), withanolidos saponinas (Dong *et al.*, 2019), a los que se les confiere características hipoglucemiantes (Rey *et al.*, 2015), antiinflamatorias, antiproliferativa (Sang *et al.*, 2016) contra células de cáncer de colon (Zavala *et al.*, 2006), líneas renales (Sang *et al.*, 2016) y capacidad antioxidante (Hassan *et al.*, 2017).

Aunque los estudios relacionados con *P. peruviana* están enfocados en los frutos; los subproductos generados a partir de la producción, transformación y comercialización de *P. peruviana* como el cáliz han sido caracterizado en las investigaciones de Wahdan *et al.* (2019) y Nocetti *et al.* (2020) donde reportaron componentes nutricionales como minerales, aminoácidos, proteínas (Tabla 1-1).

Tabla 1-1. Análisis proximal y contenido mineral de subproductos de *P. peruviana*

Componentes Análisis proximal (g/Kg⁻¹)	Cáliz	Hojas	Semillas
Ceniza	97.0	8.3	28.4
Grasa cruda	21.0	0.3	146.3
Fibra	420.0	3.5	315.2
Humedad	72.0	756.1	39.2
Proteína cruda	61.0	56.1	145.8
Carbohidratos	320.0	175.6	325.1
Calcio (Ca)	0.08	0.09	-
Hierro (Fe)	0.01	0.41	-
Cobre (Cu)	<0.01	<0.01	-
Cinc (Zn)	<0.01	0.02	-

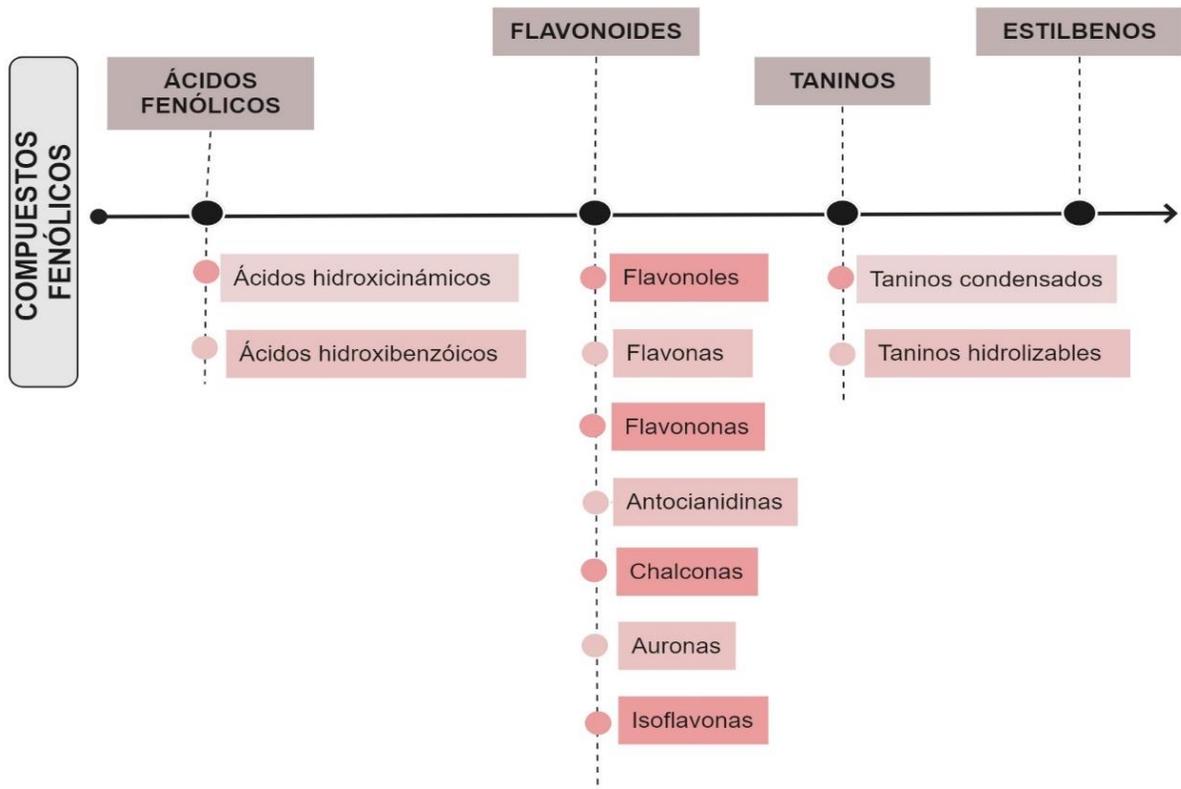
1.2 Compuestos fenólicos

Como resultado del metabolismo secundario de las plantas, los compuestos fenólicos son un tipo de fitoquímicos presentes en semillas, hojas, tallos y frutos de muchas especies vegetales y sirven como agentes protectores frente amenazas externas como las plagas. Los compuestos fenólicos aportan características organolépticas a las especies vegetales y se caracterizan por causar el sabor amargo en algunos frutos; así mismo, la actividad biológica de estos metabolitos frente a diferentes patologías humanas se ha demostrado a nivel *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Arruda *et al.*, 2020).

Estructuralmente, los compuestos fenólicos están formados por anillos aromáticos acoplados a grupos hidroxilo que se presentan como glucósidos o agliconas en conjugados con mono y polisacáridos. De acuerdo a la posición y ramificación de los anillos aromáticos, los compuestos fenólicos se agrupan en ácidos fenólicos, fenoles simples, flavonoides y derivados del ácido hidroxicinámico dando lugar a una gran cantidad de configuraciones

estructurales científicamente identificadas (Alara *et al.*, 2021). En la Fig.1-2 se presenta una clasificación general de los compuestos fenólicos.

Figura 1-2. Clasificación general de compuestos fenólicos



1.2.1 Flavonol Rutina

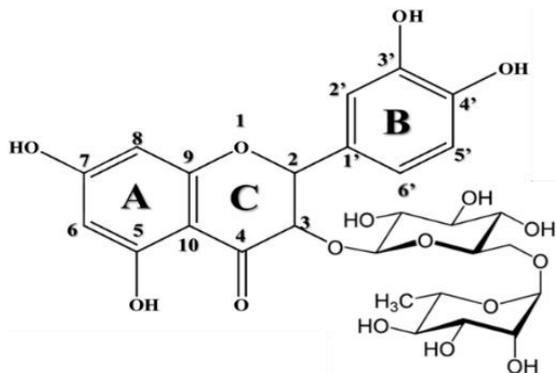
La rutina (3', 4', 5, 7-tetrahidroxi-flavona-3-rutinósido) también conocida como vitamina P, rutósido, quercetina-3-O-rutinósido y sophorina, es un flavonol que se detectó por primera vez en Ruda (*Ruta graveolens*), sin embargo, se encuentra naturalmente en semillas, hojas y frutos de algunas especies vegetales. En la investigación realizada por Baldisserotto *et al.* (2015), se reportó que la ruta de síntesis de la rutina es a través de la vía fenilpropanoide.

La rutina es reconocida por su alta capacidad antioxidante, es un compuesto capaz de neutralizar y atrapar radicales oxidantes como el radical hidroxilo, anión superóxido y

peroxilo, y quelar metales de transición debido a su geometría no plana compuesta por la aglicona flavonólica quercetina, un esqueleto de difenilpirano con un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo disacárido rutinosa en la posición 3 (Fig. 1-3). Esta configuración estructural le permite promover su interacción con los cationes metálicos (Sghaier *et al.*, 2016; Chua, 2013; Sharma *et al.*, 2013). Así mismo, se le atribuye la capacidad de inhibir la enzima xantina oxidasa, involucrada en la síntesis de especies reactivas de oxígeno (Chua, 2013).

Fisicoquímicamente, la rutina tiene un peso molecular de 610.518 g/mol, pKa de 4.3 y valor de log P de -1.97 medido en acetonitrilo a 50 °C. Es soluble en sustancias como piridina, etanol y metanol y presenta baja solubilidad en agua (0.13 mg /1 mL) (Chebil *et al.*, 2007). La baja solubilidad en agua de este compuesto está relacionada con las estructuras de los anillos, los cuales son muy grandes para ser absorbidos por un proceso de difusión simple, además la rutina tiene poca miscibilidad con los lípidos, lo que impide que pase fácilmente a través de membrana celulares ricas en lípidos dificultando los procesos de aplicabilidad respecto a este compuesto (Ravi *et al.*, 2018).

Figura 1-3. Estructura química rutina



1.3 Extracción sólido-líquido

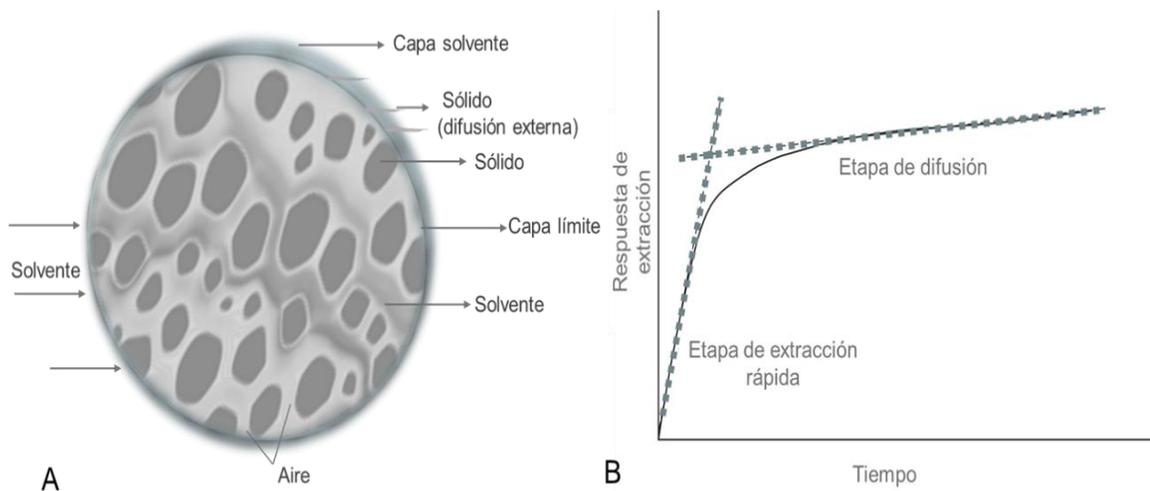
En la extracción de componentes bioactivos a partir de materiales vegetales existen tres métodos característicos: destilación (comúnmente utilizada para extraer aceites esenciales), extracción por solventes y compresión.

La extracción por solventes se realiza mediante procesos como la percolación, maceración o infusión; sin embargo, para conseguir mayores resultados de extracción, en algunos casos se requiere el uso de solventes orgánicos y tiempos prolongados de proceso (Belwal *et al.*, 2018). En general, todos los mecanismos tienen como principio de operación la transferencia de masa del sólido al líquido.

Mecanismo de difusión asociado a la transferencia de masa en la extracción sólido-líquido

En base a parámetros empíricos ampliamente demostrados, el proceso de extracción de compuestos a partir de materiales vegetales se presenta como un proceso de difusión molecular (Chan *et al.*, 2014). En la Fig. 1-4A se presenta un esquema de la matriz vegetal con los componentes que integran su estructura y el medio que la rodea (solvente).

Figura 1-4. A. Componentes asociados al proceso de difusión en la extracción de compuestos; **B.** Principales etapas asociadas al proceso de extracción.



El proceso de extracción tiene un comportamiento definido a través de dos momentos, el primero corresponde a una etapa de extracción rápida y posteriormente una etapa de extracción lenta o etapa de difusión como se presenta en la Fig. 1-4B.

El mecanismo comienza cuando el solvente cubre el material vegetal seco, de acuerdo al tipo de solvente, concentración y mezclas de solvente-agua en esta etapa se aporta humedad para hidratar la mezcla sólido líquido y provoca el contacto del solvente con la matriz interna del material vegetal (Oreopoulou *et al.*, 2020). En este punto, es importante

el gradiente de concentración de los compuestos a extraer de la matriz vegetal y la solubilidad de los mismos en el solvente utilizado. Al inicio se presenta una tasa de extracción constante de los compuestos que están disponibles en la capa externa del material, donde se encuentran las células que sufrieron mayor degradación o ruptura en procesos previos como la reducción del tamaño de partícula (Milićević *et al.*, 2021).

Posteriormente, en la etapa de extracción lenta, mediante un proceso de difusión, los compuestos que se encuentran en el interior de la matriz se disuelven en el solvente, en esta etapa, el aporte de energía externa y la solubilidad de los compuestos contribuyen con el rendimiento de extracción. El proceso de transferencia de masa termina cuando la concentración del soluto en el solvente y en la fase sólida están en equilibrio (Ali *et al.*, 2018). El análisis matemático para representar el proceso de extracción se realiza mediante diferentes modelos matemáticos que se acoplan a los procesos de transferencia de masa.

1.4 Extracción asistida por ultrasonido

Con base en los principios de la extracción convencional, surgen tecnologías emergentes como el ultrasonido para una extracción asistida, en la cual, el ultrasonido aporta energía externa para mejorar la transferencia de masa (Dzah *et al.*, 2020a) y reducir el uso de solventes contaminantes y los tiempos de proceso.

Los primeros informes de aplicación de ultrasonidos se presentaron en 1950 para intervenir el proceso de elaboración de cerveza. El uso de ultrasonido redujo en 40% la cantidad de lúpulo conservando la misma calidad (Specht & Lebensm 1952). El auge de los ultrasonidos ocurrió como un enfoque químico para lograr la ruptura celular, de tal manera que los equipos a nivel de laboratorio se empezaron a comercializar rápidamente a partir del año 1980 (Dzah *et al.*, 2020).

Principio de funcionamiento del ultrasonido en la extracción sólido-líquido

El sonido y el ultrasonido se diferencian por la frecuencia de onda. Los rangos de frecuencia se dividen en tres categorías: ondas audibles que se encuentran dentro del

rango de sensibilidad del oído humano (10 Hz – 20 kHz), ondas infrasónicas, las que tienen frecuencias por debajo del rango audible (<10 Hz) y las ondas ultrasónicas que tienen frecuencias superiores al rango audible (> 20 kHz) y menores que las frecuencias de microondas (hasta 10 MHz).

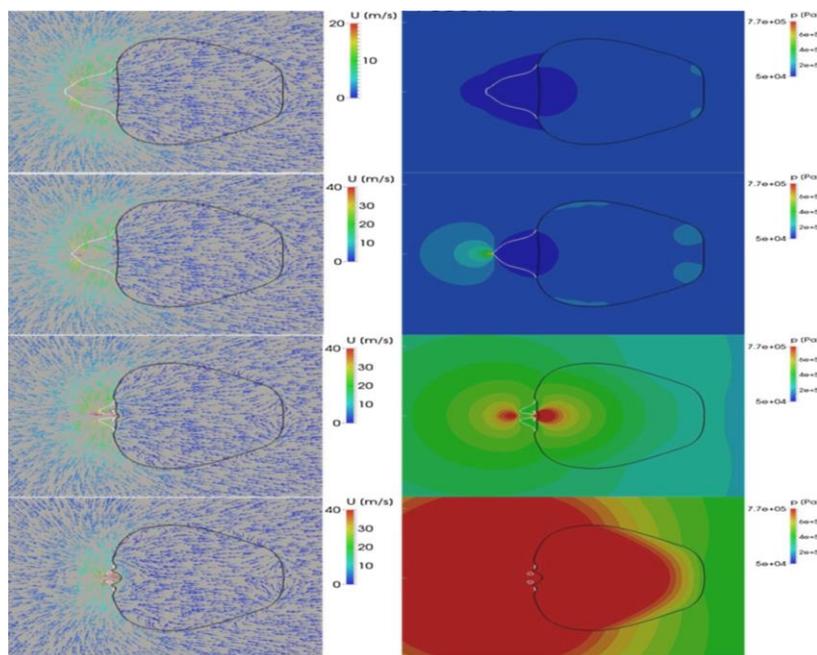
Por tratarse de una onda sonora, el ultrasonido se propaga mediante ondas formando ciclos de compresión y rarefacción inducidos en las moléculas del medio por el que pasan a una potencia suficientemente alta, estos ciclos pueden exceder las fuerzas de atracción de las moléculas del líquido y se formarán burbujas de cavitación (Mason *et al.*, 2005).

La palabra cavitación derivada del latín *cavus*, significa cavidad y se refiere a la formación de burbujas a partir de gases y/o vapores en fluidos. Las burbujas que se generan en un líquido son simétricas e implotan en sucesivos ciclos de compresión también simétricos, como resultado de esto, se generan puntos localizados de alta temperatura y presión (~4726 °C y ~2000 atm) (Vinatoru, 2015).

Otro mecanismo asociado a las burbujas de cavitación, se presenta cuando estas burbujas implotan cerca de una superficie sólida (pared del recipiente, o cualquier partícula suspendida en el líquido), y se deforman mediante un colapso asimétrico que les confiere una deformación en forma de tornillo, con el colapso asimétrico se forma un chorro a alta velocidad (> 400 km/h) “micro-jet” que impacta contra la pared y puede causar ruptura de las partículas sólidas, lo cual permite la migración de compuestos que se encuentran en el interior de las partículas como se presenta en la Figura. 1-5 (Dzah *et al.*, 2020).

El fenómeno de cavitación es el principio más importante en la extracción de compuestos asistida por ultrasonido, puesto que las partículas en suspensión promueven el colapso asimétrico de las burbujas, lo que genera chorros de solvente hacia las partículas que impulsan una extracción más eficiente del soluto. Por lo tanto, la potencia acústica aplicada debe ser lo suficientemente grande para superar el umbral de cavitación, de esta manera, se mejora la tasa de extracción inicial, y también la tasa de extracción por difusión y se reduce la barrera o la resistencia a la transferencia de masa (Vinatoru *et al.*, 2017).

Figura 1-5. Proceso secuencial de implosión de las burbujas de cavitación cerca de una superficie sólida. Adaptado de (Roohi *et al.*, 2019).



Es importante considerar que en el proceso de extracción, el vapor del solvente y los gases disueltos en el solvente están expuestos a las condiciones extremas generadas por el colapso de burbujas de cavitación, de tal manera que si no se estandariza el proceso, se puede presentar división homolítica de las moléculas de agua y generar especies reactivas HO \cdot en pequeñas proporciones así como también átomos de hidrógeno que promueven la formación de H $_2$ O $_2$ y otros agentes oxidantes (Vinatoru et al., 2017).

1.5 Capacidad antioxidante

Como mecanismo de defensa natural, las enzimas antioxidantes, glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa se producen durante el metabolismo y funcionan para proteger a las células del estrés oxidativo. Sin embargo, existen antioxidantes naturales como los compuestos fenólicos que pueden limitar la acción de las especies reactivas del oxígeno a través de diferentes mecanismos como la capacidad de transferir electrones a los radicales libres, quelar catalizadores metálicos potencialmente pro-oxidantes (Fe $^{2+}$, Al $^{3+}$, Cu $^{2+}$), activar enzimas antioxidantes, reducir los radicales alfa-tocoferol e inhibir las oxidasas (Genestra, 2007).

La configuración estructural de los compuestos fenólicos tiene relevancia para eliminar las especies reactivas del oxígeno pues los grupos hidroxilo en el anillo B donan hidrógeno y un electrón a los radicales hidroxilo, peróxilo y superóxido peroxinitrito, estabilizándolos y dando lugar a un radical fenólico relativamente estable (Heim *et al.*, 2002). De acuerdo a las reacciones involucradas, los ensayos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos antioxidantes se pueden clasificar en dos tipos: ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en transferencia de electrones (SET) (Prior, 2015).

La mayoría de los ensayos basados en HAT aplican un esquema de reacción competitivo, el antioxidante (ArOH) reacciona con los radicales libres ($X\cdot$) y se convierte en un radical libre ($ArO\cdot$) mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno a través de la ruptura homolítica del enlace OH. Los ensayos basados en SET miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante (Marín, 2019). En la transferencia de electrones (SET) del antioxidante ArOH a un radical libre $X\cdot$ con la formación de un catión radical estable ($ArOH^{+\cdot}$), la estabilización de los radicales fenoxi resultantes, $ArO\cdot$ y $ArOH^{+\cdot}$, es un resultado de la deslocalización de su electrón desapareado sobre el anillo aromático por resonancia o por efectos de hiperconjugación (Munin & Edwards-Lévy, 2011).

Si bien el resultado final de los dos mecanismos puede ser el mismo, la cinética y la dependencia de las condiciones del sistema, especialmente el solvente y el pH, varían. La transferencia de electrones es muy rápida, no está controlada por difusión y aumenta con el pH a medida que la ionización aumenta la disponibilidad de electrones (Phaniendra *et al.*, 2015). La transferencia de átomos de hidrógeno, por el contrario, se ralentiza considerablemente por la difusión; es independiente del pH, pero fuertemente mejorada por el agua e inhibida por disolventes de enlace de hidrógeno como los alcoholes. Estas diferencias en realidad tienen impactos críticos sobre cómo actúan los antioxidantes en sistemas multifásicos complejos. En la Tabla 1-2 se relacionan los análisis de capacidad antioxidante de acuerdo al mecanismo asociado.

Tabla 1-2. Métodos de análisis de la capacidad antioxidante en relación al mecanismo de reacción asociado

Ensayos que involucran reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno

ORAC (capacidad de absorbancia de radicales peróxilo)

TAP (Parámetro antioxidante de captura total de radicales)

IOU (absorción de oxígeno inhibida)

Inhibición de la oxidación del ácido linoleico

Inhibición de la oxidación LDL inducida

Ensayos que involucran la reacción de transferencia de electrones (SET)

TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox)

FRAP (parámetro antioxidante reductor de iones férricos)

DPPH (radical difenil-1-picrilhidrazilo)

Particularmente, el método ORAC es relevante porque utiliza una fuente de radicales libres con importantes implicaciones biológicas (radical peróxilo) que es el radical libre prevalente en la biología humana. Sin embargo, otros radicales libres pueden ser igualmente importantes. El ensayo ORAC considera tanto el tiempo de inhibición como el grado de inhibición de la acción de los radicales libres causada por los antioxidantes. Otras ventajas del ensayo ORAC incluyen: automatización para un alto rendimiento; es adaptable para numerosas matrices de muestras, incluidos plasma, tejidos, alimentos, etc, y es capaz de analizar antioxidantes no proteicos usando ácido perclórico, sulfato de amonio o acetona en el procedimiento de extracción (Silva, 2021).

El método ORAC se basa en la inhibición antioxidante de la oxidación inducida por radicales peróxilo de una sonda, donde los radicales peróxilo se generan por la descomposición térmica de azocompuestos, como el 2,2-azobis (2-amidino-propano) diclorhidrato (AAPH). En el ensayo, el radical peróxilo terciario derivado del AAPH reacciona con una sonda fluorescente para formar un producto no fluorescente, que puede cuantificarse fácilmente por fluorescencia (Guido *et al.*,2016).

La degradación de la sonda fluorescente se ralentiza en la mezcla de reacción cuando los antioxidantes reaccionan con los radicales peróxilo derivados del AAPH. Por lo tanto, la

capacidad antioxidante se determina mediante una disminución en la velocidad y la cantidad del producto no fluorescente formado con el tiempo. Prior y sus colaboradores desarrollaron y validaron un ensayo ORAC mejorado que utiliza fluoresceína (FLH) como sonda fluorescente (Prior, 2015).

1.6 Generalidades de los sistemas coloidales

La autoorganización de los sistemas coloidales es un fenómeno ampliamente observado en la naturaleza y la ingeniería. La escala de los sistemas coloidales es menor de mm, donde los efectos de la viscosidad y la tensión superficial del fluido son significativos en comparación con los efectos de la inercia y la gravedad (Fujita & Yamaguchi, 2010).

Las partículas coloidales, cuyos tamaños varían de nanómetros a micrómetros, experimentan un movimiento browniano (tienen patrones de movimiento de tipo aleatorio) en un fluido bajo la influencia del movimiento térmico de las moléculas del fluido. Las partículas coloidales están influenciadas no sólo por la interacción hidrodinámica sino también por interacciones electrostáticas, de Van der Waals y de contacto entre las partículas, dado que la distancia entre las partículas disminuye (Atzberger, 2006). Como resultado de la combinación de las interacciones anteriores, las partículas coloidales experimentan una formación de estructura autónoma que se llama autoorganización, la cual se refiere a la formación de una estructura ordenada en sistemas abiertos de desequilibrio.

Conforme a la clasificación de Oswald, los sistemas coloidales corresponden a un sistema de dispersión formado por la mezcla de un componente que estará en mayor proporción en la fase dispersante y otro en menor proporción en la fase dispersa (tamaño de partícula de la fase dispersa: 1-1000nm) (Fujita & Yamaguchi, 2010).

De acuerdo a la naturaleza química de esos dos componentes se pueden formar sistemas homogéneos o heterogéneos de tipo liofílico o liofóbico. Los sistemas homogéneos pueden ser tipo soluciones como las proteínas o polímeros disueltos en agua o sustancias apolares según corresponda. Dentro de este grupo también se encuentran los coloides homogéneos de agregación, los cuales tienen la particularidad de formar estructuras lamelares como

membranas, liposomas o estructuras micelares (Filipczak *et al.*, 2020). La ventaja de estos sistemas homogéneos es que inherentemente cuentan con características de distribución uniforme en la matriz, debido a sus propiedades fisicoquímicas que permiten que se formen de manera uniforme a diferencia de los sistemas coloidales heterogéneos (Atzberger, 2006).

1.7 Sistemas liposomales

Bangham. (1961) descubrieron los liposomas en la década de 1960 en el Instituto Babraham de la Universidad de Cambridge, observando que algunos lípidos forman estructuras de membrana cuando están en disolución acuosa. A partir de allí se viene perfeccionando las formulaciones de acuerdo al interés industrial y en la actualidad, existen más 100 formulaciones liposomales en el mercado (Altin *et al.*, 2018; Rafiee *et al.*, 2017)

Los liposomas hacen parte de los sistemas coloidales, son estructuras vesiculares autoensambladas formadas por una o más capas de fosfolípidos que se ordenan espontáneamente cuando entran en contacto con una solución acuosa (Taladrid *et al.*, 2017). La estructura liposomal consta de la organización de los fosfolípidos alrededor de un núcleo acuoso interno, con los grupos de cabeza polar orientados hacia la fase acuosa interna y externa. Este mecanismo basado en la capacidad anfifílica de los fosfolípidos permite atrapar moléculas de carácter polar en su núcleo, pero también moléculas apolares asociadas con las cadenas lipofílicas y moléculas anfifílicas en la interfase agua/bicapa lipídica (Ozkan *et al.*, 2019).

Otra ventaja relacionada con el carácter anfifílico de los fosfolípidos es que cuando estos se encuentran en solución tienen gran similitud a las membranas celulares naturales y gracias a esta condición se promueven las interacciones entre los liposomas y las membranas celulares de los mamíferos (He *et al.*, 2019).

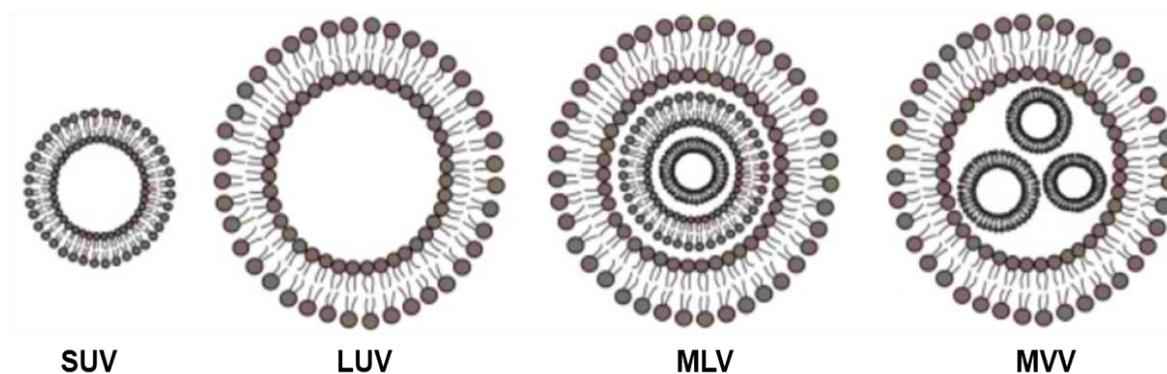
1.7.1 Clasificación de los sistemas liposomales

Los sistemas liposomales se clasifican de acuerdo con el número de bicapas (vesículas lamelares) y al tamaño (Fig. 1-6). Según la estructura de bicapa, los liposomas se pueden clasificar en vesículas unilamelares (ULV) (todos los tamaños) caracterizadas por

presentar una única capa en las cuales se favorece la encapsulación de compuestos hidrófilos; vesículas multilamelares (MLV) que constan de una o más bicapas lipídicas (>500 nm), son estructuralmente semejantes a una cebolla y favorecen la encapsulación de compuestos lipófilos, y por ultimo las estructuras multivesiculares (MVV) (> 1000 nm), las cuales constan de varias vesículas pequeñas rodeadas por una sola bicapa lipídica, por tal razón, son favorables para la encapsulación de grandes volúmenes de material hidrofílico (Fathi *et al.*, 2012).

La categoría de vesículas unilamelares también se pueden subdividir de acuerdo al tamaño en vesículas unilamelares pequeñas (20 nm – 100 nm), vesículas unilamelares grandes (> 100 nm) y vesículas unilamelares gigantes (> 1000 nm) (Large *et al.*, 2021)

Figura 1-6. Clasificación de sistemas liposomales respecto a la lamelaridad y tamaño. Adaptado de (Castañeda *et al.*, 2020).



SUV: vesículas unilaminares pequeñas, **LUV:** vesículas unilaminares grandes, **MLV:** vesículas multilaminares, **MVV:** vesículas multivesiculares.

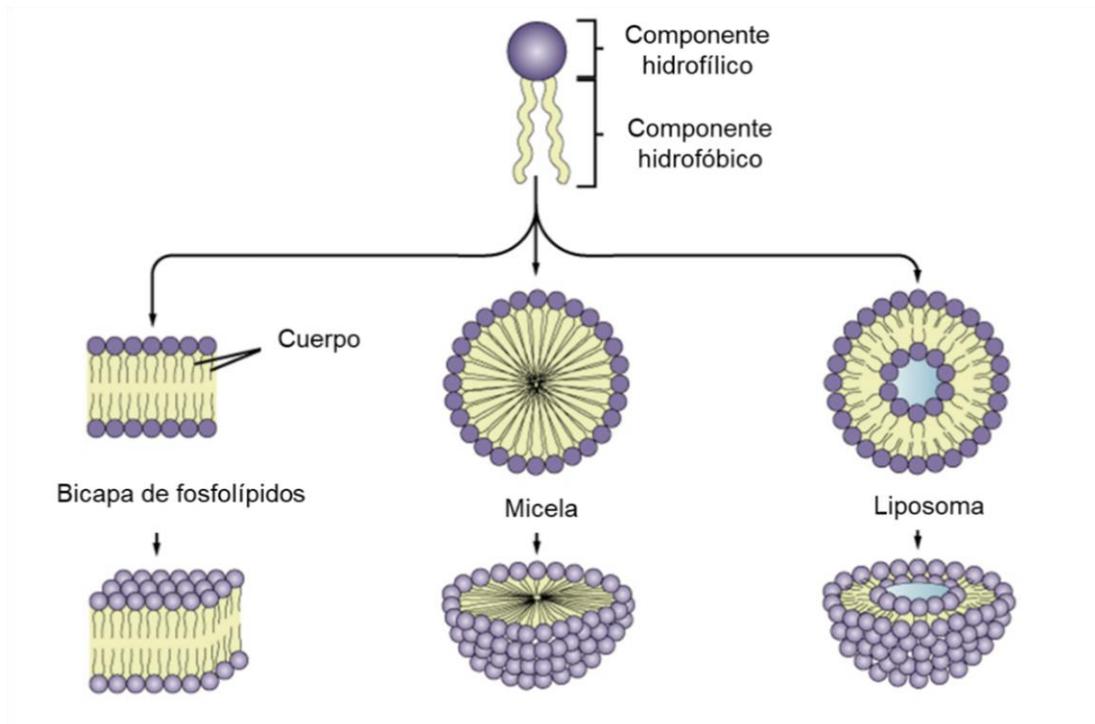
1.7.2 Formulación de sistemas liposomales

Los principales componentes de formulación de los liposomas son los fosfolípidos, moléculas de carácter anfífilas unidas químicamente mediante la esterificación de ácidos grasos, alcoholes y fosfatos, su estructura se compone de cabezas polares y cuerpos no polares, cuando los fosfolípidos se suspenden en agua, pueden autoensamblarse en bicapas creando sistemas liposomales (Filipczak *et al.*, 2020). Tal característica tiene similitud con las micelas formadas por agentes tensioactivos en un medio acuoso pero estas micelas pueden contener compuestos lipídicos en su estructura interna, por su parte,

los liposomas pueden contener compuestos de carácter hidrófilo en su cavidad interna (Fig. 1-7).

La formación de sistemas liposomales ocurre cuando los fosfolípidos se suspenden en un medio acuoso debido a su carácter anfifílico. Al entrar en contacto con el agua, los fosfolípidos se ubican en la zona de interfase, pero cuando esta se satura, los fosfolípidos migran al centro del sistema donde pueden formar bicapas estables; en este sentido, los liposomas se pueden formar por dos mecanismos: interacciones atractivas y efecto hidrófobo (He *et al.*, 2019). Las interacciones atractivas de tipo hidrófilo ocurren entre los grupos de cabezas polares, por su parte, el efecto hidrófobo ocurre entre las cadenas hidrocarbonadas mediante fuerzas de Van der Waals que mantienen juntas las largas colas de hidrocarburos. Otro tipo de interacciones posibles son los enlaces de hidrógeno e interacciones ion-dipolo con moléculas de agua.

Figura 1-7. Configuraciones estructurales formadas por fosfolípidos. Adaptado de (Bueno, 2014)



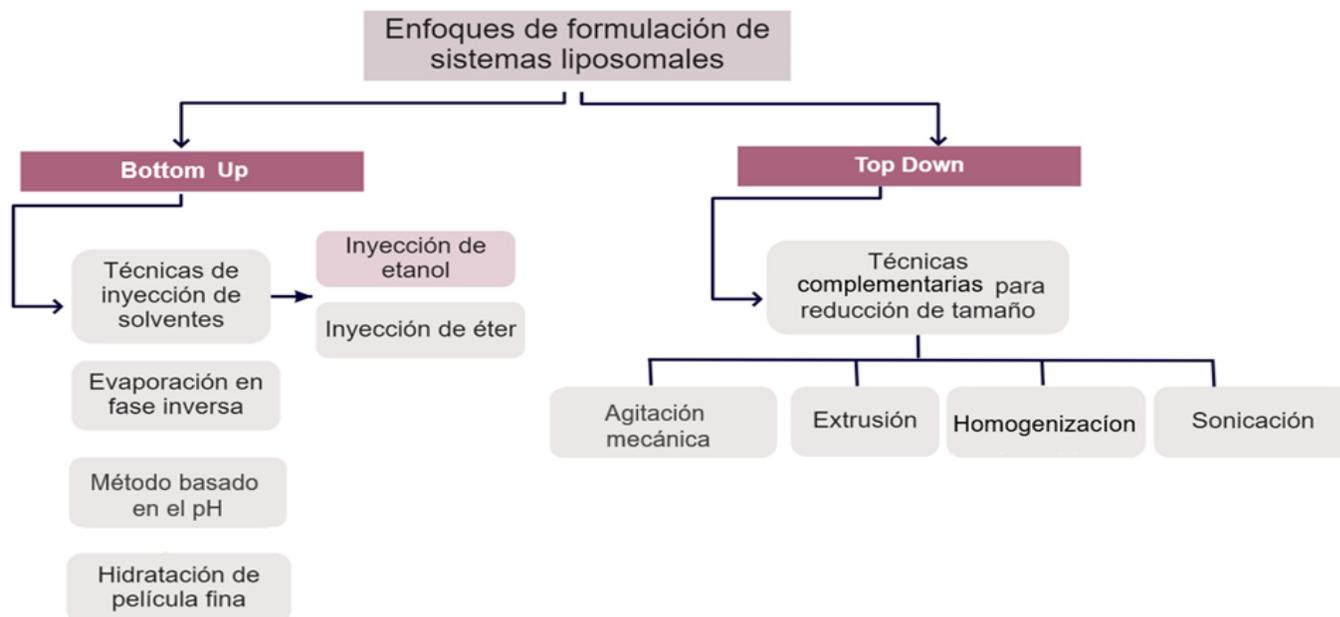
En el centro del sistema, las cadenas hidrófobas son repelidas por las moléculas de agua, experimentando interacciones diferentes a las que se presentan en la interfase y el sistema

está termodinámicamente favorecido, donde el cambio de energía, $\Delta G=0$, dado que el efecto hidrófobo se pierde y se potencializan las interacciones entre la parte polar de los fosfolípidos con el medio y las cadenas hidrocarbonadas forman enlaces entre ellas, en consecuencia se pasa de un sistema con movimiento aleatorio caótico a un sistema organizado cuando ocurre espontáneamente el autoensamblaje de los liposomas en una bicapa cerrada (Fathi *et al.*, 2012).

