

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Nanoencapsulación de catorenoides en cristales de nanocelulosa
endospérmica (ENC)**


**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado
en Ciencias Biológicas**

ALISSON MISHHELL CONDO CAGUAN

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Alisson Mishell Condo Caguan ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Dr. Javier Carvajal Barriga
Director de la Disertación

Quito, 23 de Junio de 2023

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a:

A mis padres, quienes estuvieron apoyándome incondicionalmente durante todo mi proceso formativo universitario, y que pese a la distancia siempre velaron y estuvieron pendientes de mi estado, y porque gracias a ellos tuve la fortaleza para seguir con mis metas personales.

A mis tíos, Margarita y Néstor, los cuales no tuvieron inconveniente en acogerme en su hogar, brindándome su soporte y cariño durante todo este tiempo.

A mis amigas, Ruby y Poulette, las cuales me acompañaron en los buenos y malos momentos durante la carrera, quienes nunca me negaron su hombro donde llore y desahogue todas mis penas, y que gracias a ellas pude crear buenas memorias que llevaré siempre conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a la Escuela de Ciencias Biológicas, a sus autoridades, y en especial a sus excelentes docentes de los que aprendí mucho durante todo mi proceso formativo.

Al Laboratorio Centro Neotropical para la Investigación de la Biomasa (CNIB) cuyas instalaciones e instrumentos permitieron que el desarrollo de mi proceso de investigación sea posible.

A mi director de tesis Dr. Javier Carvajal, por ser un gran guía y apoyo durante todo el desarrollo de la tesis.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	5
1.1. COLECCIÓN DE LA BIOMASA	5
1.2. PREPARACIÓN DE SEMILLAS DE ACHIOTE	5
1.3. EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO SOXHLET	6
1.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU)	6
1.5. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO	7
1.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	7
1.7. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC).....	7
1.8. NANOENCAPSULACIÓN DE CAROTENOIDES EN CRISTALES DE NANOCELULOSA ENDOSPÉRMICA (ENC).....	8
1.9. ACCIÓN PROTECTORA DE LOS ENC A UNA EXPOSICIÓN LUMÍNICA	9
RESULTADOS	10
2.1. COMPARACIÓN METODOLÓGICA Y OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES DISOLVENTES	10
2.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS CAROTENOS	11
2.3. ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES COLOIDALES	12
2.4. EXPOSICIÓN DE LAS EMULSIONES A DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ	14
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES.....	20
RECOMENDACIONES	22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rendimiento (%) de extractos de carotenoides a diferentes metodologías mediante el uso de distintos solventes.....	10
Figura 2. Reacción de los extractos obtenidos al colocar aceite mineral..	11
Figura 3. Aspecto de las emulsiones que contienen carotenos en aceite vegetal estabilizados por ENC a varias concentraciones.	12
Figura 4. Aspecto de las emulsiones que contienen carotenos hidrosolubles en agua estabilizados por ENC a varias concentraciones..	13
Figura 5. Aspecto de las emulsiones que contienen carotenos hidrosolubles en agua estabilizados por ENC a varias concentraciones a diferentes condiciones de luz.....	14

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de varianza para el rendimiento de extracción de carotenoides a diferentes metodologías.	10
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RESUMEN

Los carotenoides son pigmentos naturales que se encuentran en plantas como *Bixa orellana* y que, debido a su propiedad antioxidante y anticancerígena al ser precursor de vitamina A, son recientemente el foco de atención de la industria médico-farmacéutica, alimentaria y cosmética, ya que se presenta como una respuesta para reducir los efectos que causan el incremento anual en la dosis de radiación UV en la piel. Tomando en cuenta la falta de estudios en relación con la química y bioquímica de *Bixa orellana*, como fuente natural para la obtención de estos pigmentos, el objetivo de este trabajo experimental fue primeramente optimizar el rendimiento de extracción de carotenoides, en donde se determinó al método de extracción asistida por ultrasonido (EAU) como la técnica con mayor eficiencia en comparación con la extracción Soxhlet. En este sentido, los resultados también concluyeron que el etanol es el solvente ideal para la extracción de carotenoides en comparación a otros solventes.

Por otro lado, considerando que el uso de carotenoides en el ámbito industrial se ve limitado por su alto índice de susceptibilidad a la degradación oxidativa, cuando se exponen a factores externos como luz, humedad y calor. En este trabajo también se evaluó la estabilidad de suspensiones coloidales de carotenoides en cristales de nanocelulosa endospérmica (ENC), en donde se registró que a una concentración del 0.05% (p/p) de ENC fue suficiente para mantener emulsiones coloidales estables con carotenoides liposolubles. Sin embargo, aún es necesario realizar más pruebas para optimizar la concentración de ENC en las emulsiones, que permitan evitar la degradación de carotenoides y su posterior aplicación en la producción a nivel industrial.

PALABRAS CLAVE: carotenoides, método de extracción por ultrasonido, método de extracción convencional Soxhlet, cristales de nanocelulosa endospérmica, emulsiones coloidales.

ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments found in plants such as *Bixa orellana* and, due to their antioxidant and anticarcinogenic properties as a precursor of vitamin A, are recently the focus of attention of the medical-pharmaceutical, food and cosmetic industry, since they are presented as an answer to reduce the effects caused by the annual increase in the dose of UV radiation on the skin. Considering the lack of studies in relation to the chemistry and biochemistry of *Bixa orellana*, as a natural source for obtaining these pigments, the objective of this experimental work was first to optimize the extraction yield of carotenoids, where the ultrasound-assisted extraction method (UAE) was determined as the most efficient technique compared to Soxhlet extraction. In this sense, the results also concluded that ethanol is the ideal solvent for carotenoid extraction compared to other solvents.

On the other hand, considering that the use of carotenoids in the industrial field is limited by their high rate of susceptibility to oxidative degradation, when exposed to external factors such as light, humidity and heat. This work also evaluated the stability of colloidal suspensions of carotenoids in endospermic nanocellulose crystals (ENC), where it was recorded that a concentration of 0.05% (w/w) of ENC was sufficient to maintain stable colloidal emulsions with liposoluble carotenoids. However, further tests are still needed to optimize the ENC concentration in the emulsions to avoid carotenoid degradation and its subsequent application in industrial production.

KEYWORDS: carotenoids, ultrasound extraction method, conventional Soxhlet extraction method, endospermic nanocellulose crystals, colloidal emulsions.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son compuestos bioactivos de importancia biológica y medicinal, debido a su propiedad antioxidante y anticancerígena, volviéndose recientemente el foco de atención de las industrias farmacéutica, alimenticia, y como uso tópico en la industria cosmética (Baswan et al., 2021). No obstante, con la creciente conciencia pública de la toxicidad de los colorantes sintéticos, la industria se ha visto en la necesidad de buscar nuevas alternativas en la obtención de carotenoides a partir de fuentes naturales (Ciro et al., 2014). *Bixa orellana*, conocido popularmente como achiote, es una planta originaria de América tropical, utilizado desde las civilizaciones nativas como colorante natural rico en bixina, su derivado hidrosoluble norbixina y otros carotenoides en diferentes proporciones (Raddatz et al., 2017). Sin embargo, su análisis como fuente de carotenoides sigue siendo limitado, de ahí radica la importancia de un estudio más exhaustivo de su utilidad como materia prima para la extracción de estos pigmentos.

