

## **Universidad Tecnológica de la Mixteca**

División de Estudios de Posgrado  
Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

Microencapsulados de licopeno y compuestos fenólicos a partir de extractos de  
jitomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme)

### **Tesis**

Para obtener el grado de:  
Maestra en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

### **Presenta:**

I.Q. Yarely Espinoza Ramírez

### **Director de tesis:**

Dr. Raúl Salas Coronado

### **Co-directora de tesis:**

Dra. Norma Francenia Santos Sánchez

Huajuapán de León, Oaxaca, México. 17 de marzo de 2023

Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Bromatología y de Principios Bioactivos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), bajo la dirección del Dr. Raúl Salas Coronado y la codirección de la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez. Durante los dos años que estuve en el programa de maestría recibí una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) con número de becario: 1081076.

Parte de este trabajo se presentó en el congreso virtual CUCCAL XV, en la modalidad de cartel electrónico, organizado por la Sociedad Mexicana de Inocuidad y Calidad para Consumidores de Alimentos (SOMEICCA), los días 28 y 29 de octubre de 2022.

## **Dedicatoria**

A Dios por permitirme tener y disfrutar de mi familia.

A mis padres Gonzalo y Leonila, por ser los pilares más importantes en mi vida, con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento he podido llegar hasta este punto de mi vida profesional.

A mis hermanos Juventino, Eric y Yael por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional en todo momento.

A mi tía Lulú y su familia, por ser mi tía favorita y siempre estar dispuesta a escucharme, a ayudarme y apoyarme en cualquier momento.

A mi abuelito Juventino, por siempre cuidarme y querer lo mejor para mí, por poseer un enorme corazón y una gran fortaleza, lo quiero mucho.

A mi abuelita Leovigilda, que desde el cielo me bendice para que logre mis objetivos.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a mi director el Dr. Raúl Salas Coronado y a mi co-directora la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez por su paciencia, sus consejos y el apoyo recibido durante la parte experimental y redacción de la tesis. También por compartir conmigo sus conocimientos, su motivación y por el tiempo invertido en este trabajo.

A la auxiliar de investigación I.A. Angélica López Luis por el apoyo brindado en el uso y cuidado de los equipos y materiales de laboratorio, así como por las recomendaciones y conocimientos transmitidos durante la parte experimental.

A todas mis sinodales la Dra. Edith Graciela González Mondragón, la Dra. Beatriz Hernández Carlos, la Dra. Mirna Patricia Santiago y la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, por el tiempo dedicado a la revisión del documento de tesis, por sus observaciones y sugerencias realizadas.

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca por ser parte de mi formación académica.

A las secretarias Sarita, Celes, Carmen y Blanca por el apoyo brindado en los trámites administrativos que suelen requerirse en la institución.

A mis compañeros del grupo de trabajo, a Jerzain Martínez, Juan Carlos Barragán, Germán de Jesús González, Rafael Matadamas, Karla Islas, Isis López y al Dr. Héctor Arreaga por todos los gratos momentos que compartimos juntos. En especial a Juan Carlos, por poder contar con él en todo momento, por compartir sus conocimientos en el laboratorio, por su paciencia y por el tiempo de calidad que pasamos juntos durante la parte experimental y de redacción del trabajo.

A Concepción y la M.C. Yesica por siempre brindarme su apoyo incondicional y por los buenos momentos que compartimos durante el primer año de la maestría.

A mis compañeros de generación Concepción, Juan Carlos, Isabel y Rubí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (conacyt) por la beca de manutención otorgada.

## Resumen

El objetivo del presente trabajo consistió en obtener microcápsulas de licopeno y compuestos fenólicos provenientes de jitomate cherry (*S. lycopersicum* var. cerasiforme) empleando como material de pared las proteínas de soya y chícharo; así como, los polisacáridos pectina y goma arábica. Se estudiaron cuatro tratamientos variando el material de pared. A los extractos de jitomate se les cuantificó el contenido de fenoles totales y licopeno por espectrofotometría. Así como, los compuestos fenólicos mayoritarios por HPLC. Las emulsiones dobles y las microcápsulas formadas se analizaron por microscopía óptica. El procesamiento y extracción de los datos desde las micrografías se llevó a cabo con el software ImageJ. El análisis estadístico de las partículas se realizó mediante un ANOVA robusto. Este análisis permitió evaluar las diferencias entre los tratamientos en las emulsiones dobles y los microencapsulados durante 12 días de almacenamiento. También se realizaron dos pruebas de fragmentación de los microencapsulados empleando metanol/NaCl acuoso al 10 % (*m/v*) (1:1) o acetona asistida por ultrasonido. Los resultados mostraron un contenido de compuestos fenólicos y licopeno de  $117.98 \pm 5.54$  mg EAG/100 g masa seca y  $54.47 \pm 3.78$  mg/100 g masa seca de jitomate cherry, respectivamente. Los compuestos fenólicos predominantes en el extracto fueron el ácido clorogénico ( $18.55 \pm 0.49$  mg/100 g masa seca) y el ácido gálico ( $3.64 \pm 0.50$  mg/100 g masa seca). El tratamiento de proteína de chícharo y pectina condujo a las microcápsulas de mayor tamaño,  $6.62 \pm 3.28$   $\mu\text{m}$  (mediana =  $5.98$   $\mu\text{m}$ ), respecto a los otros tres tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ). Las emulsiones dobles y los microencapsulados de los cuatro tratamientos fueron estables después de un almacenamiento durante 12 días a temperatura de refrigeración. Las microcápsulas aglomeradas de todos los tratamientos fueron estables a las pruebas de fragmentación. Consecuentemente, no fue posible estudiar la eficiencia de microencapsulación.

