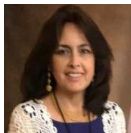


Eficiencia de encapsulación de carotenoides extraídos de capsicum annuum en nanopartículas de zeína

Encapsulation efficiency of carthenoid extracted from capsicum annuum in zein nanoparticles

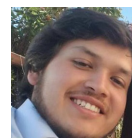
DOI: <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.1017>



Suárez Heredia Martha Azucena
Docente de la Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Central del Ecuador
masuarez@uce.edu.ec



Rosero José Augusto
Docente de la Facultad de Ingeniería
Ciencias Físicas y Matemática.
Universidad Central del Ecuador
jarosero@uce.edu.ec



Morillo Reinoso Yery Mateo
trabajador Independiente
donelelena_25@hotmail.com



Haro Morales Gabriela Johana
Estudiante de la Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Central del Ecuador
gjharo@uce.edu.ec



Ichau Espinoza Marlon Agustín
Estudiante de la Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Central del Ecuador
maichau@uce.edu.ec

RESUMEN

Se sintetizaron nanopartículas de zeína para encapsular carotenoides y determinar la eficiencia de la encapsulación en condiciones experimentales controladas. Se extrajeron cuantitativamente los carotenoides de muestras precondicionadas de *Capsicum annuum*, mediante agitación en frío con cloroformo. Los carotenoides totales, expresados como concentración de β -caroteno se cuantificaron por mediciones espectrofotométricas, que se relacionaron con unidades ASTA de color. Las nanopartículas de zeína se sintetizaron por el método de coacervación y se las caracterizó mediante mediciones de tamaño de partícula, polidispersión y potencial Z. El colorante fue encapsulado durante el proceso de síntesis. Utilizando un diseño factorial completo 23 al 95% de confianza, se determinó que las condiciones en las que se maximiza el porcentaje de inclusión del colorante en las nanopartículas de zeína, hasta un 88,94% fueron: concentración de zeína del 2%, temperatura de 20°C y pH 8.

PALABRAS CLAVE: nanopartículas; capsicumannuum; eficiencia de encapsulación; alimentos funcionales.

ABSTRACT

Zein nanoparticles were synthesized to encapsulate carotenoids and determine the efficiency of the encapsulation under controlled experimental conditions. Carotenoids were quantitatively extracted from preconditioned samples of Capsicum annuum by cold agitation with chloroform. The total carotenoids, expressed as concentration of β -carotene, were quantified by spectrophotometric measurements, which were related to ASTA units of color. The zein nanoparticles were synthesized by the coacervation method and characterized by measurements of particle size, polydispersity and Z potential. The dye was encapsulated during the synthesis process. Using a complete factorial design 23 at 95% confidence, it was determined that the conditions in which the inclusion percentage of the dye in the zein nanoparticles is maximized, up to 88.94% were: zein concentration of 2%, temperature of 20 °C and pH 8.

KEYWORDS: nanoparticles; capsicumannuum; encapsulation efficiency; functional foods.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos usados en la industria como aditivos para mejorar el aspecto de los productos. En las industrias farmacéutica, de alimentos y cosmética tienen mucha importancia debido a la asociación de la seguridad del producto con su apariencia. Entre los carotenoides de mayor importancia industrial, se encuentran la astaxantina, la luteína, la zeaxantina y el β -caroteno.

La astaxantina (Fig. 1) constituye el segmento de más rápido crecimiento en el mercado de carotenoides de Estados Unidos, impulsado por su uso en la acuicultura (Meyers, 2000).

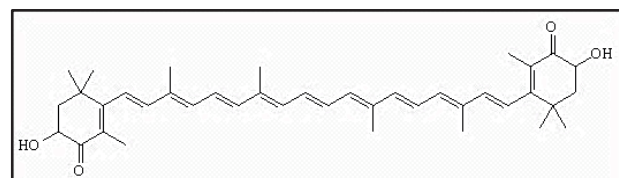


Figura 1. Estructura química del carotenoide astaxantina

La luteína y la zeaxantina (Fig. 2) son los carotenoides más utilizados como aditivos alimentarios y la industria cosmética aprovecha sus características antioxidantes para utilizarlos como suplementos nutricionales y componentes de cremas para bronceado.