Otra limitación en el uso de carotenoides a nivel industrial radica en su estructura química, los cuales presentan un alto índice de inestabilidad y susceptibilidad a la degradación oxidativa, particularmente cuando se exponen al oxígeno, luz, humedad y calor (Ariyaratna & Karunaratne, 2015). Debido a estas consideraciones, estudios en el campo de la nanotecnología han surgido con nuevas soluciones, al presentar tecnologías innovadoras, como la nanoencapsulación, que permiten mejorar la estabilidad; solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos, aumentando así su aplicabilidad en formulaciones alimenticias, nutracéuticas o biológicas (Dos Santos et al., 2018). Estos vehículos nanoestructurados necesitan ser evaluados para garantizar la seguridad y estabilidad durante su aplicación. Los parámetros más importantes en esta evaluación son el tamaño, el índice de polidispersidad (PDI), el potencial Zeta (ζ), su morfología, el pH, la carga del bioproducto y la eficiencia de encapsulación (EI) (Shishir et al., 2018).

El objetivo del presente trabajo de experimentación es la evaluación de la estabilidad de suspensiones coloidales en cristales de nanocelulosa endospérmica (ENC), derivados del tejido parenquimatosos del endospermo de la tagua (*Phytelephas aequatorialis*), los cuales funcionan como vehículos de tamaño nanométrico para la encapsulación de carotenoides, que permiten aumentar sus propiedades antioxidantes y evitar así su degradación, y su potencial aplicación en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Para lograr este objetivo general, se realizará primeramente un análisis comparativo de nivel metodológico de dos técnicas de extracción de carotenoides, el método convencional (Método Soxhlet) y la metodología de extracción asistida por ultrasonido (EAU), y se evaluará su rendimiento.

Posteriormente, se procederá a nano encapsular los carotenoides en los cristales de nanocelulosa endospérmica (ENC), y se evaluará su estabilidad a diferentes condiciones de exposición lumínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica convencional Soxhlet es un tipo de extracción que utiliza solventes a temperatura de ebullición y presiones bajas (presión ambiental) para la extracción selectiva de compuestos moleculares específicos. Actualmente, es la técnica más utilizada y la que proporciona la mayor recuperación de carotenoides (Adadi et al., 2018). Por otro lado, la extracción asistida por ultrasonido (EAU) es una técnica que utiliza la cavitación acústica para la ruptura celular, mejorando la tasa de extracción, la eficiencia y el tiempo de extracción de la biomasa en comparación con otros métodos de extracción tradicionales (Umair et al., 2021). Por estos motivos estas dos metodologías fueron aplicadas en el presente trabajo de experimentación, tomando en consideración los siguientes parámetros:

1.1. COLECCIÓN DE LA BIOMASA

Se recogieron manualmente las cápsulas verdes de *Bixa orellana* de una propiedad privada cerca de la parroquia rural Valle Hermoso, Santo Domingo de los Tsáchilas. Posteriormente, la materia vegetal fue seleccionada, separando las que se encontraban en buen estado de las que estaban con moho.

1.2. PREPARACIÓN DE SEMILLAS DE ACHIOTE

Las semillas de achiote se despulparon de la cápsula, y se dejaron secar a 60°C por una hora en un microondas. Una vez la biomasa estaba seca, se dejaron empapar en 100 ml de hexano durante 6 horas para eliminar grasas y ceras. Pasado el tiempo de exposición, se pesaron 30 g de muestra en vasos de precipitación para ser utilizadas posteriormente en las extracciones.

1.3. EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO SOXHLET

La extracción de los carotenoides se realizó por el método convencional de solventes (Soxhlet), mediante una extracción sólido-líquido, siguiendo el protocolo establecido por Handayani y Setyawati (2020), pero realizando ciertas modificaciones. La muestra se empaquetó dentro de un cartucho fabricado con papel filtro, y se transfirió a un dispositivo extractor Soxhlet con ayuda de una pinza. Posteriormente, se añadieron 300 ml de disolvente al balón Soxhlet. Se realizó 3 extracciones, utilizando disolventes de distintas polaridades: n-hexano, etanol y metanol. Una vez realizado el montaje Soxhlet, se inició la extracción ajustando la estufa a una temperatura superior al punto de ebullición para cada solvente: hexano (68°C), etanol (78°C) y metanol (65°C), aproximadamente por 6 horas. Finalmente, los extractos se almacenaron en recipientes de vidrio de 500 ml, a temperatura ambiente (25°C) en la oscuridad, antes del análisis.

1.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU)

La extracción asistida por ultrasonido se realizó siguiendo la metodología descrita por Amaro et al. (2018), pero con ciertas modificaciones. Se utilizó 30 gr de biomasa y se adicionó secuencialmente 300 ml de etanol como disolvente. Las células se sometieron a una disrupción aplicando 15 min de sonicación continua a un nivel de frecuencia de 45 KHz y una amplitud de 75% en un procesador ultrasónico de 750W (SONICS, Vibra-Cell, EE. UU.) durante 3 horas. La temperatura se mantuvo debajo de los 30°C utilizando hielo y agua en un recipiente donde fue colocada la muestra para evitar choques térmicos que degraden los carotenos. Después de la extracción, se filtraron las muestras con papeles filtro para eliminar por completo los residuos de la biomasa. Finalmente, se almacenaron en recipientes de vidrio de 500 ml, a temperatura ambiente (25°C) en la oscuridad, antes del análisis.

1.5. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO

Para estandarizar y determinar el rendimiento de las extracciones se realizó un total de tres repeticiones para cada solución y metodología seguida. Además, los extractos se filtraron y el solvente se eliminó con ayuda de un rotavapor. El rendimiento (%) del extracto se determinó en base a la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento del extracto (\%)} \\ = \text{Masa del extracto (mg)} * 100\% / \text{Masa de la semilla (mg)} \end{aligned}$$

1.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la herramienta Análisis de datos presente en el software Microsoft Excel versión 2305. Para evaluar si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos del rendimiento para cada metodología de extracción, se realizó un análisis de varianza (ANOVA).

1.7. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

La cromatografía de capa fina (TLC) se realizó en el laboratorio, de acuerdo con la metodología descrita por Melka et al. (2017), para la visualización e identificación de carotenos, pero con ciertas modificaciones mencionadas a continuación:

Para la preparación de la placa de TLC, se realizó tiras de papel filtro de 3cm x 10cm, donde se marcó con un lápiz el inicio y las líneas frontales de disolvente. Posteriormente, para el desarrollo de la fase móvil, se realizó una mezcla de cloroformo (CHCl_3) y metanol (MeOH) en una proporción de (47:3) como sistemas de solventes. En el proceso de saturación se colocó verticalmente las tiras de papel filtro, que contenían una gota con la muestra (extracto), en el solvente mezcla, cubriendo la línea frontal anteriormente marcada, durante 6 horas cubierto con un material opaco (lámina metálica). Una vez terminada la fase móvil, las zonas cromatográficas se visualizaron a la luz del día, y luego se

calculó el factor de retención (Rf) para cada banda marcada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$R_f = \text{Distancia recorrida por el soluto} / \text{distancia recorrida por el solvente}$$

Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo una campana extractora de humos con ventilación adecuada.