Por otra parte, existen dos enfoques de formulación de sistemas coloidales: Bottom Up o Top Down. El primero consiste en el autoensamblaje de las moléculas a través de múltiples interacciones para formar macromoléculas y sistemas mayores a escala nanométrica, por ejemplo, la formulación de sistemas de autoagregación como micelares o liposomales que están termodinámicamente favorecidos a formar sistemas con características uniformes en términos de tamaño (Bueno, 2014).

Por el contrario, en los sistemas Top Down se requiere el uso de alta energía para lograr la condición de homogeneidad de tamaño y pasar de mayor a menor tamaño de partícula mediante la utilización de alta energía como agitación mecánica, ultrasonidos u homogenización por altas presiones. En este caso, los fenómenos responsables de la reducción y ruptura de las gotas son las fluctuaciones turbulentas, cavitación, cizallamiento y fuerzas de impacto generadas por diferencia de presión dentro de dispositivos mecánicos u ondas de ultrasonido (Filipczak *et al.*, 2020). En la Figura 1-8 se presenta una clasificación general de los métodos de formulación de sistemas liposomales.

Figura 1-8. Enfoques de formulación de sistema liposomales



1.7.3 Método de inyección de etanol

La técnica de inyección de etanol fue descrita por primera vez por (Batzri & Korn, 1973) y desde entonces se han realizado algunas modificaciones. El método implica la inyección de una solución etanólica de lípidos en un gran volumen de fase acuosa, lo que conduce a la formación rápida de vesículas sin pasar por ningún proceso intermedio. Tras la inyección, la exposición desfavorable de los lípidos al medio acuoso da como resultado la disposición y la precipitación de los lípidos en la fase límite entre el etanol y el agua en forma de fragmentos de fosfolípidos bicapa (Lasic, 1995). En esta etapa se forman espontáneamente las vesículas liposomales unilamelares o multilamelares.

Mediante el método de inyección de etanol el autoensamblaje de los fosfolípidos en sistemas liposomales conduce a la formación de liposomas con tamaños poco homogéneos, por lo cual es importante complementar el método con la aplicación de energía externa (Marasini, 2017). La reproducibilidad del método de inyección de etanol es una de las ventajas debido a que es un proceso con amplia posibilidad de escalamiento,

así mismo usar etanol como solvente representa una ventaja adicional por ser aceptable para aplicaciones industriales según la farmacopea europea.

2. Estado del arte

Las investigaciones relacionadas con los frutos de *P. peruviana* y algunas partes de la planta evidencian la presencia de diferentes compuestos que aportan beneficios a la salud. Hasta el momento, la mayoría de estudios relacionados con extracción de compuestos a partir de este frutal exótico reportan la extracción convencional como metodología aplicada utilizando solventes orgánicos en altas concentraciones y largos tiempos de proceso (Nguyen *et al.*, 2021; H. Singh *et al.*, 2022).

Guiné *et al.* (2020) realizaron la extracción de flavonoides a partir del cáliz de una variedad de *Physalis*, la extracción se realizó mediante la técnica de percolación utilizando la combinación de solventes metanol: agua y acetona:metanol, con los cuales se obtuvo una concentración de 0.301- 0.340 mg equivalentes de quercetina/100g. Compuestos como fitprostanos, derivados de cinamoilo, flavonoides (rutina, quercetina, Kaempferol 3- O - rutinósido), glucósidos monoterpénoides, y fenilpropanoides también se identificaron en la investigación de (Chen *et al.*, 2014; Medina *et al.*, 2017).

Un acercamiento más completo a la caracterización del cáliz de *Physalis* se realizó en la investigación realizada por Ballesteros *et al.* (2019), donde se utilizaron estrategias multianalíticas realizando la extracción de líquido a presión y cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas para la identificación de compuestos químicos. Los resultados reportaron un total de 56 metabolitos pertenecientes a diferentes familias incluidos los principales componentes fenólicos, varios withanólidos y ésteres de sacarosa.

El cáliz de *Physalis* se investigó para determinar la clasificación biofarmacéutica según las propiedades de solubilidad y permeabilidad del flavonol rutina. La extracción de rutina se realizó empleando solventes como diclorometano, acetato de etilo y butanol. Los resultados indicaron que la rutina extraída a partir de cáliz de *Physalis* podría clasificarse en clases III (alta solubilidad/baja permeabilidad) (Domínguez Moré *et al.*, 2020).

2.1 Actividad biológica del cáliz de *Physalis peruviana* L.

El interés en el estudio de cáliz de *Physalis* está relacionado con la presencia de compuestos con capacidad antioxidante, las investigaciones relacionadas con este material se reportan a partir del año 2007, donde se han identificado flavonoides, ácidos grasos, y ésteres de sacarosa entre otros compuestos (Ballesteros *et al.*, 2019; Harwansh *et al.*, 2019; Medina *et al.*, 2017)

Los estudios con cáliz de *Physalis* iniciaron evaluando la actividad biológica y se encontraron resultados promisorios en cuanto a la actividad antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana y hepatotóxica comprobadas experimentalmente a través de modelos *in vitro* e *in vivo* como se relaciona en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1. Estudios relacionados con la actividad biológica del cáliz de *P. peruviana*

Investigación	Resultados	Ref.
Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> en ratones con edema de oído inducido	Actividad antiinflamatoria significativa, con respuesta positiva para dosis superiores a 250 µg/oreja.	(Franco <i>et al.</i> , 2007)
Actividad hepatotóxica en un modelo de ratones con colitis inducida	Mejora significativa en el tejido colónico, el extracto mostró actividad antiinflamatoria intestinal.	(Ocampo <i>et al.</i> , 2015)
Actividad antioxidante y antiinflamatoria, modelo <i>in vitro</i> de edema de oído	Eliminación de superóxido y óxido nítrico, fueron encontrados rutina y nicotoflorína.	(Toro <i>et al.</i> , 2014)
Actividad antiinflamatoria mediante la evaluación en edema λ-carragenano y macrófagos peritoneales	Se atribuyó actividad antiinflamatoria de dos esteres de sacarosa caracterizados, se demostró que no produce efectos secundarios en el hígado y los riñones y atenuó la inflamación inducida.	(Franco <i>et al.</i> , 2014)

42	Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz de uchuva (<i>Physalis peruviana</i> L.) y formulación de sistemas liposomales como método de encapsulación
----	--

Hepatotoxicidad inducida por ccl4 en ratas	El extracto disminuyó el estrés oxidativo causado a nivel hepático y redujo los niveles de las enzimas hepáticas.	(Toro <i>et al.</i> , 2013)
Actividad antimicrobiana	Reducción logarítmica en recuento microbiano, eliminación de óxido nítrico	(Gullón <i>et al.</i> , 2017)

2.2 Sistemas liposomales utilizados para la protección de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos

Los sistemas liposomales se caracterizan por su aplicación en la industria farmacéutica para la administración de medicamentos, sin embargo, se consideran una alternativa innovadora para la encapsulación de fitonutrientes y posteriores aplicaciones alimentarias, cosméticas o nutraceuticas. En la Tabla 2-2 se describe las investigaciones realizadas en encapsulación de compuestos fenólicos extraídos a partir de fuentes naturales.

Tabla 2- 2. Investigaciones realizadas en la formulación de sistemas liposomales para la encapsulación de compuestos fenólicos

Extracto fenólico encapsulado	Método de formación de liposomas	Resultados	Referencia
Extracto fenólico de semilla de uva	Homogenización a altas presiones (22.500 psi); Adición de cuatro capas de recubrimiento con quitosano y pectina.	Más del 80% de los compuestos fenólicos se incorporaron en la membrana liposómica; Diámetro medio de partícula <100 nm; dispersiones físicamente estables durante 150 días	(Gibis <i>et al.</i> , 2012)
Extracto de hibisco (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) en liposomas multicapa	Disposición electrostática capa por capa	Mayor adsorción en el núcleo interno; eficiencia de encapsulación: 63% diámetro medio de partícula: 46-63-200 nm, oxidativamente estables durante 145 días, físicamente estables durante 35 días	(Gibis <i>et al.</i> , 2014)

Extracto de orujo de uva	Hidratación de capa delgada fina	Diámetro medio de partícula: 300 nm, liberación controlada en estudio <i>in vitro</i>	(Manconi <i>et al.</i> , 2016)
Polifenoles de semilla de uva	Disposición electrostática capa por capa	Interacción en la superficie de las bicapas lipídicas; eficiencia de encapsulación: 88%; liberación <i>In vitro</i> que se ajustó al modelo cinético de primer orden	(Gibis <i>et al.</i> , 2016)
Extracto de residuos de morera negra (<i>Morus nigra</i>)	Método de hidratación capa por capa, seguido de secado por aspersión	Eficiencia de encapsulación: 78%; tamaño medio de partícula <300 nm; mejora en la bioaccesibilidad <i>in vitro</i>	(Gültekin-Özgüven <i>et al.</i> , 2016)
Compuestos fenólicos del extracto de cáscara de pistacho verde	Método de hidratación de capa delgada	Tamaño medio de partícula: 90.4–103.8 nm; eficiencia de encapsulación: 52.9%	(Rafiee <i>et al.</i> , 2017)
Extractos antioxidantes de residuos naturales	Hidratación de capa delgada seguido de sonicación y liofilización	Diámetro medio de partícula: 75.7- 81.0 nm y 199–283 nm después de la liofilización, reducción no significativa en la actividad antioxidante durante el ensayo de digestión <i>in vitro</i>	(Marín <i>et al.</i> , 2018)
Extracto de residuos de cáscara de cacao	Método de hidratación capa por capa seguido de secado por aspersión	Incorporación en el interior y parcialmente en la membrana del fosfolípido; eficiencia de encapsulación: 73.6% diámetro de partícula <252 nm	(Altin <i>et al.</i> , 2018)
Extracto de zanahoria negra	Hidratación de capa delgada seguido de secado por aspersión	Diámetro de partícula: 82.7 nm; Eficiencia de encapsulación: 82.2 ± 9.7%. Estabilidad al almacenamiento hasta 6 meses con 6-9% de disminución en la retención de compuestos fenólicos	(Guldiken <i>et al.</i> , 2019)
Extracto de té verde	Microfluidización en dos medios acuosos diferentes (pH = 3,8 de tampón de acetato y pH = 6,5 de agua destilada)	Adsorción en la superficie de la membrana, estabilidad durante 28 días de almacenamiento a 4 ° C.	(Dag <i>et al.</i> , 2019)
Extractos de hinojo marino (<i>Crithmum maritimum</i>)	Inyección de etanol seguido de sonicación y liofilización	Adsorción a nivel de la membrana de los liposomas, eficiencia de encapsulación 65.6%	(Alemán <i>et al.</i> , 2019)

Extracto de té blanco	Hidratación de capa delgada seguido de sonicación	Diámetro medio de partícula de 82.2, eficiencia de encapsulación de 76.5%, índice de polidispersidad de 0.1, se presentó aumento de la estabilidad térmica	(Ahmadi & Amir Hossein Elhamirad, Nasrin Mollania, 2021)
Extracto de romero	Método Mozafari seguido de liofilización	Eficiencia de encapsulación: 54.6%, diámetro de partícula: 583.5 nm, potencial ζ : -65.1 mV.	(Jahanfar <i>et al.</i> , 2021)
Extracto de café	Hidratación de capa delgada	Diámetro medio 110- 500 nm, índice de polidispersidad 0.3 potencial ζ : -70 mV, los liposomas exhibieron mayor capacidad antioxidante que el extracto solo	(Macit <i>et al.</i> , 2021)
Trigo fermentado	Hidratación de capa delgada seguido de sonicación	Eficiencia de encapsulación de 75%, potencial ζ : -29 mV, diámetro de partícula: 132 nm se conservaron las propiedades antioxidantes tanto <i>in vitro</i> como <i>ex vivo</i>	(Gabriele <i>et al.</i> , 2022)
Greyán de montaña (<i>Teucrium montanum</i> L.)	Método de proliposomas seguido de liofilización	Eficiencia de encapsulación: 68.3%, diámetro de partícula: 326.2 nm, índice de polidispersidad: 0.3, potencial ζ : -23 mV, liberación de compuestos controlada y estabilidad al almacenamiento	(Šeremet <i>et al.</i> , 2022)

Bibliografía

- Abou Baker, D. H., & Mohammed, D. M. (2022). Polyphenolic rich fraction of *Physalis peruviana* calyces and its nano emulsion induce apoptosis by caspase 3 up-regulation and G2/M arrest in hepatocellular carcinoma. *Food Bioscience*, 50(PA), 102007. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102007>
- Ahmadi, E., & Amir Hossein Elhamirad, Nasrin Mollania, M. R. S. A. (2021). Incorporation of white tea extract in nano-liposomes: optimization, characterization, and stability. *Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.11544>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4(December 2020), 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Alemán, A., Marín, D., Taladrid, D., Montero, P., & Carmen Gómez-Guillén, M. (2019). Encapsulation of antioxidant sea fennel (*Crithmum maritimum*) aqueous and ethanolic extracts in freeze-dried soy phosphatidylcholine liposomes. *Food Research International*, 119(May 2018), 665–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.044>
- Ali, A., Lim, X. Y., Chong, C. H., Mah, S. H., & Chua, B. L. (2018). Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from betel leaves (*Piper betle*): Extraction kinetics and modeling. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 53(14), 2192–2205. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1443137>
- Altin, G., Gültekin-Özgülven, M., & Ozcelik, B. (2018). Chitosan coated liposome dispersions loaded with cacao hull waste extract: Effect of spray drying on physico-chemical stability and in vitro bioaccessibility. *Journal of Food Engineering*, 223, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.005>
- Arruda, H. S., Neri-Numa, I. A., Kido, L. A., Maróstica Júnior, M. R., & Pastore, G. M. (2020). Recent advances and possibilities for the use of plant phenolic compounds to manage ageing-related diseases. *Journal of Functional Foods*, 75(August), 104203. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104203>
- Atzberger, P. J. (2006). Velocity correlations of a thermally fluctuating Brownian particle: A novel model of the hydrodynamic coupling. *Physics Letters, Section A: General, Atomic and Solid State Physics*, 351(4–5), 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.physleta.2005.10.107>
- Avendaño, W. A., Muñoz, H. F., Leal, L. J., Deaquiz, Y. A., & Castellanos, D. A. (2022). Physicochemical characterization of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruits ecotype Colombia during preharvest development and growth. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16318>

- Baldisserotto, A., Vertuani, S., Bino, A., De Lucia, D., Lampronti, I., Milani, R., Gambari, R., & Manfredini, S. (2015). Design, synthesis and biological activity of a novel Rutin analogue with improved lipid soluble properties. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(1), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.10.023>
- Ballesteros-Vivas, D., Álvarez-Rivera, G., Ibáñez, E., Parada-Alfonso, F., & Cifuentes, A. (2019a). A multi-analytical platform based on pressurized-liquid extraction, in vitro assays and liquid chromatography/gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for food by-products valorisation. Part 2: Characterization of bioactive compound. *Journal of Chromatography A*, 1584, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.054>
- Ballesteros-Vivas, D., Álvarez-Rivera, G., Ibáñez, E., Parada-Alfonso, F., & Cifuentes, A. (2019b). A multi-analytical platform based on pressurized-liquid extraction, in vitro assays and liquid chromatography/gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for food by-products valorisation. Part 2: Characterization of bioactive compound. *Journal of Chromatography A*, 1584, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.054>
- Ballesteros-Vivas, D., Álvarez-Rivera, G., Ibáñez, E., Parada-Alfonso, F., & Cifuentes, A. (2019c). A multi-analytical platform based on pressurized-liquid extraction, in vitro assays and liquid chromatography/gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for food by-products valorisation. Part 2: Characterization of bioactive compound. *Journal of Chromatography A*, 1584, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.054>
- Bangham, A. D. (1961). Correlation between Surface Charge and Coagulant Action of Phospholipids. *Nature*.
- Batzri, S., & Korn, E. D. (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication. *BBA - Biomembranes*, 298(4), 1015–1019. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90408-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90408-2)
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>
- ben Sghaier, M., Pagano, A., Mousslim, M., Ammari, Y., Kovacic, H., & Luis, J. (2016). Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 1972–1978. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.001>

- Bravo, K., Sepulveda Ortega, S., Lara Guzman, O., Navas Arboleda, A., & Osorio, E. (2011). *Influence of cultivar and ripening time on bioactive compounds and antioxidant properties in Cape Gooseberry (Physalis peruviana L .)*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6866>
- Bueno, D. (2014). *Liposomas, ¿la medicina del futuro?* Naukas. <https://naukas.com/2014/09/24/liposomas-la-medicina-del-futuro/>
- Cardona, M. I., Dominguez, G. P., Echeverry, S. M., Valderrama, I. H., Bernkop-Schnürch, A., & Aragón, M. (2021). Enhanced oral bioavailability of rutin by a self-emulsifying drug delivery system of an extract of calyces from *Physalis peruviana*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66(April). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102797>
- Castañeda-Reyes, E. D., Perea-Flores, M. de J., Davila-Ortiz, G., Lee, Y., & de Mejia, E. G. (2020). Development, characterization and use of liposomes as amphipathic transporters of bioactive compounds for melanoma treatment and reduction of skin inflammation: A review. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 7627–7650. <https://doi.org/10.2147/IJN.S263516>
- Castro, J., Ocampo, Y., & Franco, L. (2015). Cape Gooseberry [*Physalis peruviana* L.] Los cálices mejoran la colitis inducida por ácido TNBS en ratas. *Journal of Crohn's and Colitis Advance Access*.
- Chan, C. H., Yusoff, R., & Ngoh, G. C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(6), 1169–1186. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.10.001>
- Chebil, L., Humeau, C., Anthony, J., Dehez, F., Engasser, J. M., & Ghoul, M. (2007). Solubility of flavonoids in organic solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 52(5), 1552–1556. <https://doi.org/10.1021/je7001094>
- Chen, L. X., Xia, G. Y., Liu, Q. Y., Xie, Y. Y., & Qiu, F. (2014). Chemical constituents from the calyces of *Physalis alkekengi* var. *franchetii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.12.030>
- Chua, L. S. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 805–817. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.036>
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), 2047–2053. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.003>
- Dag, D., Guner, S., & Oztop, M. H. (2019). Physicochemical mechanisms of different biopolymers' (lysozyme, gum arabic, whey protein, chitosan) adsorption on green tea

extract loaded liposomes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 473–482. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.106>

Dasgupta, N., Ranjan, S., Mundekkad, D., Ramalingam, C., Shanker, R., & Kumar, A. (2015). Nanotechnology in agro-food: From field to plate. *Food Research International*, 69, 381–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.005>

Domínguez Moré, G. P., Feltrin, C., Brambila, P. F., Cardona, M. I., Echeverry, S. M., Simões, C. M. O., & Aragón, D. M. (2020). Matrix effects of the hydroethanolic extract and the butanol fraction of calyces from *Physalis peruviana* L. on the biopharmaceutics classification of rutin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(5), 738–747. <https://doi.org/10.1111/jphp.13248>

Dong, B., An, L., Yang, X., Zhang, X., Zhang, J., Tuerhong, M., Jin, D. Q., Ohizumi, Y., Lee, D., Xu, J., & Guo, Y. (2019). Withanolides from *Physalis peruviana* showing nitric oxide inhibitory effects and affinities with iNOS. *Bioorganic Chemistry*, 87(February), 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.051>

Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020a). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35(February), 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>

Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020b). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35(February), 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>

El-Sawi, S. A., Ibrahim, M. E., Sleem, A. A., Farghaly, A. A., Awad, G. E. A., & Merghany, R. M. (2022). Development of alternative medicinal sources from golden berry, bananas and carrot wastes as antioxidant, cytotoxic and antimicrobial agents. *Acta Ecologica Sinica*, 42(3), 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2021.04.006>

Etzbach, L., Pfeiffer, A., Weber, F., & Schieber, A. (2018). Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DAD-APCI-MSn. *Food Chemistry*, 245(October 2017), 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.120>

FAO. (2022). *Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) Agenda de Desarrollo Post-2015 de la Organización de las Naciones Unidas*.

Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 23(1), 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>

- Figueroa-Robles, A., Antunes-Ricardo, M., & Guajardo-Flores, D. (2021). Encapsulation of phenolic compounds with liposomal improvement in the cosmetic industry. *International Journal of Pharmaceutics*, 593(September 2020), 120125. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120125>
- Filipczak, N., Pan, J., Yalamarty, S. S. K., & Torchilin, V. P. (2020). Recent advancements in liposome technology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 156, 4–22. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.022>
- Franco, L. A., Matiz, G. E., Calle, J., Pinzón, R., & Ospina, L. F. (2007). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Biomedica*, 27(1), 110–115. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.237>
- Franco, L. A., Ocampo, Y. C., Gómez, H. A., De La Puerta, R., Espartero, J. L., & Ospina, L. F. (2014). Sucrose esters from *Physalis peruviana* calyces with anti-inflammatory activity. *Planta Medica*, 80(17), 1605–1614. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383192>
- Fujita, M., & Yamaguchi, Y. (2010). Mesoscale modeling for self-organization of colloidal systems. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1–2), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.06.001>
- Gabriele, M., Caddeo, C., Lubrano, V., Valenti, D., & Pucci, L. (2022). Encapsulation of bioactive fermented wheat (Lisosan G) in Eudragit-liposomes. *Lwt*, 156(September 2021), 113044. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113044>
- Gad, F. I., Salem, E. G., Abdullatef, O. A., & Aborhyem, S. M. (2022). Potential hepatic-protective effect of *Physalis peruviana* against lead-induced toxicity in albino rats. 11(4), 1367–1381. <https://doi.org/10.11591/ijphs.v11i4.21737>
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*, 26(2), 68–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>
- Genestra, M. (2007). Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*, 19(9), 1807–1819. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.009>
- Gibis, M., Ruedt, C., & Weiss, J. (2016). In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Research International*, 88, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.010>
- Gibis, M., Vogt, E., & Weiss, J. (2012). Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. *Food and Function*, 3(3), 246–254. <https://doi.org/10.1039/c1fo10181a>

- Gibis, M., Zeeb, B., & Weiss, J. (2014). Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*, 38, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.014>
- Guiné, R. P. F., Gonçalves, F. J. A., Oliveira, S. F., & Correia, P. M. R. (2020). Evaluation of Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Bioaccessibility in *Physalis Peruviana* L. *International Journal of Fruit Science*, 20(S2), S470–S490. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1741056>
- Guldiken, B., Linke, A., Capanoglu, E., Boyacioglu, D., Kohlus, R., Weiss, J., & Gibis, M. (2019). Formation and characterization of spray dried coated and uncoated liposomes with encapsulated black carrot extract. *Journal of Food Engineering*, 246(June 2018), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.025>
- Gültekin-Özğüven, M., Karadağ, A., Duman, Ş., Özkal, B., & Özçelik, B. (2016). Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessability studies. *Food Chemistry*, 201, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.091>
- Harwansh, R. K., Deshmukh, R., & Rahman, M. A. (2019). Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51(January), 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.006>
- Hassan, H. A., Ghareb, N. E., & Azhari, G. F. (2017). Antioxidant activity and free radical-scavenging of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in hepatocellular carcinoma rats model. *Hepatoma Research*, 3(2), 27. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2016.33>
- He, H., Lu, Y., Qi, J., Zhu, Q., Chen, Z., & Wu, W. (2019). Adapting liposomes for oral drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.06.005>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Jahanfar, S., Gahavami, M., Khosravi-Darani, K., Jahadi, M., & Mozafari, M. R. (2021). Entrapment of rosemary extract by liposomes formulated by Mozafari method: physicochemical characterization and optimization. *Heliyon*, 7(12), e08632. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08632>
- Kowalska, H., Czajkowska, K., Cichowska, J., & Lenart, A. (2017). What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.016>
- Krstić, Đ. D., Ristivojević, P. M., Gašić, U. M., Lazović, M., Fotirić Akšić, M. M., Milivojević, J., Morlock, G. E., Milojković-Opšenica, D. M., & Trifković, J. (2023). Authenticity assessment

- of cultivated berries via phenolic profiles of seeds. *Food Chemistry*, 402(April 2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134184>
- Large, D. E., Abdelmessih, R. G., Fink, E. A., & Auguste, D. T. (2021). Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176, 113851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>
- Lasic, D. D. (1995). Mechanisms of liposome formation. *Journal of Liposome Research*, 5(3), 431–441. <https://doi.org/10.3109/08982109509010233>
- Liu, W., Hou, Y., Jin, Y., Wang, Y., Xu, X., & Han, J. (2020). Research progress on liposomes: Application in food, digestion behavior and absorption mechanism. *Trends in Food Science and Technology*, 104(March), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.012>
- Macit, M., Eyupoglu, O. E., Macit, C., & Duman, G. (2021). Formulation development of liposomal coffee extracts and investigation of their antioxidant capacities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 64(May), 102605. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102605>
- MADR. (2019). Dirección de cadenas agrícolas y forestales. Cadena de la Uchuva. *Ministerio de Agricultura*, 18.
- Manconi, M., Marongiu, F., Castangia, I., Manca, M. L., Caddeo, C., Tuberoso, C. I. G., D'hallewin, G., Bacchetta, G., & Fadda, A. M. (2016). Polymer-associated liposomes for the oral delivery of grape pomace extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 910–917. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.043>
- Marín, D., Alemán, A., Sánchez-Faure, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2018). Freeze-dried phosphatidylcholine liposomes encapsulating various antioxidant extracts from natural waste as functional ingredients in surimi gels. *Food Chemistry*, 245(July 2017), 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.141>
- Marín, D. P. (2019). Nanoliposomas a partir de productos naturales infrautilizados y residuos agroalimentarios como ingrediente funcional en alimentos. *Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas*.
- Mason, T. J., Riera, E., Vercet, A., & Lopez-buesa, P. (2005). Ultrasound. In *Emerging Technologies for Food Processing: An Overview*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-676757-5.50015-3>
- Medina, S., Collado-González, J., Ferreres, F., Londoño-Londoño, J., Jiménez-Cartagena, C., Guy, A., Durand, T., Galano, J. M., & Gil-Izquierdo, Á. (2017). Potential of Physalis peruviana calyces as a low-cost valuable resource of phytoprostanes and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2194–2204. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9413>

- Milićević, N., Kojić, P., Sakač, M., Mišan, A., Kojić, J., Perussello, C., Banjac, V., Pojić, M., & Tiwari, B. (2021). Kinetic modelling of ultrasound-assisted extraction of phenolics from cereal brans. *Ultrasonics Sonochemistry*, 79, 105761. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105761>
- Monkad, S. M., Embaby, H., & Swalilam, H. (2017). Techno-functional Department of Food Technology , Faculty of Agriculture , Suez Canal University , National Center for Radiation , Research and Technology (NCRRT) , Atomic Energy. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.117>
- Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. In *Pharmaceutics* (Vol. 3, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>
- N. Marasini, K.A. Ghaffar, M. Skwarczynski, T. (2017). Liposomes as a Vaccine Delivery System. In *Micro- and Nanotechnology in Vaccine Development*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39981-4/00012-9>
- Nguyen, K. N. H., Nguyen, N. V. T., & Kim, K. H. (2021). Determination of phenolic acids and flavonoids in leaves, calyces, and fruits of *Physalis angulata* L. in Viet Nam. *Pharmacia*, 68(2), 501–509. <https://doi.org/10.3897/PHARMACIA.68.E66044>
- Nocetti, D., Núñez, H., Puente, L., Espinosa, A., & Romero, F. (2020). Composition and biological effects of goldenberry byproducts: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(12), 4335–4346. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10386>
- Núñez, V., Sanchez, E., Barrero, L., Mayorga, F., Gomez, M., Hernandez, E., Garzon, G., Enciso, F., Navas, A., & Lobo, M. (2014). Estado del arte de la investigación en uchuva *Physalis peruviana* L. In *Estado del arte de la investigación en uchuva Physalis peruviana L.* <https://doi.org/10.21930/978-958-740-180-6>
- Ocampo, Y., Franco, L., & Indias, C. De. (2015). *Cape gooseberry (Physalis peruviana L.) calyces ameliorate TNBS-induced colitis in rats.*
- Olivares-Tenorio, M. L., Dekker, M., Verkerk, R., & van Boekel, M. A. J. S. (2016a). Health-promoting compounds in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.): Review from a supply chain perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.009>
- Olivares-Tenorio, M. L., Dekker, M., Verkerk, R., & van Boekel, M. A. J. S. (2016b). Health-promoting compounds in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.): Review from a supply chain perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.009>
- Oreopoulou, A., Goussias, G., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2020). Hydro-alcoholic extraction kinetics of phenolics from oregano: Optimization of the extraction parameters.

Food and Bioproducts Processing, 123, 378–389.

<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.017>

Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, 272(August 2018), 494–506.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.205>

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>

Popova, V., Petkova, Z., Ivanova, T., Stoyanova, M., Mazova, N., & Stoyanova, A. (2021). Lipid composition of different parts of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit and valorization of seed and peel waste. *Grasas y Aceites*, 72(2).

<https://doi.org/10.3989/GYA.1256192>

Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>

Puente, L. A., Pinto-Muñoz, C. A., Castro, E. S., & Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*, 44(7), 1733–1740. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.034>

Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Maherani, B. (2017). Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high – valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chemistry*, 220, 115–122.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.207>

Ramadan, M. F. (2011). Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Research International*, 44(7), 1830–1836. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.042>

Ravi, G. S., Charyulu, R. N., Dubey, A., Prabhu, P., Hebbar, S., & Mathias, A. C. (2018). Nano-lipid Complex of Rutin: Development, Characterisation and In Vivo Investigation of Hepatoprotective, Antioxidant Activity and Bioavailability Study in Rats. *AAPS PharmSciTech*, 19(8), 3631–3649. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1195-9>

Rey, D. P., Ospina, L. F., & Aragón, D. M. (2015). Inhibitory effects of an extract of fruits of *Physalis peruviana* on some intestinal carbohydrases: Evaluación in vitro del efecto de un extracto de frutos de *Physalis peruviana* sobre algunas carbohidrasas intestinales.

Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 44(1), 72–89.

- Roohi, R., Abedi, E., Hashemi, S. M. B., Marszałek, K., Lorenzo, J. M., & Barba, F. J. (2019). Ultrasound-assisted bleaching: Mathematical and 3D computational fluid dynamics simulation of ultrasound parameters on microbubble formation and cavitation structures. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 55(May), 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.05.014>
- Sang-Ngern, M., Youn, U. J., Park, E. J., Kondratyuk, T. P., Simmons, C. J., Wall, M. M., Ruf, M., Lorch, S. E., Leong, E., Pezzuto, J. M., & Chang, L. C. (2016). Withanolides derived from *Physalis peruviana* (Poha) with potential anti-inflammatory activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(12), 2755–2759. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.077>
- Šeremet, D., Vugrinec, K., Petrović, P., Butorac, A., Kuzmić, S., Vojvodić Cebin, A., Mandura, A., Lovrić, M., Pjanović, R., & Komes, D. (2022). Formulation and characterization of liposomal encapsulated systems of bioactive ingredients from traditional plant mountain germander (*Teucrium montanum* L.) for the incorporation into coffee drinks. *Food Chemistry*, 370(September 2021), 0–2. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131257>
- S.Gaviria, L.Mejia, M.Castro, E.Gómez, F. C. (2016). Pérdida y Desperdicio de alimentos en Colombia. *Departamento Nacional de Planeación*, 39, 116.
- Sharma, S., Ali, A., Ali, J., Sahni, J. K., & Baboota, S. (2013). Rutin: Therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(8), 1063–1079. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.805744>
- Silva Paccha, E. S. (2021). Revisión bibliográfica sobre la relación entre la presencia de compuestos fenólicos en extractos vegetales y su actividad antioxidante determinada por el método ORAC. *Universidad Central Del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Figura 1*, 2–3.
- Singh, H., Singh, T., Singh, A. P., Kaur, S., Arora, S., & Singh, B. (2022). Hepatoprotective effect of *Physalis divaricata* in paracetamol induced hepatotoxicity: In vitro, in silico and in vivo analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 290(January), 115024. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115024>
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 252, 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
- Specht, W., & Lebensm Untersuch. Forsch, Z. (1952). *Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*.
- Stanisavljević, I. T., Lazić, M. L., & Veljković, V. B. (2007). Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(5), 646–652. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.10.003>

- Stein, A., Compera, D., Karge, B., Brönstrup, M., & Franke, J. (2019). Isolation and characterisation of irinans, androstane-type withanolides from *Physalis peruviana* L. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 15, 2003–2012. <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.196>
- Suang Ng, H., Kee, P. E., Yim, H. S., Chen, P. T., Wei, Y. H., & Chi-Wei Lan, J. (2020). Recent advances on the sustainable approaches for conversion and reutilization of food wastes to valuable bioproducts. *Bioresource Technology*, 302(135), 122889. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122889>
- Taladrid, D., Marín, D., Alemán, A., Álvarez-Acero, I., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2017). Effect of chemical composition and sonication procedure on properties of food-grade soy lecithin liposomes with added glycerol. *Food Research International*, 100(July), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.052>
- Teigiserova, D. A., Hamelin, L., & Thomsen, M. (2020). Towards transparent valorization of food surplus, waste and loss: Clarifying definitions, food waste hierarchy, and role in the circular economy. *Science of the Total Environment*, 706, 136033. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136033>
- Toro, R., Aragon, D., & Ospina, L. (2013). HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF CALYCES EXTRACT OF *Physalis peruviana* ON HEPATOT...: EBSCOhost. *Publicacion Academica*, 45, 125–132. <https://doi.org/SSN 0121-4004 / ISSN 2145-2660>. Volumen 20 número 2, año 2013
- Toro, R. M., Aragón, D. M., Ospina, L. F., Ramos, F. A., & Castellanos, L. (2014). Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activity of calyces from *physalis peruviana*. *Natural Product Communications*, 9(11), 1573–1575. <https://doi.org/10.1177/1934578x1400901111>
- Villena de Francisco, E., & García-Esteba, R. M. (2018). Nanotechnology in the agrofood industry. *Journal of Food Engineering*, 238(November 2017), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.024>
- Vinatoru, M. (2015). Ultrasonically assisted extraction (UAE) of natural products some guidelines for good practice and reporting. *Ultrasonics Sonochemistry*, 25(1), 94–95. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.003>
- Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- Wahdan, O. A., Badrd, S. E.-S. A., & Abdelfattah, M. S. (2019). Phytochemical Analysis, Antibacterial and Anticancer Activities of the *Physalis Peruviana* Calyces Growing in Egypt. *Food & Nutrition*, 4(01), 1–6. <https://doi.org/10.29011/2575-7091.100097>

Zavala, D., Quispe, A., Posso, M., Rojas, J., & Vaisberg, A. (2006). Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* (capulí). *An Fac Med Lima*, 67(4), 283–289.