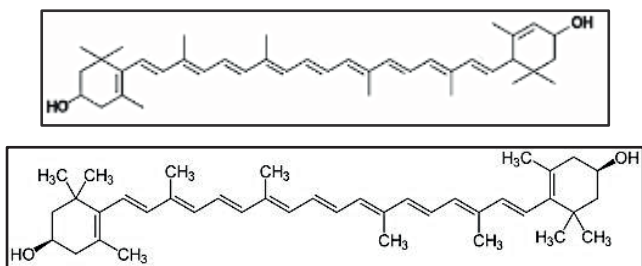


Figura 2. Estructura química de los carotenoides luteína y zeaxantina

Otro compuesto de importancia industrial es el β -caroteno (Fig. 3), ampliamente utilizado en alimentos y suplementos terapéuticos, constituye el segmento de carotenoides más grande en el mercado mundial. La creciente popularidad del β -caroteno es atribuida a sus beneficios para la salud y actualmente es el carotenoide con más aplicaciones en la industria de alimentos (AQUA HOY, Portal de información de acuicultura, 2017)

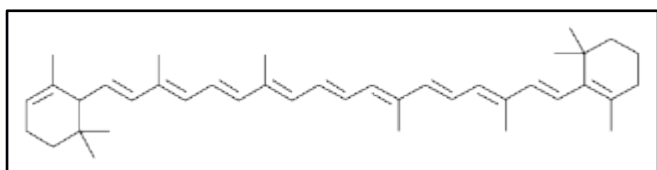


Figura 3. Estructura química del β -caroteno

El creciente interés en dietas saludables que incluyen a los productos alimenticios funcionales y procesados está acelerando el crecimiento del mercado mundial de los carotenoides (AQUA HOY, Portal de información de acuicultura, 2017). Entre los años 2003 y 2007 en países desarrollados se produjo un crecimiento en la importación de materia prima a fuente para la extracción de estos compuestos (Tabla 1); debido a sus propiedades funcionales, a su baja toxicidad y a su alto poder tintóreo.

Tabla 1. Principales mercados importadores de fuentes de pigmentos carotenoides

Países importadores	Valor miles de USD	Volumen Ton	% Crecimiento 2003-2007
Estados Unidos	38421	1583	10
Países Bajos	37669	1379	7
México	18140	329	9
Dinamarca	15959	495	16
España	15454	1311	15
Italia	12446	787	11
Australia	10703	601	15
Pakistán	10685	4283	116

Fuente: (Trade map estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresas, 2016)

Las propiedades antioxidantes de los carotenoides han sido aprovechadas en la industria de los alimentos. En los próximos años, se espera que los carotenoides naturales tengan una mayor aceptación entre los consumidores, desplazando del mercado a los carotenoides sintéticos, debido al incremento de la demanda por productos alimenticios fortificados y naturales. Estados Unidos y Europa son los principales exportadores y consumidores de carotenoides, especialmente luteína, cantaxantina y astaxantina (AQUA HOY, Portal de información de acuicultura, 2017).

En Latinoamérica, el Ecuador es uno de los países exportadores de carotenoides, para lo cual se creó una partida arancelaria con el nombre de “Materias colorantes de origen vegetal o animal” que incluye los pigmentos naturales de origen vegetal, entre estos los carotenoides. Según Trade Map las ventas de carotenoides tienen un crecimiento proyectado de más del 20% cada año, siendo el principal mercado de exportación los Estados Unidos, lo que demuestra la importancia de estos colorantes dentro de la economía ecuatoriana (International Trade Center, 2016).

Además de la importancia comercial, los pigmentos carotenoides son esenciales en la salud humana por sus funciones biológicas como: actividad provitamina A, actividad antioxidante, inhibición de mutagénesis, transformación e inhibición de lesiones premalignas y protección frente a fotosensibilización (Wang, 2008).

Las fuentes naturales de carotenoides son en general las frutas y verduras. Los vegetales de color amarillo, verde oscuro, naranja y rojo, contienen zeaxantina, luteína y β -caroteno, estos compuestos también se encuentran presentes en la yema de huevo. Las mejores fuentes de astaxantina natural incluyen a varios organismos marinos como el camarón y salmón, a pesar de que estos organismos no pueden sintetizarla, la acumulan en diversas partes de su cuerpo. Entre los vegetales con un alto contenido de carotenoides se encuentra el pimiento rojo, *Capsicum annum*. La producción de pimiento representa un rubro importante en el sector agrícola ecuatoriano, debido a que puede cultivarse tanto en la costa como en los valles interandinos. Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería en el año 2005 se cosecharon 1760 hectáreas en la costa, con una producción estimada de 27.221 toneladas siendo las provincias de Guayas, Manabí, y Esmeraldas las de mayor producción (International Trade Center, 2016).