1.8. NANOENCAPSULACIÓN DE CAROTENOIDES EN CRISTALES DE NANOCELULOSA ENDOSPÉRMICA (ENC)

Para la preparación de las emulsiones se siguió la metodología propuesta por Fitri et al. (2022), pero cambiando ciertos parámetros en el protocolo. Primeramente, se preparó una emulsión de aceite que contenía carotenos (fase oleosa), producto comercial “La Favorita”, en agua. Para ello, se preparó una emulsión fina mezclando la fase oleosa al 10% (p/p) en una fase acuosa (agua destilada) al 90% (p/p) con ayuda de un procesador ultrasónico de 750W (SONICS, Vibra-Cell, EE. UU.) durante 2 min a un nivel de frecuencia de 45 KHz y una amplitud de 50%. Obtenidas las emulsiones, se mantuvieron a temperatura ambiente (25°C) durante 1h hasta obtener una condición de equilibrio. A continuación, se añadió ENC a la emulsión a diferentes concentraciones de 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04% y 0.05% (p/p), y un control donde no se añadió el emulsificante, y tras una suave agitación a temperatura ambiente durante 1h, se obtuvieron las emulsiones finales. Las soluciones se depositaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml en un lugar oscuro. Para cada concentración, se realizó un total de 3 repeticiones. Los resultados fueron posteriormente analizados mediante evidencia fotográfica después de 8 días de observación.

Por otro lado, para analizar la estabilidad de los cristales de nanocelulosa endospérmica (ENC) al encapsular los carotenos en agua, se preparó soluciones de 1ml que contenían carotenos en agua en proporción (1:10), una fase acuosa de 90% (p/p), y ENC en concentraciones de 0.02%, 0.05%, 0.1% y 0.15% (p/p), además de un control que no contenía el emulsificante. Las suspensiones

coloidales se prepararon mediante un sistema sencillo utilizando jeringas de insulina conectados a una válvula de tres vías (MEETOOT 5), donde se mezcló progresivamente la fase acuosa y el emulsificador durante 2 min a temperatura ambiente (25°C) en un cuarto oscuro para evitar la degradación de los carotenos por la luz. Una vez obtenida las soluciones, se depositaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, y se mantuvieron en un lugar oscuro. Para cada concentración, se realizó un total de 5 repeticiones. Los resultados fueron posteriormente analizados mediante evidencia fotográfica después de 3 días de observación.

1.9. ACCIÓN PROTECTORA DE LOS ENC A UNA EXPOSICIÓN LUMÍNICA

Por último, para determinar la acción protectora de la ENC en la encapsulación de carotenos, las soluciones resultantes se expusieron a distintas condiciones de exposición lumínica (luz y oscuridad) por un plazo de tiempo de 3 días, a una temperatura controlada de 25°C. Los resultados fueron posteriormente analizados mediante evidencia fotográfica.

RESULTADOS

2.1. COMPARACIÓN METODOLÓGICA Y OPTIMIZACIÓN DE DIFERENTES DISOLVENTES

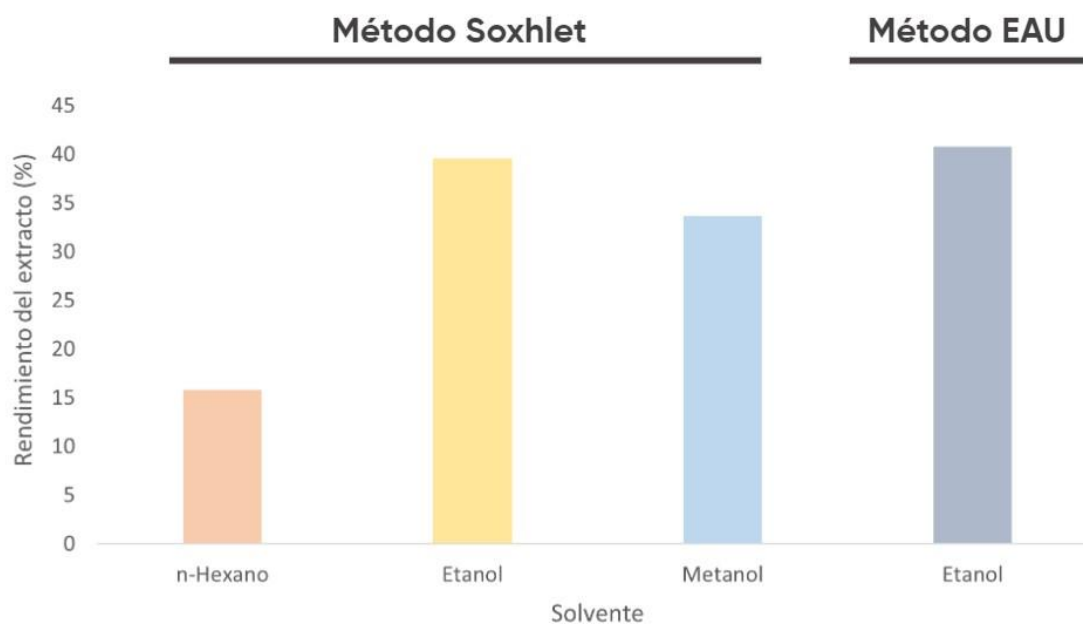


Figura 1. Rendimiento (%) de extractos de carotenoides a diferentes metodologías mediante el uso de distintos solventes. En el método Soxhlet, se evaluó 3 solventes: n-Hexano, Etanol y Metanol. En el método de extracción asistida por ultrasonido (EAU), se evaluó únicamente al Etanol como solvente.

Tabla 1. Análisis de varianza para el rendimiento de extracción de carotenoides a diferentes metodologías.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	SS	df	MS	F	P-value	F crítico
Entre grupos	1199.07	3	399.69	39.44	3.8562E-05	4.07
Dentro de los grupos	81.07	8	10.13			
Total	1280.139344	11				

SS, suma de cuadrados; df, grados de libertad; MS, promedio de los cuadrados. Nivel de significancia 5%

Se evaluó el rendimiento de dos métodos de extracción de carotenoides a partir de las semillas de *Bixa orellana*: el método convencional Soxhlet, mediante el uso

de solventes de distintas polaridades (n-Hexano, Etanol y Metanol); y el método de extracción asistida por ultrasonido (EAU), donde se utilizó etanol como único solvente. Los resultados demostraron que el método que generó mayor rendimiento fue el método EAU en un 40.79% (Figura 1); seguido a este con un valor del 39,56% fue el Etanol del método Soxhlet; la extracción por Metanol obtuvo un 33.64%; y, la extracción con el porcentaje de rendimiento más bajo, con un 15,77% para la extracción con n-Hexano. El análisis de varianza (ANOVA) determinó un valor significativo en $p < 0,05$ para los tratamientos, lo que implica que si existen diferencias significativas entre los rendimientos de las metodologías de extracción aplicadas para la obtención de carotenoides.