3. Extracción de flavonoles a partir de cáliz de uchuva (*Physalis peruviana* L.): Influencia de los parámetros de proceso y evaluación de la capacidad antioxidante

Resumen

Los residuos agroindustriales generados en el cultivo y comercialización de los frutos exóticos de *P. peruviana* contienen compuestos fenólicos (entre ellos flavonoles), que pueden extraerse con tecnologías no convencionales. El objetivo estudio fue extraer y cuantificar compuestos flavonoles mediante extracciones asistidas por ultrasonido a partir de cáliz *P. peruviana*, y evaluar su capacidad antioxidante mediante ensayos *in vitro*, DPPH, ABTS, FRAP, ORAC. Inicialmente, para determinar el comportamiento de los factores que afectan la extracción de compuestos fenólicos, se evaluó el tiempo de sonicación (1 min, 5 min, 10 min, 20 min y 30 min), la amplitud de onda (20%, 40%, 50% y 60%), la relación líquido-sólido (10 mL/g, 20 mL/g, 30 mL/g, 40mL/g), el tamaño de partícula (110µm, 150µm, 210µm, 270µm), el tipo de solvente (etanol y metanol) y la concentración de solvente (40%, 60%, 80%, 100%v/v), usando diseños experimentales independientes. Para evaluar el contenido de flavonoles y la capacidad antioxidante se realizó un diseño factorial con las variables de proceso: porcentaje de amplitud de onda (50%, 60%), relación líquido- sólido (30 mL/g, 40 mL/g) y la condición del sólido: tamaño de partícula (210 µm, 270µm). Finalmente se determinó el rendimiento de extracción global y la correlación entre el contenido fenólico, el contenido de flavonoles y la capacidad antioxidante.

Los resultados de los diseños independientes permitieron establecer que el contenido fenólico aumenta con los niveles: tiempo de sonicación (10 min), amplitud de onda (60%), relación líquido-sólido (40 mL/g), tamaño de particulade (270 µm) y etanol (60%), la respuesta de contenido de flavonoles fue de 74.56 ± 1.4 mg ER/g. Se demostró eficacia antioxidante de los extractos de *P. peruviana*, mediante los mecanismos de transferencia de electrones y átomos de hidrogeno y se evidenció una fuerte correlación entre el contenido fenólico, los flavonoles y la capacidad antioxidante evaluada mediante los ensayos ORAC y DPPH y ABTS.

Introducción

La extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales ha generado un crecimiento en el desarrollo de tecnologías más limpias que replacen la extracción convencional. De acuerdo con Martín *et al.* (2022), las extracciones convencionales por solventes permiten un acercamiento inicial hacia la caracterización de los extractos naturales, sin embargo, las implicaciones ambientales y legislaciones en la industria regulan cada vez más su aplicación en el ámbito farmacéutico, cosmético y alimentario. En consecuencia, es necesario evaluar otras técnicas de extracción de compuestos bioactivos como el ultrasonido, existen diferentes estudios donde se justifica la aplicación de esta tecnología para recuperar compuestos fenólicos a partir de residuos agroalimentarios (Araújo *et al.*, 2015; Barba *et al.*, 2016; Madiha *et al.*, 2022; Raza *et al.*, 2019).

Algunas variedades de cultivos andinos como *P. peruviana* han demostrado importante actividad biológica derivada de los fitonutrientes que la caracterizan. Además, extractos de diferentes partes de la planta como semillas, hojas y cáliz se estudian por su actividad antiinflamatoria, y antidiabética (Cardona *et al.*, 2021). Por lo tanto, el residuo de cáliz de *P. peruviana* representa una alternativa sostenible para la extracción de compuestos antioxidantes.

En este apartado se presenta un acercamiento general hacia el conocimiento de las principales variables implicadas en la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáliz de *P. peruviana* empleado la metodología asistida por ultrasonido, para ello, se realizaron diseños unifactoriales con los factores: tiempo de sonicación, amplitud de onda, relación líquido-sólido, tamaño de partícula, tipo de solvente y concentración de solvente. A partir de los resultados de los diseños independientes se estudió la extracción de flavonoles y se evaluó la capacidad antioxidante *in vitro* mediante un análisis completo que incluye diferentes tipos de radicales sintéticos, los cuales inducen las reacciones de oxidación por diferentes vías, para ello se utilizaron técnicas espectrofotométricas y mediante el decaimiento de la intensidad de fluorescencia se comprobó la efectividad del extracto

frente al ataque del radical peroxilo en el análisis ORAC, en adición, se determinó el rendimiento global de extracción.

Los resultados obtenidos representan el punto de partida para optimizar el proceso de extracción asistida por ultrasonido a fin de maximizar la respuesta del contenido fenólico, conocer la aptitud del extracto respecto a la acción antioxidante y formular sistemas de encapsulación que disminuyan la degradación de los compuestos fenólicos.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Preparación del material vegetal

Se recolectaron cálices de *P. peruviana* provenientes de frutos sanos en estado de madurez comercial 5-6 (Norma técnica colombiana 4580) de plantaciones ubicadas en las granjas de la Universidad de Nariño, departamento de Nariño, Colombia (2527 msnm., temperatura promedio de 14 °C y humedad relativa de 70%)

800 g de calices de *P. peruviana*, con un contenido de aceite de 20 - 30% de acuerdo a datos bibliográficos para partes no comestibles de la planta (Chasquibol & Yacono, 2015) se utilizaron para los procesos de extracción. Los cálices se retiraron del fruto y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio 200 ppm durante 10 min, posteriormente se sometieron a secado convectivo (40 ± 1 °C, 24 h) hasta alcanzar un porcentaje de humedad de 8% aproximadamente. Se realizó la reducción de tamaño de partícula por medio de un molino eléctrico (IKA-Werke A11, USA) y se tamizó con mallas No. 60, 70, 80, 100 (Standar Physis, Analytica Ltda., Medellín, Colombia) utilizando una tamizadora eléctrica (PS-35, serie 1329, PINZUAR LTDA., Bogotá, Colombia) en 2 ciclos de 7 min. Se determinó el diámetro medio de partícula (Ecuación 3.1) según la metodología reportada por (Zhao *et al.*, 2014). El material resultante se almacenó a 3 °C y en ausencia de luz.

$$ds = \log^{-1}_{10} \frac{\sum_{i=1}^n (m_i (\log_{10}(d_i * d_{i+1})^{1/2}))}{\sum_{i=1}^n m_i}$$

Ecuación 3.1

Donde:

d_s : diámetro geométrico medio (μm)

m_i : masa de la muestra retenida en el tamiz (g)

d_i : diámetro del tamiz (μm)

d_{i+1} : diámetro del tamiz superior al tamiz (μm)

3.1.2 Reactivos

Se utilizó etanol con 99,8% de pureza (Merck, Alemania), reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución 1:5) (Merck, Alemania), Quercetin-3-O-rutinoside (rutina) >99% de pureza, Radical DPPH 100 ppm ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$; MW 394.32), ácido gálico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 188,13), Trolox 512 μm ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$; MW 25.29 g/m) , Radical AAPH (2,2'-AZOBIS(2-METHYLPROPIONAMIDINE) Radical ABTS ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4$; MW 548.68), Buffer acetato pH 3.6, tricloruro de amonio 2% p/v (ALCL_3 ; FW 133,34) TPZ 10 Mm ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$; MW 312.53), cloruro férrico hexahidratado 20 mM (FeCl_3), Sulfato ferroso 1.024 μM ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; MW 278.02) y fluoresceína (Sigma-Aldrich, USA) se usaron directamente en el ensayo, acetonitrilo >98% de pureza, metanol >98% de pureza, ácido acético grado y carbonato de sodio anhidro (NA_2CO_3 ; 105,99) (Merck, Alemania), agua ultrapura (conductividad eléctrica 1 μScm) se obtuvo mediante el sistema de purificación Elix Millipore esencial®.

3.1.3 Comportamiento de los factores que afectan la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos

Mediante diseños unifactoriales independientes se evaluó el comportamiento de las variables de operación: tiempo de sonicación, amplitud de onda tipo y concentración del solvente, relación líquido-sólido y la condición del sólido tamaño de partícula. La Tabla 3-1 presenta los niveles de cada diseño unifactorial y las variables independientes fijas respecto a la variable respuesta contenido fenólico. El mejor resultado para cada variable independiente se definió como valor fijo para el análisis de la próxima variable.

Tabla 3-1. Diseños experimentales unifactoriales (DAC) para la extracción de compuestos fenólicos mediante la técnica asistida por ultrasonido

Factor	Niveles de cada factor					Variables independientes de cada diseño				
T (min)	1	5	10	20	30	A:40	L/S:20	P:270	C:80	S:Etanol
A (%)	20	40	50	60		T:10	L/S:20	P:270	C:80	S:Etanol
L/S (mL/g)	10	20	30	40		A:60	T:10	P:270	C:80	S:Etanol
P (µm)	110	150	210	270		A:60	L/S:20	T:10	C:80	S:Etanol
C (%)	40	60	80	100		A:60	L/S:20	P:210	T:10	S:Etanol
S	Etanol Metanol					A:60	L/S:20	P:210	C:60	T:10

T: Tiempo de sonicación, A: Amplitud de onda, L/S: Relación líquido-sólido, P: Tamaño de partícula, C: Concentración del solvente, S: Solvente de extracción.

Se realizó un protocolo completo de tratamiento estadístico de los datos en el cual, en primera instancia se ejecutó un análisis exploratorio con el fin de identificar datos atípicos y verificar si estos son extremos o no, posteriormente, se realizó la validación de supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Cuando se cumplieron los supuestos se trabajó utilizando análisis paramétricos por medio de la prueba ANOVA y comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$). Por el contrario, cuando no se cumplieron los supuestos, los datos se trataron con análisis no paramétricos mediante la comparación de las medianas. Los análisis de correlaciones se realizaron mediante el estadístico de Pearson ($\alpha 0,05$) (Anexo 1) para determinar la relación de dependencia entre las variables de respuesta. En todos los casos se utilizó el software estadístico R, V. 4.1.1.

Se realizaron extracciones asistidas por ultrasonido utilizando un sonicador (Ref. 505960 INVYMEN Danbury, USA) acoplado a una sonda eléctrica y un generador ultrasónico, con potencia máxima de salida (400 W) y el tip utilizado fue de 1/2" de diámetro. En cada extracción se usó 1 g de cáliz, se depositaron en un vaso de precipitado de 50 mL, el cual contenía el solvente de estudio con la respectiva relación líquido-sólido (mL/g) y se sometieron a diferentes tiempos de sonicación (de acuerdo con la Tabla 3-1). Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min (Universal 320R, Hettich, Alemania), y se filtraron. El filtrado se utilizó para cuantificar el contenido fenólico. Los extractos se protegieron de la luz usando una cabina oscura.

3.1.4 Cuantificación del contenido fenólico (TPC)

El TPC de los extractos obtenidos en los seis diseños unifactoriales (numeral 3.1.3) se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927). Se formuló una solución de ácido gálico 128 ppm y a partir de esta se elaboró una curva de calibración con las concentraciones de 0.06 a 0.126 mg/mL. Utilizando una microplaca de análisis de 96 pozos, se depositaron 60 µL de agua tipo 1 en los 7 pozos de la primera fila, se agregaron 120 µL de la solución de ácido gálico al primer pozo y a partir de ahí se realizaron 7 diluciones seriadas 10^7 , metodología basada en (Aadil *et al.*, 2013).

Posteriormente se diluyeron 3 mg de los extractos en 1 mL de etanol, la solución se homogenizó empleando un vórtex (Boeco, V1 plus, Boeckel + Co, Hamburgo, Alemania). En la microplaca se depositaron 60 µL de la muestra de análisis a partir del pozo 8 de la primera fila, se agregaron 60 µL del reactivo de Folin seguido de 180 µL de disolución de carbonato de sodio al 7%. La microplaca se incubó a 30 °C durante 30 min y posteriormente, se determinó la absorbancia a 750 nm en un lector de microplacas (Biotek Lx800). La curva de calibración se construyó graficando absorbancia respecto a la concentración de ácido gálico en mg/mL. El tratamiento de datos respecto a la variable de respuesta (contenido fenólico) se realizó a partir de la ecuación de la recta de calibración: $TPC = 0.0129 - 0.0102$; $R^2 = 0.992$, elaborada con el estándar de ácido gálico en concentraciones de 0.06 a 0.126 mg/mL. El resultado se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g).

3.1.5 Efecto de la amplitud de onda, la relación líquido-sólido y el tamaño de partícula sobre la concentración de flavonoles y capacidad antioxidante

La extracción de flavonoles se realizó siguiendo en el procedimiento descrito en el numeral 3.1.3. Se evaluó el efecto de los factores: amplitud de onda, relación líquido-sólido y tamaño de partícula sobre el contenido de flavonoles y la capacidad antioxidante *in vitro* con los métodos DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, usando un diseño factorial 3^2 con tres repeticiones y 8 tratamientos, como se presenta en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2. Diseño experimental factorial para la extracción de compuestos flavonoles y capacidad antioxidante *in vitro*

Tratamiento	A (%)	L/S (mL/g)	P (%)	Variables de respuesta
1	60	30	270	Contenido de flavonoles Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> : DPPH, ABTS, FRAP, ORAC
2	60	30	210	
3	60	40	270	
4	60	40	210	
5	50	30	270	
6	50	30	210	
7	50	40	270	
8	50	40	210	

A: amplitud de onda, **L/S:** relación líquido-sólido **P:** Tamaño de partícula.

3.1.5.1 Cuantificación de flavonoles

La cuantificación de flavonoles en los extractos se realizó con base en la metodología reportada por (Aadil *et al.*, 2013). Se utilizó un estándar de rutina (128 ppm) y una solución de tricloruro de aluminio al 2% (p/v) para inducir la reacción de oxidación. Utilizando una microplaca de análisis de 96 pozos, se depositaron 220 μ L de la solución de rutina en los pozos A, B, C de la primera fila y a partir de éstos se realizaron diluciones seriadas 10^7 . Se diluyó 1 mg de los extractos en 3 mL de etanol y se tomaron 100 μ L de la mezcla resultante en la microplaca, posteriormente, se agregaron 100 μ L de la solución de tricloruro de aluminio en todos los pozos de ensayo. Se determinó la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Biotek Lx800). El tratamiento de datos respecto a la variable respuesta (contenido de flavonoles) se realizó a partir de la ecuación de la recta de calibración: $TPF = y + 0.007/0.0223$; $R^2=0.998$, elaborada con el estándar de rutina. El resultado se expresó como mg equivalentes de rutina por gramo de extracto (mg ER/g).

3.1.5.2 Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*

- **Actividad captadora de radicales libres DPPH (radical 2,2difeníl-1-picrilhidrazil)**

La metodología del análisis DPPH se basó en el protocolo descrito por (Anusmitha *et al.*, 2022). Se utilizó el antioxidante estándar Trolox y se realizó la curva de calibración a partir de diluciones seriadas hasta 10^7 en un rango de concentraciones de 0.02 - 0.16 mg/ml. Se mezclaron 3 mg de los extractos con 1 ml de etanol, de esta dilución se tomó una alícuota de 60 μ L y se depositó en una microplaca de análisis, posteriormente se agregaron 140 μ L de solución de DPPH 100 ppm. La absorbancia se determinó a 517 nm. El tratamiento de datos se realizó a partir de la Ecuación 3.2 y los resultados se expresaron como μ moles equivalentes de Trolox por gramo de extracto (μ molesET/gE).

$$\mu\text{molesET/gE} = \left(\frac{(A-b)(FD)V}{(m)(M)} \right) \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Donde A es la absorbancia corregida de la muestra, b y m son el intercepto y la pendiente de la ecuación de la recta de calibración respectivamente, FD es el factor de dilución de la muestra, V es el volumen original de la muestra (l) y M es la masa del del extracto.

- **Actividad captadora de radicales ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)**

La determinación de la actividad captadora de radicales ABTS se basó en la metodología reportada por (Tlili & Sarikurkcü, 2020). Se preparó una solución de trabajo del catión radical ABTS mezclando persulfato de potasio (2.45 mM) y ABTS (7 mM) en proporciones iguales y se mantuvo a 4 °C en oscuridad durante 16 h. Se utilizó una disolución del antioxidante estándar Trolox 128 μ M para elaborar la curva de calibración. En la microplaca de análisis se agregaron 60 μ L de los extractos diluidos en etanol y posteriormente, se adicionaron 240 μ L del catión radical ABTS a todos los pozos de análisis para inducir la reacción. La absorbancia se midió a 734 nm frente al blanco (solución ABTS diluida). El tratamiento de datos respecto a la variable respuesta ABTS se realizó a partir de la ecuación de la recta de calibración: $y = -0.0039x + 0.5234$; $R^2=0,996$. Los datos se expresaron en μ m equivalentes de Trolox por gramo de extracto.

- **Evaluación del poder antioxidante reductor férrico (FRAP)**

El ensayo FRAP se desarrolló con base en la metodología reportada por (Tlili & Sarikurkcu, 2020), se agitaron en vórtex 50 μL de los extracto con 1 mL del reactivo FRAP preparado previamente a partir de 10 mM de (TPTZ) disuelto en 40 mM de HCl y 20 mM de solución acuosa de FeCl_3 . Se realizó una curva de calibración utilizando una solución de sulfato ferroso 1024 μM y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas 10^7 . Utilizando una microplaca de análisis, se agregaron 60 μL de los extractos diluidos en etanol a los pozos, según correspondían y posteriormente, se adicionaron 140 μL del reactivo FRAP para inducir la reacción. Se midió la absorbancia a 630 nm después de 20 min de incubación. Los resultados se expresaron en micromoles de ion ferroso por gramo de extracto de acuerdo con la ecuación 3.3

$$\mu\text{molesFe}^{2+}/\text{gEs} = \left(\frac{(A-b)xFDxV}{mxM} \right) \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

Donde A es la absorbancia corregida de la muestra, b y m son el intercepto y la pendiente de la ecuación de la recta de calibración respectivamente, FD es el factor de dilución de la muestra, V es el volumen original de la muestra en litros y M es la masa en gramos del material seco utilizado en la extracción.

▪ **Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC)**

La capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno se determinó de acuerdo a la metodología reportada por (Yarce *et al.*, 2020). Se prepararon soluciones de fluoresceína de 0.02 mg/mL y AAPH y 59.8 mg/mL en PBS (pH: 7.4), se utilizó el antioxidante estándar TROLOX a concentraciones de 7.65, 15.25, 30.5 y 61 $\mu\text{g/mL}$ para elaborar la curva de calibración. Utilizando una microplaca de análisis, se eligieron 3 pozos como control positivo, el cual correspondía a 75 μL de la solución PBS 7.4 y 125 μL de fluoresceína, en 3 pozos de la fila B se agregaron 75 μL de fluoresceína, 75 μL de solución PBS 7.4 y se rotularon como control negativo. 75 μL de los extractos diluidos en etanol se agregaron a los otros pozos de estudio distribuidos en la microplaca y posteriormente, se agregaron 50 μL de reactivo AAPH a todos los pozos exceptuando el control positivo. La intensidad de fluorescencia se controló cada 5 min durante 120 min a 37 °C (longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 528 nm, respectivamente) en un lector de microplacas

Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT, EE. UU). Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos de intensidad de fluorescencia respecto al tiempo se expresaron como la eficiencia antioxidante ($\mu\text{M ET/g}$) calculada mediante la ecuación 3.4.

$$\mu\text{M ET/g} \left[\frac{\text{AUC}_{\text{muestra}} - \text{AUC}_{\text{control neg}}}{\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{control neg}}} \right] * f \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Donde:

AUC_{muestra}: Área bajo la curva de disminución de fluorescencia para el extracto.

AUC_{Control neg}: Área bajo la curva de disminución de fluoresceína para el control negativo

AUC_{Trolox}: Área bajo la curva de disminución de fluoresceína para el estándar Trolox

f: factor de dilución de la muestra (11).

3.1.6 Rendimiento global de extracción

Para determinar el rendimiento global de extracción de solutos, los extractos se secaron a 40°C hasta peso constante. El rendimiento global (Y) se determinó como la relación entre la masa del extracto seco (MS) y la masa de la muestra inicial en base seca (MI) utilizando la ecuación 3.5.

$$Y(\%) = \frac{MS}{MI} * 100 \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

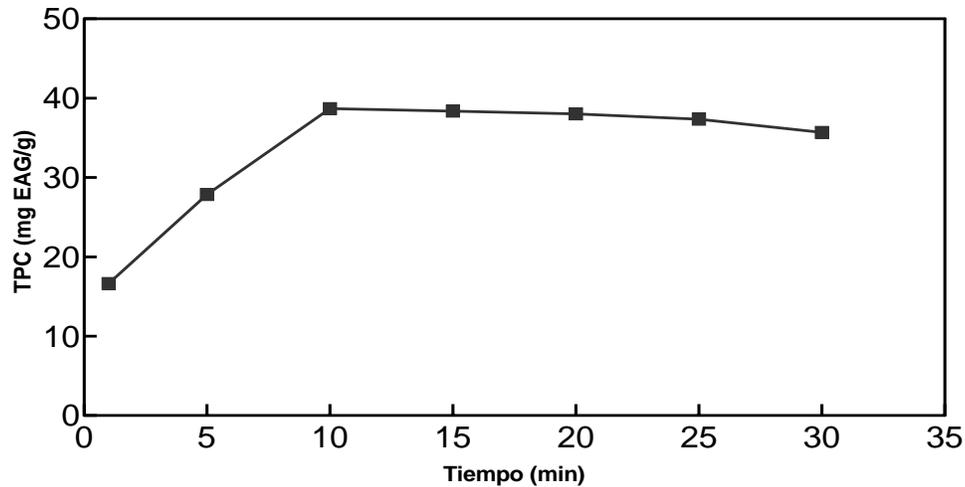
3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Comportamiento de factores que afectan la extracción de compuestos fenólicos

Efecto del tiempo de sonicación

Para analizar el comportamiento de extracción de compuestos fenólicos, se graficó la curva de extracción (Fig. 3-1), donde se observa que los tratamientos se dividieron en tres grupos principales que difirieron estadísticamente entre sí ($p \leq 0.05$). Por un lado, se encuentra el tratamiento de 1 min, posteriormente se observa el grupo formado por los tratamientos de 5 min y 30 min; y, finalmente, el grupo integrado por tratamientos de 10 min y 20 min.

Figura 3-1. Curva de extracción de compuestos fenólicos respecto al tiempo de sonicación



De manera general, la tendencia de extracción de compuestos fenólicos obedece al comportamiento general de los procesos de extracción por solventes en donde, la etapa inicial corresponde a una fase rápida de mayor transferencia de masa influenciada por el mecanismo de difusión como lo reportó Alara *et al.* (2021), esto indica que gran parte de los solutos están en la superficie del material vegetal disponibles para ser arrastrados por el solvente y, en base a este ocurre todo el proceso de partida, durante esta etapa se logra mayor fraccionamiento de la materia prima exponiendo los tejidos vegetales para permitir la segunda etapa de extracción.

Posteriormente, inicia una segunda etapa a partir de 10 min que representa una fase de equilibrio con tendencia al agotamiento de solutos, esta segunda etapa puede estar influenciada por mecanismos convectivos según lo indicó Milićević *et al.* (2021). En este sentido, existen solutos en el interior del material vegetal, los cuales migran al solvente, pero están impedidos por la capa estacionaria que rodea la superficie de las partículas, de tal manera, que los resultados de extracción disminuyen con tendencia a volverse constante (Mohammadpour *et al.*, 2019). Por tratarse de un proceso convectivo, en la segunda etapa, el aporte de energía externa cobra mayor importancia debido a que las altas fuerzas de corte y cavitación generadas por el ultrasonido mantienen la homogeneidad de la mezcla, pero también afectan la matriz vegetal irrumpiendo la pared celular para mejorar la salida de los solutos desde el interior.

Se observó que después de 10 min no hay un incremento en los resultados de contenido fenólico (TPC), lo cual denota un efecto adverso respecto a los tiempos largos de sonicación. En otras investigaciones también se han reportado fenómenos similares a causa de tiempos largos de sonicación. Tavares *et al.* (2017), informaron que existen fenómenos de incremento del área superficial a causa de la reabsorción de compuestos en la matriz vegetal fraccionada, lo cual dificulta la extracción de compuestos fenólicos después de cierto tiempo. Calderón *et al.* (2019), informaron la reducción en el TPC por la sobreexposición del material vegetal al ultrasonido, los autores relacionaron este comportamiento con procesos de oxidación no enzimática y la formación de complejos por reacciones químicas.

Por su parte, el tiempo de sonicación se relaciona directamente con la temperatura. Se conoce que, a causa de los fenómenos de cavitación se genera un incremento en la temperatura, lo cual impacta de manera positiva y negativa el proceso de extracción. Por una parte, hay un beneficio dual para el soluto y el solvente ya que el incremento de la temperatura propicia la apertura de las células en la matriz vegetal, así mismo, se reduce la viscosidad del solvente y la tensión superficial al aumentar la presión de vapor y finalmente se mejora la transferencia de masa y la difusividad del solvente (Rao *et al.*, 2021). Sin embargo, el impacto negativo se genera cuando se excede el tiempo de sonicación y la temperatura alta ocasiona la degradación de los compuestos fenólicos, tal como se mencionó en la investigación de Kumar *et al.* (2021), el efecto de cavitación disminuye como resultado de una mayor tensión de cizallamiento, mayor presión de vapor y menor tensión superficial de las burbujas de cavitación.

De otro lado, Zhang *et al.* (2015), informaron que el efecto de la cavitación puede disminuir por la temperatura, en este sentido, el incremento de la temperatura puede reducir la intensidad del umbral requerido para producir cavitación y, por lo tanto, disminuir la formación y colapso de las burbujas de cavitación. En la misma línea de investigación Mrkonjić *et al.* (2021), reportaron la presencia de radicales libres cuando el tiempo de sonicación fue mayor a 40 min, los autores concluyeron que los compuestos fenólicos pueden reaccionar con radicales generados en solución acuosa y contribuir con las tasas de degradación.

Otros autores han reportado un efecto similar respecto a los tiempos prolongados de exposición al tratamiento por ultrasonido. Chew *et al.* (2021), informaron acerca de la degradación de compuestos fenólicos en *Hibiscus cannabinus* L. El tratamiento consistió en 30 min de sonicación, pero se evidenció que después de 7 min, el TPC disminuyó, los autores concluyeron que la degradación de compuestos se debió al calentamiento generado por fenómenos de cavitación y fuerzas de corte. En la misma línea de investigación, Calderón *et al.* (2019) informaron la reducción de TPC por la sobreexposición del material vegetal al ultrasonido, los autores relacionaron este comportamiento con procesos de oxidación no enzimática y la formación de complejos por reacciones químicas.

Finalmente, se confirma una de las ventajas más relevantes de la extracción asistida por ultrasonido, relacionada con tiempos cortos de proceso. De acuerdo con los resultados, se puede inferir que los tiempos de extracción fueron significativamente menores respecto a la extracción convencional, donde se reportan tiempos en el rango de 4 a 10 h (Abbas *et al.*, 2021; Mohammadpour *et al.*, 2019).

Efecto de la amplitud de onda

El porcentaje de amplitud de onda incidió en el TPC. Se presentaron diferencias significativas entre los niveles 20% y 40% ($p < 0.05$) (Fig. 3-2B). No hubo diferencias significativas entre los niveles (40%, 50% y 60%)

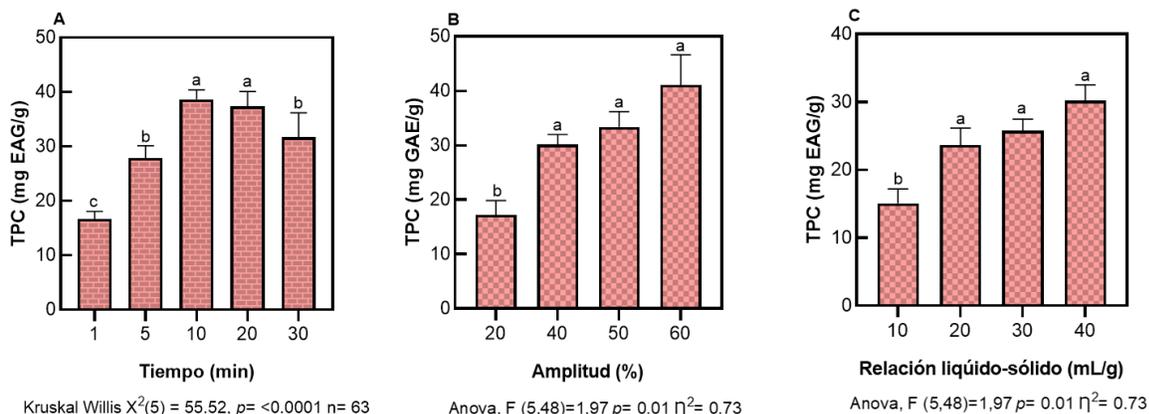
El comportamiento observado se puede explicar dado que, durante la extracción asistida por ultrasonido, la presión generada en las fases de expansión y rarefacción de las ondas ultrasónicas atraviesa la fuerza de atracción entre las moléculas y el solvente, dando lugar a la formación de burbujas de cavitación. Las burbujas de cavitación influenciadas por la amplitud de onda, aumentan de tamaño y colapsan generando así fenómenos de choque entre las partículas y creando una región de alta presión que permiten la fragmentación de la estructura intracelular del material vegetal y facilita la transferencia de masa, por ende, se mejora la extracción de compuestos fenólicos (Dash *et al.*, 2021). De acuerdo a los resultados obtenidos, se eligió el porcentaje de amplitud de 50% para el próximo análisis.

Efecto de la relación líquido-sólido

El efecto de la relación líquido-sólido sobre el TPC se presenta en la Fig. 3-2C. Se encontraron diferencias significativas entre los niveles 10 mL/g y 20 mL/g, mientras que entre los niveles 20 mL/g, 30 mL/g y 40 mL/g no hubo diferencias estadísticas.

El solvente en mayor proporción respecto al sólido es relevante, se espera que con mayor cantidad de solvente se faciliten los procesos difusivos en los tejidos celulares, sin embargo, cuando se excede la cantidad de solvente se puede presentar saturación de la mezcla de extracción y se reduce la solubilidad de los compuestos. En este caso se eligió la relación líquido sólido de 20 mL/g para el próximo análisis.

Figura 3-2. A. Efecto del tiempo de sonicación, **B.** Amplitud, **C.** Relación líquido- sólido en la extracción asistida por ultrasonido sobre el contenido fenólico (mg EAG/g) en el extracto de cáliz de *P. peruviana*



Letras diferentes indican diferencias significativas (95% de confianza).

Efecto del tamaño de partícula sobre el contenido fenólico

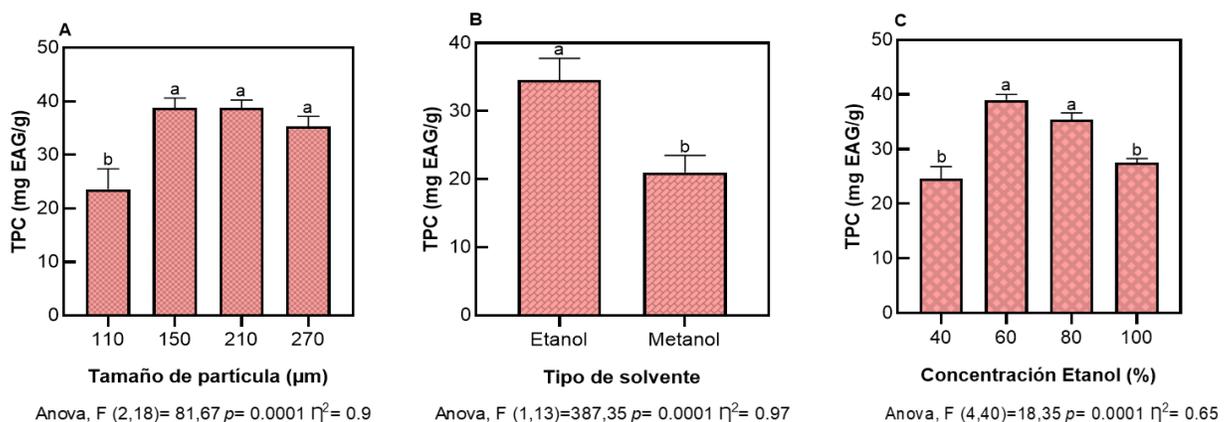
El tamaño de partícula insidió en la extracción de compuestos fenólicos. Se encontraron diferencias significativas entre los niveles 110 μm y 150 μm ($p < 0.05$), mientras que entre los niveles 150 μm , 210 μm y 270 μm no se presentaron diferencias estadísticas (Fig. 3-3A). En los resultados también se observó que un tamaño de partícula inferior a 150 μm disminuye el TPC. En consecuencia, la transferencia de masa durante la extracción asistida por ultrasonido del cáliz de *P. peruviana* dependía de la tasa de transporte dentro de la partícula. Las partículas con un diámetro superior a 150 μm podrían haber impedido

la penetración del disolvente y la solubilización de los solutos. Por el contrario, las partículas con diámetros inferiores a 150 μm podrían dar lugar a la formación de canales preferentes y/o bloqueos durante la extracción, dificultando los mecanismos de cavitación (Abbas *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta los costos del proceso de molienda, un diámetro de partícula mayor sería más factible económicamente ya que obtener un menor tamaño implica alto gasto energético por tratarse de una operación mecánica. En este sentido, se eligió un tamaño de partícula de 270 μm para el próximo análisis, considerando que el tamaño de partícula es una condición sólida que debe optimizarse

Efecto del tipo y concentración de solvente sobre el contenido fenólico

Los resultados demostraron diferencias significativas en el uso de etanol y metanol como solventes en la extracción de compuestos fenólicos de cáliz de *P. peruviana* ($p < 0,05$). El mayor valor para TPC se obtuvo mediante la extracción con el etanol (Fig. 3-3B). Estadísticamente se encontró que es igual utilizar concentraciones de 60% y 80% de etanol, sin embargo, utilizando la menor concentración de etanol (40%) y también la mayor concentración (100%) se obtuvo menor contenido fenólico (Fig. 3-3C).

Figura 3-3. A Efecto del tamaño de partícula, B. Tipo de solvente, C. Concentración de etanol sobre el contenido de fenoles totales (mg EAG/g) en el extracto de cáliz de *P. peruviana*.



Letras diferentes indican diferencias significativas (95% de confianza).

Los resultados permiten inferir que hubo mayor interacción molecular cuando se empleó etanol, debido a la solubilidad de los compuestos fenólicos presentes en el extracto. Según

lo reportado por Mrkonjić *et al.* (2021), parámetros como la estequiometría de los compuestos (los fragmentos polares y apolares de la molécula) y las fuerzas intermoleculares entre ellos y el solvente, definen el éxito de la extracción.

Teniendo en cuenta la estequiometría de los compuestos fenólicos, se puede decir que la mezcla de extracción fue favorable para promover las interacciones moleculares principalmente mediante enlaces de hidrógeno, lo cual contribuye con la solubilidad de los compuestos (Houda Lezoul *et al.*, 2020). Otros autores también han reportado etanol como solvente en extracciones convencionales de compuestos fenólicos a partir de algunas variedades de *Physalis* (Bazana *et al.*, 2019; Martínez *et al.*, 2010).