Los carotenoides presentan una alta sensibilidad a factores externos como luz, temperatura, pH,



metales, enzimas y peróxidos que estimulan la oxidación de estos pigmentos e inactivan sus propiedades antioxidantes. La inestabilidad de los carotenoides se debe a que contienen nueve o más dobles enlaces conjugados que pueden ser oxidados por ciertas formas reactivas de oxígeno, como el oxígeno singulete, lo que lleva a una disminución progresiva del color (Meléndez et al., 2004). La inestabilidad de estos pigmentos crece al aumentar el número de dobles enlaces no coplanares; en la estructura del β -caroteno, dos de sus dobles enlaces conjugados no son coplanares con la cadena poliénica, por lo que presenta una mayor inestabilidad en comparación al licopeno que contiene once dobles enlaces conjugados coplanares (Meléndez-Martínez et al., 2004).

Varias investigaciones se enfocan en aumentar la estabilidad de los pigmentos carotenoides utilizando diferentes técnicas, entre ellas: secado por atomización utilizando agentes encapsulantes como: gelatina, goma arábica, caseinato de sodio, almidón modificado, mezclas de maltosa-dextrina y almidón de arroz-gelatina (Beatus et al., 1985). Se han desarrollado métodos de coacervación utilizando alginato de calcio y una barrera intermedia compuesta de aislado proteico de suero (Rosenberg & Lee, 2004) los cuales han dado como resultado un cambio en la cinética de degradación de primero a segundo orden (Palma Astudillo, 2013), sugiriendo que la estabilidad de los pigmentos carotenoides mejora al ser encapsulados en una matriz biopolimérica. Utilizando secado por atomización como método de encapsulación en matrices biopoliméricas, la vida media estimada de β -caroteno estabilizado fue de 7-27 días a 25°C y de carotenoides de oleoresina de ají de 18-25 días a 35°C, (Rodríguez et al., 2004).

Una de las ventajas más notables del encapsulamiento de carotenoides en biopolímeros es el incremento de su vida útil, favoreciendo la conservación del compuesto y su actividad biológica, sin incremento de la toxicidad del producto final (Robert et al., 2003). Los biopolímeros son usados en la industria para formar, proteger y transportar los compuestos activos (Singh & Lillard, 2009). Entre los más utilizados como matrices poliméricas están las proteínas usadas por sus propiedades emulsificantes, formación de películas, solubilidad, y biodegradabilidad (Favaro et al., 2010).

La zeína es una proteína de origen natural que cumple funciones de almacenamiento de los carotenoides presentes en la semilla del grano de

maíz (Wang, 2008). No se han encontrado reportes bibliográficos respecto del uso de zeína como agente encapsulante para el diseño de alimentos funcionales; a pesar de que la zeína como matriz polimérica presenta múltiples beneficios, tanto físicoquímicos como nutricionales. Existen reportes del encapsulamiento de licopeno y polifenol galato de epigallocatequina (EGCG) en fibras de zeína mediante la técnica de electrospinning (Fernández, 2009), así como de lisozima mediante el proceso de anti disolvente supercrítico y aceite de pescado mediante el método de dispersión líquido - líquido (Zhong, 2009).

Utilizando zeína como matriz polimérica de encapsulamiento en nanoestructuras, se planteó resolver el problema de la inestabilidad de los pigmentos carotenoides. La zeína al ser una proteína que se encuentra naturalmente en el grano de maíz, protege a los carotenos de los factores externos de degradación (Robert et al., 2003), además por ser una proteína de uso cotidiano, agregaría prestancia y funcionalidad a los productos.

METODOLOGÍA

Se seleccionaron frutos de *Capsicum annum* por inspección visual, mediante la homogeneidad del color. Se retiraron las semillas y la pulpa se lavó con abundante agua, se cortó en segmentos transversales y se escaldó. Se secó a 40°C en estufa de convección BINDER hasta consistencia áspera y se molió y tamizó en malla 20.

Se extrajeron cuantitativamente los carotenoides por agitación con cloroformo EMSURE en frío a 1200 rpm, hasta reacción de Carr-Price negativa. El extracto de carotenoides se concentró a sequedad, a presión reducida.