2.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS CAROTENOS

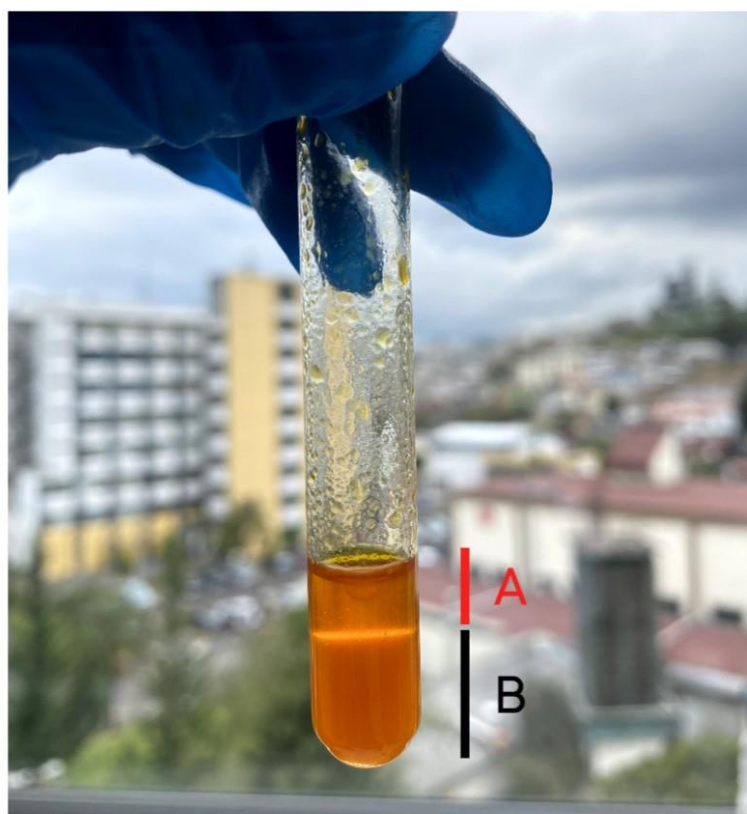


Figura 2. Reacción de los extractos obtenidos al colocar aceite mineral. A, aceite mineral; B, carotenoides en etanol y agua en proporción (1:5).

La cromatografía de capa fina (TLC) realizada a las muestras registró un valor R_f de 0,98 en todos los sistemas de extracción. En la **figura 2** se puede observar cómo los carotenoides obtenidos de las extracciones tienen una mayor afinidad

por el agua (hidrosolubles), con una mayor pigmentación naranja en la fase acuosa (Figura 2A) en relación con el aceite mineral (medio liposoluble), donde se supone tendría una mayor afinidad, lo que podría indicar la presencia de norbixina, un derivado hidrosoluble de la bixina. Aún así, se puede observar cierta pigmentación retenida en el solvente liposoluble (Figura 2B).

2.3. ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES COLOIDALES

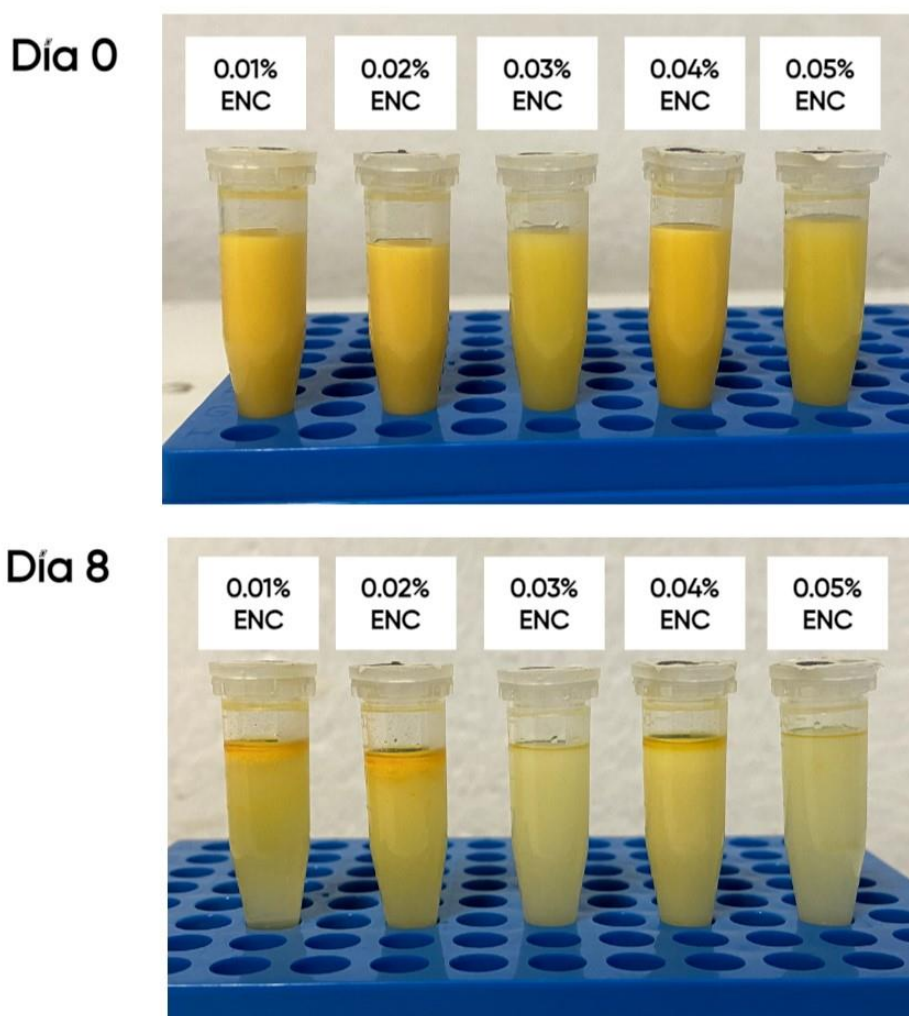


Figura 3. Aspecto de las emulsiones que contienen carotenos en aceite vegetal estabilizados por ENC a varias concentraciones. Las emulsiones contienen ENC a diferentes concentraciones de 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04% y 0.05% (p/p). El tiempo de observación fue un periodo de 8 días.

Las emulsiones que contenían carotenos en aceite vegetal, extraídos del producto comercial “La Favorita”, presentaron una estabilidad mayor en las muestras que

comprendían 0.05% (p/p) de cristales de nanocelulosa endospérmica (ENC) en comparación con concentraciones menores (0.01%, 0.02%, 0.03% y 0.04%), donde se puede observar la separación de las fases en las emulsiones después de su almacenamiento durante 8 días (Figura 3. Cuadro inferior). Además, también se puede observar la formación de crema en las emulsiones de concentraciones bajas de ENC (Figura 3. Cuadro superior), en relación con la emulsión a 0.05% de ENC, la cual presenta un aspecto un poco más líquido.