De otro lado, la mezcla etanol-agua resultó adecuada para la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáliz de *P. peruviana*. La combinación etanol-agua cobra importancia en la extracción de compuestos fenólicos, debido a que el agua hincha las partículas del cáliz facilitando la entrada de etanol y la extracción de compuestos polares generalmente presentes en las vacuolas. Así mismo, en la mezcla de solventes, uno de esta mejora la solubilidad de los compuestos a extraer, mientras que el otro mejora la adsorción de los compuestos, en este caso, el agua es importante porque ayuda a romper la matriz y los enlaces de hidrogeno entre la matriz y el compuesto (Mustafa & Turner, 2011).

Por otra parte, se debe considerar la energía de activación del solvente como otra explicación a los resultados obtenidos. En este sentido, el etanol aporta mayor energía de activación respecto al metanol, considerando que la energía de activación representa la energía que las moléculas deben adquirir para participar en una reacción (Hernandez, 2003). En este caso, es la energía necesaria para que haya interacción entre el solvente y los compuestos en el interior los orgánulos celulares presentes en el extracto de cáliz de *P. peruviana*.

En el presente estudio, se eligió el solvente etanol y la concentración del solvente de 60% para próximos análisis, teniendo en cuenta que la mezcla etanol-agua genera ventajas relevantes a nivel económico y ambiental, además, el etanol es considerado un solvente seguro de alta pureza y biodegradabilidad que puede obtenerse de fuentes renovables, por lo tanto, también aporta valor agregado para fines comerciales (Stevanato & da Silva, 2019).

3.2.2 Efecto de la amplitud de onda, la concentración del sólido y el tamaño de partícula sobre la concentración de flavonoles y capacidad antioxidante

Extracción y cuantificación de flavonoles

En la extracción de flavonoles a partir de los extractos de cáliz de *P. peruviana*, se fijaron los parámetros tiempo de sonicación 10 min y solvente etanol 60% de acuerdo con los resultados de los diseños independientes y se evaluaron 2 niveles para las variables: amplitud de onda, relación líquido:sólido y tamaño de partícula. En la Tabla 3-3 se presentan los resultados de la cuantificación de flavonoles. Se encontraron diferencias significativas entre algunos tratamientos. Aunque los tratamientos 1, 2, 3, no fueron estadísticamente diferentes respecto al tratamiento 4 (amplitud de onda de 60%, relación líquido:sólido de 40% y tamaño de partícula de 150 μm), este último demostró una tendencia hacia el incremento en el valor teórico de TPC.

Tabla 3-3. Contenido de flavonoles en extractos de cáliz de *P. peruviana*. Efecto de la amplitud de onda, relación líquido-sólido y tamaño de partícula en la extracción asistida por ultrasonido

Tratamiento	Amplitud de onda (%)	Relación líquido-sólido (mL/g)	Tamaño de partícula (μm)	Contenido de flavonoles (mg ER/g)
1	60	30	210	63.1 \pm 0.2 ^a
2	60	30	150	66.4 \pm 0.4 ^a
3	60	40	210	69.5 \pm 0.2 ^a
4	60	40	150	74.6 \pm 1.4 ^a
5	50	30	210	30.2 \pm 0.2 ^c
6	50	30	150	38.8 \pm 0.1 ^c
7	50	40	210	51.2 \pm 1.2 ^b
8	50	40	150	44.1 \pm 1.3 ^b

a,b,c, medias con letras diferentes en la misma columna difieren entre si según la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

El análisis de varianza para la variable respuesta contenido de flavonoles (Anexo 2), indicó que el efecto de los factores individuales y su interacción presentaron efecto significativo

($p < 0.05$). En este caso, los fenómenos de cavitación asociados a una mayor amplitud de onda mejoraron la extracción de flavonoles, se observó que, a diferencia de los factores tamaño de partícula y relación líquido-sólido, los tratamientos con amplitud de onda de 50% presentaron menor respuesta de flavonoles respecto a los tratamientos con amplitud de onda de 60%. Por su parte, los factores: tamaño de partícula y relación líquido-sólido incrementaron con el aumento de la amplitud de onda. Teniendo en cuenta que el principal mecanismo de transferencia de masa fue el difusivo, la acción del solvente en mayor proporción y un tamaño de partícula menor facilitaron los fenómenos de transferencia de masa, cabe mencionar que el efecto de la relación líquido-sólido depende de la naturaleza de los compuestos a extraer y su relación con la polaridad del solvente.

El contenido de flavonoles en el cáliz de *P. peruviana* sugiere la presencia compuestos como el glicósido rutina. Esta afirmación se sustenta en los resultados de extracción que fueron relevantes empleando etanol. Este solvente puede establecer enlaces hidrofílicos con los grupos O-H de la rutina, ya que los glicósidos como este compuesto, se extraen con mayor facilidad por la presencia de grupos polares como fracciones de azúcar unidas a través de un grupo O-H o enlaces carbono-carbono (Barreca *et al.*, 2021). Además, el contenido de flavonoles en el cáliz de *P. peruviana* podría estar asociado a otros compuestos flavonoles en formas libres como las agliconas unidos a la pared celular, sin embargo, los compuestos flavonoles unidos a la pared celular tienen escasa solubilidad y son de difícil extracción por los fuertes enlaces a macromoléculas como pectina, celulosa y proteínas estructurales (Tong *et al.*, 2021)..

Finalmente, como lo reporta Tong *et al.* (2021), el solvente etanol fue apropiado para la extracción de flavonoles dado que los flavonoles presentan una emisión dual, la cual se define como una propiedad fotoluminiscente con los solventes que actúan como aceptores y donantes de enlaces de hidrógeno como el etanol, en efecto, los flavonoles no podrían formar enlaces de hidrógeno con solventes menos polares.

Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*

Se demostró la capacidad antioxidante de los extractos de cáliz de *P. peruviana* obtenidos mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonido. El análisis de varianza para cada

variable respuesta indicó que la interacción de los factores: amplitud de onda, relación líquido-sólido y tamaño de partícula fue significativa en todos los casos ($p < 0.05$) (Anexo 3).

En la Tabla 3-4 se presentan los resultados de los ensayos DPPH, ABTS, FRAP y ORAC. La respuesta de los ensayos DPPH y ABTS confirmaron la capacidad que tienen los compuestos fenólicos, incluidos los flavonoles, para estabilizar los radicales libres que involucran la transferencia de electrones. El ensayo FRAP indicó la capacidad de reducción de iones metálicos y el análisis ORAC demostró que existen compuestos fenólicos que son capaces de generar reacciones que involucran transferencia de átomos de hidrógeno.

Tabla 3-4. Capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de cáliz de *P. peruviana*

Tto	A (%)	L/S (%)	P (µm)	DPPH (µM ET/g)	ABTS (µM ET/g)	FRAP (µM Fe ²⁺ /g)	ORAC (µM ET/g)
1	60	30	210	97.4±1.6 ^b	182.1±12.3 ^b	177.6±21.1 ^a	160.8±11.1 ^b
2	60	30	150	90.4±1.1 ^b	214.8±20.2 ^a	170.3±19.2 ^a	175.3±12.1 ^b
3	60	40	210	87.9±5.54 ^b	220.2±21.3 ^a	140.2±9.4 ^a	183.7±12.4 ^b
4	60	40	150	76.6±22.3 ^b	234.5±26.3 ^a	130.2±12.3 ^a	193.8±15.8 ^b
5	50	30	210	78.5±11.3 ^b	153.2±18.5 ^b	164.3±16.2 ^a	114.2±12.2 ^a
6	50	30	150	84.5±11.3 ^b	166.6±10.2 ^b	153.5±10.3 ^a	125.5±14.7 ^a
7	50	40	210	63.5±4.7 ^a	70.1±11.2 ^c	94.7±8.2 ^b	140.2±13.3 ^a
8	50	40	150	53.6±4.6 ^a	86.1±12.1 ^c	88.3±7.3 ^b	152.3±12.7 ^a

A: amplitud de onda, **L/S:** relación líquido-sólido, **P:** tamaño de partícula, **ET:** Equivalentes Trolox, **µM Fe²⁺:** Micromoles de ion ferroso, DPPH, ABTS, FRAP, ORAC (Ver nomenclatura en metodología). **a,b,c,** medias con letras diferentes en la misma columna difieren entre si según la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

En el análisis DPPH se encontraron diferencias significativas entre algunos tratamientos como se presenta en la Tabla 3-4. Los tratamientos 7 y 8 mostraron un leve incremento en los resultados del análisis indicando un menor cambio en la medida espectrofotométrica, aunque no se presentaron diferencias estadísticas. En el análisis DPPH, la capacidad

antioxidante total es equivalente a la concentración del extracto de *P. peruviana* necesaria para reducir la concentración inicial del radical DPPH; por lo tanto, valores más bajos numéricamente corresponden a una mayor actividad antioxidante.

El máximo valor numérico en el análisis ABTS se obtuvo con el tratamiento 4 ($234.48 \pm 26.3 \mu\text{mET/g}$), sin embargo, este tratamiento no mostró diferencias estadísticas con los tratamientos 1, 2 y 3. La capacidad de captura de radical ABTS generada por el extracto de *P. peruviana* se comparó con la del antioxidante estándar Trolox, por lo tanto, los valores más altos obtenidos en el tratamiento 4 correspondieron a una mayor capacidad antioxidante.

El tratamiento 8 presentó la mejor respuesta del poder antioxidante reductor férrico (FRAP) (88.29 ± 7.3), es decir, presentó el valor numérico más bajo. Este tratamiento mostró diferencias estadísticas con los tratamientos 6 y 7. Por su parte, en el tratamiento 4, mediante el análisis ORAC, se evidenció el incremento en la respuesta de la capacidad antioxidante sin presentar diferencias estadísticas respecto a los tratamientos 1, 2, 3.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos extraídos permitió hacer un análisis puntual respecto a la amplitud de onda. En los ensayos DPPH Y FRAP se asume mayor acción antioxidante de los compuestos fenólicos lipofílicos, en este sentido, se observó que el incremento de la amplitud (60%) afectó la actividad antioxidante posiblemente a causa de fenómenos de degradación mediados por el incremento de temperatura u otros mecanismos de cavitación. Los ensayos ORAC y ABTS sugieren acción de los compuestos hidrófilos y demostraron mayor estabilidad con el incremento en la amplitud de onda. Por su parte, en todos los ensayos se observaron mejores resultados con la relación líquido-sólido (40%).

En algunas investigaciones se ha reportado que los compuestos fenólicos glicosilados o ligados a la pared celular presentan mayor capacidad para reducir el complejo de tripiridiltriaina férrica (Fe^{2+} -TPTZ) en el análisis FRAP (Alara *et al.*, 2021; Belwal *et al.*, 2018). En el presente estudio, las extracciones realizadas con un tamaño de partícula menor ($210 \mu\text{m}$), demostraron mayor variación en los resultados del ensayo FRAP. Lo anterior permite inferir que la reducción de tamaño de partícula junto con la acción del

ultrasonido fue favorable para extraer compuestos fenólicos ligados a la pared celular, este tipo de compuestos no se extraen fácilmente sin acondicionar previamente el material vegetal a tamaños de partícula reducidos. En este análisis particular, las muestras con menor tamaño de partícula presentaron mayores resultados de capacidad antioxidante FRAP, confirmando así la capacidad del extracto de *P. peruviana* para reducir iones metálicos.

De manera general, los frutos de la planta de *P. peruviana* han sido ampliamente estudiados encontrando importante actividad biológica. Vega *et al.* (2014) reportaron valores de capacidad antioxidante de 94.07 y 2763.66 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ determinados mediante los ensayos DPPH y FRAP, respectivamente. Los autores concluyeron que la actividad antioxidante estuvo relacionada con el contenido fenólico y se verificó que la acción de las enzimas oxidativas es un parámetro de especial cuidado en este tipo de frutos. Algunos resultados de capacidad antioxidante se reportan en las investigaciones de Olivares *et al.* (2017) con valores para DPPH de $380.3 \pm 14.3 \mu\text{g ET}/100\text{g}^{-1}$, Puente *et al.* (2021) reportaron la capacidad antioxidante de frutos de *Physalis* con un valor de 270.9 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ determinado por el ensayo DPPH. González *et al.* (2020) con valores de 73.43 $\mu\text{g ET}/100\text{g}$ y 63.79 $\mu\text{g ET}/100\text{g}$ correspondientes a los ensayos DPPH y ABTS, respectivamente.

Lo anterior contrasta con las escasas investigaciones en el cáliz de *P. peruviana*, Cardona *et al.* (2017), evaluaron la capacidad antioxidante del extracto de cáliz de una variedad de *Physalis*, la extracción de compuestos se realizó mediante la técnica convencional, y los valores de actividad antioxidante reportados se encontraron en el rango de 25.44 ± 0.5 y $60.23 \pm 1.2\%$ para el análisis DPPH. Arango. (2014) realizó la extracción por fraccionamiento de compuestos fenólicos a partir del cáliz de *Physalis* utilizando hexano y butanol, los resultados indicaron valores de capacidad antioxidante de 405.41 y 42.96 $\mu\text{m ET}/\text{g}$ para los ensayos ABTS y FRAP, respectivamente, los cuales fueron 4 veces superiores a los valores reportados para el fruto de *Physalis*.

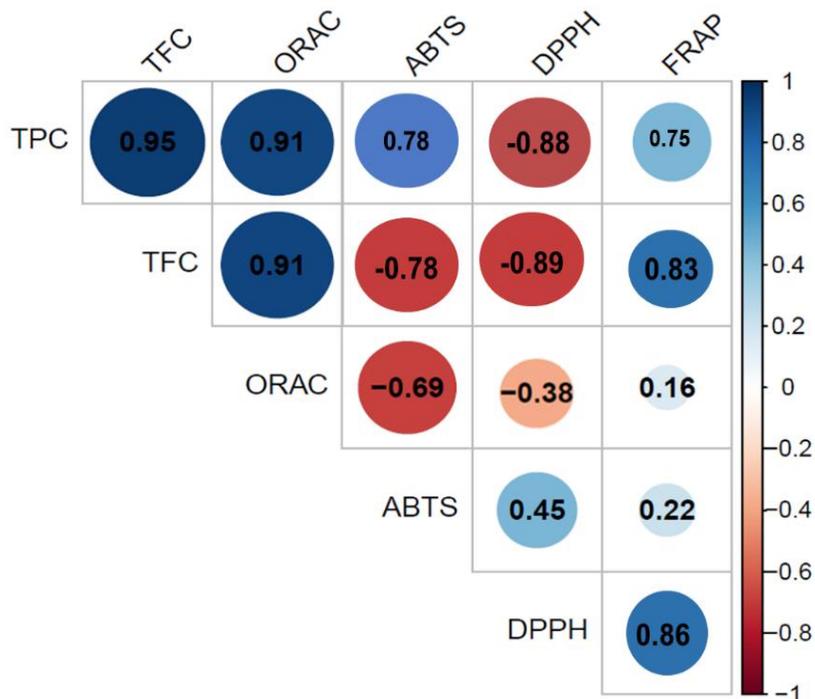
La capacidad antioxidante del cáliz de *P. peruviana* determinada en el presente estudio, resultó en algunos casos mayormente comparable con la capacidad antioxidante de otro tipo de residuos agroindustriales como los residuos de café, donde se reportaron valores

comprendidos entre 92.98 - 140.30 $\mu\text{g ET}/100\text{g}$ para el ensayo ABTS y 38.65 - 82.40 $\mu\text{g ET}/100\text{g}$ en el ensayo DPPH. En semillas de mango se reportaron valores de capacidad antioxidante de 64.04 a 54.50 $\mu\text{M ET}/\text{g}$ para DPPH, 297.32 a 151.85 $\mu\text{M ET}/\text{g}$ para ABTS, y finalmente, 24.33 a 6.64 $\mu\text{M ET}/\text{g}$ para FRAP (Castañeda *et al.*, 2021).

Uno de los resultados a destacar en la presente investigación es la capacidad antioxidante que presenta el extracto de cáliz de *P. peruviana* en el ensayo ORAC ($193.37 \pm 24.2 \mu\text{M ET}/\text{g}$). La relevancia del análisis permite confirmar la importancia de la actividad biológica *in vitro* de este residuo agroindustrial ya que confirma la aptitud para donar átomos de hidrogeno que limitan la peroxidación lipídica generada por radicales peróxido en gran cantidad de procesos industriales. En el presente estudio, los resultados del método ORAC presentaron fuerte correlación positiva con el TPC (0.95) y con el contenido de flavonoles totales (0.91), como se presenta en la (Fig. 3-4). La actividad antioxidante de cáliz de *P. peruviana* se puede atribuir a la presencia de compuestos fenólicos, entre estos el flavonol rutina.

Los resultados del ensayo ORAC para el extracto de cáliz de *P. peruviana* son comparables con otro tipo residuos, por ejemplo, extracto de orujo de arándano ($13.58 \pm 0,74 \mu\text{M ET}/\text{g}$) (Tamkuté *et al.*, 2022), extracto de residuos de cebolla ($27.3 \pm 22.5 \mu\text{M ET}/100\text{g}$) (Moreno *et al.*, 2020) o residuos de aceituna ($10.3 \pm 22.2 \mu\text{mol ET}/\text{g}$) (Presti *et al.*, 2017)

Figura 3-4. Análisis de correlación entre en contenido fenólico, contenido de flavonoles y capacidad antioxidante de extractos de cáliz de *P. peruviana*.



TPC: Contenido fenólico (mg EAG/g); TFC: flavonoles totales (mg ER/g); ensayos *in vitro* de capacidad antioxidante (ORAC, ABTS, DPPH, FRAP).

El análisis de correlaciones permitió comprobar que los resultados mostraron coincidencias entre sí. La variable DPPH presentó una correlación alta respecto al TPC y contenido de flavonoles. La variable FRAP tuvo una correlación alta (0,83) con la variable flavonoles totales, lo cual permite inferir que existen flavonoles con alta capacidad de quelar metales que propician reacciones de oxidación. Así mismo, las variables ORAC y ABTS estuvieron altamente correlacionadas con el TPC y los flavonoles, de tal manera que, si aumenta el TPC, incrementa el contenido de flavonoles y la capacidad antioxidante.

Rendimiento global de extracción

El rendimiento global de extracción se determinó con base en los resultados obtenidos a partir de los diseños independientes. Se eligieron las condiciones amplitud de onda (60%), relación líquido-sólido (20%), tamaño de partícula (270 μm) y solvente etanol (60%) y se

obtuvo un rendimiento acumulado de 18.52%, algunos autores también han reportado rendimientos similares comprendidos en un rango de 15-20% en extracciones de compuestos fenólicos asistidas por ultrasonido (Mrkonjić *et al.*, 2021; Rao *et al.*, 2021). Cabe mencionar que las operaciones de reducción de tamaño y sonicación inciden en los costos de extracción, sin embargo, se debe tener en cuenta la disponibilidad de materia prima y el uso de solventes, en este caso los dos componentes son de fácil acceso y así mismo, el uso de agua y etanol como solventes disminuye los costos operativos y aporta características de extracción relacionadas con las metodologías emergentes y solventes seguros, por lo tanto, el extracto puede ser utilizado en diferentes campos industriales.

Se observó que el rango variable de algunos niveles no permitió encontrar valores exactos en los cuales se maximice el TPC, por lo tanto, se evidencia la necesidad de estudiar el comportamiento de los factores utilizando herramientas de optimización.

3.3 Conclusiones

Se demostró que el cáliz de *P. peruviana* contiene compuestos fenólicos, los cuales se pueden extraer mediante la técnica asistida por ultrasonido.

La extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz de *P. peruviana* estuvo influenciada por parámetros propios de la extracción convencional como el tipo y concentración del solvente y el tamaño de partícula, y por parámetros operativos del sistema de ultrasonido como la amplitud de onda y el tiempo de sonicación. Se encontró que, a diferencia de otros factores, la amplitud de onda, relación líquido sólido y tamaño de partícula demostraron resultados favorables de contenido fenólico con más de un nivel de estudio, evidenciando la necesidad de buscar puntos óptimos de extracción para evaluar el comportamiento de interacción

Los ensayos *in vitro* de actividad antioxidante evidenciaron la capacidad que tiene el extracto fenólico de cáliz de *P. peruviana* para transferir electrones y átomos de hidrógeno. La alta correlación entre el contenido fenólico, el contenido de flavonoles y la capacidad antioxidante que presentaron los extractos de cáliz de *P. peruviana* permite simplificar los

procesos metodológicos, dado que, si se logra aumentar el contenido fenólico, también incrementarán el contenido de flavonoles y la capacidad antioxidante.

La técnica de extracción no convencional asistida por ultrasonido permitió extraer compuestos con capacidad antioxidante a partir del cáliz de *P. peruviana* utilizando agua y etanol (solventes seguros), sumado a esto, por tratarse de un residuo agroindustrial; los resultados brindan una alternativa sostenible para la extracción de compuestos fenólicos y pueden explorarse para aplicaciones futuras como bioactivos naturales, además, la metodología empleada favorece la transferencia de tecnología y el escalamiento industrial.

Los resultados obtenidos demuestran el potencial que tiene el subproducto agroindustrial para generar valor agregado mediante la extracción de compuestos bioactivos, estos hallazgos representan una alternativa de mitigación al impacto ambiental generado por los desperdicios agroalimentarios y la oportunidad de explorar mercados y dinamizar la cadena productiva de la uchuva.

Bibliografía

- Aadil, R. M., Zeng, X. A., Han, Z., & Sun, D. W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, *141*(3), 3201–3206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.008>
- Abbas, M., Ahmed, D., Qamar, M. T., Ihsan, S., & Noor, Z. I. (2021). Optimization of ultrasound-assisted, microwave-assisted and Soxhlet extraction of bioactive compounds from *Lagenaria siceraria*: A comparative analysis. *Bioresource Technology Reports*, *15*(May). <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100746>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, *4*(December 2020), 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Anusmitha, K. M., Aruna, M., Job, J. T., Narayanankutty, A., PB, B., Rajagopal, R., Alfarhan, A., & Barcelo, D. (2022). Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, anti-genotoxic, and anticancer activities of different *Ocimum* plant extracts prepared by ultrasound-assisted method. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *117*(September 2021), 101746. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101746>
- Araújo, M., Pimentel, F. B., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, *45*(2), 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.010>
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *49*, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>
- Barreca, D., Trombetta, D., Smeriglio, A., Mandalari, G., Romeo, O., Felice, M. R., Gattuso, G., & Nabavi, S. M. (2021). Food flavonols: Nutraceuticals with complex health benefits and functionalities. *Trends in Food Science and Technology*, *September 2020*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.030>
- Bazana, M. T., da Silva, S. S., Codevilla, C. F., de Deus, C., Lucas, B. N., Ugalde, G. A., Mazutti, M. A., Moraes Flores, E. M., Barin, J. S., de Bona da Silva, C., & de Menezes, C. R. (2019). Development of nanoemulsions containing *Physalis peruviana* calyx extract: A study on stability and antioxidant capacity. *Food Research International*, *125*, 108645. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108645>
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used

- for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>
- Calderón, J., Marroquin, A., Luviano, L., Maqueda, V., Marín, E., & Calderón, A. (2019). Sonido, Ultrasonido y Cavitación. *Am. J. Phys. Educ*, 13(4), 3–7.
- Cardona, M. I., Dominguez, G. P., Echeverry, S. M., Valderrama, I. H., Bernkop-Schnürch, A., & Aragón, M. (2021). Enhanced oral bioavailability of rutin by a self-emulsifying drug delivery system of an extract of calyces from *Physalis peruviana*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66(April). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102797>
- Cardona, M. I., Toro, R. M., Costa, G. M., Ospina, L. F., Castellanos, L., Ramos, F. A., & Aragón, D. M. (2017). Influence of extraction process on antioxidant activity and rutin content in *Physalis peruviana* calyces extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(6), 164–168. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70623>
- Castañeda-Valbuena, D., Ayora-Talavera, T., Luján-Hidalgo, C., Álvarez-Gutiérrez, P., Martínez-Galero, N., & Meza-Gordillo, R. (2021). Ultrasound extraction conditions effect on antioxidant capacity of mango by-product extracts. *Food and Bioprocess Processing*, 127, 212–224. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.03.002>
- Chasquibol, N., & Yacono, J. (2015). Composición fitoquímica del aceite de las semillas del fruto del “Aguaymanto”, *Physalis peruviana* L. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 81(4), 311–318.
- Chew, S. Y., Teoh, S. Y., Sim, Y. Y., & Nyam, K. L. (2021). Optimization of ultrasonic extraction condition for maximal antioxidant, antimicrobial, and antityrosinase activity from *Hibiscus cannabinus* L. leaves by using the single factor experiment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 25(1), 100321. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100321>
- Dash, D. R., Pathak, S. S., & Pradhan, R. C. (2021). Extraction of oil from *Terminalia chebula* kernel by using ultrasound technology: Influence of process parameters on extraction kinetics. *Industrial Crops and Products*, 171(August), 113893. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113893>
- de Elguea-Culebras, G. O., Bravo, E. M., & Sánchez-Vioque, R. (2022). Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market – A review. *Industrial Crops and Products*, 175(November 2021). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114261>
- El Houda Lezoul, N., Belkadi, M., Habibi, F., & Guillén, F. (2020). Extraction processes with several solvents on total bioactive compounds in different organs of three medicinal plants. *Molecules*, 25(20). <https://doi.org/10.3390/molecules25204672>

- Folin, O., & Ciocalteau, V. (1927). Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–648.
- Gil-Martín, E., Forbes-Hernández, T., Romero, A., Cianciosi, D., Giampieri, F., & Battino, M. (2022a). Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chemistry*, 378. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131918>
- Gil-Martín, E., Forbes-Hernández, T., Romero, A., Cianciosi, D., Giampieri, F., & Battino, M. (2022b). Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chemistry*, 378. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131918>
- González-Locarno, M., Pautt, Y. M., Albis, A., López, E. F., & Tovar, C. D. G. (2020). Assessment of chitosan-rue (*Ruta graveolens* L.) essential oil-based coatings on refrigerated cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) quality. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/APP10082684>
- Hernandez, F Galindo, F. (2003). Determinacion de la energia de activacion para la reaccion de H + H 2 mediante el calculo de superficie de energia potencial. *Rev. Mex. Fis*, 49(3), 264–270.
- Lee, J., Kumar, S., Patel, S., Hyun, B., & Chandra, V. (2019). Bioresource Technology Biomolecules from municipal and food industry wastes : An overview. *Bioresource Technology*, September, 122346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122346>
- Madiha, I., Mat, Z., Rahmat, Z., & Suan, L. (2022). A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds : Phenolics , flavonoids , thymols , saponins and proteins. *Food Research International*, 157(February), 111268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>
- Marcela, R., & Arango, T. (2014). *Propuesta de un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto con actividad antioxidante de cálices de Physalis peruviana.*
- Martínez, W., Ospina, L. F., Granados, D., & Delgado, G. (2010). In vitro studies on the relationship between the anti-inflammatory activity of *Physalis peruviana* extracts and the phagocytic process. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 32(1), 63–73. <https://doi.org/10.3109/08923970903143957>
- Milićević, N., Kojić, P., Sakač, M., Mišan, A., Kojić, J., Perussello, C., Banjac, V., Pojić, M., & Tiwari, B. (2021). Kinetic modelling of ultrasound-assisted extraction of phenolics from cereal brans. *Ultrasonics Sonochemistry*, 79. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105761>

- Mohammadpour, H., Sadrameli, S. M., Eslami, F., & Asoodeh, A. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Moringa peregrina* oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. *Industrial Crops and Products*, 131(January), 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.030>
- Moreno-Ortega, A., Pereira-Caro, G., Luis Ordóñez, J., Manuel Muñoz-Redondo, J., Moreno-Rojas, R., Pérez-Aparicio, J., & Manuel Moreno-Rojas, J. (2020). Changes in the antioxidant activity and metabolite profile of three onion varieties during the elaboration of 'black onion.' *Food Chemistry*, 311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125958>
- Mrkonjić, Ž., Rakić, D., Olgun, E. O., Canli, O., Kaplan, M., Teslić, N., Zeković, Z., & Pavlić, B. (2021). Optimization of antioxidants recovery from wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) by ultrasound-assisted extraction: Multi-response approach. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 24(July). <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100333>
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- Olivares-Tenorio, M. L., Verkerk, R., van Boekel, M. A. J. S., & Dekker, M. (2017). Thermal stability of phytochemicals, HMF and antioxidant activity in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Functional Foods*, 32, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.021>
- Presti, G., Guarrasi, V., Gulotta, E., Provenzano, F., Provenzano, A., Giuliano, S., Monfreda, M., Mangione, M. R., Passantino, R., San Biagio, P. L., Costa, M. A., & Giacomazza, D. (2017). Bioactive compounds from extra virgin olive oils: Correlation between phenolic content and oxidative stress cell protection. *Biophysical Chemistry*, 230, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.09.002>
- Puente, L., Vega-Gálvez, A., Fuentes, I., Stucken, K., Rodríguez, A., & Pastén, A. (2021). Effects of drying methods on the characterization of fatty acids, bioactive compounds and antioxidant capacity in a thin layer of physalis (*Physalis peruviana* L.) pulp. *Journal of Food Science and Technology*, 58(4), 1470–1479. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04659-0>
- Rao, M. V., Sengar, A. S., C K, S., & Rawson, A. (2021). Ultrasonication - A green technology extraction technique for spices: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 116(September), 975–991. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.006>
- Raza, W., Lee, J., Raza, N., Luo, Y., Kim, K. H., & Yang, J. (2019). Removal of phenolic compounds from industrial waste water based on membrane-based technologies. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 71, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.11.024>

- Stevanato, N., & da Silva, C. (2019). Radish seed oil: Ultrasound-assisted extraction using ethanol as solvent and assessment of its potential for ester production. *Industrial Crops and Products*, 132(December 2018), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.032>
- Tamkutė, L., Jančiukė, G., Pukalskienė, M., Sarapinienė, I., Arvydas Skeberdis, V., & Rimantas Venskutonis, P. (2022). Cranberry and black chokeberry extracts isolated with pressurized ethanol from defatted by supercritical CO₂ pomace inhibit colorectal carcinoma cells and increase global antioxidant response of meat products during in vitro digestion. *Food Research International*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111803>
- Tavares, G. R., Massa, T. B., Gonçalves, J. E., da Silva, C., & dos Santos, W. D. (2017). Assessment of ultrasound-assisted extraction of crambe seed oil for biodiesel synthesis by in situ interesterification. *Renewable Energy*, 111, 659–665. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.065>
- Tlili, N., & Sarikurkcu, C. (2020). Bioactive compounds profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of water extracts from five selected medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 151(April), 112448. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112448>
- Tong, C., Shi, F., Tong, X., Shi, S., Ali, I., & Guo, Y. (2021). Shining natural flavonols in sensing and bioimaging. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 137, 116222. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116222>
- Vega-Gálvez, A., López, J., Torres-Ossandón, M. J., Galotto, M. J., Puente-Díaz, L., Quispe-Fuentes, I., & Di Scala, K. (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.010>
- Yarce, C. J., Alhaji, M. J., Sanchez, J. D., Oñate-Garzón, J., & Salamanca, C. H. (2020). Development of Antioxidant-Loaded Nanoliposomes Employing Lecithins with Different Purity Grades. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules25225344>
- Zhao, Y., Hou, Y., Tang, G., Cai, E., Liu, S., Yang, H., Zhang, L., & Wang, S. (2014). Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Epimedium brevicornum* maxim using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activities in vitro. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/864654>

4. Optimización de parámetros de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz de uchuva (*Physalis peruviana* L.)

Resumen

La extracción de compuestos de valor agregado a partir de residuos agroindustriales es un componente fundamental frente a la mitigación de pérdidas y desperdicios alimentarios, sin embargo, la estandarización de las metodologías de extracción requiere la aplicación de herramientas estadísticas que reduzcan el rango de condiciones de estudio a fin de encontrar los parámetros óptimos del proceso. El objetivo de esta investigación fue optimizar el proceso de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáliz de *P. peruviana* mediante la técnica asistida por ultrasonido. Se formuló un diseño experimental Box-Behnken para evaluar el efecto de los factores: amplitud de onda (20%, 40%, 60%), relación líquido-sólido (20, 30 mL/g, 40 mL/g) y tamaño de partícula (20 μm , 210 μm , 150 μm). Se utilizaron los coeficientes de determinación en términos individuales lineales, cuadráticos de interacción y la falta de ajuste para evaluar la capacidad predictiva de los modelos matemáticos y posteriormente se realizó la validación experimental. En el extracto obtenido bajo condiciones óptimas, se identificó y cuantificó el flavonol Rutina mediante la técnica de HPLC-DAD.

El análisis de varianza indicó significancia para los factores independientes, factores al cuadrado y la interacción entre la amplitud de onda y el tamaño de partícula. Se demostró que la amplitud de onda fue el factor que más influyó en la extracción, seguido del tamaño de partícula y relación líquido-sólido. El modelo de regresión tuvo un coeficiente de correlación R^2 de 98.52, R^2 ajustado de 95.87 y falta de ajuste no significativo ($p > 0.05$). Se encontró que la amplitud de onda de 53, relación líquido-sólido de 32 mL/g y tamaño de partícula de 200 μm permitieron maximizar la respuesta de contenido fenólico. Mediante validación experimental se obtuvo un contenido fenólico de 54.52 mg EAG/g y se encontró una concentración de Rutina de 18.932 mg/g en el extracto obtenido bajo condiciones óptimas.

4.1 Introducción

La presencia de compuestos fenólicos en el cáliz de *P. peruviana* es relevante puesto que en algunas variedades se ha identificado el flavonol rutina, compuesto que se puede asociar con las propiedades biológicas del cáliz tales como la capacidad antioxidante (Franco *et al.*, 2007; Ocampo *et al.*, 2015). Sin embargo, la extracción de compuestos es una fase crítica que implica la elección del método de extracción y evaluación de parámetros operativos para lograr extraer la mayor cantidad de compuestos. En este sentido, la extracción asistida por ultrasonido se considera una técnica segura que ha mostrado ventajas sobre los métodos convencionales (Annur *et al.*, 2021; Bouafia *et al.*, 2021; Dzah *et al.*, 2020)

La elección de los parámetros de extracción requiere de herramientas matemáticas y estadísticas que permitan el análisis simultáneo del efecto de las variables, así como la optimización de las condiciones experimentales y la reducción del número de experimentos. En este sentido, la metodología de superficies de respuesta es una herramienta eficaz de alta capacidad de análisis estadístico que permite maximizar o minimizar la variable respuesta de interés, además, esta metodología ha sido aceptada para optimizar los procesos de extracción de compuestos bioactivos a partir de materias primas vegetales (Chan *et al.*, 2014).

Con el propósito de profundizar en el estudio de la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáliz de *P. peruviana*, se llevó a cabo el proceso de optimización mediante un diseño de superficies de respuesta aplicado a la extracción asistida por ultrasonido. Para esto, se tuvo en cuenta los resultados de los diseños unifactoriales presentados en el capítulo 3, donde se encontró que el tiempo de sonicación de 10 min y el solvente etanol al 60% fueron adecuados para obtener una mejor respuesta de contenido fenólico. Por su parte, entre los factores: amplitud de onda, relación líquido-sólido y tamaño de partícula se evidenció que, aunque no hubo diferencias estadísticas, la variable respuesta contenido fenólico presentó una tendencia creciente con algunos niveles de estudio medios y máximos en el diseño unifactorial. Lo anterior genera interés en el estudio de las interacciones de los factores a fin de maximizar la variable respuesta. En efecto, los

factores: porcentaje de amplitud de onda, relación líquido-sólido y tamaño de partícula se eligieron para realizar el análisis de superficies de respuesta.