Se tamizaron gránulos de carbón por malla 30 para eliminar el polvo fino. El sólido retenido se lavó con exceso de etanol 70%, se activó con aire caliente a 105°C. Se prepararon soluciones de zeína USP Sigma-Aldrich al 0,3% y 2% (p/v) en una mezcla etanol/agua 85:15 (v/v). Se agregó carbón activado sobre la solución de zeína, en una relación 1:50 (p/v) y se agitó durante dos horas a 600 rpm, se filtró al vacío y la solución decolorada se almacenó en refrigeración y protegida de la luz.

Se prepararon soluciones etanol/agua al 20% con pH controlado de 4 y 8. La solución base se agitó mecánicamente en un agitador Fisher Scientific a 700 rpm. Se dispersó la solución de zeína sobre la

solución base a una presión constante de 30 psi, y se mantuvo en agitación durante un minuto.

Se preparó una solución de extracto de carotenoides en cloroformo EMSURE y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS VARIAN Biocary 50. El colorante se incorporó en las nanopartículas de zeína, con la misma metodología.

DISCUSIÓN

Se obtuvo un extracto de carotenoides totales, con las concentraciones de β-caroteno detalladas en la Tabla 2. Mediante la metodología de coacervación, se sintetizaron nanopartículas a partir de zeína USP decolorada, encapsulando el colorante durante el proceso de síntesis. Con una solución hidroalcohólica detallada para la síntesis. El cloroformo se eliminó por calentamiento y se redispersaron las nanopartículas en etanol al 85% a pH constante, se midió la absorbancia de la solución. Las nanopartículas se caracterizaron mediante mediciones de tamaño, polidispersión y potencial Z en un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS), Nanopartica SZ-1000 Series.

Tabla 2. Concentración de carotenoides totales como β-caroteno.

Carotenoides totales como β-caroteno /100g extracto seco)	Carotenoides totales como β-caroteno (mg/100g muestra seca)
20340,67 ± 108,58	4603,09 ± 24,57

La eficiencia de encapsulación se determinó espectrofotométricamente a 460 nm, utilizando un estándar analítico de β-caroteno Sigma-Aldrich CAS 7235-40-7, mediante la evaluación de la intensidad de color (Ecuación 1) según el método cuantitativo ASTA (Association of Official Analytical Chemists, Inc., 1984)

$$\text{unidades ASTA} = \frac{A \cdot 16,4 \cdot I_f}{g \text{ de muestra}} \quad \text{Ec. (1)}$$

El factor de corrección instrumental I_f se determinó con soluciones estándar preparadas con reactivos analíticos MERCK de dicromato de potasio y sulfato de cobalto. El cálculo de la concentración de carotenoides totales expresados como β-caroteno se realizó a partir de la Ecuación 2, utilizando el coeficiente de absorción específica ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) para β-caroteno en el solvente de extracción a 460 nm de zeína 2% se obtuvo un tamaño de partícula de 250,1 nm; con polidispersión de 0,097 y con una solución hidroalcohólica de zeína 0,3% se obtuvo un tamaño de partícula de 175,9 nm y polidispersión de 0,153.

$$(\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g muestra}) = \frac{A \cdot V \text{ (mL)} \cdot 10^6}{100 \cdot (A_{1\text{cm}}^{1\%}) \cdot g \text{ muestra}} \quad \text{Ec.(2)}$$

La fase dispersante utilizada fue una solución de etanol al 20%. Los niveles para el pH utilizados se definieron, tomando en cuenta las máximas ionizaciones tanto básica (pH 8) como ácida (pH 4) de la proteína. No se consideraron los valores de pH cercanos al punto isoelectrico (pH 6,2) ya que provocarían aglomeración de las nanopartículas con la consecuente falta de estabilidad (Shukla & Cheryan., 2001). Los resultados de potencial Z a pH4 y pH8 fueron: -28,3mV y 77,9 mV a pH 8, respectivamente.

Se determinaron experimentalmente los niveles de temperatura mediante la síntesis de nanopartículas en medios de temperatura controlada. Se encontró que a 4°C las nanopartículas de zeína sintetizadas se aglomeran obteniéndose tamaños 3200,2 nm que son mayores a los considerados nanométricos (Raula & Eerikainen, 2004). El rango de temperatura en el cual las nanopartículas de zeína presentaron estabilidad se definió entre 15 - 30°C, con tamaños de partícula menores a 500 nm. Este rango de temperatura favorece el encapsulamiento, ya que de acuerdo con el estudio de Martínez et al., (2015) se observa un efecto de degradación térmica de los carotenoides a temperaturas superiores a 40°C.