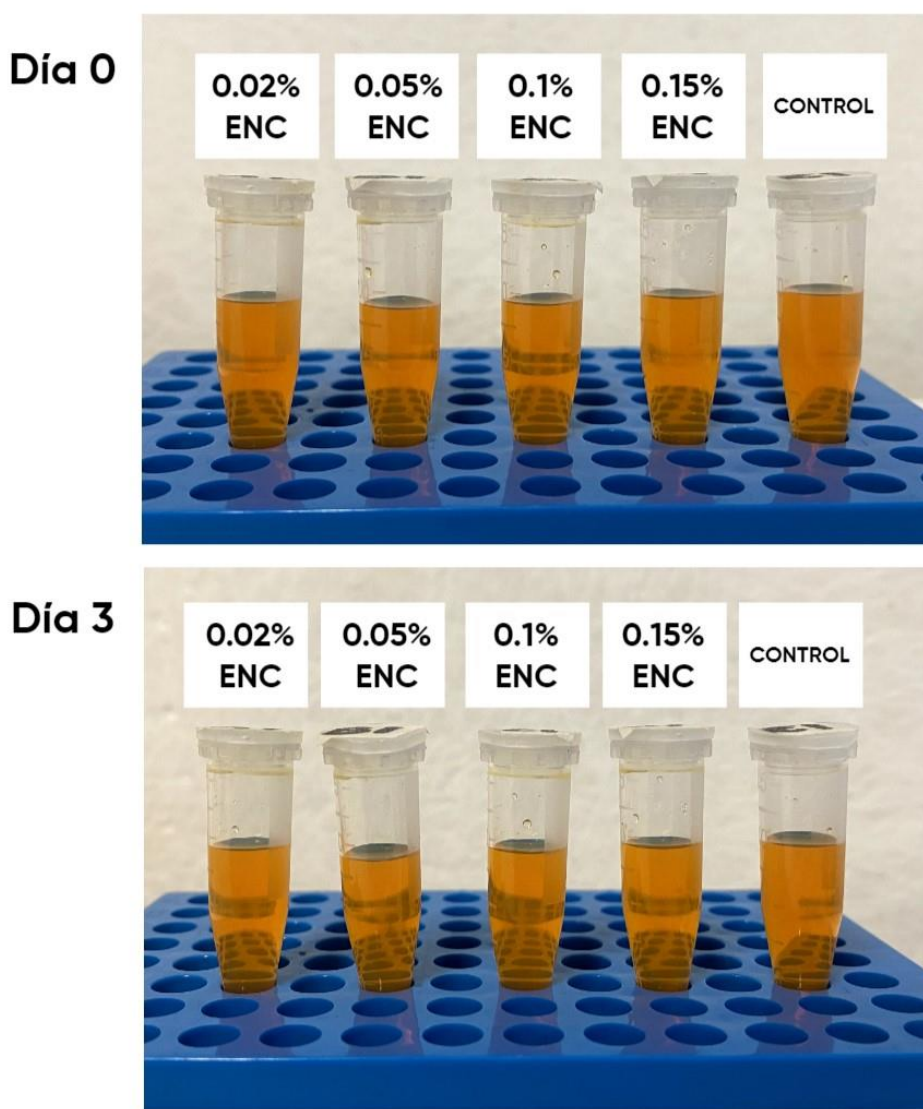


Figura 4. Aspecto de las emulsiones que contienen carotenos hidrosolubles en agua estabilizados por ENC a varias concentraciones. Las emulsiones contienen ENC a diferentes concentraciones de 0.02%, 0.05%, 0.1% y 0.15% (p/p). El tiempo de observación fue un periodo de 3 días.

Por otro lado, las emulsiones que contenían carotenos hidrosolubles en agua no presentaron una diferencia significativa con relación a su estabilidad. Todas las emulsiones parecen tener una gran estabilización con los cristales de nanocelulosa endospérmica (ENC) después de su almacenamiento durante 3 días (Figura 4. Cuadro inferior). Al compararlo con el control, el cual no contenía ENC, y su similitud con las otras muestras, nos puede indicar que todos los componentes simplemente se mezclaron de manera homogénea.

2.4. EXPOSICIÓN DE LAS EMULSIONES A DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ

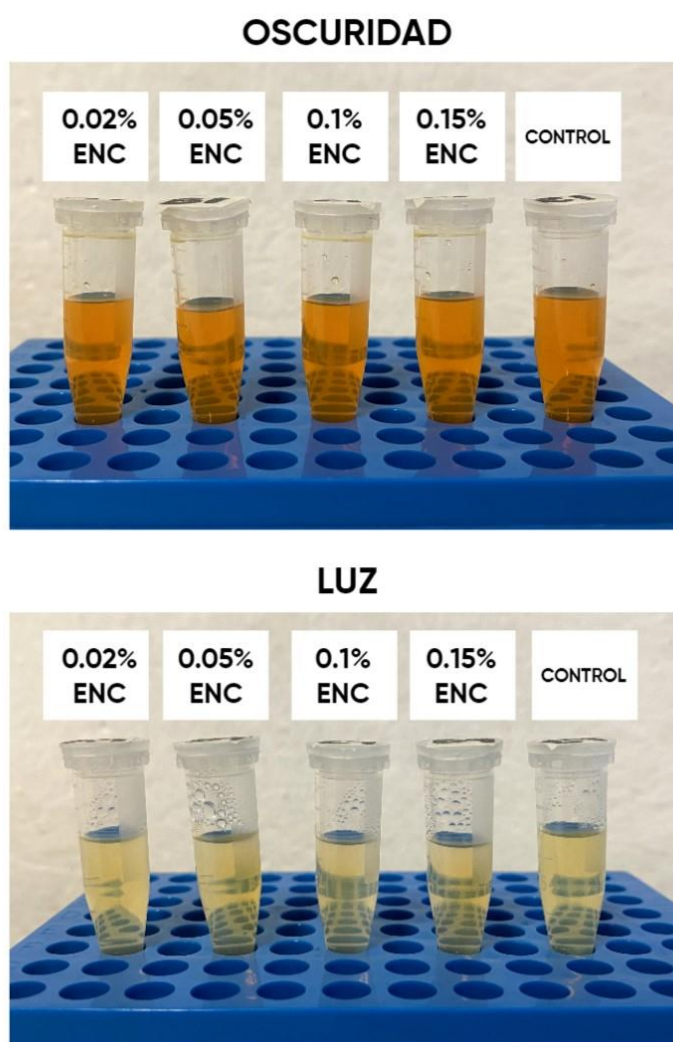


Figura 5. Aspecto de las emulsiones que contienen carotenos hidrosolubles en agua estabilizados por ENC a varias concentraciones a diferentes condiciones de luz. Cuadro superior: emulsiones que contienen ENC a diferentes concentraciones de 0.02%, 0.05%, 0.1% y 0.15% (p/p) conservadas en un lugar oscuro. Cuadro inferior: emulsiones que contienen ENC a diferentes

concentraciones de 0.02%, 0.05%, 0.1% y 0.15% (p/p) que se expusieron a la luz del ambiente.

Por último, se analizó la capacidad de acción de los ENC para proteger a los carotenoides frente a una exposición continua a la luz. Los resultados recolectados después de tres días nos indicaron que en todas las muestras que fueron sometidas a la luz ambiental hubo una degradación de carotenos, la cual se visualiza con el cambio de color de las soluciones (Figura 5. Cuadro inferior) en relación con las muestras que se mantuvieron almacenadas en un lugar oscuro (Figura 5. Cuadro superior). Al compararlas con el control, se puede observar que el estado de degradación es el mismo, lo que nos puede estar indicando que los ENC no encapsularon carotenos.

DISCUSIÓN

La demanda de colorantes naturales como los carotenoides ha aumentado en la última década, no solo por su papel como aditivos alimenticios, si no por su contribución a disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas (cáncer) y trastornos de la piel, debido a que algunos de ellos son generadores de provitamina A (Meléndez et al., 2019). Esto sumado al hecho que en la actualidad estamos experimentando un incremento anual del 30% o más en la dosis de irradiación absorbida (Zerres, 2020). La búsqueda de nuevas fuentes naturales para la obtención de carotenoides se ha vuelto fundamental para la industria médico-farmacéutica y alimentaria (Hirko y Getu, 2022). *Bixa orellana*, cuyo componente activo más abundante es la bixina (carotenoide liposoluble), y su derivado hidrosoluble norbixina, es una planta comercialmente importante que se cultiva por su colorante natural achiote, pero que aún carece de estudios que mejoren la comprensión de su química y bioquímica (Kusmita et al., 2022). En este sentido, tomando en cuenta que un mejor análisis de *B. orellana* se relaciona con un aumento en la extracción de contenido de carotenoides, el cual puede verse afectado por diferentes condiciones ambientales (Sankari et al., 2019), el objetivo de este trabajo experimental fue primeramente optimizar el rendimiento de extracción de carotenoides, mediante la evaluación de un sistema de solventes diferentes, utilizando dos procesos metodológicos distintos: el método convencional Soxhlet, y el método de extracción asistida por ultrasonido (EAU). Las extracciones se realizaron utilizando las semillas de *B. orellana* previamente tratadas, tejido vegetal que contiene alrededor del 80% de los carotenoides totales (Us et al., 2022).