Otro criterio a tener en cuenta en la elección de los factores fue la relevancia industrial y económica, en este sentido, se procuró que las variables elegidas involucren variables de proceso y también condiciones del sólido, cabe mencionar que las operaciones de sonicación y reducción de tamaño de partícula implican alto gasto energético y consumo de solventes, debido a esto, se requiere conocer el comportamiento de estas variables en conjunto para identificar si existe un punto óptimo que permita maximizar la respuesta de contenido fenólico. En adición, la elección de los factores también se sustenta en un análisis bibliográfico con estudios relacionados con la extracción de compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales, así mismo, con base en estudios previos de la presencia del flavonol rutina en diferentes partes de la planta de *P. peruviana*.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Reactivos y materia prima

La metodología de adecuación de la materia prima y reactivos utilizados se describen a detalle en el apartado 3.1.1 y 3.1.2 del capítulo 3

4.2.2 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos (TPC)

La extracción de compuestos fenólicos se realizó utilizando la metodología asistida por ultrasonido con un tiempo de sonicación de 10 min y etanol al 60%. Se eligieron como factores de estudio la amplitud de onda (40%, 50%, 60%), la relación líquido-sólido (20 mL/g, 30 mL/g, 40 mL/g) y tamaño de partícula (20 μm , 210 μm , 150 μm), los cuales se analizaron mediante un diseño de superficies de respuesta.

Se utilizó un sonicador (Ref. 5059600 INVYEMEN Danbury, USA) acoplado a una sonda eléctrica y un generador ultrasónico, con potencia máxima de salida (400 W) y el tipo utilizado fue de 1/2" de diámetro. En cada extracción se usó 1 g de cáliz de *P. peruviana*, se depositaron en un vaso de precipitado de 50 mL, el cual contenía el solvente, los extractos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 min y se filtraron, el filtrado se utilizó

para la cuantificación del contenido de compuestos fenólicos mediante el método de Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927)

4.2.3 Diseño experimental y análisis estadístico

El análisis de datos se realizó mediante un diseño Box-Behnken con 3 factores y tres repeticiones en el punto central para un total de 15 experimentos y una variable respuesta. Los factores estudiados fueron amplitud de onda (X_1), relación líquido-sólido (X_2) y tamaño de partícula (X_3) y la variable respuesta fue el contenido fenólico (TPC).

Los resultados de TPC se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g) y se ajustaron a una ecuación polinomial de segundo orden. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% y los modelos matemáticos fueron evaluados en función de la falta de ajuste y sus coeficientes de determinación en términos individuales lineales, cuadráticos y de interacción. Para la representación gráfica de los resultados, se generaron gráficos de superficie a partir de la ecuación polinomial ajustada (Ec. 4.1) utilizando los coeficientes de regresión.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (\text{Ec 4.1})$$

Donde β_0 es la constante del modelo; β_i es el término dependiente o efecto lineal del factor de entrada, X_i ; β_{ii} es el efecto cuadrático del factor de entrada X_i y β_{ij} es el efecto de interacción lineal- lineal entre el factor de entrada X_i y X_j (Myers & Douglas, 2009).

El análisis estadístico del diseño Box-Behnken se realizó utilizando el software R (versión 4.1.1). En la Tabla 4-1 se presenta el diseño experimental donde se indica la combinación de factores y nivel junto con la respectiva codificación.

4.2.4 Identificación y cuantificación de Rutina mediante HPLC-DAD

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), se realizó en un equipo Shimadzu® equipado con una bomba binaria (Waters, 1525) y un detector de arreglo de diodos (DAD) G1315 Agilent 1200. El método de identificación de rutina se basó en estudios previos relacionados con el compuesto en extractos vegetales (J. Huang & Xie, 2010; Li *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2010).

La fase estacionaria consistió en una columna C18 (4.6X150 mm) a una temperatura de 30 °C, la fase móvil estuvo conformada por la combinación de solventes A: ácido fórmico 0.1%, B: acetonitrilo en ácido fórmico 0.1% de acuerdo al siguiente gradiente: 10-60% A (0 – 10 min), 60% A (10-15 min), 60 – 80% A (15-20 min), y 90% A (25-30 min). Se realizó una separación en fase reversa, la presión del sistema fue de 104.7±0.7 bar (90% solvente A, 1ml/min, 30°C) y se utilizaron 20 µL como volumen de inyección. Las muestras se filtraron por medio de una membrana de 0.20 µm Antes de inyectarlas al sistema. Los cromatogramas se registraron a 260 nm.

La preparación del estándar de rutina se realizó disolviendo 10 mg en 10 mL de metanol al 10% y a partir de esta solución se prepararon diferentes diluciones en un rango de concentraciones desde 0.01 - 0.1 mg/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

Los resultados de TPC se presentan en la Tabla 4-1. Se observó que los factores de estudio mostraron un rango de respuesta de TPC entre 21.92±0.11 a 48.292±2.3 mg EAG/g encontrando que, con una amplitud de onda de 50%, relación líquido-sólido de 30 mL/g y tamaño de partícula de 210 µm, la respuesta de contenido fenólico tuvo una tendencia hacia el incremento.

Tabla 4- 1. Diseño Box-Behnken para la evaluación de los factores: amplitud de onda, relación líquido-sólido y tamaño de partícula en la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz *P. peruviana*

Tratamiento	Amplitud de onda (%)	Relación líquido-sólido (mL/g)	Tamaño de partícula (µm)	Valores codificados			TPC (mg EAG/g)
				X ₁	X ₂	X ₃	
1	50	20	270	0	-1	1	32.25±0.31
2	60	30	270	1	0	1	26.44±0.21

3	60	20	210	1	-1	0	41.56±1.02
4	60	40	210	1	1	0	36.92±0.83
5	50	40	150	0	1	-1	34.69±0.22
6	50	20	150	0	-1	-1	40.34±0.34
7	60	30	150	1	1	-1	32.97±1.23
8	40	30	150	-1	0	-1	26.65±0.43
9	50	40	270	0	1	1	25.32±0.92
10	50	30	210	0	0	0	48.28±0.22
11	40	20	210	-1	-1	0	35.47±0.54
12	40	30	270	-1	0	1	21.92±0.11
13	40	40	210	-1	1	0	29.80±0.45
14	50	30	210	0	0	0	48.29±2.31
15	50	30	210	0	0	0	48.28±0.88

Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar. **TPC:** contenido fenólico, **EAG/g:** equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto.

Los resultados de los puntos factoriales presentados en la Tabla 4.1 indicaron que la combinación de los tres factores evaluados incrementó el TPC en comparación con los resultados de los diseños independientes, donde el TPC no alcanzó valores superiores a 40 mg EAG/g. En el presente análisis se podría inferir que la región óptima del experimento está cercana a los puntos centrales; por el contrario, con los diseños independientes se asumió que algunos factores como el porcentaje de amplitud de onda de 60% (nivel superior) era la mejor condición de proceso.

En el análisis de varianza (Anexo 4) se encontró que los términos lineales y cuadráticos de todos los factores de estudio tuvieron efecto significativo sobre el TPC, así mismo, el efecto de interacción entre la amplitud y el tamaño de partícula fueron significativos ($p < 0,05$). De acuerdo con lo anterior, se estableció el modelo que describe el

comportamiento de los resultados para el contenido fenólico y así se determinó una relación empírica entre la variable respuesta y los factores de estudio:

$$\text{TPC (mg EAG/g)} = 48.28300 + 3.02062X_1 - 2.85488X_2 - 3.59325X_3 - 9.23825X_1^2 - 12.05450X_3^2 - 1.2332 X_1 X_3$$

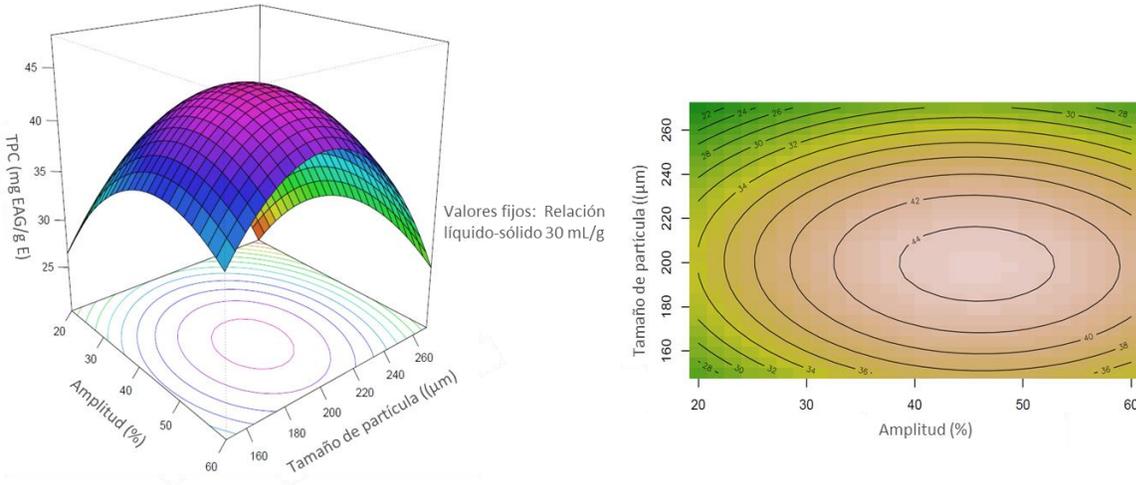
Donde: X_1 : (Amplitud %); X_2 : Relación líquido-sólido; X_3 : Tamaño de partícula

En el modelo estadístico se omitieron el término cuadrático de la relación líquido-sólido y los términos de las interacciones amplitud: relación líquido-sólido y relación líquido-sólido: tamaño de partícula puesto que no fueron significativos ($p > 0.05$). El signo y magnitud de los coeficientes de regresión permitió interpretar el efecto de los factores sobre la variable respuesta. El signo negativo indicó que, cuando el nivel de la variable aumenta, la respuesta tiende a disminuir, mientras que el signo positivo indicó una relación directamente proporcional con la respuesta. La falta de ajuste del modelo no fue significativa ($p > 0.05$), lo cual significa que el modelo encontrado explica adecuadamente la variación del TPC. El valor de R^2 ajustado fue de 98.35% y demuestra un alto grado de correlación entre los valores experimentales y predichos, por lo tanto, se establece que el modelo tiene buena capacidad predictiva.

Con base en los valores para los coeficientes del modelo, el factor que más influyó respecto al TPC fue la amplitud de onda X_1 , seguido del tamaño de partícula X_3 y la relación líquido-sólido X_2 . La relación entre los parámetros de extracción y el TPC se representa en las gráficas de superficie de respuesta.

En la Fig. 4-1 se fijó la relación líquido-sólido a 30 mL/g para observar el comportamiento de extracción con base en la amplitud de onda y el tamaño de partícula, la interacción de estos factores resultó significativa en el modelo establecido, por lo tanto, tuvo relevancia en la extracción de compuestos fenólicos, en este caso, se observa que la región donde se podría maximizar la respuesta de TPC se alcanza con una amplitud de onda entre 45 a 55% y un tamaño de partícula entre 200 y 220 μm .

Figura 4-1. Superficie de respuesta y diagrama de contorno. Comportamiento de las variables amplitud de onda y tamaño de partícula sobre el contenido fenólico en la extracción asistida por ultrasonido



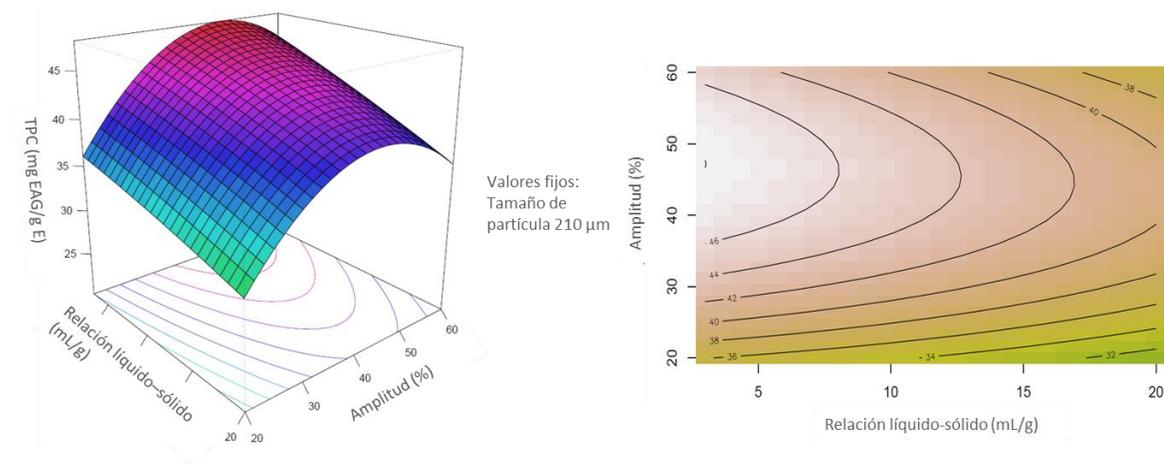
El comportamiento observado indica que los niveles de estudio para la amplitud de onda y el tamaño de partícula tienen un punto límite a partir del cual la respuesta de TPC tiende a disminuir posiblemente por la degradación de compuestos fenólicos asociada al incremento en la temperatura como lo reportó Bouafia *et al.* (2021) para rangos de amplitud comprendidos entre 40% a 60%. En este sentido, los compuestos fenólicos, tienden a degradarse con temperaturas cercanas a los 50 °C, las cuales se alcanzan en los procesos de sonicación según lo reporta Roman *et al.* (2020). En la misma línea de investigación, Xu & Pan. (2013) informaron un efecto negativo cuando se incrementó el porcentaje de amplitud más del 60%, en este caso los autores indicaron que si se excede el porcentaje de amplitud las burbujas aumentan su tamaño, hay menor posibilidad de implotar y, por lo tanto, se disminuyen los resultados de extracción.

De otro lado, en el trabajo experimental realizado con cáliz de *P. peruviana* se evidenció que las características físicas y morfológicas del cáliz similares a una estructura fibrosa, dificultaron la extracción de TPC sin el aporte de energía externa como el ultrasonido. La reducción del tamaño de partícula ayudó a incrementar el área de superficie de contacto con el solvente y, posteriormente, incrementar la difusividad, promover la transferencia de masa y generar una ruta de difusión más corta para los compuestos desde el sólido al solvente (Annur *et al.*, 2021; Dassoff & Li, 2019).

La interacción de los factores amplitud y tamaño de partícula permitió concluir que, en la extracción asistida por ultrasonido, un diámetro de partícula medio como componente de las propiedades de la materia prima resultó favorable para la extracción a diferencia de la de los resultados del análisis de factores independientes, donde se encontró que el TPC tuvo una tendencia hacia el incremento con un tamaño de partícula menor (150 μm). En este sentido, es importante mencionar que los efectos del tratamiento de sonicación también promueven la reducción de tamaño de la matriz vegetal mediante la ruptura y fragmentación de los tejidos, por lo tanto, los procesos de reducción de tamaño de partícula mediante la molienda se pueden estandarizar a fin de lograr un tamaño de partícula promedio que no implique excesivo gasto energético.

Por otra parte, se analizó el comportamiento de extracción de compuestos fenólicos en la interacción de la amplitud de onda y la relación líquido-sólido (Figura 4-2). La combinación de los dos factores se relaciona con la densidad de la mezcla, de acuerdo a las condiciones de la mezcla, se promueve la transferencia de energía externa a través de la propagación de ondas de ultrasonido y finalmente se mejora la difusividad. En este caso, la región donde se maximiza el TPC corresponde al rango comprendido entre 25 – 35 mg/ mL.

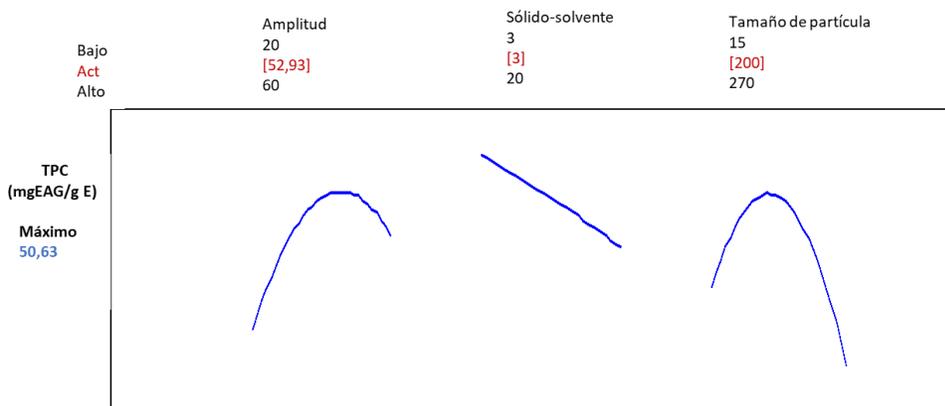
Figura 4-2. Superficies de respuesta y diagramas de contorno. Comportamiento de las variables relación líquido-sólido y amplitud de onda sobre el contenido fenólico en la extracción asistida por ultrasonido



Es importante mencionar que, con la máxima relación líquido-sólido evaluada (40 mL/g) no se evidenció aumento del TPC, lo cual incurre en desperdicio de solvente y energía. Se ha reportado que durante la primera etapa de extracción (extracción rápida) el efecto de la relación sólido solvente no es significativo, por el contrario, en la segunda etapa la relación sólido solvente es relevante dado que se requiere mayor eficacia del solvente (Stanisavljević *et al.*, 2007). De otro lado, cuando se utiliza una proporción baja de solvente respecto a sólido, se tiende a alcanzar el equilibrio rápidamente, es decir la acción del solvente no se completa y los resultados de extracción tienden a ser menores.

De acuerdo al procedimiento estadístico, los resultados de optimización arrojados por el software mostraron que para maximizar el TPC a un valor de 51.63 mg EAG/gE se requiere un porcentaje de amplitud de onda de 53%, una relación líquido-sólido 32 mL/g y un tamaño de partícula de 200 μm (Fig. 4-3).

Figura 4-3. Factores optimizados para la variable contenido fenólico en la extracción asistida por ultrasonido



El análisis de superficies de respuesta demostró que el TPC incrementó con las combinaciones de los niveles de puntos centrales, cabe mencionar que el comportamiento de los factores independientes como la amplitud de onda y la relación líquido-sólido en los diseños unifactoriales presentaron una tendencia hacia el incremento en TPC con las combinaciones de los niveles máximos. Lo anterior representa un beneficio en los costos operativos que se generar por el uso de energía en los procesos de sonicación y también

en la cantidad de solvente utilizado. Así mismo, los resultados de TPC en los diseños independientes estuvieron en el rango de (17.18 ± 0.12 a 37.85 ± 0.94 mg EAG/g) mientras que los puntos factoriales (Tabla. 4-1) demostraron un mayor resultado de TPC (48.29 ± 0.22 mg EAG/g).

Finalmente, se realizó la validación experimental donde se obtuvo un TPC de 54.52 mg EAG/g y se observó que la variación entre la respuesta predicha y la experimental fue de 0.42%. Lo anterior demuestra que el modelo presentó una buena capacidad predictiva y describe adecuadamente el comportamiento del contenido fenólico en función de la amplitud, la relación líquido-sólido y el tamaño de partícula en la extracción asistida por ultrasonido, además, el coeficiente de variación en la etapa experimental fue de 0.8%, indicando que el ensayo de extracción permitió obtener resultados confiables y el proceso se controló adecuadamente.

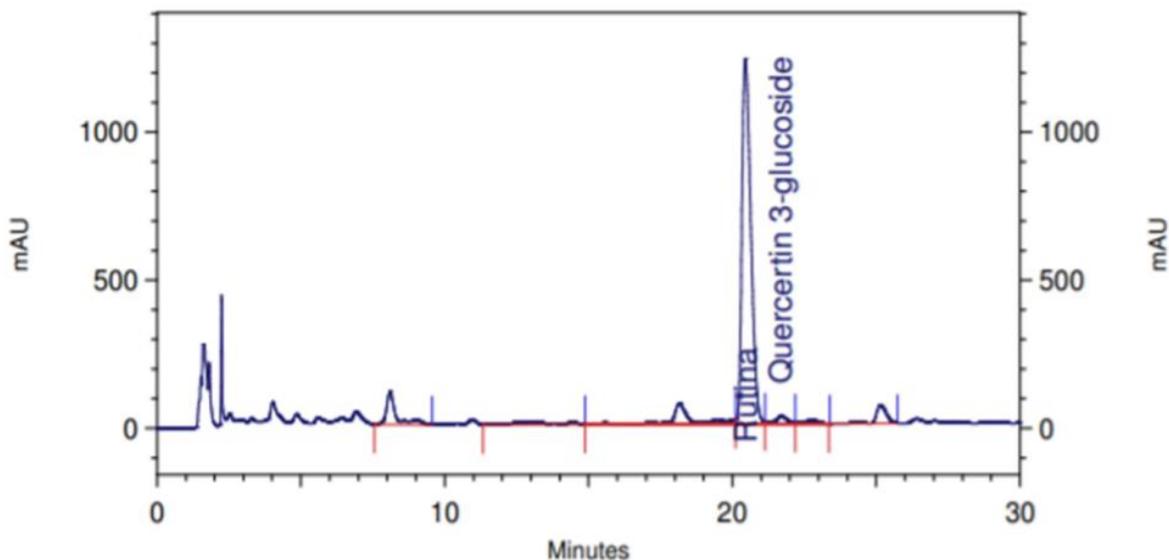
Se reportan pocas investigaciones relacionadas con el cáliz de *P. peruviana*, Cardona *et al.*, (2017) utilizaron extracción convencional con etanol 70% durante 72 h, el máximo valor de TPC reportado en este estudio fue de 20,86 mg EAG/g. Gironés *et al.* (2014) identificaron fitonutrientes en diferentes frutos exóticos de Latinoamérica, para el caso de algunas variedades de *Physalis*, los resultados indicaron mayor TPC presente en los cálices ($195,44 \pm 3,88$ mg/100g peso seco) respecto al fruto ($2,18 \pm 0,71$ mg/100 g peso seco). En este caso, la extracción se realizó por medio de la técnica convencional utilizando etanol como solvente. Cabe mencionar que el contenido fenólico también se atribuye al cultivar, el tiempo de cosecha, el estado de madurez, la localización y el solvente empleado para la extracción (Bravo *et al.*, 2011).

4.4 Identificación y cuantificación de Rutina por HPLC-DAD

Las condiciones cromatográficas utilizadas permitieron obtener una buena resolución para la señal de rutina en el cáliz de *P. peruviana*. cómo se presenta en la Fig. 4-4. El tiempo de retención para las muestras evaluadas por triplicado fue de 15 min y la elución del compuesto se logró a través de un gradiente que consistió en disminuir la polaridad del sistema y poco a poco se concentró la fase orgánica para que terminen de eluir los

compuestos poco polares. Se observaron picos que indican la presencia de otros compuestos en el extracto, los cuales tienen una condición lipofílica y podrían ser de interés para futuras investigaciones.

Figura 4- 4. Cromatograma para extracto de cáliz *P. peruviana* Elución del compuesto Rutina (Quercetin 3-glucoside)



El cromatograma confirma la presencia del flavonol rutina en el extracto vegetal, el pico cromatográfico sugiere buena calidad del análisis. Se eligió un rango de concentraciones comprendido entre 0.05 hasta 2 mg/mL para elaborar la curva de calibración con el estándar (Anexo 5), así mismo, se obtuvo la ecuación de la recta $y = 65231470.34X + 1077993.4$, $R^2 = 0.997$. Los resultados demostraron linealidad en los datos, confirmando que las concentraciones de trabajo propuestas fueron directamente proporcionales a la concentración del compuesto en un rango establecido. El valor de R^2 o coeficiente de determinación (0.997) indicó alta correlación entre la concentración del analito y la respuesta del cromatógrafo (Área).

Por su parte, la concentración del flavonol rutina en el cáliz *P. peruviana* se cuantificó como se observa en la Tabla 4-2, los coeficientes de variación para los datos fueron menores a 5%, lo que sugiere que los resultados son confiables y se ajustaron al análisis realizado, en este sentido, se encontró una concentración final de rutina en el extracto de cáliz de *P. peruviana* de 18.93 mg/g.

Tabla 4- 2. Concentración de Rutina en el extracto de cáliz de *P. peruviana*

ID muestra	[] Extracto (g/mL)	Tiempo Ret (min).	Área	[] Rutina (mg/mL)	[] Rutina (mg/g E.seco)	SD	CV%
M1	0.0373	20.46	55669867	0.836	17.28	0.759	4.325
M2	0.0629	20.44	57492497	0.864	18.05	0.232	1.564
M3	1.842	19.33	97345146	1.475	18.65	0.543	3.375
M4	3.189	19.31	121035401	1.838	18.70	0.531	3.674
M5	5.142	19.85	156604142	2.384	19.28	0.394	2.432
Promedio					18.93		

[] Extracto (mg/mL): Concentración del extracto, tiempo de retención, área, [] Rutina: Concentración de rutina, SD: Desviación estándar, CV%: Coeficiente de variación.

La presencia de rutina en plantas del género *Physalis* tiene mayor relevancia para la extracción debido a la actividad biológica relacionada con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes; se ha evidenciado la presencia de este compuesto en diferentes partes de la planta encontrando mayor contenido de rutina en las hojas y flores (Moreira & de Souza Dias, 2018).

Nguyen *et al.* (2021) informaron acerca de la presencia de rutina en una variedad de *Physalis*, la extracción se realizó con la mezcla metanol-agua al 70% y ultrasonido. Se comprobó que las hojas de la planta tuvieron mayor contenido de rutina (165.8 ± 6.337 mg/kg de peso seco) respecto al fruto. Cardona *et al.* (2017), extrajo rutina a partir de las hojas de *Physalis* usando extracción convencional con etanol al 70% y un tiempo de extracción de 72 h, los autores reportaron una concentración de rutina de 13.25 ± 0.02 µg/mg con un rango de concentraciones de estudio de 0.1 a 40 µg/mL.

En la misma línea de investigación, Moreira & de Souza. (2018) realizaron la extracción de compuestos como rutina, catequina y ácido cafeico a partir de *Physalis angulata*, la extracción fue asistida por ultrasonido y para el análisis cualitativo HPLC-DAD se estableció un rango de detección de 0.5 a 30 µg/mL, la concentración de rutina como componente mayoritario varió de 23.5 a 110.7 µg/mg. Por su parte, Carniel *et al.* (2018) reportaron un contenido de rutina de 58.28 mg/L. en la extracción asistida por ultrasonido en frutos de *Physalis angulata*.

La actividad biológica de las plantas del género *Physalis* se evaluó en modelos *in vivo*. Sun *et al.* (2020), evaluaron la actividad antidiabética en un modelo de ratón inducido por D-galactosa, se demostró que disminuyó la β -galactosidasa asociada a la senescencia del hígado, el bazo y el hipocampo, así como el estrés oxidativo del hígado, el plasma y el cerebro. Entre los compuestos fenólicos presentes se cuantificó rutina, la cual estuvo presente en una concentración de 1.67 ± 0.07 mg/g.

Los resultados del presente estudio demostraron que el contenido de rutina presente en un subproducto agroindustrial es comparable con algunas especies alimentarias. Carbone *et al.* (2020), realizaron la extracción de rutina a partir de una planta aromática *Humulus lupulus* mediante la técnica de ultrasonido utilizando etanol como solvente, obteniendo una concentración de 1.092 μ g/g de extracto. La rutina también se extrajo de pulpa y piel de berenjena, en este caso la concentración del compuesto en la pulpa fue de 0.82 mg/g, mientras que en la piel la concentración fue de 2.32 mg/g (Dong *et al.*, 2020). La aplicación de solventes verdes en la recuperación de rutina también se ha estudiado, en este sentido los solventes eutécticos profundos naturales, NADES: cloruro de colina y glicerol en proporción 1:1 se utilizaron para extraer rutina a partir de trigo serraceno, los autores reportaron una concentración de 9.5 mg/g (Huang *et al.* (2017). Con la misma combinación de NADES se logró extraer rutina de *Sophora japónica* obteniendo un rendimiento máximo de extracción de 284.81 mg/g (Zang *et al.*, 2020).

4.5 Conclusiones

Colombia es el principal país exportador mundial de uchuva, por tal razón se espera que la producción aumente y es necesario utilizar tecnologías eficientes para el aprovechamiento de los subproductos que se generan después de la cosecha o procesos agroindustriales y han demostrado potencial comercial.

La combinación de los factores que incluyeron condiciones del sólido como el tamaño de partícula y variables de proceso como la amplitud de onda y la relación líquido-sólido en la extracción asistida por ultrasonido permitieron maximizar la respuesta en la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáliz de *P. peruviana* empleando herramientas de optimización.

Los resultados del presente estudio demostraron que es posible la extracción de compuestos fenólicos utilizando una técnica sencilla, de bajo impacto ambiental y de fácil reproducibilidad. El proceso de extracción permitió determinar que el flavonol rutina se solubilizó en el solvente etanol (60%), lo cual facilitó su extracción y cuantificación. Por lo tanto, el cáliz de *P. peruviana* es una fuente sostenible para la extracción de metabolitos que aportan beneficios a la salud como la rutina, un compuesto de gran relevancia en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Sin embargo, debido a la alta sensibilidad de estos compuestos a factores extrínsecos es necesario que se evalúen mecanismos de encapsulación que limiten los fenómenos de degradación y permitan la aplicación del extracto en matrices cosméticas, farmacéuticos o alimentarias.

Bibliografía

- Agcam, E. (2022). Degradation kinetics of pomegranate juice phenolics under cold and warm sonication process. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 80(July), 103080. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103080>
- Annur, A. S., Rahman, R. A., Munir, A., Murad, A., El-enhasy, H. A., & Illias, R. (2021). Ultrasonidos: una técnica de extracción de especias con tecnología verde: una revisión. *Carbohydrate Polymers*, 118159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.006>
- Bouafia, M., Colak, N., Ayaz, F. A., Benarfa, A., Harrat, M., Gourine, N., & Yousfi, M. (2021a). The optimization of ultrasonic-assisted extraction of *Centaurea* sp. antioxidative phenolic compounds using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 25(July 2020), 100330. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100330>
- Bouafia, M., Colak, N., Ayaz, F. A., Benarfa, A., Harrat, M., Gourine, N., & Yousfi, M. (2021b). The optimization of ultrasonic-assisted extraction of *Centaurea* sp. antioxidative phenolic compounds using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 25(July), 100330. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100330>
- Bravo, K., Sepulveda Ortega, S., Lara Guzman, O., Navas Arboleda, A., & Osorio, E. (2011). Influence of cultivar and ripening time on bioactive compounds and antioxidant properties in Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.). <https://doi.org/10.1002/jsfa.6866>
- Carbone, K., Macchioni, V., Petrella, G., & Cicero, D. O. (2020). Exploring the potential of microwaves and ultrasounds in the green extraction of bioactive compounds from *Humulus lupulus* for the food and pharmaceutical industry. *Industrial Crops and Products*, 156(April), 112888. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112888>
- Cardona, M. I., Toro, R. M., Costa, G. M., Ospina, L. F., Castellanos, L., Ramos, F. A., & Aragón, D. M. (2017). Influence of extraction process on antioxidant activity and rutin content in *Physalis peruviana* calyces extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(6), 164–168. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70623>
- Carniel, N., Dallago, R. M., Bilibio, D., Nunes, A. L., Bender, J. P., & Priamo, W. L. (2018). The effects of ultrasound-assisted extraction on polyphenolics compounds obtained from *physalis angulata* using response surface approach. *Acta Scientiarum - Technology*, 40, 4–9. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v40i1.35530>

- Chan, C. H., Yusoff, R., & Ngoh, G. C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(6), 1169–1186. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.10.001>
- Dassoff, E. S., & Li, Y. O. (2019). Mechanisms and effects of ultrasound-assisted supercritical CO₂ extraction. *Trends in Food Science and Technology*, 86(February), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.001>
- Dong, R., Yu, B., Yan, S., Qiu, Z., Lei, J., Chen, C., Li, Y., & Cao, B. (2020). Analysis of Vitamin P Content and Inheritance Models in Eggplant. *Horticultural Plant Journal*, 6(4), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.05.005>
- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35(February), 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–648.
- Franco, L. A., Matiz, G. E., Calle, J., Pinzón, R., & Ospina, L. F. (2007). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Biomedica*, 27(1), 110–115. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.237>
- Gironés-Vilaplana, A., Baenas, N., Villaño, D., Speisky, H., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.025>
- Huang, J., & Xie, W. (2010). Extraction of rutin from flos sophorae immaturus with an aqueous 1-butyl-3-methylimidazolium chloride solution. *Analytical Sciences*, 26(3), 383–386. <https://doi.org/10.2116/analsci.26.383>
- Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., & Chen, Z. G. (2017). Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 221, 1400–1405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.013>
- Li, F. J., Ning, S. L., Li, Y., Yu, Y. J., Shen, C. D., & Duan, G. L. (2012). Optimisation of infrared-assisted extraction of Rutin from crude Flos Sophorae Immaturus using response surface methodology and HPLC analysis. *Phytochemical Analysis*, 23(4), 292–298. <https://doi.org/10.1002/pca.1357>
- Moreira, G. C., & de Souza Dias, F. (2018). Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-

cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. *Microchemical Journal*, 141(April), 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.035>

- Myers, R., & Douglas, M. (2009). *Response Surface Methodology: Process and Product in Optimization Using Designed Experiment*. John Wiley & Sons, Inc.
- Nguyen, K. N. H., Nguyen, N. V. T., & Kim, K. H. (2021). Determination of phenolic acids and flavonoids in leaves, calyces, and fruits of *Physalis angulata* L. in Viet Nam. *Pharmacia*, 68(2), 501–509. <https://doi.org/10.3897/PHARMACIA.68.E66044>
- Ocampo, Y., Franco, L., & Indias, C. De. (2015). *Cape gooseberry (Physalis peruviana L.) calyces ameliorate TNBS-induced colitis in rats*.
- Roman, M. C., Fabani, M. P., Luna, L. C., Feresin, G. E., Mazza, G., & Rodriguez, R. (2020). Convective drying of yellow discarded onion (Angaco INTA): Modelling of moisture loss kinetics and effect on phenolic compounds. *Information Processing in Agriculture*, 7(2), 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2019.07.002>
- Stanisavljević, I. T., Lazić, M. L., & Veljković, V. B. (2007). Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(5), 646–652. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.10.003>
- Sun, K., Sun, Y., Li, H., Han, D., Bai, Y., Zhao, R., & Guo, Z. (2020). Anti-ageing effect of *Physalis alkekengi* ethyl acetate layer on a d-galactose-induced mouse model through the reduction of cellular senescence and oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051836>
- Veillet, S., Tomao, V., & Chemat, F. (2010). Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*, 123(3), 905–911. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.005>
- Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- Xu, Y., & Pan, S. (2013). Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1026–1032. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.006>
- Zang, Y. Y., Yang, X., Chen, Z. G., & Wu, T. (2020). One-pot preparation of quercetin using natural deep eutectic solvents. *Process Biochemistry*, 89(April 2019), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.019>
- Zeng, H., Wang, Y., Kong, J., Nie, C., & Yuan, Y. (2010). Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of rutin from Chinese medicinal plants. *Talanta*, 83(2), 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.006>

5. Encapsulación de un extracto fenólico de cáliz de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en sistemas liposomales

Resumen

La escasa estabilidad fisicoquímica de los compuestos fenólicos después de extraerse de la matriz de origen es la mayor limitante para futuras aplicaciones industriales tales como nutraceúticas, alimentarias o cosméticas, por lo tanto, es necesario diseñar métodos de encapsulación que eviten la degradación de los compuestos y protejan su actividad biológica. El objetivo de este estudio fue formular sistemas liposomales como mecanismo de encapsulación de un extracto de cáliz de *P. peruviana*. Inicialmente, se determinaron los parámetros generales de formulación de liposomas libres de material encapsulado, evaluando la relación lecitina:colesterol y el medio de dilución. Posteriormente, se utilizó un diseño Box-Behnken para maximizar la respuesta de eficiencia de encapsulación y minimizar la respuesta de diámetro medio de partícula en la formulación de sistemas liposomales cargados con el extracto vegetal, se estudiaron los factores: concentración del extracto (40%, 70%, 100%), concentración de lecitina de soja (3 mg/mL, 5 mg/mL, 7 mg/mL) y tiempo de sonicación (10 min, 15 min, 20 min). Los sistemas liposomales se caracterizaron de acuerdo al diámetro medio de partícula, el índice de polidispersidad, el potencial ζ , la capacidad antioxidante y se evaluó la liberación *in vitro* de compuestos fenólicos.