La eficiencia de encapsulación se evaluó a partir la cuantificación espectrofotométrica del β-caroteno incluido en las nanopartículas durante el proceso de formación. Se definió el efecto de la concentración de zeína (CZ), el pH y la temperatura (T) sobre el porcentaje de inclusión del colorante –eficiencia de encapsulación.

A partir de un diseño experimental 23 al 95% de confianza (Vega, 2016), se pudo establecer la eficiencia de encapsulación (EE) de los carotenoides en nanopartículas de zeína. Los resultados de los experimentos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Eficiencia de encapsulación experimental, diseño factorial completo 23 con réplica de diseño completo

Nº	EE (R1)	EE (R2)	EE
1	79,19	81,79	80,49 ± 1,84
2	77,34	87,34	82,34 ± 7,07
3	81,16	88,17	84,67 ± 4,96
4	75,03	76,53	75,78 ± 1,06
5	88,42	90,31	89,36 ± 1,34
6	80,38	94,45	87,41 ± 9,94
7	79,19	85,98	82,59 ± 4,80
8	78,37	85,80	82,09 ± 5,25

R₁. Eficiencia de encapsulación calculada para la primera réplica. R₂. Eficiencia de encapsulación calculada para la segunda réplica

La significancia estadística de los efectos determina que la eficiencia de encapsulación está afectada por el pH como efecto de primer orden y la interacción de la concentración de zeína (CZ) y la temperatura (T), como efectos de segundo orden (Tabla 4).

Tabla 4. Significancia estadística de los efectos en la eficiencia de encapsulación

Efectos generados por los factores de estudio	Identificación	Significancia estadística de los efectos
-2,37	Cz	no significativo
2,32	T	no significativo
-3,62	Cz, T	significativo
2,43	pH	significativo
-3,05	Cz, pH	no significativo
-1,15	pH, T	no significativo
4,54	Cz, T, pH	no significativo

A partir del análisis de los experimentos, se para la eficiencia de encapsulación obteniéndose los determinó una eficiencia de encapsulación promedio de parámetros dados en la Tabla 5.

83,09%. Mediante el software de análisis estadístico Statgraphics Centurión XVI, se maximizó la respuesta

Tabla 5. Optimización de la respuesta para la eficiencia de encapsulación

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Cz (%)	0,3	2,0	2,0
T (°C)	20,0	30,0	20,0
pH	4,0	8,0	8,0

Valor óptimo $E_E = 88,94\%$

El pH, genera un efecto positivo en la eficiencia de encapsulación haciendo que ésta se incremente en 2,43 unidades cuando se sintetizan nanopartículas en pH 8. En este valor de pH, la estabilidad de las nanopartículas medida a través del potencial Z es mayor.

La ionización negativa de la proteína mejoraría las interacciones electrostáticas entre las moléculas de carotenoides y el encapsulante. Si se analiza la conformación estructural de las nanopartículas, éstas dejarían en la parte interna los grupos apolares de la proteína, con lo que se formarían nanopartículas capaces de encapsular mayor cantidad de colorante apolar.

En la Fig. 4, se muestra una posible estructura de las nanopartículas sugerida por Ashok Patel, (2010).

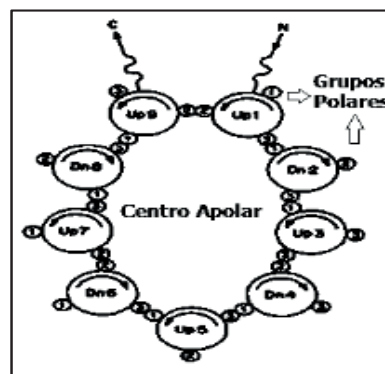


Figura 4. Conformación de la estructura con centro apolar de la pared de las nanopartículas de zeína (Ashok Patel, 2010).

La eficiencia de encapsulación depende principalmente de la interacción entre proteína, sustrato y disolvente orgánico. En estudios realizados mediante electrospraying se comprobó que si las interacciones electrostáticas son desfavorables la incorporación de tensoactivos puede mejorar la estabilidad del sistema (Xu & Hanna, 2006).

El decremento estadísticamente significativo generado por la interacción de (CZT) hace que la eficiencia de encapsulación disminuya en 3,62 unidades porcentuales cuando las nanopartículas fueron sintetizadas a 30°C. Estos resultados podrían deberse a que al aumentar la temperatura, la velocidad de volatilización de la fase apolar que incluye los carotenoides en el sistema se incrementa.