Los resultados determinaron que el método de extracción asistida por ultrasonido obtuvo el mayor rendimiento de extracción (40.79%), que fue tres veces más que el rendimiento obtenido por la extracción Soxhlet, utilizando n-Hexano. El alto rendimiento de la extracción EAU es consecuencia del rompimiento de las paredes celulares de la biomasa, permitiendo que el solvente llegue rápidamente hacia el material de la matriz, lo que hace que los carotenoides se depositen con

facilidad al medio de extracción (Wang y Weller, 2006). Asimismo, la variación en el rendimiento de las extracciones utilizando diferentes disolventes se debe también a sus diferentes polaridades (Tow et al., 2011). Por otro lado, se pudo observar que la extracción Soxhlet que utilizó como solvente EtOH también obtuvo un rendimiento alto (39.56%), lo que nos indica que en términos generales el etanol es el solvente ideal para la extracción de carotenoides. Esto se correlaciona con la bibliografía consultada (de Andrade Lima et al., 2019; Umair et al., 2021; Kultys y Kurek, 2022; Gunathilake et al., 2019) donde también se demostró que el etanol mostró el rendimiento máximo de carotenoides en comparación a otros solventes. Además, de que la utilización de este solvente orgánico también presenta otras ventajas, como el hecho de que sea relativamente barato, reutilizable y presente una baja toxicidad (Gunathilake et al., 2019).

Para identificar los tipos de carotenoides obtenidos de las extracciones realizadas, se llevó a cabo una cromatografía de capa fina (TLC), donde se obtuvo una banda gruesa en la parte superior de la placa, con un factor de retención (R_f) de 0,98. De acuerdo con Saini et al. (2018) valores mayores de 0,8 indican presencia de isómeros de β -caroteno en la muestra. El β -caroteno es un carotenoide liposoluble (insoluble en agua), con un alto contenido de olefinas y precursor de la vitamina A (Wang et al., 2021). Sin embargo, después de observar el comportamiento de las moléculas con el agua y el aceite, se pudo examinar que los carotenoides obtenidos presentaban una mayor asociación con el agua, lo que contradice la descripción de los β -carotenos. Esto nos permite especular dos cosas, primero que posiblemente la mayoría de los carotenoides presentes en la muestra son de tipo hidrosoluble (norbixina), en relación con los carotenoides liposolubles (bixina). Saini et al. (2018) menciona que, dependiendo de la polaridad del disolvente utilizado en el proceso de extracción, se obtendrán en mayor proporción distintos tipos de carotenoides; para obtener carotenoides no polares, los disolventes a utilizar serán el hexano, el éter de petróleo y el tetrahidrofurano, y para carotenoides polares, por otro lado, la acetona, el etanol o el acetato de etilo. Segundo, pudo ocurrir un error en la metodología de TLC seguida, en relación con una alta compatibilidad con la fase móvil. Es decir, la distancia de migración de los componentes de la muestra y las soluciones

utilizadas en la fase móvil son muy similares, esto implica que el componente es muy polar como para que la fase móvil pueda retenerlo adecuadamente (Snyder et al., 2011; Stahl, 2013; Swartz y Krull, 2018). Esto nos indica que, posiblemente la metodología descrita por Melka et al. (2017) no es la mejor para la identificación y cuantificación de carotenoides. Adicionalmente, para una caracterización completa de los carotenoides obtenidos, para próximos trabajos de experimentación, es importante realizar más técnicas espectroscópicas, como una cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPLC), espectroscopia UV-Vis, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, dicroísmo circular y espectroscopia Raman (Minyuk y Solovchenko, 2018; Xu et al., 2019; Agócs et al., 2022; Papapostolou et al., 2023).

La particular estructura y química de superficie de la nanocelulosa ha permitido que funcionen como estabilizadores para varios tipos de emulsiones y sistemas heterogéneos de polímeros a base de agua (Kedzoir et al., 2021). Sumado a que los carotenoides son compuestos muy sensibles a la oxidación, isomerización u otros procesos térmicos (Umair et al., 2021), la siguiente parte del trabajo de experimentación fue evaluar la estabilidad coloidal que proporciona el uso de los cristales de nanocelulosa endospérmica (ENC) en emulsiones con carotenoides de distintas polaridades. Estas nanoestructuras contienen nanofibrillas de un ancho promedio de 3.5 nm, con un grado de sulfatación de $130 \mu\text{M} \text{SO}_3^- \text{g}^{-1}$, el cual es relativamente bajo en comparación con otros nanosistemas. No obstante, es suficiente para mantener la repulsión electrostática y promover la estabilidad coloidal (Carvajal et al., 2022). Los resultados demostraron que, en el caso de los carotenoides liposolubles, una concentración del 0.05% (p/p) de ENC fue suficiente para mantener una emulsión estable. Este resultado nos indica que los ENC son muy buenos estabilizadores en comparación a otras nanoestructuras reportadas, como en el trabajo de Fitri et al. (2022), donde la mayor estabilización de las emulsiones ocurrió cuando se aplicó 0.20% p/p de NCC o NFC. A concentraciones mayores, por lo tanto, se espera que la estabilidad de las emulsiones mejore aún más. Esto significa que la estructura en nanofibrillas entrelazadas largas actúo como un puente entre las gotas de aceite, evitando así la separación de las gotas de aceite durante el periodo de almacenamiento (Varanasi et al., 2013). Mientras que, en el caso de los carotenoides

hidrosolubles, las concentraciones de 0.02% a 0.15% de ENC mantuvieron a simple vista una buena estabilización en las emulsiones, de manera que todos los componentes de la emulsión se homogenizaron aparentemente.

Para verificar si en realidad ocurrió la encapsulación de los carotenoides hidrosolubles, se llevó a cabo la exposición de las soluciones a distintas condiciones de luz, para determinar la cinética de degradación de los carotenoides y definir la vida útil del producto encapsulado. De acuerdo con la literatura (Casanova y Santos, 2016; Figueroa et al., 2021; Marcillo, 2022), los agentes encapsulantes si ofrecen cierto tipo de protección al caroteno contra la luz, siendo los carotenoides encapsulados más estables que los carotenoides libres cuando fueron expuestos a la luz. Esto es importante porque la encapsulación de carotenoides solubles como la norbixina, mejoraría sus propiedades antioxidantes, implicados en la desactivación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daños en el ADN (Kovary et al., 2001; Tupuna et al., 2018; Baswan et al., 2021), al reducir su susceptibilidad a la degradación cuando se exponen a factores adversos como altas temperaturas, oxígeno, luz o pH bajo (Dos Santos et al., 2018; Horuz y Belibağlı, 2018). No obstante, los resultados no mostraron cambios significativos con el control (el cual no contenía ENC), lo que nos indica que posiblemente los cristales de nanocelulosa no están encapsulando a los carotenoides. En consecuencia, para próximos trabajos, se plantea que se aumente la concentración de ENC en las emulsiones y se vuelva a evaluar su estabilidad a la luz, parámetro importante para su posterior aplicación en matrices de productos alimenticios, farmacéuticos o cosméticos. Además, también se sugiere realizar otros estudios, como la evaluación del potencial zeta (ζ) de las emulsiones, que proporciona una mejor información sobre la estabilidad a las emulsiones (Morais et al., 2022).