Se encontró que la concentración de lecitina de soja (4 ± 0.3 mg/mL), concentración del extracto ($69 \pm 1.1\%$), tiempo de sonicación (13 ± 0.3 min) permitieron obtener liposomas con diámetro medio de partícula de 177.32 nm, eficiencia de encapsulación 68.32%, potencial ζ de -38.6 ± 2.11 mV, índice de polidispersidad de 0.11 ± 0.02 y evidenciaron capacidad antioxidante frente al radical peróxilo en condiciones de pH ácido y neutro. El ensayo de liberación *in vitro* de compuestos fenólicos indicó un porcentaje de liberación total de 81.32% a 996 min. Mediante el modelo matemático de primer orden se encontró una constante de liberación K de 0.76.

Introducción

Los compuestos fenólicos representan un grupo de metabolitos secundarios con amplia aplicabilidad industrial atribuida a sus propiedades biológicas las cuales han sido demostradas a nivel *in vitro* e *in vivo* (Duque *et al.*, 2020; Kowalska *et al.*, 2017; Saldaña *et al.*, 2015; Teng & Chen, 2019). En los últimos años, la búsqueda de alternativas para proteger la propiedad biológica de los biocompuestos a ha generado interés en el diseño de sistemas de encapsulación que resulten adecuados para la incorporación de diferentes extractos vegetales.

En este contexto, se reconocen algunas fuentes de extracción sostenible de compuestos de valor biológico como los residuos agroindustriales. Como parte de este estudio, previamente se logró extraer compuestos fenólicos a partir del cáliz del frutal exótico de *Physalis peruviana* L. entre los cuales se identificó y cuantificó el flavonol rutina, un antioxidante de relevancia industrial. Sin embargo, mediante ensayos exploratorios de la incorporación del extracto directamente en un prototipo de bebida, se observó deficiencias de solubilidad, defectos organolépticos y fisicoquímicos. Por lo tanto, se evidencia la necesidad de formular un sistema de encapsulación que protejan la actividad antioxidante del extracto y brinden una alternativa de uso en futuras aplicaciones.

Los sistemas liposomales son de interés de estudio puesto que permiten encapsular compuestos de carácter hidrófilo o hidrófobo debido a las propiedades fisicoquímicas que aportan los componentes de formulación como los fosfolípidos, por lo tanto, son útiles para la encapsulación de compuestos fenólicos. Además, los liposomas se pueden formular utilizando materia prima de origen natural como las lecitinas, característica que resulta relevantes en diferentes campos industriales (Large *et al.*, 2021).

Algunos autores concluyen que los extractos vegetales se encapsulan con éxito en sistemas liposomales, por ejemplo, Altin *et al.* (2018) formularon sistemas liposomales para encapsular el extracto de residuos de cáscara de cacao, la eficiencia de encapsulación reportada fue de $73.6 \pm 0.2\%$; Guldiken *et al.* (2019), encapsularon el extracto de zanahoria negra con una eficiencia de encapsulación de $82.2 \pm 9.7\%$; y Altin *et al.* (2018) formularon liposomas para encapsular el extracto de morera negra y lograron una eficiencia de encapsulación de 78.6%.

En este apartado se presenta la valuación de parámetros de formulación de sistemas liposomales para la encapsulación del extracto fenólico de cáliz de *P. peruviana* a fin de proteger la capacidad antioxidante. El estudio comprende la optimización de la formulación de liposomas y la caracterización de las propiedades fisicoquímicas que son relevantes para conocer la estabilidad, eficiencia de encapsulación y liberación de compuestos fenólicos encapsulados en liposomas.

5.1 Materiales y métodos

5.1.1 Reactivos y materias primas

Extracto seco de *P. peruviana* obtenido bajo condiciones optimizadas de extracción asistida por ultrasonido, lecitina de soja (mezcla de fosfolípidos: soy-phospholipids, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), Rutina (Quercetin-3-O-rutinoside 98%), etanol 98%, metanol 98%, (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)), carbonato de sodio, fluoresceína, 2-metilpropionamida (AAPH), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)), agua ultrapura (conductividad eléctrica 1 μScm) obtenida mediante el sistema de purificación Elix Millipore esencial®.

5.1.2 Formulación de liposomas libres de material encapsulado

Los sistemas liposomales se formularon utilizando lecitina de soja comercial (mezcla de fosfolípidos: soy-phospholipids), cuyo fosfolípido principal es la fosfatidilcolina. Por tratarse de una mezcla de fosfolípidos, la lecitina de soja presenta otros componentes (fosfolípidos >30%, fosfatidiletanolamina 10%, fosfatidilserina 10%, fosfatidilglicerol 10%, ácido fosfatídico 7% y carbohidratos, proteínas y cenizas 3%). De acuerdo con lo anterior, se tuvieron en cuenta algunas consideraciones para formular los sistemas liposomales. En primer lugar, el pKa de la fosfatidilcolina es 1, y se considera un fosfolípido de carga neutra. En segundo lugar, algunos estudios realizados con lecitina de soja han reportado que la concentración micelar crítica esta alrededor de 0.1 mmol medida a pH 7.4 a 30 °C, indicando que a partir de allí se forman agregados de tipo liposomal (Suk & Misran, 2017; Turchi *et al.*, 2022).

La formulación de los liposomas se realizó mediante el método de inyección de etanol, con base en la metodología reportada por Yarce *et al.* (2020). Así mismo, los factores y niveles de estudio se eligieron con base en los resultados de investigaciones previas realizadas por el grupo de investigación NATURA de la Universidad ICESI en la ciudad de Cali Colombia.

Con base en estudios previos, se conoce que factores como el pH y la relación lecitina:colesterol influyen en las características estructurales de los liposomas, en el presente estudio, se realizaron diseños independientes para evaluar diferentes condiciones de pH y relación lecitina:colesterol.

Se prepararon dos fases de estudio de la siguiente manera: la fase orgánica consistió en la solución etanólica de lecitina de soja y colesterol (0.6 mg/mL) en diferentes concentraciones como se presenta en la Tabla 5-1. Se añadieron gota a gota 2 mL de la fase orgánica a 2 mL de la fase acuosa la cual consistió en diferentes medios de dilución (buffer pH 4; 5; 7.4). El sistema se mantuvo en agitación constante (250 rpm, 5 min), la mezcla se llevó a agitación en vortex durante 3 min y se dejó en reposo 10 min. La mezcla resultante entre la fase orgánica y acuosa se diluyó en los medios acuosos preparados previamente en una relación 1:9 (v/v), se dejaron en reposo 15 min y se llevaron a sonicación durante 15 min (sonicador ref. 5059600 INVYMEN Danbury, USA) con una potencia de ultrasonido de 110 Watts, tip de 1/2" de diámetro y amplitud de onda 10%. El proceso de sonicación se llevó a cabo en intervalos de 2 min para evitar procesos de degradación. Por último, la purificación de liposomas se realizó por ultracentrifugación (1 min, 2000 rpm) en una microcentrífuga (Hettich RCF 10538) utilizando tubos de ultrafiltración (Eppendorf VWR, polietersulfona-PES modificada de 10 kDa, diámetro: 0.96 cm). Cada muestra se preparó por triplicado.

Tabla 5- 1. Diseño experimental unifactorial (DAC)

Factores	Niveles	Variable respuesta
Relación lecitina: colesterol	100:1, 100:5, 100:10	Diámetro medio de partícula, potencial eléctrico
Medio de dilución	Buffer pH 4; 5; 7.4	

5.1.1.1 Evaluación del diámetro medio de partícula y potencial eléctrico de los liposomas libres de material encapsulado

Teniendo en cuenta los enfoques de sistemas de encapsulación, en la presente investigación se espera obtener diámetros de partícula dentro del rango nanométrico, ya que el tamaño de partícula se relaciona con el aumento del área superficial de las gotas, de tal manera que un diámetro reducido confiere mayor estabilidad al sistema, cabe mencionar que los datos de diámetro medio se registraron en términos de intensidad, así mismo un potencial eléctrico cercano a [30 mV] se consideró adecuado como indicador de la fuerza de repulsión entre las partículas (Silva Malheiros *et al.*, 2010).

Con base en los principios de movimiento Browniano, se utilizó la dispersión de luz dinámica para relacionar la intensidad de radiación en función del diámetro de partícula y determinar los valores de índice de polidispersidad y diámetro medio de partícula. Para determinar el potencial eléctrico a partir de la movilidad medida se estimó la velocidad y dirección de las partículas en el campo eléctrico aplicado, en los dos casos se utilizó un Zetasizer nano ZSP (Malvern Instrument UK) con un láser rojo (633 nm) He/Ne, y un ángulo de dispersión de 173° a 25 °C. Para cada análisis se tomó 1 mL de los liposomas diluidos en agua ultrapura (1:100, v/v) se depositaron en una celda de flujo de cuarzo (ZEN0023) y se realizaron mediciones por triplicado.

5.1.3 Formulación de sistemas liposomales cargados con extracto de *P. peruviana*

La formulación de liposomas cargados con el extracto vegetal se realizó como se indicó en la sección 5.1.1, con algunas modificaciones. Las condiciones generales de formulación pH del medio (7.4) y relación lecitina:colesterol (100:10) se eligieron con base en los resultados de la formulación inicial sin extracto encapsulado.

Se diluyeron 15 mg/mL del extracto seco de *P. peruviana* en etanol como lo han reportado estudios previos para encapsulación de extractos fenólicos (Cantor *et al.*, 2019; Gibis *et al.*, 2012, Guldiken *et al.*, 2019), esta condición se definió como la concentración 100% del extracto. A partir de esta, se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 70% y 40%.

La fase oleosa consistió en: lecitina (3 mg/mL, 5 mg/mL, 7 mg/mL) y colesterol (0.6 mg/mL). A continuación, 2mL del extracto se agregaron lentamente a 2 mL de la fase oleosa, la mezcla se mantuvo en agitación y se dejó en reposo durante 20 min, posteriormente se realizó una dilución 1:9 de la mezcla final en el medio acuoso Buffer pH 7.4 y se mantuvo en agitación constante. Se realizó la ultracentrifugación y sonicación como es indicado en el apartado 5.1.2.

En el diseño de superficies de respuesta se estudiaron los factores: concentración del extracto de *P. peruviana* (40%, 70%, 100%), concentración de lecitina (3 mg/mL, 5 mg/mL, 7 mg/mL) y tiempo de sonicación (10 min, 15 min, 20 min) evaluados mediante el diseño Box-Behnken. Las variables de respuesta fueron diámetro medio de partícula (nm) y eficiencia de encapsulación (%), cada ensayo se realizó por triplicado.

Para establecer los parámetros óptimos de formulación, se utilizó la función de deseabilidad (D) a fin de minimizar el diámetro medio de partícula y maximizar la eficiencia de encapsulación. Finalmente, se llevó a cabo la validación de acuerdo a los resultados encontrados a partir del modelo estadístico.

5.1.4 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se realizó con base en la cuantificación de compuestos fenólicos siguiendo la metodología reportada por Jahanfar *et al.* (2021). Se tomó una alícuota de liposomas cargados con el extracto de *Physalis p.* y se llevó a ultracentrifugación (6 min, 10.000 rpm) utilizando tubos de ultrafiltración (Eppendorf VWR, polietersulfona-PES modificada de 10 kDa, diámetro: 0.96 cm). Posteriormente en una microplaca de 96 pozos, se depositaron 60 μ L del filtrado 60 μ L de del reactivo de Folin-Ciocalteu y 180 μ L de disolución de carbonato de sodio al 7%. La microplaca se incubó a 30 °C durante 30 min y posteriormente, se determinó la absorbancia a 750 nm en un lector de microplacas (Biotek Lx800, USA). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y el contenido total de fenoles fue calculado a partir de una curva de calibración de contenido fenólico para el extracto vegetal a concentraciones de 0.2 mg/ml, 1.5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL, 60 mg/mL, 100 mg/mL ($Y = 0.01226X + 0.1409$, $R^2: 0.943$). Los datos se reportaron de acuerdo a la Ecuación 5.1.

$$E.E (\%) = \frac{\text{Contenido fenólico inicial}}{\text{Contenido fenólico inicial} + \text{Contenido fenólico final}} * 100 \quad \text{Ec. 5.1}$$

Donde:

CFi: contenido fenólico inicial, Cff: contenido fenólico final

5.1.5 Caracterización de sistemas liposomales cargados con el extracto de *P. peruviana*

Diámetro medio de partícula, índice de polidispersidad y potencial ζ

Se realizó la evaluación del diámetro medio de partícula, índice de polidispersidad y potencial ζ como se indicó en el apartado 5.1.1.1.

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó mediante el ensayo *in vitro* ORAC, con base en la metodología reportada por Yarce *et al.* (2020). Se prepararon diluciones (1:10) de los sistemas liposomales en buffer pH 7.4 y 5 a fin de evidenciar el comportamiento antioxidante a diferentes condiciones de pH. Se prepararon soluciones de fluoresceína de 0.02 mg/mL y AAPH y 59.8 mg/mL. Utilizando una microplaca de análisis, se eligieron 3 pozos como control positivo (75 μ L de agua ultrapura y 125 μ L de fluoresceína), el control negativo consistió en 75 μ L de fluoresceína y 75 μ L de agua ultrapura. 60 μ L de las diluciones de sistemas liposomales se depositaron en otros pozos de estudio y posteriormente, se agregaron 50 μ L de reactivo AAPH a todos los pozos exceptuando el control positivo. La intensidad de fluorescencia se controló cada 5 min durante 120 min a 37 °C en un lector de microplacas Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT, EE. UU, longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 528 nm, respectivamente). Los datos se analizaron con base en la curva de calibración del extracto a concentraciones de 0.2 mg/ml, 1.5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL, 60 mg/mL, 100 mg/mL ($Y = 26592X + 7367664$ $R^2 = 0.9267$) y la capacidad antioxidante se expresó en μ M ET/g de acuerdo a la Ecuación 5.2.

$$\mu M ET/g \left[\frac{AUC_{muestra} - AUC_{control\ neg}}{AUC_{ex} - AUC_{control\ neg}} \right] * f \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

Donde:

AUC_{muestra} : Área bajo la curva de disminución de fluorescencia para la muestra de estudio.

$AUC_{\text{Control neg}}$: Área bajo la curva de disminución de fluoresceína para el control negativo

AUC_{Ex} : Área bajo la curva de disminución de fluoresceína para el extracto sin encapsular.

f: factor de dilución de la muestra (11).

5.1.6 Ensayo de liberación *in vitro* de compuestos fenólicos encapsulados en sistemas liposomales

El ensayo de liberación *in vitro* se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Yarce *et al.* (2020), se utilizó un buffer de pH 7.4 que simula condiciones fisiológicas y la liberación del extracto de *P. peruviana* se cuantificó en términos del contenido fenólico. En primer lugar, se depositaron 10 mL del medio de disolución tampón fosfato pH 7.4 en condiciones de sumidero, por lo tanto, 1 mL de los liposomas formulados bajo condiciones óptimas de colocó en tubos de ultrafiltración (Eppendorf VWR, polietersulfona-PES modificada de 10 kDa, diámetro: 0.96 cm) y se llevaron a un agitador orbital incubado a 37 °C y 60 rpm (Inkubator 1000 con Unimax 1010, Heidolph Instruments, Schwalbach, Alemania). Posteriormente, se tomaron las muestras del medio externo a intervalos de 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 360 y 996 min, en cada caso se reemplazó el volumen de muestreo con un volumen equivalente del medio de disolución a la misma temperatura. La cuantificación de fenoles se realizó de acuerdo a la metodología previamente descrita en el apartado 3.1.3 del Capítulo 2. Los resultados se expresaron como porcentaje de liberación de acuerdo a la Ecuación 5-3.

$$\% \text{ de liberacion} = \frac{CFI}{CFe} * 100 \quad \text{Ecuación 5.3}$$

Donde:

CFI: contenido fenólico liberado, CFe: contenido fenólico encapsulado

Los resultados se ajustaron a un modelo matemático de primer orden, el cual ha sido comúnmente utilizado en procesos de liberación de compuestos (Barzegar *et al.*, 2008, Costa & Sousa, 2001, Javadzadeh *et al.*, 2010). Según el modelo de primer orden, la liberación de compuestos se puede expresar mediante la Ecuación 5-4.

$$\text{Log } C = \text{Log } C_0 - Kt/2.303 \quad \text{Ecuación 5.4}$$

Donde C_0 es la concentración inicial de compuestos, K es la constante de velocidad de primer orden expresada en unidades de tiempo⁻¹, t es el tiempo, C representa el porcentaje de compuestos fenólicos liberado en el medio. Los datos se trataron como porcentaje logarítmico de compuestos fenólicos respecto al tiempo.

5.1.7 Evaluación preliminar de estabilidad respecto al diámetro medio de partícula, índice de polidispersidad, potencial ζ y capacidad antioxidante

Como información adicional a los objetivos de la presente investigación se realizó un ensayo preliminar de estabilidad de los liposomas bajo condiciones de refrigeración, para ello, 5 mL de los sistemas liposomales cargados con el extracto de *P. peruviana* se depositaron en recipientes de vidrio a 4°C durante 10 días, en los cuales se realizó el seguimiento al diámetro medio de partícula, índice de polidispersidad, potencial ζ y capacidad antioxidante según se indicó en los apartados 5.1.1.1 y 5.3.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Formulación de sistemas liposomales libres de material encapsulado

Efecto de la relación lecitina:colesterol

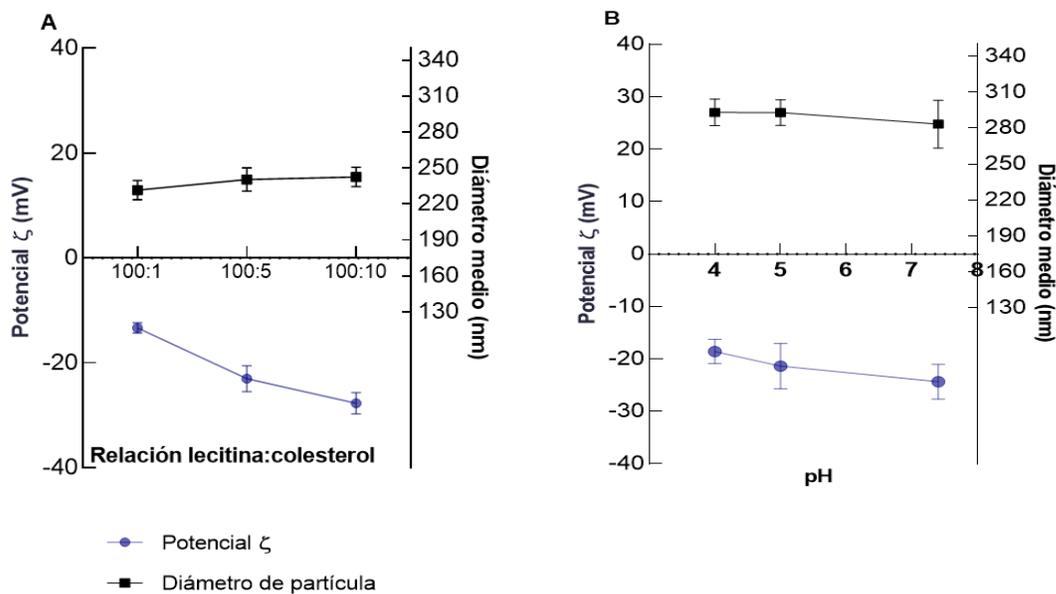
La relación lecitina:colesterol influyó en el valor del potencial eléctrico, se encontraron valores comprendidos en el rango de -16.34 ± 0.2 mV (con una relación molar de 100:1) a -27.7 ± 0.3 mV (con una relación de 100:10); por el contrario, la adición de colesterol a la formulación denotó solo un leve cambio en el diámetro medio de partícula como se presenta en la Fig. 5-1A.

En algunas investigaciones se ha reportado que la adición de colesterol podría favorecer la incorporación de compuestos de tipo lipófilo en los liposomas y, por lo tanto, se han trabajado relaciones molares altas, incluso 1:1 con respecto a los fosfolípidos (Kaddah *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2011). En el presente estudio se incorporó colesterol en la formulación

para aportar rigidez a la bicapa o estructura liposomal dado que los fosfolípidos por su configuración estructural presentan una configuración flexible que puede afectar la curvatura de los liposomas formando otro tipo de estructuras no esféricas.

Los resultados de potencial ζ demostraron que el colesterol aportó carga negativa al sistema reflejado en el incremento de los valores, lo cual favorece la repulsión electrostática. Como se reportó en la investigación de Lu *et al.* (2011), la incorporación de colesterol en los sistemas liposomales reduce la afinidad de unión a la superficie entre los cationes en la solución tampón y la superficie bicapa disminuyendo así los fenómenos de desestabilización. Por su parte, algunos autores reportaron que la incorporación de colesterol evita fugas de los compuestos hidrófilos encapsulados debido a que se logra mejorar el empaquetamiento de la membrana liposomal. (Eloy *et al.*, 2014; Vergara & Shene, 2019). De acuerdo a lo anterior, se eligió la relación molar lecitina: colesterol 100:10 para los ensayos posteriores.

Figura 5-1. A. Relación lecitina:colesterol, **B.** pH, sobre el potencial eléctrico (mV) y el diámetro de partícula (nm) en la formulación de sistemas liposomales libres de material encapsulado



Efecto del medio de dilución

Respecto a la influencia del medio en la formulación de los sistemas liposomales sin cargar, se pudo observar que el valor absoluto del potencial eléctrico incrementó con los valores de pH, pasando de -23.58 ± 1.2 mV (en buffer pH 4) a -28.56 ± 2.2 mV (en buffer pH 7.4); mientras que, el diámetro medio de partícula varió en un rango de 293.13 ± 12.2 a 283.30 ± 13.1 nm en las condiciones de pH evaluadas (Fig.5-1 B).

En este sentido, el comportamiento observado se puede explicar como el resultado de la protonación de los grupos fosfato y la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas. Es importante señalar que las fosfatidilcolinas permanecen en su configuración de ion híbrido por encima de pH 3, ya que el valor de pKa del grupo fosfato está entre 2 a 3 (Boggs, 1987). Sin embargo, por tratarse de una mezcla de fosfolípidos, algunos de éstos pueden tener un valor de pKa mayor, y por tal razón, con el incremento del pH aumentaría el número de moléculas con carga negativa.

De acuerdo con lo anterior, se podría inferir que el incremento del pH facilitó las interacciones en la capa eléctrica de la superficie liposomal sin afectar el tamaño de partícula. Otros autores también han reportado este comportamiento, Taylor *et al.* (2007) demostraron que los liposomas que encapsulan nisina permanecieron estables en un rango de pH de 5.5 a 11.5, por su parte, Gouda *et al.*, (2021) informaron que el efecto del pH esta coherentemente relacionado con el tipo de lípidos que conforman los liposomas ya que el pH afecta la carga del grupo fosfato y da como resultado un impedimento estérico, razón por la cual se obtienen diámetros de partícula pequeños y estables.

Los resultados del diámetro de partícula demuestran que los sistemas liposomales libres de material encapsulado se mantuvieron estables respecto al medio de dilución, así mismo, la mezcla de fosfolípidos empleada en la formulación resultó favorable ya que aporta carga negativa al sistema e incrementa el valor de potencial ζ . De acuerdo a lo anterior, se puede inferir que los compuestos sensibles al pH, como los compuestos fenólicos pueden encapsularse en sistemas liposomales.

5.2.2 Formulación de sistemas liposomales cargados con extracto de *P. peruviana*

A continuación, se presenta en análisis del diseño experimental Box-Behnken realizado para minimizar la respuesta del diámetro medio de partícula y maximizar la respuesta de eficiencia de encapsulación. El diámetro medio de partícula se eligió por ser una variable que contribuye a la estabilidad física del sistema y la eficiencia de encapsulación como un indicador de la aplicabilidad de los sistemas liposomales para encapsular el extracto vegetal.

5.2.2.1 Diámetro medio de partícula

En la Tabla 5-2 se presenta el diseño experimental con los valores reales y codificados y los resultados obtenidos para las variables respuesta: diámetro medio de partícula (nm) y eficiencia de encapsulación (%).

Tabla 5- 2. Diseño Box-Behnken para la encapsulación del extracto de *P. peruviana* en sistemas liposomales mediante la técnica de inyección de etanol

Tratamiento	Concentración extracto (%)	Concentración de lecitina (mg/mL)	Tiempo de sonicación (min)	Valores codificados			Diámetro de partícula (nm)	E:E (%)
				X ₁	X ₂	X ₃		
1	70	7	20	0	1	1	229.98±10.31	58.67±0.11
2	100	5	10	1	0	-1	297.15±21.22	70.34±5.65
3	100	5	20	1	0	1	256.12±24.22	68.32±5.11
4	70	3	20	0	-1	1	184.32±10.31	65.32±2.12
5	70	5	15	0	0	0	189.34±16.22	76.23±6.43
6	70	5	15	0	-1	-1	189.34±16.22	76.23±6.43
7	70	3	10	1	-1	-1	187.34±9.22	70.33±3.21
8	40	5	20	-1	0	1	168.22±11.61	56.45±53.32
9	40	3	15	-1	0	0	180.43±21.21	51.43±5.20

10	100	7	15	1	1	0	323.01±21.01	64.33±4.22
11	40	5	10	-1	0	-1	178.04±9.21	57.67±5.22
12	70	5	15	0	0	0	189.34±23.02	76.23±6.31
13	40	7	15	-1	1	0	251.43±13.12	53.21±4.21
14	100	3	15	1	-1	0	276.12±14.45	68.12±3.23
15	70	7	10	0	1	0	223.96±0.81	65.7±6.11

Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar. **EE (%)**: Eficiencia de encapsulación (%)

El diámetro medio de partícula de los liposomas cargados con el extracto de *P. peruviana* mostró un rango variable dependiente de los factores evaluados (167.34 ± 9.22 a 323.01 ± 21.01 nm). La combinación de factores en el tratamiento 8 indicó un menor diámetro de partícula. Algunos autores han reportado diámetros de partícula similares a los encontrados en el presente estudio para la encapsulación de extractos vegetales (*Altin et al.*, 2018; *Gülteki et al.*, 2016; *Marín et al.*, 2018).

El diámetro medio de partícula también está relacionado con el método de formación de liposomas. Se ha informado previamente que los fosfolípidos pueden generar liposomas en forma de vesículas unilamelares o multilamelares de acuerdo al método de formulación, a saber, un diámetro de partícula mayor a 600 nm podría indicar la existencia vesículas multilamelares con tamaños poco homogéneos (*Taladrid et al.*, 2017). Si se hace un análisis comparativo de los resultados de diámetro de partícula obtenidos en el presente estudio mediante el método de inyección de etanol, y el método de hidratación de película, se encuentran diferencias. Los diámetros reportados con el método de hidratación de película están en el orden de 700-1000 nm (*Sala et al.*, 2017). Esto se debe a que el método de inyección de etanol permite la formación directa de vesículas sin pasar por etapas que impliquen secado o evaporación que promueven la formación de estructuras de mayor tamaño.

En el análisis de varianza para la variable diámetro de partícula (Anexo 6) se observó que el efecto lineal y cuadrático de la concentración del extracto, así como el efecto lineal de la concentración de lecitina fueron significativos ($p < 0.01$) mientras que el efecto lineal del

tiempo de sonicación y el efecto cuadrático de la concentración de lecitina fueron significativos con 95% de confiabilidad. Por su parte, los efectos de la interacción no presentaron significancia para un 95% de confianza y se excluyeron del modelo final que se presenta a continuación:

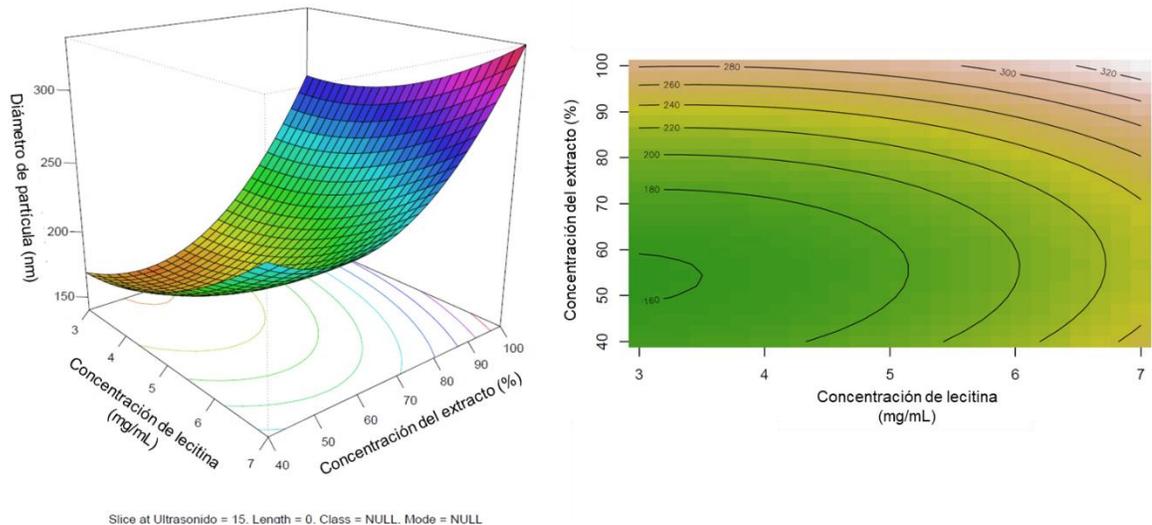
$$\text{Diámetro de partícula} = 189.34 + 50.0387X_1 + 32.5175X_2 - 11.7312X_3 + 51.6912X_1^2 + 16.7088X_2^2$$

X₁: Concentración del extracto (%); X₂: Concentración de lecitina (mg/mL); X₃: Tiempo de sonicación (min)

Se encontró que la falta de ajuste del modelo no fue significativa ($p > 0.05$), lo cual indica que la variación de la respuesta fue explicada correctamente por el modelo estadístico encontrado. El valor de R² ajustado (0.93) denota que hubo un grado de correlación entre los valores experimentales y predichos, es decir, el modelo presenta adecuada capacidad predictiva.

Los coeficientes del modelo estadístico muestran un signo positivo para la concentración de extracto (X₁) y la concentración de lecitina (X₂), indicando que, a medida que se incrementó la concentración de lecitina y la concentración del extracto, se obtuvo un diámetro de partícula mayor. En este sentido, Sebaaly *et al.* (2016), reportaron que el incremento en el diámetro medio en los liposomas cargados se relaciona con el tamaño molecular de los compuestos a encapsular, también se ha reportado que concentraciones de fosfolípidos hasta de 20 mg/mL son viables para para obtener diámetros de partícula con poca variabilidad. Para observar el comportamiento del diámetro de partícula respecto a la concentración de lecitina y la concentración del extracto, se fijó el tiempo de sonicación en 15 min (Fig. 5-2).

Figura 5-2. Superficie de respuesta y diagrama de contorno para la variable respuesta diámetro de partícula respecto a los factores concentración de lecitina (mg/mL) y concentración de extracto de *P. peruviana* (%) en la formulación de sistemas liposomales

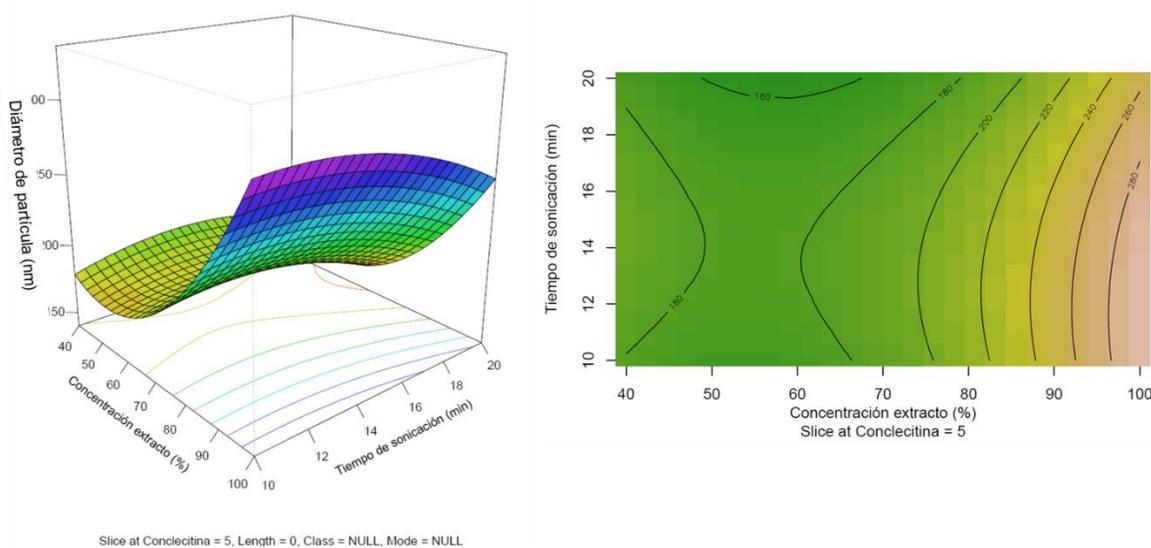


De manera general, se puede hacer un análisis comparativo de los resultados de diámetro de partícula respecto a los liposomas formulados con y sin incorporación del extracto vegetal. El diámetro de partícula de los liposomas sin el extracto fue aproximadamente 210 nm, en este caso el tratamiento de los factores fue mediante diseños independientes, sin embargo, con la combinación de factores en el diseño Box-Behnken, se obtuvo un menor diámetro de partícula (167.34 nm).

El comportamiento respecto al diámetro de partícula se atribuye a los efectos de la cavitación generados por el tratamiento de sonicación, aunque también se ha informado que las interacciones entre los compuestos fenólicos y los fosfolípidos contribuyen con la reducción del diámetro de partícula, es decir que, promoviendo las interacciones de tipo atractivo a través de la evaluación de la concentración de compuestos a encapsular y los componentes de formulación de liposomas, se mejora el empaquetamiento de los liposomas generando la reducción en el diámetro de partícula (Peng *et al.*, 2018). Cabe mencionar que, el flavonol rutina, presente en el extracto puede incorporarse en sistemas liposomales por las interacciones favorables que se crean con los fosfolípidos y con ello mejorar la configuración o el empaquetamiento de los liposomas (Bernardo *et al.*, 2019).

De otro lado, el comportamiento del diámetro de partícula respecto a la interacción del tiempo de sonicación y la concentración del extracto permitió evidenciar que la región donde se minimiza la respuesta corresponde a una concentración del extracto comprendida en el rango de 55% a 60% y un tiempo de sonicación de 20 min (Fig 5-3), sin embargo, posteriormente se realizará la optimización del proceso para obtener resultados precisos y comprobar si es posible reducir el tiempo de sonicación a fin de disminuir el gasto energético.