CONCLUSIONES

Se encapsularon carotenoides en nanopartículas de zeína utilizando el método de coacervación. Se encapsuló 16,90 g de β -caroteno por cada 100 g de zeína. Mediante la utilización del software estadístico.

Se definió que la encapsulación favorece la solubilidad de los carotenoides en solventes polares, manteniendo sus propiedades de color.

Los carotenoides encapsulados en matrices de nanopartículas de zeína posibilitan la formulación de saturando la fase polar en la que las nanopartículas con colorante son parcialmente solubles, lo cual tiene como consecuencia la disminución de los puntos apolares disponibles para encapsulación.

La eficiencia de encapsulación de colorantes carotenoides en nanopartículas de zeína comparada con otras matrices poliméricas como ciclodextrinas, es superior en un 72%. El estudio de Sente et al.,

(1998) determinó que en la encapsulación para formar complejos de β -caroteno:ciclodextrina el contenido de colorante carotenoide no superaba el 11% usando β -ciclodextrina como encapsulante.

Statgraphics Centurión XVI, se estableció que con los valores óptimos de los factores de estudio definidos en la Tabla 5, se podría maximizar el encapsulamiento hasta 18,09 g de β -caroteno por cada 100 g de zeína. cosméticos y alimentos con características funcionales debido a las propiedades de los carotenoides, además de proporcionar un suplemento nutricional por la proteína utilizada.

REFERENCIAS

Aqua Hoy, Portal de información de acuicultura, (2017). [Online] Disponible en: <https://www.aquahoy.com/156-uncategorised/14796-mercado-mundial-de-carotenoides-alcanzara-us13-billones-para-el-2017>.

Ashok Patel, E.B., (2010). Sodium Caseinate Stabilized Zein Colloidal Particles. *Journal of agriculture and food chemistry*, pp.12497-503.

Association of Oficial Analytical Chemists, Inc., (1984). *Official Methods of Analysis*. Arlington, USA.

Beatus, Y., Razi, A., Rosenberg, M. & Kopelman, I., (1985). Spray-drying microencapsulation of paprika oleoresin. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, p. 28.34.

Favaro, C., Santana, A., Monterrey, E. & Trindade, M., (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, pp.336-40.

Fernández, J. (2009). Food hydrocolloids. *Food hydrocolloids*, pp.1 427-32.

International Trade Center, (2016). Trade map estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresas. [Online] Disponible en: http://www.trademap.org/Country_SelProductCountry_TS.

Martínez-Girón, J. & Ordóñez-Santos, E. (2015). Efecto del procesamiento térmico sobre el color superficial del pimentón rojo (*Capsicum annum*), Variedad "Natal Y". *Biología en el sector agropecuario y agroindustrial*, pp. 104-13.

Meléndez-Marínez, A., Vicario, I. & Heredia, F. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), pp. 1155-1158.

Meyers, S.P., (2000). Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas. In *Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. México.

Palma Astudillo, M. (2013). Extracción de capsantina a partir de hojuelas de pimentón (*Capsicum annum* L.) y estabilización por microencapsulación. *Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*, pp. 1-78.

Raula, J. & Eerikainen, H. (2004). Influence of the solvent composition on the aerosol synthesis of pharmaceutical polymer nanoparticles. *International journal Pharmaceutics*, pp. 13-21.

Robert, P., Carlsson, R., Romero, N. & Masson, L. (2003). Stability of spray-drying encapsulated carotenoid pigments from Rosa Mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oleoresin in *Journal of the American Oil Chemists Society*, pp. 1115-20.

Rodríguez, M.E. (2004). Micro encapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, pp. 351-59.

Rosenberg, M. & Lee, S. (2004). Water-insoluble, whey protein-based microspheres prepared by an all aqueous process. *Journal of Food Science*, pp. 50-58.

Shukla, R. & Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Ind. Crops Prod.*, pp. 171- 92.

Singh, R. & Lillard, J. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, pp. 215-23.

Szente Lajos, K. (1998). Stabilization and Solubilization of Lipophilic Natural Colorants with Cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry Netherlands*.

Vega, R. (2016). *Curso de diseño experimental y análisis estadístico*. Quito: Escuela Politécnica Nacional.

Wang, I. (2008). *Food biophysics*. *Food biophysics*, 3, pp. 174-81.

Xu, Y.X. & Hanna, M.A. (2006). Electrospray encapsulation of water-soluble protein with polylactide e effects of formulations on morphology, encapsulation efficiency and release profile of particles. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 30-36.

Zhong, H. (2009). *J Food process pres*, pp. 255-70.