CONCLUSIONES

- El método de extracción asistida por ultrasonido (EAU) presenta un mayor rendimiento de extracción (40.79%) en comparación con la metodología convencional por extracción Soxhlet, debido a que las ondas de ultrasonido de alta frecuencia que emiten permiten que el solvente llegue fácilmente hacia el material de la matriz, convirtiéndolo en la técnica ideal para extracción de carotenoides, con una mayor eficiencia y tiempo de extracción reducido.
- Los resultados del trabajo de experimentación también confirmaron que el etanol es el solvente ideal para la extracción de carotenoides, al obtener un rendimiento máximo de carotenoides alto en comparación a otros solventes. Además, de que la utilización de este solvente orgánico permite minimizar costos en la extracción y presenta una baja toxicidad.
- La mayoría de los carotenoides obtenidos siguiendo la metodología propuesta en este estudio fueron de tipo hidrosoluble (norbixina), en relación con los carotenoides liposolubles (bixina), esto se verificó por la afinidad al agua que tenían las muestras, por lo tanto, para próximos estudios se deberá tener en cuenta la polaridad del disolvente si se quiere obtener un tipo de carotenoides específico.
- Una concentración del 0.05% (p/p) de ENC fue suficiente para mantener emulsiones coloidales estables con los carotenoides liposolubles. Lo que nos indica que los ENC son muy buenos estabilizadores en comparación a otras nanoestructuras reportadas en bibliografía. No obstante, los resultados no fueron tan favorables en las emulsiones que se formaron con los carotenoides hidrosolubles, donde los cristales de nanocelulosa no beneficiaron su estabilidad al ser expuestas a la luz.

- Aún es necesario realizar más pruebas con relación a optimizar la concentración de ENC en las emulsiones, las cuales permitan evitar la degradación de carotenoides cuando se exponen a factores externos como altas temperaturas, oxígeno, luz o pH bajo, parámetros importantes para su posterior aplicación en matrices de productos de la industria alimenticia, farmacéutica o cosmética.

RECOMENDACIONES

- Aunque el trabajo de experimentación permitió determinar que el etanol es el solvente ideal para la extracción de carotenoides por su alto rendimiento de carotenoides en comparación a otros solventes, se podría realizar más estudios que impliquen utilizar el solvente a diferentes concentraciones, y de esta manera seguir optimizando la metodología.
- Para obtener una caracterización completa de los carotenoides, para próximos trabajos de experimentación, es importante realizar más técnicas espectroscópicas, como una cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPLC), espectroscopia UV-Vis, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, dicroísmo circular y espectroscopia Raman.
- Para optimizar la concentración de ENC y mejorar la estabilización de las emulsiones coloidales, se plantea que se aumente la concentración de ENC (> 0.15% p/p) y se vuelva a evaluar su estabilidad a la luz. Además, también se sugiere realizar otros estudios metodológicos, como la evaluación del potencial ζ de las emulsiones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adadi, P., Barakova, N. V., y Krivoschapkina, E. F. (2018). Selected methods of extracting carotenoids, characterization, and health concerns: A review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(24), 5925-5947. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01407>

Agócs, A., Turcsi, E., Nagy, V., y Deli, J. (2022). Isolation and Analysis of Carotenoids in Hungary from Zechmeister until Today. *Processes*, 10(4), 707. <https://doi.org/10.3390/pr10040707>

Ahi, E. P., Lecaudey, L. A., Ziegelbecker, A., Steiner, O., Goessler, W., y Sefc, K. M. (2020). Expression levels of the tetratricopeptide repeat protein gene ttc39b covary with carotenoid-based skin colour in cichlid fish. *Biology letters*, 16(11), 20200629. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0629>

Amaro, H. M., Guedes, A. C., Preto, M. A. C., y Malcata, F. X. (2018). Gloeotheca sp. as a Nutraceutical Source — An improved method of extraction of carotenoids and fatty acids. *Marine Drugs*, 16(9), 327. <https://doi.org/10.3390/md16090327>

Ariyaratna, I. y Karunaratne, D. (2015). Use of chickpea protein for encapsulation of folate to enhance nutritional potency and stability. *Food and Bioproducts Processing*, 95, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.04.004>

Baswan, S. M., Klosner, A. E., Weir, C., Salter-Venzon, D., Gellenbeck, K. W., Leverett, J., y Krutmann, J. (2021). Role of ingestible carotenoids in skin protection: A review of clinical evidence. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 37(6), 490-504. <https://doi.org/10.1111/phpp.12690>

Burghardt, R. C., y Droleskey, R. (2006). Transmission electron microscopy. *Current protocols in microbiology*, 3(1), 2B-1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b01s03>

Carvajal, E., Putaux, J., Martín, P., Simbaña, J., Portero, P. y Martín, J. (2022). Opportunities for Ivory Nut Residue Valorization as a Source of Nanocellulose Colloidal Suspensions. *Gels*, 9(1), 32. <https://doi.org/10.3390/gels9010032>

Casanova, F. y Santos, L. (2016). Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application—a review. *Journal of microencapsulation*, 33(1), 1-17. <https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1115900>

Ciro, G. L., Zapata, J. E., y López, J. (2014). In vitro evaluation of Bixa orellana L.(annatto) seeds as potential natural food preservative. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(21), 772-779.

de Andrade Lima, M., Kestekoglou, I., Charalampopoulos, D., y Chatzifragkou, A. (2019). Supercritical fluid extraction of carotenoids from vegetable waste matrices. *Molecules*, 24(3), 466. <https://doi.org/10.3390/molecules24030466>

Dos Santos, P., Andrade, L., Flôres, S., y Rios, A. (2018). Nanoencapsulation of carotenoids: A focus on different delivery systems and evaluation parameters. *Journal of food science and technology*, 55(10), 3851-3860. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3316-6>

Figuroa, A., Antunes, M. y Guajardo, D. (2021). Encapsulation of phenolic compounds with liposomal improvement in the cosmetic industry. *International journal of pharmaceuticals*, 593, 120125. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120125>

Fitri, I. A., Mitbunrung, W., Akanitkul, P., Rungraung, N., Kemsawasd, V., Jain, S., y Winuprasith, T. (2022). Encapsulation of β -carotene in oil-in-water emulsions containing nanocellulose: Impact on emulsion properties, in vitro digestion, and bioaccessibility. *Polymers*, 14(7), 1414. <https://doi.org/10.3390/polym14071414>

Gunathilake, K., Ranaweera, K., y Rupasinghe, H. (2019). Response surface optimization for recovery of polyphenols and carotenoids from leaves of *Centella asiatica* using an ethanol-based solvent system. *Food science & nutrition*, 7(2), 528-536. <https://doi.org/10.1002/fsn3.832>