Figura 5-3. Superficie de respuesta y diagrama de contorno para la variable respuesta diámetro de partícula respecto a los factores concentración de extracto de *P. peruviana* (%) y tiempo de sonicación (min) en la formulación de sistemas liposomales



Otros autores han reportado tiempos sonicación similares en la formulación de liposomas, Wu *et al.* (2017) optimizaron el tiempo de sonicación en la encapsulación del polisacárido de *Glycyrrhiza*, el mejor tiempo reportado fue de 15 min para obtener liposomas de tamaño de 136 nm. Rieth & Lozano. (2020), realizaron un estudio acerca de los factores que inciden en la formación de liposomas utilizando ultrasonido, entre estos, se informó que un tiempo de sonicación superior a 25 min provoca oxidación de los fosfolípidos y pérdida o fuga del material encapsulado. Klingler *et al.* (2015), quienes tuvieron como objetivo determinar si el tratamiento de sonicación permite obtener vesículas unilamelares, realizaron un análisis de espectroscopía de resonancia magnética que permitió confirmar la estructura unilamelar de los liposomas, además, los autores reportaron tamaños de partícula de 132 nm.

Aunque la sonicación es un método sencillo que permitió buenos resultados respecto a la reducción de diámetro de partícula, Rieth & Lozano. (2020) informaron que tiempos prolongados de sonicación generan una transición de fase en el ensayo de calorimetría diferencial de barrido, este fenómeno se reportó como un pico que se empezó a formar a medida que se incrementa el tiempo de sonicación por encima de 36 min. Los autores sugieren que este pico indica una parte de los lípidos suspendida en solución que no se incorporó en la estructura liposomal. Además, se puede inferir que los lípidos que quedan suspendidos en el medio son mayormente susceptibles a degradación y, por lo tanto, son una limitante para la estabilidad del sistema

5.2.2.2 Eficiencia de encapsulación

Los resultados de la eficiencia de encapsulación del extracto de *P. peruviana* determinada respecto al contenido fenólico se presentaron en la Tabla 5-2. Los puntos factoriales del diseño mostraron mayor eficiencia de encapsulación ($76.23\% \pm 6.43$) con una concentración de extracto de 70%, concentración de lecitina 5mg/mL y tiempo de sonicación de 15 min, los cuales corresponden a los niveles centrales del diseño experimental. De acuerdo con el análisis de varianza para la eficiencia de encapsulación (Anexo 7), los términos lineales y cuadráticos de todos los factores tuvieron un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación, así mismo, la interacción entre la concentración del extracto y concentración de lecitina resultó significativa ($p < 0.05$). Los términos de interacción entre la concentración del extracto: tiempo de sonicación y concentración de lecitina: tiempo de sonicación no presentaron significancia ($p > 0.05$).

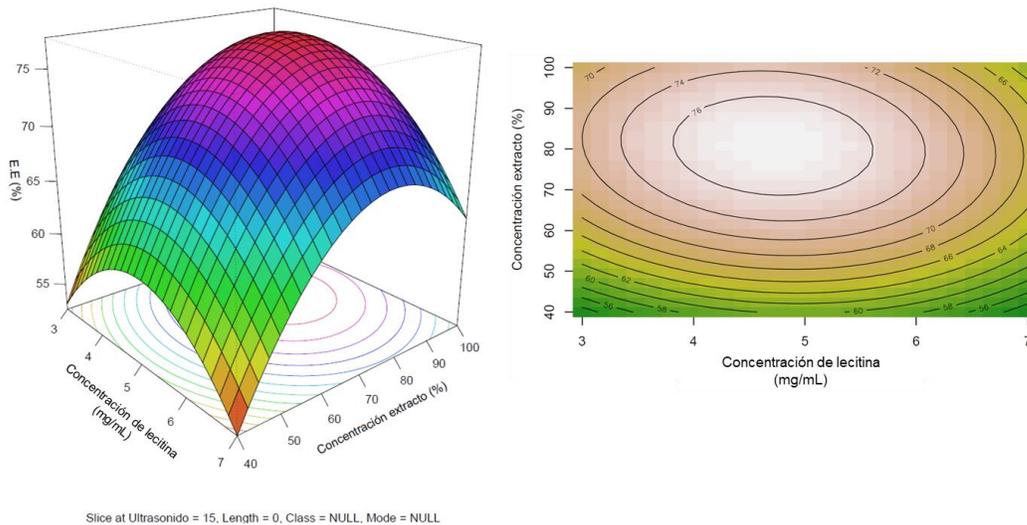
A continuación, se presenta el modelo matemático que describe el comportamiento de la eficiencia de encapsulación. El valor de R^2 ajustado fue de 94.2%, por lo tanto, se evidenció alta correlación entre los datos observados y los predichos, es decir que el modelo presentó adecuada capacidad predictiva, además, la falta de ajuste no significativa ($p > 0.05$) indicó que la variación en la eficiencia de encapsulación fue explicada correctamente por el modelo estadístico

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = 76.2300 + 6.54375X_1 - 1.66125X_2 - 1.91000X_3 - 9.38375X_1^2 - 7.57375X_2^2 - 3.65125X_3^2 + 1.23422X_1X_2$$

X_1 : Concentración del extracto (%); X_2 : Concentración de lecitina (mg/mL); X_3 : Tiempo de sonicación (min)

Como se observa en la Figura 5-4, el incremento en la concentración de lecitina hasta el 5 mg/mL aumentó la eficiencia de encapsulación, sin embargo, con la mayor concentración de estudio (7mg/mL), el resultado fue menor. Este resultado se puede explicar teniendo en cuenta que una mayor concentración de lecitina pudo generar agregación de lípidos, y con ello, el incremento de la viscosidad y la reducción en la encapsulación de compuestos, así mismo, a mayor concentración de lecitina también hay un aumento de otros componentes de la lecitina como como proteínas, carbohidratos o minerales que pueden interactuar molecularmente e impedir el empaquetamiento y formación de la estructura liposomal.

Figura 5- 4. Superficie de respuesta y diagrama de contorno para la variable respuesta eficiencia de encapsulación respecto a los factores concentración de extracto de *P. peruviana* (%) y concentración de lecitina en la formulación de sistemas liposomales



De otro lado, la concentración del extracto también tuvo efecto significativo en la encapsulación, se observó que una concentración del extracto de 70% resultó en una mayor eficiencia de encapsulación, sin embargo, con la concentración de 100%, los resultados fueron menores. Se demostró que existe un límite en la cantidad de compuestos fenólicos que pueden encapsularse en los sistemas liposomales, lo cual podría estar relacionado con la solubilidad de los compuestos presentes en el cáliz de *P. peruviana*. Algunos autores han informado que la sobresaturación de los extractos genera pequeños

cristales en matrices de encapsulación y esto impide la incorporación total en la estructura liposomal (Peng *et al.*, 2018).

La reducción de la eficiencia de encapsulación a causa del aumento de la concentración del extracto (mayor a 70%) también podría indicar fuga de los compuestos fenólicos, en este caso, si se presenta sobresaturación del extracto, los compuestos que no se encapsulan tienden a desestabilizar el sistema y posteriormente, generar deficiencias en el empaquetamiento de la estructura liposomal. Este fenómeno se ha reportado en un estudio relacionado con la encapsulación de curcumina; los autores sugieren que mayor concentración del extracto perturbó el empaquetamiento de la bicapa de fosfolípidos en los liposomas y por tal razón, disminuyó la eficiencia de encapsulación (Peng *et al.*, 2018).

Por su parte, con las concentraciones del extracto menores al 70%, se promovió la eficiencia de encapsulación. Tomando como ejemplo el principal flavonol del cáliz de *P. peruviana*, es posible inferir que la rutina con su configuración estructural hidrofílica atribuida al contenido de disacárido e hidrofóbica por su estructura de aglicona pueda formar interacciones por puentes de hidrógeno o dipolo-dipolo y posiblemente ion-dipolo con la parte polar de los fosfolípidos, mientras que se podrían presentar algunas interacciones de tipo hidrófobo con la parte apolar de los fosfolípidos.

La rutina puede interactuar con las moléculas de los fosfolípidos principalmente a través de enlaces de hidrógeno ya que la cabeza polar de los fosfolípidos tiene grupos funcionales como ácidos carboxílicos, sulfatos, alcoholes, glicoles entre otros (Baldisserotto *et al.*, 2015). Particularmente la fosfatidilcolina que es el principal componente de la lecitina de soja abarca una amina y un grupo fosfato en la parte polar, por lo tanto, se podría presentar una interacción ion-dipolo debido a la cantidad de grupos OH que presenta la rutina.

La interacción ion-dipolo implica que los átomos de hidrógeno presentes en la estructura química de la rutina tengan una carga parcial negativa por la alta electronegatividad que representan los átomos de oxígeno que la acompañan, esta configuración hace que la rutina tenga dipolos donde el hidrógeno con carga parcial positiva interactúa con cargas parciales negativas como los iones del grupo fosfato de los fosfolípidos y así se logre encapsular en la estructura liposomal.

De acuerdo a la afirmación anterior, se podría inferir que, los compuestos fenólicos presentes en el cáliz de *P. peruviana* se encapsularon principalmente en los dominios hidrófilos (núcleo polar) de la estructura liposomal ya que se facilitan las interacciones de tipo polar, aunque también se ha informado que la rutina puede encapsularse entre las cadenas lipídicas o dominios hidrófobos, esta configuración es menos favorable que la formada por interacciones hidrofílicas (Vu *et al.*, 2018). Sin embargo, se requieren más estudios para identificar exactamente donde se incorporaron los compuestos fenólicos de cáliz de *P. peruviana*

5.2.3 Validación de las condiciones óptimas para las variables diámetro medio de partícula y eficiencia de encapsulación

En la Tabla 5-3 se presenta la combinación de factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas mediante la función de deseabilidad.

Tabla 5- 3. Valores promedio de deseabilidad prevista vs observada para las variables respuesta diámetro de partícula y eficiencia de encapsulación

<i>Corrida</i>	<i>Diámetro de partícula</i>	<i>E. Encapsulación</i>	<i>Deseabilidad Prevista</i>	<i>Deseabilidad Observada</i>
1	323,01	64,33	0,0	0,0
2	256,12	68,32	0,49	0,50
3	251,4	53,21	0,13	0,16
4	144,32	65,32	0,74	0,74
5	276,12	68,12	0,40	0,42
6	223,96	65,7	0,55	0,56
7	229,98	58,67	0,47	0,38
8	178,04	57,67	0,47	0,45
9	313,15	70,34	0,34	0,20
10	158,22	56,45	0,34	0,43
11	167,34	70,33	0,73	0,81
12	180,43	51,43	0,23	0,00
13	189,34	76,23	0,86	0,86
14	188,22	75,13	0,85	0,85
15	187,12	75,23	0,84	0,84

La deseabilidad máxima prevista y observada se obtuvo en la corrida 13 (0.86) sin embargo, de acuerdo a los resultados del software estadístico (Anexo 8), la deseabilidad óptima de 0.89 se obtiene con la siguiente combinación de factores: concentración de extracto: 70%, concentración de lecitina: 4.2 mg/mL y tiempo de sonicación de 13 min; con

estos niveles se esperaba obtener un diámetro de partícula de 175.06 nm y una eficiencia de encapsulación de 74.16%.

La validación de resultados se llevó a cabo experimentalmente. Para cada variable respuesta, diámetro medio de partícula y eficiencia de encapsulación, se realizaron tres réplicas por ensayo utilizando los valores óptimos. Los resultados de la validación experimental se presentan en la Tabla 5-4. En todos los casos se obtuvo un porcentaje de error inferior al 5%, por lo tanto, se asume buena capacidad predictiva de los modelos estadísticos.

Tabla 5- 4. Resultados de la validación experimental bajo las condiciones óptimas de formulación de sistemas liposomales cargados con extracto de *P. peruviana* respecto al diámetro medio de partícula y la eficiencia de encapsulación

Respuestas	Valores predichos	Valores experimentales (n=3)	Porcentaje de error (%)
Diámetro medio de partícula (nm)	175.42	177.32±10.22	1.07
Eficiencia de encapsulación	71.26	68.32±6.42	4.37

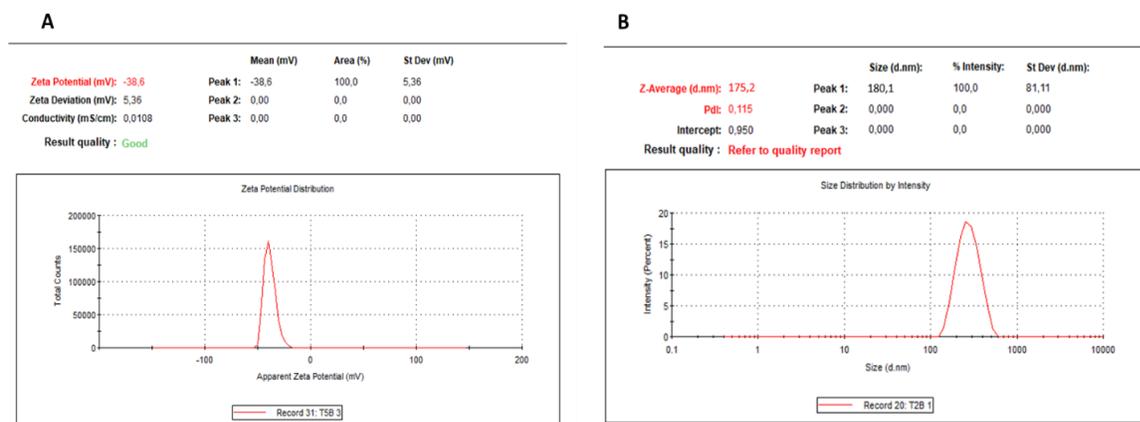
Error (%) = (Valor experimental – Valor predicho) *100/Valor experimental.

En resumen, de acuerdo a los resultados del diseño de superficies de respuesta, los liposomas se formularon a partir de 2 mL del extracto de *P. peruviana* (15 mg/mL) al 70%, 1.8 mL de lecitina (4.2 mg/mL) y 0.2 mL de colesterol. Como se indicó en la metodología, esta mezcla posteriormente requiere una dilución 1:9 en el medio acuoso Buffer pH 7.4 y, teniendo en cuenta que la eficiencia de encapsulación fue de 68.32%, la concentración final del extracto encapsulado en los liposomas fue de 1.13 mg/mL.

5.2.4 Evaluación del índice de polidispersidad y potencial eléctrico de los sistemas liposomales cargados con el extracto de *P. peruviana*

Los sistemas liposomales formulados con las condiciones óptimas tuvieron un valor de potencial ζ de -38.6 ± 2.11 y un índice de polidispersidad de 0.11 ± 0.02 como se presenta en la Figuras 5-5 A y B, respectivamente.

Figura 5- 5. Correlograma para los sistemas liposomales cargados con el extracto de *P. peruviana* **A.** Potencial eléctrico, **B.** Diámetro medio de partícula e índice de polidispersidad



El potencial ζ se utilizó como medida de la fuerza de repulsión entre las partículas. Valores más altos (en valor absoluto) se relacionan con sistemas más estables. En este caso, el valor negativo pudo atribuirse a los grupos fosfato de los fosfolípidos y algunos componentes como el colesterol que está presente en la formulación, por su parte, el valor del índice de polidispersidad de 0.11 representó un sistema monodisperso.

Los resultados encontrados en la presente investigación demostraron que el potencial ζ se mantuvo con carga negativa cuando se incorporó el extracto, pero incrementó en su valor absoluto respecto a los liposomas libres del material encapsulado (-28.56 mV). Tomando como base que el potencial ζ es un indicador de las cargas accesibles en la superficie de los liposomas como lo reportó Silva Malheiros *et al.* (2010), los resultados de potencial ζ de los liposomas libres y cargados con el extracto de vegetal indicaron que la capa que rodea la estructura liposomal tuvo carga negativa en los dos casos. Por lo tanto, se podría inferir que los compuestos fenólicos quedaron ubicados principalmente en el centro acuoso de la estructura liposomal en lugar de recubrir la superficie y, que las interacciones electrostáticas presentadas allí fueron favorables para incrementar la carga del sistema.

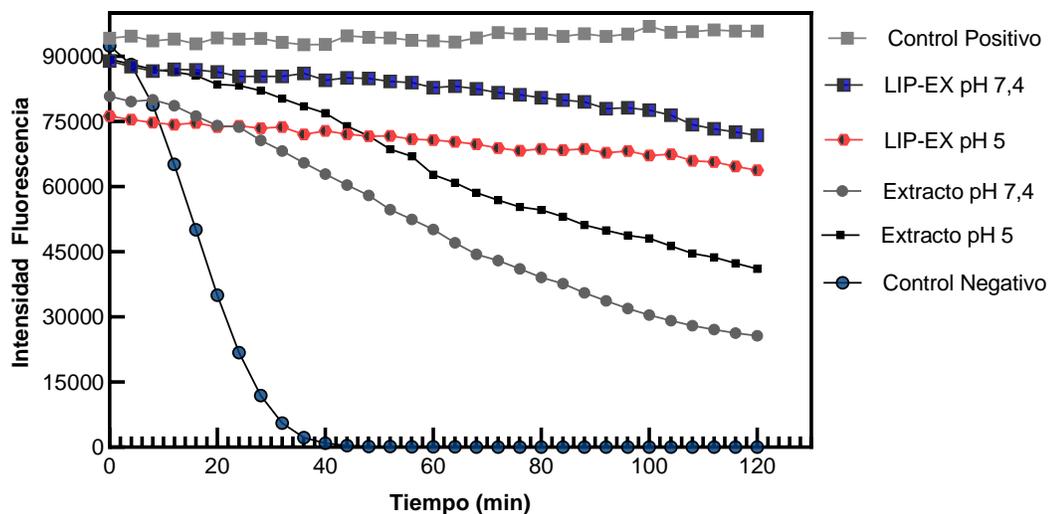
Por su parte, el índice de polidispersidad de los liposomas indicó distribución de tamaño monodisperso. Cabe mencionar que, en la configuración del equipo de medición, la medida del índice de polidispersidad se reportó en función de la intensidad, es decir que la mayoría de las partículas del sistema presentaron el mismo tamaño. Se observó que el valor del índice de polidispersidad se mantuvo cercano al observado en los liposomas vacíos, por

lo tanto, se puede atribuir buena configuración estructural de los liposomas, lo cual resulta en una compactación y empaquetamiento de la estructura liposomal, con esto se logra uniformidad en la distribución de tamaño tal como lo reportó Hasan *et al.* (2014). La anterior analogía también se justifica por el tamaño de los liposomas, el cual presentó ligeros cambios cuando se agregó el extracto, indicando que las condiciones de formulación propiciaron interacciones para encapsular el extracto.

5.2.4.1 Evaluación de la capacidad antioxidante

Se realizó la evaluación *in vitro* de la capacidad antioxidante de los liposomas cargados con el extracto y el extracto libre mediante el ensayo ORAC a diferentes valores de pH. En la Figura 5-6 se presenta el comportamiento de la intensidad de fluorescencia como indicador de capacidad antioxidante durante un tiempo de análisis de 120 min.

Figura 5-6. Intensidad de fluorescencia respecto al tiempo para el extracto de *P. peruviana* libre y encapsulado en sistemas liposomales evaluada en pH 5 y 7.4.



LIP-EX pH 7.4: liposomas cargados con el extracto (medio de estudio pH 7.4), LIP-EX pH 5: liposomas cargados con el extracto (medio de estudio pH 5)

Los ensayos de capacidad antioxidante permitieron comprobar la susceptibilidad frente a la oxidación que presentó el extracto sin encapsular. Se observó que las condiciones de

pH afectaron la capacidad antioxidante del extracto libre, con menor respuesta antioxidante a pH 7.4, en los dos casos la tendencia fue decreciente. En otras investigaciones se han reportado resultados similares, lo cual confirma la inestabilidad de los compuestos fenólicos y que su actividad antioxidante está determinada por las condiciones del medio (Panche *et al.*, 2016).

Los resultados encontrados permiten inferir que breves modificaciones de pH condujeron a que los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos se ionicen y se carguen electronegativamente, esta condición incrementa su carácter hidrófilo y con ello la susceptibilidad a oxidación, mientras que, a condiciones de pH ácido, los compuestos fenólicos no están totalmente ionizados, por lo tanto, esa condición resulta más favorable para mantener la estabilidad frente a la degradación.

Los hallazgos de la presente investigación tienen relación con el comportamiento fisicoquímico de la rutina. Se sabe que otros compuestos fenólicos como la quercetina se degrada rápidamente a condiciones de pH neutro y alcalino, sin embargo, la rutina ha demostrado mayor estabilidad, en este sentido, Wang *et al.* (2011), informaron que la presencia del azúcar en anillo C de la rutina reduce la formación del carbaniones y esto aporta estabilidad respecto a la oxidación.

Por su parte, los liposomas cargados con el extracto presentaron un comportamiento estable respecto a la actividad antioxidante *in vitro* reflejada mediante la señal de fluorescencia emitida. La señal de fluorescencia fue superior a la del extracto sin encapsular en las dos condiciones de pH. Se observó que a pH 5 la señal de fluorescencia disminuyó levemente, pero se mantuvo estable durante el tiempo de ensayo lo cual indica eficacia antioxidante.

Los resultados del análisis ORAC evidenciaron la aptitud de los sistemas liposomales cargados con el extracto vegetal para prevenir la oxidación a causa de los radicales peróxilo. En un medio acuoso la capacidad antioxidante depende principalmente de la aptitud de los compuestos presentes en la matriz liposomal para capturar radicales peróxilo, siempre y cuando éste pueda ser liberado, lo cual indica que los sistemas liposomales proporcionaron una barrera de protección para los compuestos fenólicos y, además, podría ser un indicio de su efectividad respecto a la liberación de los compuestos.

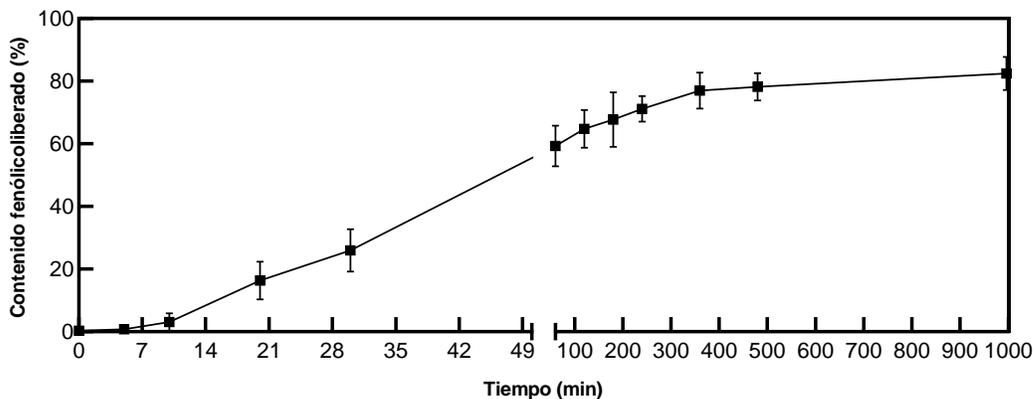
De acuerdo a lo reportado por Paiva *et al.* (2003), otro parámetro importante relacionado con la capacidad antioxidante es la ubicación de los compuestos en el sistema liposomal. En este sentido, los antioxidantes lipofílicos pueden actuar como eliminadores de radicales peróxilo acuosos en la superficie liposomal y dentro de la estructura, sin embargo, no pueden actuar como captadores de radicales peróxilo que se propagan en cadena dentro de la membrana, mientras que los antioxidantes hidrófilos pueden eliminar radicales del oxígeno acuoso y actuar como eliminador de radicales peróxilo que se propagan en cadena dentro de las membranas (Peng *et al.*, 2018).

Aunque hace falta otros análisis de precisión, el mecanismo de acción reflejado con los resultados favorables de capacidad antioxidante se puede asociar a la eliminación de radicales peróxilo desde el núcleo o centro liposomal mediado por compuestos hidrófilos encapsulados en los dominios polares del sistema

5.2.5 Ensayo de liberación *in vitro* de compuestos fenólicos encapsulados en sistemas liposomales

El comportamiento de liberación *in vitro* de compuestos fenólicos respecto al tiempo se presenta en la Fig. 5-7. Los resultados indican un comportamiento en diferentes etapas. Durante los primeros 20 min se logró una mínima cuantificación de compuestos fenólicos, con un porcentaje de liberación (8.93%). A partir del minuto 30 hasta completar 6h (400 min), se presentó un comportamiento creciente donde se incrementó la cuantificación de compuestos fenólicos y se alcanzó un porcentaje de liberación de 82.32%, a partir de este punto, se observó un leve incremento sin aumentar el porcentaje de liberación hasta finalizar el tiempo de ensayo. En acuerdo con otros autores, el comportamiento observado permite inferir que los sistemas liposomales promueven la liberación controlada de compuestos activos. (de Souza *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2016; Shalabaliya *et al.*, 2021). El patrón de liberación observado concuerda con el análisis de capacidad antioxidante, donde se observó que durante 120 min de ensayo, se presentaron resultados efectivos frente a la oxidación inducida por el radical, es decir que se liberaron compuestos fenólicos de la estructura liposomal a los cuales se les atribuye la actividad antioxidante.

Figura 5-7. Comportamiento de liberación de compuestos fenólicos extraídos del cáliz de *P. peruviana* y encapsulados en sistemas liposomales. Medio de liberación: buffer pH 7.4



Un parámetro a tener en cuenta respecto al comportamiento de liberación corresponde a los componentes de formulación de los sistemas liposomales, estos componentes definen la fluidez o rigidez de la bicapa lipídica, lo cual influyó finalmente en la liberación de los compuestos encapsulados. Los liposomas formulados en el presente estudio no contienen otros componentes o recubrimientos adicionales como polímeros, por lo tanto, las características de rigidez dependen únicamente de la composición de los fosfolípidos y esto facilitó el proceso de liberación.

De acuerdo con la literatura reportada, la bicapa lipídica que puede formar la fosfatidilcolina presente en la lectina de soja, existe en una forma ordenada con características de flexibilidad (Morata *et al.*, 2012; Schubert *et al.*, 2011). Sin embargo, alterar la estabilidad de los sistemas liposomales mediante el incremento de temperatura y agitación constante, conduce a que las cadenas de fosfolípidos se separen y la estructura liposomal permita la salida de los compuestos fenólicos. Los procesos químicos que provocan la desestabilización de los liposomas se relacionan parcialmente con la degradación/hidrólisis de los enlaces que unen a los fosfolípidos y la peroxidación de los dobles enlaces (en los lípidos). Estos dos procesos rompen o acortan las cadenas de lípidos y crean subproductos solubilizados que impactan directamente las bicapas de liposomas, lo cual provoca la fuga de los compuestos encapsulados.

De acuerdo al modelo matemático de primer orden: $\text{Log } C = \text{Log } C_0 - Kt/2.03$, los resultados del proceso de liberación permitieron determinar la velocidad de liberación y

tener otro acercamiento de la eficiencia del método de encapsulación. El modelo matemático brinda información acerca del posible mecanismo de liberación de los compuestos. El ajuste del modelo se determinó mediante el coeficiente de correlación R^2 . El valor de la constante de liberación K fue de 0.76 ± 0.03 con un R^2 de 0.81 ± 0.001 .

Diferentes fenómenos se han asociado a los mecanismos de liberación, entre estos la difusión y erosión de las matrices encapsulantes (Guo *et al.*, 2016). El modelo matemático propuesto, relaciona la cantidad de compuestos liberados en función del tiempo, en este caso algunos autores sugieren que el valor de la constante K es un indicador del mecanismo de liberación a través de la matriz (Shalabalija *et al.*, 2021).

De acuerdo a lo anterior, Jalali *et al.* (2018) informaron que el modelo matemático de primer orden representa un mecanismo de difusión en el cual los valores de la constante K reportados estuvieron comprendidos en un rango de 0.5 a 12, por lo tanto, se relaciona con la liberación de compuestos fenólicos controlada por procesos difusivos mediados por la acción de energía externa y la temperatura que facilita la separación de las cadenas de fosfolípidos y posteriormente, la liberación de los compuestos fenólicos.

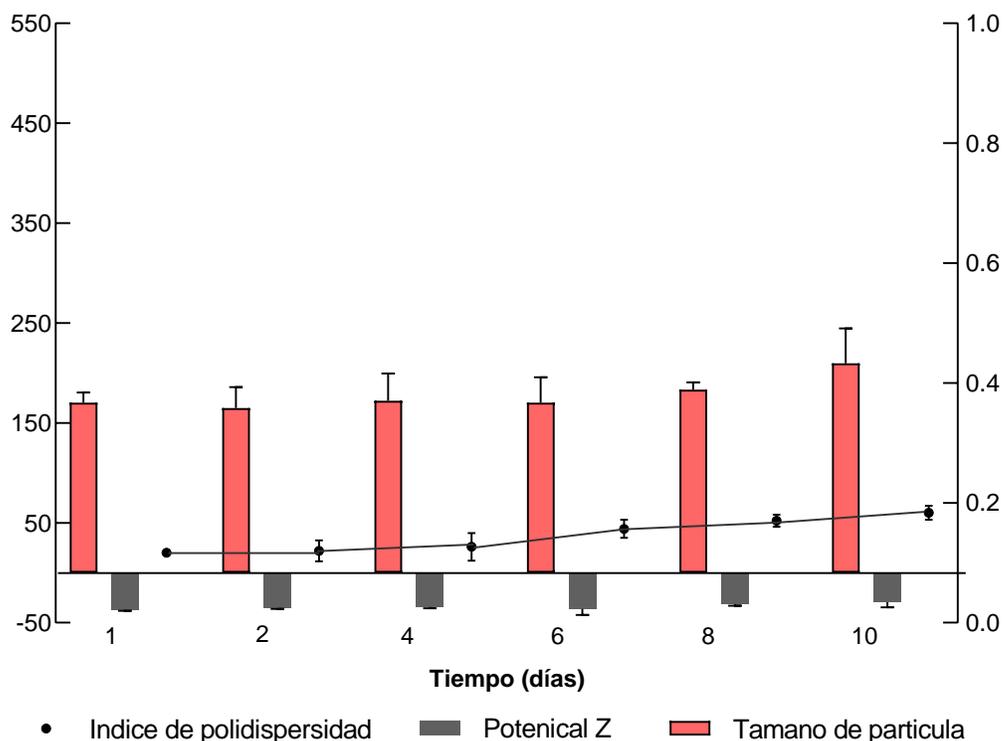
Otros autores también sugieren que la estructura liposomal presenta ciertas características de flexibilidad, en efecto, se ha considerado como una membrana porosa que facilita la liberación de compuestos encapsulados por fenómenos difusivos (Shalabalija *et al.*, 2021). La condición de partícula porosa se basa en la formulación y en las condiciones operacionales utilizadas, en este sentido, dado que los liposomas se formularon sin la adición de otros compuestos de recubrimiento como polímeros, se pueden categorizar como partícula porosa y por ello el tratamiento de datos también se relacionó con fenómenos difusivos (Feczko *et al.*, 2018).

En algunas investigaciones se ha reportado que la adición de colesterol en la formulación de liposomas podría disminuir la liberación de compuestos encapsulados ya que aporta rigidez a la membrana liposomal y dificulta la salida de compuestos hidrófilos del interior del sistema, sin embargo, en este estudio se evidenció una liberación controlada incluso con la adición de colesterol en la formulación, lo cual sugiere que la incorporación de bajas concentraciones de colesterol no incide en el comportamiento de liberación.

5.2.6 Evaluación preliminar del diámetro medio de partícula, índice de polidispersidad y potencial ζ de los liposomas durante el almacenamiento a 4 °C

Los resultados del seguimiento a las propiedades físicas de los liposomas durante 10 días demostraron un leve incremento en el diámetro medio de partícula pasando de 175.22 nm a 190.33 nm, mientras que el índice de polidispersidad se mantuvo en un rango que 0.11 a 0.19, con lo cual se podría inferir que se presentaron fenómenos de agregación a baja escala. Por su parte, el potencial ζ permaneció con carga negativa durante el tiempo de seguimiento y se mantuvo en un rango de -30 a -32 mV como se presenta en la figura 5-8.

Figura 5-8. Diámetro de partícula (nm), índice de polidispersidad y potencial ζ de los sistemas liposomales cargados con extracto de *P. peruviana* respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C



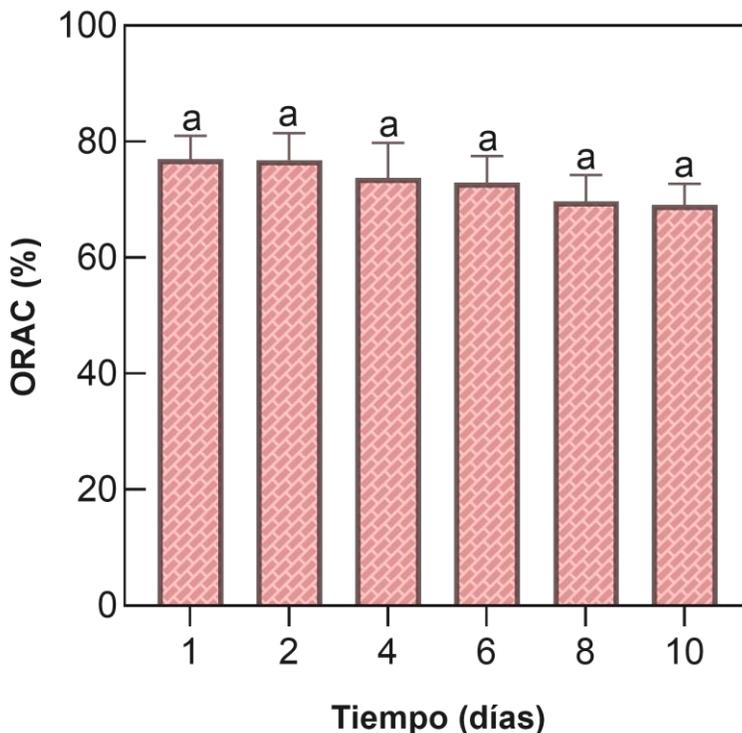
Los resultados obtenidos fueron comparables con otras investigaciones donde se ha reportado cambio en las propiedades físicas de los liposomas formulados sin modificaciones superficiales. Vergara & Shene. (2019), reportaron un incremento de

diámetro de partícula dos veces mayor al diámetro inicial a los 21 días de almacenamiento en liposomas cargados con lactoferrina. Sarabandi *et al.* (2019) reportaron un incremento en el diámetro de partícula de hasta 3 veces el inicial en los liposomas caseína encapsulada después de 30 días de almacenamiento. Bryła *et al.* (2015) encapsularon extracto de saúco y reportaron incremento en el índice de polidispersidad que pasó de 0,3 a 0,49 después del almacenamiento durante 4 semanas. Cabe mencionar que la condición de almacenamiento a 4 °C contribuyó con la estabilidad del sistema, así mismo se puede inferir que los compuestos fenólicos ejercieron efecto protector que evitó el daño de los liposomas posiblemente manteniendo unida la estructura liposomal.

Los resultados del potencial ζ sugieren que hubo algunas alteraciones respecto a la repulsión electrostática, lo cual podría ser consecuencia de cambios en el diámetro de partícula, sin embargo, el valor final de potencial eléctrico continúa siendo alto indicando estabilidad en el sistema. Finalmente, en otros estudios, los fenómenos de desestabilización de los sistemas liposomales durante el almacenamiento se ha relacionado con la hidrólisis de la fosfatidilcolina a partir de sus enlaces éster en ambientes acuosos, provocando la agregación de partículas (Sarabandi *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2018).

En el presente estudio, la oxidación de los liposomas podría darse principalmente debido a la oxidación de las cadenas de ácidos grasos insaturados, sin embargo, los resultados de estabilidad a la actividad antioxidante no indicaron diferencias significativas (Fig. 5-9), este fenómeno se puede atribuir a la acción de los compuestos fenólicos del extracto de cáliz de *P. peruviana*. Así mismo, las condiciones de almacenamiento controladas contribuyen a reducir la permeabilidad de la estructura liposomal, la baja movilidad molecular y un proceso oxidativo retardado de los ácidos grasos en los fosfolípidos (Gibis *et al.*, 2012).