- Handayani, I., y Setyawati, R. (2020). Evaluation types of solvents on the extraction of *Bixa orellana* and application of extract on a chicken sausage product as natural colour and antioxidant sources. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 443, No. 1, p. 012048). doi:10.1088/1755-1315/443/1/012048
- Hirko, B., y Getu, A. (2022). *Bixa orellana* (Annatto *Bixa*). A Review on Use, Structure, Extraction Methods and Analysis. *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management*, 5(1), 687-696.
- Honary, S., y Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 255-264. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>
- Horuz, T. y Belibağlı, K. (2018). Nanoencapsulation by electrospinning to improve stability and water solubility of carotenoids extracted from tomato peels. *Food chemistry*, 268, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.017>
- Horuz, T. y Belibağlı, K. (2019). Nanoencapsulation of carotenoids extracted from tomato peels into zein fibers by electrospinning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 759-766. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9244>
- Kedzior, S. A., Gabriel, V. A., Dubé, M. A., & Cranston, E. D. (2021). Nanocellulose in emulsions and heterogeneous water-based polymer systems: A review. *Advanced Materials*, 33(28), 2002404. <https://doi.org/10.1002/adma.202002404>
- Kovary, K., Louvain, T., e Silva, M., Albano, F., Pires, B., Laranja, G., Lage, C. y Felzenszwalb, I. (2001). Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. *British Journal of Nutrition*, 85(4), 431-440. <https://doi.org/10.1079/BJN2000287>
- Kultys, E., y Kurek, M. A. (2022). Green extraction of carotenoids from fruit and vegetable byproducts: A review. *Molecules*, 27(2), 518. <https://doi.org/10.3390/molecules27020518>

Kusmita, L., Franyoto, Y., Mutmainah, M., Puspitaningrum, I., y Nurcahyanti, A. (2022). Bixa orellana L. carotenoids: antiproliferative activity on human lung cancer, breast cancer, and cervical cancer cells in vitro. *Natural Product Research*, 36(24), 6421-6427. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2036144>

Marcillo, V. (2022). Valorization of ecuadorian mango peel (*Mangifera indica* L.) as a potential source of bioactive compounds, to obtain an encapsulated extract with functional properties by spray-drying (Tesis doctoral). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

Meléndez, A., Stinco, C., y Mapelli, P. (2019). Skin carotenoids in public health and nutricosmetics: The emerging roles and applications of the UV radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene. *Nutrients*, 11(5), 1093. <https://doi.org/10.3390/nu11051093>

Melka, B., Bisrat, D., y Neelaiah Babu, G. (2017). Isolation, Characterization and Biological Activities of Food Colorants from Bixa orellana. *Journal of Pharmacovigilance*, 5(4), 237. doi: 10.4172/2329-6887.1000237

Minyuk, G. S., y Solovchenko, A. E. (2018). Express analysis of microalgal secondary carotenoids by TLC and UV-Vis spectroscopy. *Microbial Carotenoids: Methods and Protocols*, 73-95. doi:10.1007/978-1-4939-8742-9_4

Morais, N., Passos, T., Ramos, G., Ferreira, V., Moreira, S., Chaves Filho, G., Gomes, A., Palacio, P., Silva de Almeida, R., Roque, C., Fernandes, R., Dantas da Silva, S., da Cruz, S., de Sousa, F. y de Assis, C. (2022). Nanoencapsulation of buriti oil (*Mauritia flexuosa* L. f.) in porcine gelatin enhances the antioxidant potential and improves the effect on the antibiotic activity modulation. *Plos one*, 17(3), e0265649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265649>

Li, C., Li, X., Li, S., Weng, Y., Wang, K., Zhang, T., ... y Liang, X. (2016). Development and validation of a method for determination of encapsulation efficiency of CPT-11/DSPE-mPEG2000 nanoparticles. *Med Chem (Los Angeles)*, 6(05), 345-348.

Papapostolou, H., Kachrimanidou, V., Alexandri, M., Plessas, S., Papadaki, A., y Kopsahelis, N. (2023). Natural Carotenoids: Recent Advances on Separation from

Microbial Biomass and Methods of Analysis. *Antioxidants*, 12(5), 1030.
<https://doi.org/10.3390/antiox12051030>

Raddatz, D., Pérez, L., Carrari, F., Mendoza, J., de León-Sánchez, F., Pinzón, L., Godoy, G. y Rivera, F. (2017). Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of food science and technology*, 54, 1729-1741.

Saini, R. K., Moon, S. H., Gansukh, E. y Keum, Y. S. (2018). An efficient one-step scheme for the purification of major xanthophyll carotenoids from lettuce, and assessment of their comparative anticancer potential. *Food chemistry*, 266, 56-65.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.104>

Saini, R. K. y Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food chemistry*, 240, 90-103.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>

Sankari, M., Hridya, H., Sneha, P., Doss, C., Christopher, J. G., Mathew, J., Zayed, H. y Ramamoorthy, S. (2019). Implication of salt stress induces changes in pigment production, antioxidant enzyme activity, and qRT-PCR expression of genes involved in the biosynthetic pathway of *Bixa orellana* L. *Functional & integrative genomics*, 19, 565-574. <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00654-7>

Shishir, M., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., y Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 34-60.

Snyder, L., Kirkland, J., y Dolan, J. (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons.

Stahl, E. (Ed.). (2013). *Thin-layer chromatography: a laboratory handbook*. Springer Science & Business Media.

Strati, I., y Oreopoulou, V. (2011). Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry*, 129(3), 747-752.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.015>

Swartz, M. y Krull, I. (Eds.). (2018). *Analytical method development and validation*. CRC press.

Tow, W. W., Premier, R., Jing, H., y Ajlouni, S. (2011). Antioxidant and antiproliferation effects of extractable and nonextractable polyphenols isolated from apple waste using different extraction methods. *Journal of food science*, 76(7), T163-T172. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02314.x>

Tupuna, D., Paese, K., Guterres, S., Jablonski, A., Flôres, S., y de Oliveira Rios, A. (2018). Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. *Industrial crops and products*, 111, 846-855. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.001>

Umair, M., Jabbar, S., Nasiru, M., Lu, Z., Zhang, J., Abid, M., Murtaza, M., Kieliszek, M. y Zhao, L. (2021). Ultrasound-assisted extraction of carotenoids from carrot pomace and their optimization through response surface methodology. *Molecules*, 26(22), 6763. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules26226763>

Us, R., Aguilar, M., Rodríguez, J., Vallejo, A. A., Carballo, V. M., Serrano, H. y Rivera, R. (2022). Identifying Bixa orellana L. new carotenoid cleavage dioxygenases 1 and 4 potentially involved in bixin biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 13, 224. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.829089>

Varanasi, S., He, R., y Batchelor, W. (2013). Estimation of cellulose nanofibre aspect ratio from measurements of fibre suspension gel point. *Cellulose*, 20, 1885-1896. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9972-9>

Venturini, C., Jäger, E., Oliveira, C., Bernardi, A., Battastini, A. M., Guterres, S., y Pohlmann, A. (2011). Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 375(1-3), 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.011>

Wang, L., Liu, Z., Jiang, H., y Mao, X. (2021). Biotechnology advances in β -carotene production by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 322-332. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.077>

Wang, L., y Weller, C. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>

Win, K. Y., y Feng, S. S. (2005). Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15), 2713-2722. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.050>

Xu, L., Shu, T., y Liu, S. (2019). Simplified quantification of representative bioactives in food through TLC image analysis. *Food Analytical Methods*, 12, 2886-2894. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01645-x>

Zerres, S., y Stahl, W. (2020). Carotenoids in human skin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11), 158588. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158588>

Zhang, J., Fan, Y., y Smith, E. (2009). Experimental design for the optimization of lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 1813–1819. <https://doi.org/10.1002/jps.21549>