Figura 5- 9. Comportamiento de la capacidad antioxidante de liposomas cargados con extracto de *P. peruviana* durante 10 días de almacenamiento a 4 °C



Aunque la fosfatidilcolina presente en las formulaciones también tiene un ligero efecto antioxidante, la mayor capacidad para donar átomos de hidrógeno y neutralizar reacciones de oxidación está dada por los compuestos fenólicos presentes en el extracto de cáliz de *P. peruviana*. En consecuencia, se puede decir que los compuestos fenólicos encapsulados en los sistemas liposomales presentaron estabilidad respecto a la actividad antioxidante y estuvieron disponibles para prevenir la acción de los agentes oxidantes.

5.3 Conclusiones

Los resultados de la presente investigación demuestran un nuevo conocimiento para la encapsulación del extracto de cáliz de *P. peruviana*, hasta donde se investigó rigurosamente, no se encontró una formulación de sistemas liposomales para encapsular el extracto de cáliz de *P. peruviana*, en este sentido, la presente tesis contribuye al estado del arte sobre el tema de encapsulación de extractos vegetales en sistemas liposomales con información experimental basada en diseños experimentales y herramientas

estadísticas que aportan en la toma de decisiones cuando se pretende su uso en futuras aplicaciones. Además, apoya investigaciones adelantadas en la Universidad Nacional de Colombia, dirigidas al estudio de residuos agroindustriales como alternativas de extracción y encapsulación de biocompuestos.

Los sistemas liposomales formulados con el extracto de *P. peruviana* son una alternativa al uso inexplorado del residuo y representan un insumo de partida para el desarrollo de novedosos sistemas de materias primas antioxidantes que pueden aplicarse en diferentes campos de formulación. Estos resultados cobran mayor relevancia, considerando que Colombia es el principal exportador mundial de este frutal exótico y, por lo tanto, se genera gran cantidad de residuos de cáliz facilitando la disponibilidad de materia prima.

La encapsulación del extracto de cáliz de *P. peruviana* estuvo influenciada por la concentración del extracto, concentración de lecitina y tiempo de sonicación. Se demostró que el método de inyección de etanol y herramientas de optimización en el proceso de formulación permitieron obtener liposomas con características de diámetro de partícula en el rango nanométrico y relevante eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos, así como también se consiguieron atributos de calidad adecuados, tales como tamaños de partícula homogéneo que limitan la agregación.

Se concluyó que la lecitina de soja como principal componente de formulación permite la encapsulación y liberación de compuestos fenólicos bajo condiciones controladas de temperatura y agitación, por lo tanto, se considera una materia prima con potencial uso para el diseño de sistemas de encapsulación, sumado a esto, el método de inyección de etanol es una técnica con posibilidades de escalamiento industrial sin el uso de solventes contaminantes.

Con base en el conocimiento adquirido mediante la presente investigación, se recomienda que estudios futuros investiguen la naturaleza exacta de los procesos de unión de compuestos fenólicos en la estructura liposomal, así mismo, evaluar la posible incorporación de un recubrimiento apto para la formulación liposomal a fin de prolongar la estabilidad del sistema durante el almacenamiento.

Bibliografía

- Altin, G., Gültekin-Özgülven, M., & Ozcelik, B. (2018). Chitosan coated liposome dispersions loaded with cacao hull waste extract: Effect of spray drying on physico-chemical stability and in vitro bioaccessibility. *Journal of Food Engineering*, 223, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.005>
- Baldisserotto, A., Vertuani, S., Bino, A., De Lucia, D., Lampronti, I., Milani, R., Gambari, R., & Manfredini, S. (2015). Design, synthesis and biological activity of a novel Rutin analogue with improved lipid soluble properties. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(1), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.10.023>
- Bernardo, J., Videira, R. A., Valentão, P., Veiga, F., & Andrade, P. B. (2019). Extraction of phospholipid-rich fractions from egg yolk and development of liposomes entrapping a dietary polyphenol with neuroactive potential. *Food and Chemical Toxicology*, 133(July), 110749. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110749>
- Boggs, J. M. (1987). Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 906(3), 353–404. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(87\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0304-4157(87)90017-7)
- Bryła, A., Lewandowicz, G., & Juzwa, W. (2015). Encapsulation of elderberry extract into phospholipid nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 167, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.025>
- Cantor, S., Vargas, L., Rojas, O. E. A., Yarce, C. J., Salamanca, C. H., & Oñate-Garzón, J. (2019). Evaluation of the antimicrobial activity of cationic peptides loaded in surface-modified nanoliposomes against foodborne bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030680>
- da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 21(6), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.03.003>
- de Souza Von Zuben, E., Eloy, J. O., Araujo, V. H. S., Gremião, M. P. D., & Chorilli, M. (2021). Insulin-loaded liposomes functionalized with cell-penetrating peptides: influence on drug release and permeation through porcine nasal mucosa. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 622(April). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126624>
- Duque-Acevedo, M., Belmonte-Ureña, L. J., Cortés-García, F. J., & Camacho-Ferre, F. (2020). Agricultural waste: Review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. *Global Ecology and Conservation*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e00902>

- Eh Suk, V. R., & Misran, M. (2017). Preparation, characterization and physicochemical properties of DOPE-PEG2000 stabilized oleic acid-soy lecithin liposomes (POLL). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 513, 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.10.053>
- Eloy, J. O., Claro de Souza, M., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J., & Marchetti, J. M. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345–363. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.029>
- Gibis, M., Ruedt, C., & Weiss, J. (2016). In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Research International*, 88, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.010>
- Gibis, M., Vogt, E., & Weiss, J. (2012). Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. *Food and Function*, 3(3), 246–254. <https://doi.org/10.1039/c1fo10181a>
- Gouda, A., Sakr, O. S., Nasr, M., & Sammour, O. (2021). Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61(May 2020), 102174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102174>
- Guldiken, B., Linke, A., Capanoglu, E., Boyacioglu, D., Kohlus, R., Weiss, J., & Gibis, M. (2019). Formation and characterization of spray dried coated and uncoated liposomes with encapsulated black carrot extract. *Journal of Food Engineering*, 246(June 2018), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.025>
- Gültekin-Özgülven, M., Karadağ, A., Duman, Ş., Özkal, B., & Özçelik, B. (2016). Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessibility studies. *Food Chemistry*, 201, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.091>
- Guo, Y., Shen, L., Lu, Y., Li, H., Min, K., Li, L., Yu, C., & Zheng, X. (2016). Preparation of Rutin-liposome Drug Delivery Systems and Evaluation on Their in vitro Antioxidant Activity. *Chinese Herbal Medicines*, 8(4), 371–375. [https://doi.org/10.1016/s1674-6384\(16\)60065-5](https://doi.org/10.1016/s1674-6384(16)60065-5)
- Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C. J. F., Jabbari, E., Linder, M., & Arab-Tehrany, E. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of Pharmaceutics*, 461(1–2), 519–528. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.007>
- Jahanfar, S., Gahavami, M., Khosravi-Darani, K., Jahadi, M., & Mozafari, M. R. (2021). Entrapment of rosemary extract by liposomes formulated by Mozafari method:

physicochemical characterization and optimization. *Heliyon*, 7(12), e08632.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08632>

Kaddah, S., Khreich, N., Kaddah, F., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2021). Pentacyclic triterpenes modulate liposome membrane fluidity and permeability depending on membrane cholesterol content. *International Journal of Pharmaceutics*, 610(May).
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121232>

Klingler, J., Vargas, C., Fiedler, S., & Keller, S. (2015). Preparation of ready-to-use small unilamellar phospholipid vesicles by ultrasonication with a beaker resonator. *Analytical Biochemistry*, 477, 10–12. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.015>

Kowalska, H., Czajkowska, K., Cichowska, J., & Lenart, A. (2017). What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.016>

Large, D. E., Abdelmessih, R. G., Fink, E. A., & Auguste, D. T. (2021). Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176, 113851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>

Lu, Q., Li, D. C., & Jiang, J. G. (2011). Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13004–13011. <https://doi.org/10.1021/jf203194w>

Marín, D., Alemán, A., Sánchez-Faure, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2018). Freeze-dried phosphatidylcholine liposomes encapsulating various antioxidant extracts from natural waste as functional ingredients in surimi gels. *Food Chemistry*, 245(July 2017), 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.141>

Miao, Z. L., Deng, Y. J., Du, H. Y., Suo, X. Bin, Wang, X. Y., Wang, X., Wang, L., Cui, L. J., & Duan, N. (2015). Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(3), 941–946.
<https://doi.org/10.3892/etm.2015.2201>

Paiva-Martins, F., Gordon, M. H., & Gameiro, P. (2003). Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 124(1), 23–36.
[https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00032-X](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00032-X)

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

Peng, S., Zou, L., Liu, W., Liu, C., & McClements, D. J. (2018). Fabrication and Characterization of Curcumin-Loaded Liposomes Formed from Sunflower Lecithin: Impact of Composition and Environmental Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(46), 12421–12430. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04136>

- Redondo-Morata, L., Giannotti, M. I., & Sanz, F. (2012). Influence of cholesterol on the phase transition of lipid bilayers: A temperature-controlled force spectroscopy study. *Langmuir*, 28(35), 12851–12860. <https://doi.org/10.1021/la302620t>
- Rieth, M. D., & Lozano, A. (2020). Preparation of DPPC liposomes using probe-tip sonication: Investigating intrinsic factors affecting temperature phase transitions. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 22(July 2019), 100764. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100764>
- Sala, M., Miladi, K., Agusti, G., Elaissari, A., & Fessi, H. (2017). Preparation of liposomes: A comparative study between the double solvent displacement and the conventional ethanol injection—From laboratory scale to large scale. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 524, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.02.084>
- Saldaña, M. D. A., dos Reis Coimbra, J. S., & Cardozo-Filho, L. (2015). Recovery, encapsulation and stabilization of bioactives from food residues using high pressure techniques. *Current Opinion in Food Science*, 5, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.001>
- Sarabandi, K., Mahoonak, A. S., Hamishehkar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2019). Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering*, 251(January), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.004>
- Schubert, T., Schneck, E., & Tanaka, M. (2011). First order melting transitions of highly ordered dipalmitoyl phosphatidylcholine gel phase membranes in molecular dynamics simulations with atomistic detail. *Journal of Chemical Physics*, 135(5). <https://doi.org/10.1063/1.3615937>
- Sebaaly, C., Greige-Gerges, H., Stainmesse, S., Fessi, H., & Charcosset, C. (2016). Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method. *Food Bioscience*, 15, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.04.005>
- Shalabalija, D., Mihailova, L., Crcarevska, M. S., Karanfilova, I. C., Ivanovski, V., Nestorovska, A. K., Novotni, G., & Dodov, M. G. (2021). Formulation and optimization of bioinspired rosemary extract loaded PEGylated nanoliposomes for potential treatment of Alzheimer's disease using design of experiments. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63(August 2020), 102434. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102434>
- Silva-Weiss, A., Quilaqueo, M., Venegas, O., Ahumada, M., Silva, W., Osorio, F., & Giménez, B. (2018). Design of dipalmitoyl lecithin liposomes loaded with quercetin and rutin and their release kinetics from carboxymethyl cellulose edible films. *Journal of Food Engineering*, 224, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.01.001>

- Suang Ng, H., Kee, P. E., Yim, H. S., Chen, P. T., Wei, Y. H., & Chi-Wei Lan, J. (2020). Recent advances on the sustainable approaches for conversion and reutilization of food wastes to valuable bioproducts. *Bioresource Technology*, 302(135), 122889. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122889>
- Taladrid, D., Marín, D., Alemán, A., Álvarez-Acero, I., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2017a). Effect of chemical composition and sonication procedure on properties of food-grade soy lecithin liposomes with added glycerol. *Food Research International*, 100(July), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.052>
- Taladrid, D., Marín, D., Alemán, A., Álvarez-Acero, I., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2017b). Effect of chemical composition and sonication procedure on properties of food-grade soy lecithin liposomes with added glycerol. *Food Research International*, 100(July), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.052>
- Taylor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by ζ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11483-007-9023-x>
- Teigiserova, D. A., Hamelin, L., & Thomsen, M. (2020). Towards transparent valorization of food surplus, waste and loss: Clarifying definitions, food waste hierarchy, and role in the circular economy. *Science of the Total Environment*, 706, 136033. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136033>
- Teng, H., & Chen, L. (2019). Polyphenols and bioavailability: an update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(13), 2040–2051. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1437023>
- Turchi, M., Karcz, A. P., & Andersson, M. P. (2022). First-principles prediction of critical micellar concentrations for ionic and nonionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 606, 618–627. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.08.044>
- Vergara, D., & Shene, C. (2019a). Encapsulation of lactoferrin into rapeseed phospholipids based liposomes: Optimization and physicochemical characterization. *Journal of Food Engineering*, 262(February), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.012>
- Vergara, D., & Shene, C. (2019b). Encapsulation of lactoferrin into rapeseed phospholipids based liposomes: Optimization and physicochemical characterization. *Journal of Food Engineering*, 262(February), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.012>
- Vu, H. T. H., Hook, S. M., Siqueira, S. D., Müllertz, A., Rades, T., & McDowell, A. (2018). Are phytosomes a superior nanodelivery system for the antioxidant rutin *International Journal of Pharmaceutics*, 548(1), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.042>

- Wang, J., Zhao, L. L., Sun, G. X., Liang, Y., Wu, F. A., Chen, Z. li, & Cui, S. ming. (2011). A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. *African Journal of Biotechnology*, 10(8), 1460–1466. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i8>
- Wu, Y., Yi, L., Li, E., Li, Y., Lu, Y., Wang, P., Zhou, H., Liu, J., Hu, Y., & Wang, D. (2017). Optimization of Glycyrrhiza polysaccharide liposome by response surface methodology and its immune activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.006>
- Yarce, C. J., Alhajj, M. J., Sanchez, J. D., Oñate-Garzón, J., & Salamanca, C. H. (2020). Development of Antioxidant-Loaded Nanoliposomes Employing Lecithins with Different Purity Grades. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules25225344>

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo estadístico para los diseños unifactoriales (DAC) para los factores: Tiempo, amplitud de onda, relación líquido-sólido, tamaño de partícula, tipo y concentración del solvente.

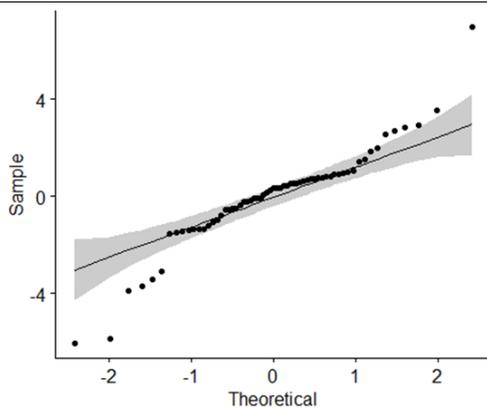
TIEMPO

Verificación de supuestos

1. Valores atípicos: 3

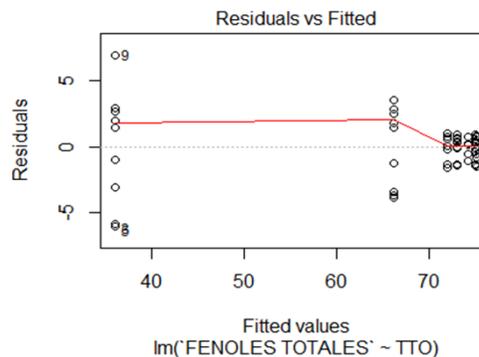
Valores atípicos extremos: 0

2. Supuesto de Normalidad



Prueba de Shapiro Wilks para normalidad: valores de p menores a 0.05 no hay normalidad:
Statics: 0.917
p= 0.000435

3. Supuesto de Homogeneidad de varianza



Prueba de leven: valores de p menores a 0.05 no hay igualdad de varianzas:
Statics: 5.92
p= 0.0000752

4. Tabla ANOVA: En este caso se realiza la prueba de Kruskal Willis debido a que no se cumplen los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza; valores de p menores a

0.05 indica diferencias significativas entre los tratamientos

y	n	statistic	df	P<0.5	method
Fenoles	63	55.5	6	3.6e-10	Kruskal-
Totales					Wallis

5. Comparaciones de medias: se utilizó la Prueba de Dunn. Tratamientos con la misma letra indican que no presentaron diferencias significativas (grafico reportado en el documento).

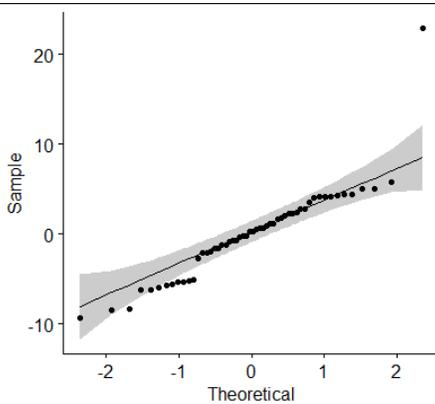
AMPLITUD DE ONDA.

Verificación de supuestos

1. Valores atípicos: 1

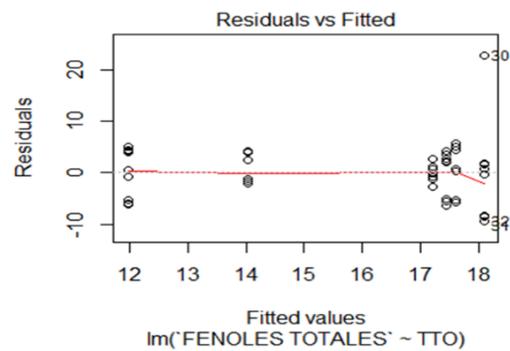
Valores atípicos extremos: 0

2. Supuesto de Normalidad



Prueba de Shapiro Wilks para normalidad: valores de p menores a 0.05 no hay normalidad:
 Statics: 0.871

3. Supuesto de Homogeneidad de varianza



Prueba de leven: valores de p menores a 0.05 no hay igualdad de varianzas:
 Statics: 1.70
 p= 0.153

4. Tabla ANOVA: valores de p menores a 0.05 indica diferencias significativas entre los tratamientos

Effect	DFn	DFd	F	P<0.5	ges
TTO	5	48	1.971	0.002	0.17

5. Comparaciones de medias: se utilizó la prueba de Tukey. Tratamientos con la misma letra indican que no presentaron diferencias significativas (grafico reportado en el documento).

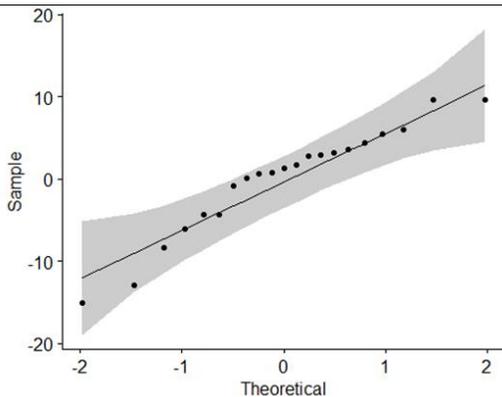
Relación líquido-sólido

Verificación de supuestos

1. Valores atípicos: 4

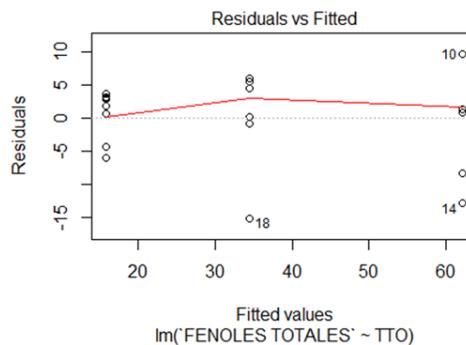
Valores atípicos extremos: 0

2. Supuesto de Normalidad



Prueba de Shapiro Wilks para normalidad: valores de p menores a 0.05 no hay normalidad:
 Statics: 0.933
 p= 0.155

3. Supuesto de Homogeneidad de varianza



Prueba de leven: valores de p menores a 0.05 no hay igualdad de varianzas:
 Statics: 1.30
 p= 0.296

4. Tabla ANOVA: valores de p menores a 0.05 indica diferencias significativas entre los tratamientos

Effect	DFn	DFd	F	P<0.5	ges
TTO	2	18	81.665	9.36e-10	0.91

5. Comparaciones de medias: se utilizó la prueba de Tukey. Tratamientos con la misma letra indican que no presentaron diferencias significativas (grafico reportado en el documento)

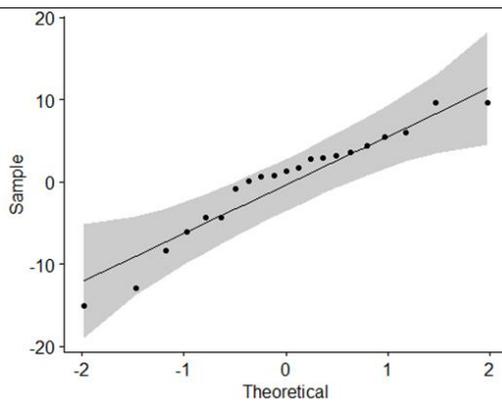
TAMAÑO DE PARTÍCULA

Verificación de supuestos

1. Valores atípicos: 4

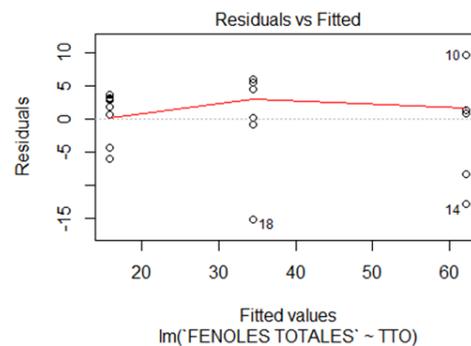
Valores atípicos extremos: 0

2. Supuesto de Normalidad



Prueba de Shapiro Wilks para normalidad: valores de p menores a 0.05 no hay normalidad:
 Statics: 0.933
 p= 0.155

3. Supuesto de Homogeneidad de varianza



Prueba de leven: valores de p menores a 0.05 no hay igualdad de varianzas:
 Statics: 1.30
 p= 0.296

4. Tabla ANOVA: valores de p menores a 0.05 indica diferencias significativas entre los tratamientos

Effect	DFn	DFd	F	P<0.5	ges
TTO	2	18	81.665	9.36e-10	0.91

Comparaciones de medias: se utilizó la prueba de Tukey.
Tratamientos con la misma letra indican que no presentaron diferencias significativas (grafico reportado en el documento)

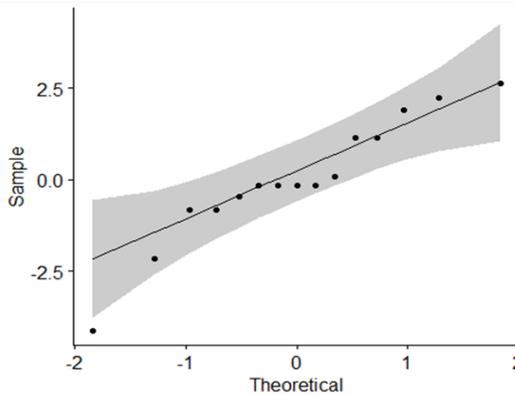
SOLVENTE DE EXTRACCIÓN

Verificación de supuestos

1. Valores atípicos: 4

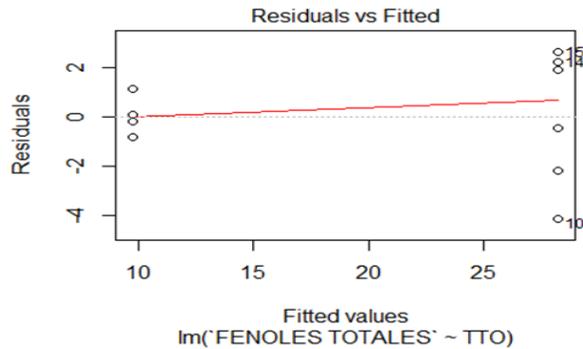
Valores atípicos extremos: 0

2. Supuesto de Normalidad



Prueba de Shapiro Wilks para normalidad: valores de p menores a 0.05 no hay normalidad:
Statics: 0.932
p= 0.293

3. Supuesto de Homogeneidad de varianza



Prueba de leven: valores de p menores a 0.05 no hay igualdad de varianzas:
Statics: 12
p= 0.00416

4. Tabla ANOVA: valores de p menores a 0.05 indica diferencias significativas entre los tratamientos

Effect	DFn	DFd	F	P<0.5	ges
TTO	3	13	387.354	4.65e-11	0.968

Comparaciones de medias: se utilizó la prueba de Tukey.

Tratamientos con la misma letra indican que no presentaron diferencias significativas (grafico reportado en el documento)

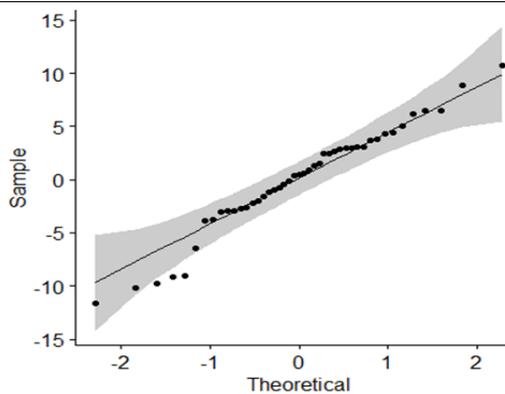
CONCENTRACIÓN DEL SOLVENTE

Verificación de supuestos

5. Valores atípicos: 0

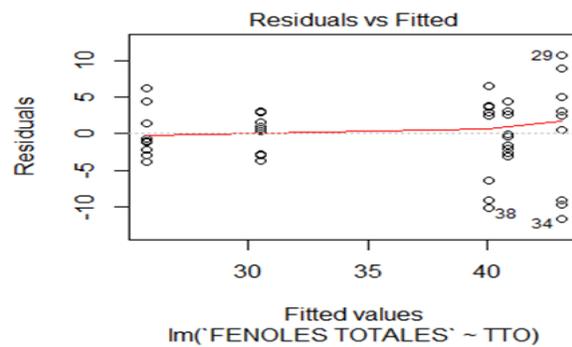
Valores atípicos extremos: 0

6. Supuesto de Normalidad



Prueba de Shapiro Wilks para normalidad: valores de p menores a 0.05 no hay normalidad:
 Statics: 0.968
 p= 0.245

7. Supuesto de Homogeneidad de varianza



Prueba de leven: valores de p menores a 0.05 no hay igualdad de varianzas:
 Statics: 2.64
 p= 0.0675

8. Tabla ANOVA: valores de p menores a 0.05 indica diferencias significativas entre los tratamientos

Effect	DFn	DFd	F	P<0.5	ges
TTO	4	40	18.348	1.24e-08	0.647

Comparaciones de medias: se utilizó la prueba de Tukey.

Tratamientos con la misma letra indican que no presentaron diferencias significativas (grafico reportado en el documento)

Anexo 2. Análisis de varianza para el contenido de flavonoles

Interacciones	GL	SC	SC Media	F val	P val
Amplitud de onda	1	5215	5215	4.36e+11	2e-14
Relación líquido-sólido	1	1514	1514	1.26e+11	2e-14
Tamaño partícula	1	4	4	3.45e+13	2e-14
A:L/S	1	0	0	1.80 e+7	2e-6
A:P	1	101	101	8.45e+4	2e-4
L/S:P	1	0	0	1.18e+7	2e-7
A:L/S:P	1	661	661	5.54e+6	2e-5
Residuales	14	0	0		

A: amplitud de onda, **L/S:** relación líquido -sólido, **P:** Tamaño de partícula

Anexo 3. Análisis de varianza para la capacidad antioxidante DPPH, ABTS, FRAP, ORAC

Variable DPPH

ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)	
Repetición	2	0.0	0.0	2.760e+00	0.0976	
Amplitud	1	2054.2	2054.2	1.348e+31	<2E-16	***
C. sólido/solvente	1	161.5	161.5	1.060e+30	<2E-16	***
Tamaño		11.3	11.3	7.435e+28	<2E-16	***
Amplitud: C. sólido/solvente	1	1955.0	1955.0	1.283e+31	<2E-16	***
Amplitud: tamaño	1	0.8	0.8	5.377e+27	<2E-16	***
C. sólido: tamaño	1	6.4	6.4	4.210e+28	<2E-16	***

Amplitud: C.sólido: tamaño	1	510.4	510.4	3.350e+30	<2E-16	***
Residuals	14	0.0	0.0			

Signif. Codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey

Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes

60: 17: 270	97.43b	b
60: 17: 210	90.44	b
60: 3: 270	87.85	b
60: 3: 210	76.59	b
40: 17: 270	78.52	b
40: 17: 210	84.98	b
40: 3: 270	63.53	a
40: 3: 210	53.57	a

Variable ABTS

ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)	
Repetición	2	0	0	8.600e-0.2	0.918	
Amplitud	1	52892	52892	1.114e+32	<2E-16	***
C. sólido/solvente	1	4192	4192	8.929e+30	<2E-16	***
Tamaño		2185	2185	4.603e+30	<2E-16	***
Amplitud: C. sólido/solvente	1	18402	18402	3.876e+31	<2E-16	***
Amplitud: tamaño	1	116	116	2.439e+29	<2E-16	***
C. sólido: tamaño	1	94	94	1.976e+29	<2E-16	***
Amplitud: C.sólido: tamaño	1	167	167	3.510e+29	<2E-16	***
Residuals	14	0	0			

Signif. Codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey

Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes

60: 17: 270	182.05	b
60: 17: 210	214.75	a
60: 3: 270	220.23	a
60: 3: 210	234.48	a
40: 17: 270	153.22	b
40: 17: 210	166.58	b
40: 3: 270	70.084	c
40: 3: 210	86.09	c

15C Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y formulación de sistemas liposomales como método de encapsulación

Variable FRAP

ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)	
Repetición	2	0	0	9.890e-0.1	0.396	
Amplitud	1	18513	18513	9.9806e+30	<2E-16	***
C. sólido/solvente	1	4413	4413	2.300e+30	<2E-16	***
Tamaño		742	742	3.929e+29	<2E-16	***
Amplitud: C. sólido/solvente	1	840	840	4.448e+29	<2E-16	***
Amplitud: tamaño	1	26	26	1.382e+28	<2E-16	***
C. sólido: tamaño	1	38	38	1.999e+28	<2E-16	***
Amplitud: C.sólido: tamaño	1	111	111	5.871e+28	<2E-16	***
Residuals	14	0	0			

Signif. Codes: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey

Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes

60: 17: 270	177.56	a
60: 17: 210	170.32	a
60: 3: 270	140.23	a
60: 3: 210	130.22	a
40: 17: 270	164.28	a
40: 17: 210	153.45	a
40: 3: 270	94.69	b
40: 3: 210	88.29	b

Variable ORAC

ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)	
Repetición	2	0	0	9.820e-0.1	0.399	
Amplitud	1	12212	12212	4.413e+30	<2E-16	***
C. sólido/solvente	1	3320	3320	1.200e+30	<2E-16	***
Tamaño		866	866	3.131e+29	<2E-16	***
Amplitud: C. sólido/solvente	1	49	49	1.787e+28	<2E-16	***
Amplitud: tamaño	1	1	1	2.258e+26	<2E-16	***
C. sólido: tamaño	1	7	7	2.694e+27	<2E-16	***
Amplitud: C.sólido: tamaño	1	14	14	4.942e+27	<2E-16	***
Residuals	14	0	0			

Signif. Codes: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey

Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes

60: 17: 270	160,38	b
60: 17: 210	175,34	b
60: 3: 270	183,66	b
60: 3: 210	193,37	b
40: 17: 270	114,23	a
40: 17: 210	125,53	a
40: 3: 270	140,23	a
40: 3: 210	152,32	a

ANEXO 4. Análisis de varianza para los factores amplitud de onda, concentración del sólido respecto al solvente y tamaño de partícula en la extracción de compuestos fenólicos asistida por ultrasonido

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
CONTENIDO DE FENOLES TOTALES					
Modelo Lineal (%)	6	205.0878	145.324	42.35	0.0032
Amplitud (%)	1	106.179	106.179	41.99	0.0013
Relación L/S (mL/g)	1	97.4338	97.4338	38.53	0.0016
T. Partícula (µm)	1	103.723	103.723	41.02	0.0014
Cuadrado	3	168.324	123.234	45.32	0.0003
Amplitud *Amplitud	1	155.269	155.269	61.41	0.0005
Relación L/S *Relación L/S	1	0.354259	0.35425	0.14	0.7235
T. Partícula *T. Partícula	1	409.484	409.484	161.94	0.0001
Interacción de 2 factores					
Amplitud *T.Partícula(µm)	1	0.79477	0.79477	64.32	0.002
Amplitud *Relación L/S	1	0.89668	0.89668	239.94	0.651
Relación L/S*T.Partícula(µm)	1	0.29343	0.29343	0.74	0.303
Error	9	0.7035			
Falta de ajuste	7	3.0378	3.7654	132.98	0.122
Error puro	2	0.0945			
Total	14	857.199			

Anexo 5. Niveles de concentración para la curva de calibración estándar de Rutina

ID estándar	Área	Concentración de Rutina (mg/mL)
1	3856147	0,0472
2	7409887	0,0944
3	10593732	0,1416

152 Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáliz de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y formulación de sistemas liposomales como método de encapsulación

4	13516729	0,1888
5	16197353	0,236

ID: Identificación de la muestra, Respuesta del cromatógrafo: Área en mAU para 260 nm, Tiempo de retención.

Anexo 6. Análisis de varianza para los factores concentración de lecitina, relación lecitina:colesterol y tiempo de sonicación respecto al diámetro medio de partícula en la encapsulación del extracto de cáliz de *P. peruviana* en sistemas liposomales

Fuente	GL	SC Ajust	Std Error.	Valor T	Valor p
DIÁMETRO MEDIO DE PARTÍCULA (nm)					
Modelo					
Lineal					
Concentración extracto(%)	1	454.332	8.414	9.711	0.0001
Concentración lecitina(%)	1	123.211	5.152	6.310	0.001
t. sonicación (min)	1	43.232	5.152	-2.276	0.014
Cuadrado					
C. extracto * C. extracto	1	122.433	7.584	6.815	0.002
C. lecitina * C. lecitina	1	231.221	7.584	2.203	0.028
Error					
Falta de ajuste	7	2.22	1.212	3.218	0.112
Error puro	2	0,023			

ANEXO 7. Análisis de varianza para los factores concentración de lecitina, relación lecitina:colesterol y tiempo de sonicación respecto a la eficiencia de encapsulación en la encapsulación del extracto de cáliz de *P. peruviana* en sistemas liposomales

Fuente	GL	SC Ajust.	Std Error.	Valor T	Valor p
Eficiencia de encapsulación (%)					
Modelo					
Lineal					
Concentración extracto (%)	1	145.333	0.737	8.872	0.002
Concentración lecitina(%)	1	432.321	0.737	-2.252	0.007

t. sonicación (min)	1	98.344	0.737	-2.589	0.041
Cuadrado					
C. extracto * C. extracto	1	78.411	1.085	-8.643	0.002
C. lecitina * C. lecitina	1	67.532	1.085	-6.976	0.001
t. s * t. s	1	32.332	1.085	-3.363	0.020
Interacción de dos factores					
C. extracto * C. Lecitina	1	125.976	0.212	2.243	0.021
Error	9	4.703			
Falta de ajuste	7	3.452	1.123	4.231	0.202
Error puro	2	0.012			

Anexo 8. Deseabilidad óptima para las variables respuesta: diámetro de partícula y eficiencia de encapsulación.

Optimizar Deseabilidad
 Valor óptimo = 0,890192

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración	40,0	100,0	69,0873
Concentración de lecitina	3,0	7,0	4,29772
Tiempo de ultrasonido	10,0	20,0	13,12987

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo</i>
Tamaño de partícula	175,063
EE	75,1663