**Palabras clave:** licopeno, compuestos fenólicos, microencapsulación, coacervación compleja, reticulación enzimática, estabilidad.

# Índice de contenido

<b>Resumen.....</b>	<b>VI</b>
<b>Índice de contenido.....</b>	<b>VII</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>X</b>
<b>Índice de tablas.....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>XII</b>
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>- 13 -</b>
1.1. Originalidad .....	- 14 -
1.2. Hipótesis.....	- 14 -
1.3. Objetivos .....	- 15 -
1.3.1. Objetivo general .....	- 15 -
1.3.2. Objetivos particulares.....	- 15 -
1.4. Importancia del estudio.....	- 15 -
1.5. Limitaciones del estudio .....	- 16 -
<b>Capítulo 2. Marco teórico.....</b>	<b>- 17 -</b>
2.1. Generalidades del jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....	- 17 -
2.1.1. Producción.....	- 19 -
2.1.2. Jitomate cherry .....	- 19 -
2.1.3. Composición.....	- 21 -
2.2. Encapsulación .....	- 26 -
2.2.1. Métodos de encapsulación.....	- 27 -
2.2.2. Agentes encapsulantes.....	- 30 -
2.2.3. Clasificación de las cápsulas .....	- 36 -
2.3. Emulsiones.....	- 38 -
2.3.1. Tensoactivos.....	- 39 -
2.3.2. Estabilidad de las emulsiones .....	- 41 -
2.4. Caracterización de las microcápsulas.....	- 42 -
2.4.1. Contenido de fenoles totales.....	- 42 -
2.4.2. Microscopía óptica .....	- 42 -
2.4.3. Espectroscopía UV/visible .....	- 43 -
2.5. Cuantificación de la eficiencia de la encapsulación.....	- 44 -
2.6. Cuantificación de proteína por Biuret .....	- 45 -

<b>Capítulo 3. Metodología.....</b>	<b>- 47 -</b>
3.1. Materiales, reactivos y equipos .....	- 47 -
3.1.1. Materiales, reactivos y disolventes.....	- 47 -
3.1.2. Equipos.....	- 48 -
3.2. Caracterización física de la muestra de jitomate cherry.....	- 49 -
3.3. Caracterización fisicoquímica de la muestra de jitomate cherry.....	- 50 -
3.4. Obtención del extracto de jitomate cherry .....	- 51 -
3.5. Determinación de licopeno y fenoles en el extracto de jitomate cherry .....	- 52 -
3.5.1. Cuantificación de licopeno .....	- 52 -
3.5.2. Cuantificación de los compuestos fenólicos totales .....	- 52 -
3.5.3. Cuantificación de los compuestos fenólicos mayoritarios por HPLC.....	- 53 -
3.6. Cuantificación de proteína soluble por el método modificado de Biuret.....	- 55 -
3.7. Obtención de las microcápsulas .....	- 57 -
3.8. Pruebas de ruptura de las microcápsulas.....	- 58 -
3.9. Análisis de la morfología y distribución de tamaño de partículas .....	- 58 -
3.10. Análisis estadístico.....	- 59 -
3.10.1. Procedimiento para el análisis de los datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación por espectrofotometría y HPLC.....	- 59 -
3.10.2. Procedimiento para el análisis de los datos de tamaño de las microcápsulas.....	- 60 -
<b>Capítulo 4. Resultados y discusión.....</b>	<b>- 61 -</b>
4.1. Caracterización de la materia prima.....	- 61 -
4.1.1. Caracterización fisicoquímica del jitomate cherry Rubino Top.....	- 61 -
4.1.2. Contenido de licopeno.....	- 63 -
4.1.3. Contenido de compuestos fenólicos .....	- 64 -
4.1.4. Cuantificación de compuestos fenólicos mayoritarios en el extracto de jitomate cherry..	- 65 -
4.1.5. Cuantificación de proteína total en los aislados de proteína de chícharo y soya.....	- 66 -
4.2. Caracterización de las microcápsulas.....	- 67 -
4.2.1. Tamaño de las emulsiones y las microcápsulas.....	- 67 -
4.3. Pruebas de fragmentación .....	- 75 -
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>	<b>- 77 -</b>
<b>Capítulo 6. Perspectivas.....</b>	<b>- 79 -</b>
<b>Capítulo 7. Referencias .....</b>	<b>- 81 -</b>
<b>Capítulo 8. Apéndices.....</b>	<b>- 89 -</b>
<b>Apéndice A.</b> Gráfico para la obtención del punto final de la valoración .....	- 89 -

<b>Apéndice B.</b> Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido gálico por HPLC .....	- 90 -
<b>Apéndice C.</b> Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido clorogénico por HPLC .....	- 95 -
<b>Apéndice D.</b> Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido 4-hidroxibenzoico por HPLC .....	- 100 -
<b>Apéndice E.</b> Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido cafeico por HPLC.....	- 105 -
<b>Apéndice F.</b> Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido <i>p</i> -cumárico por HPLC .....	- 110 -
<b>Apéndice G.</b> Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido ferúlico por HPLC.....	- 115 -
<b>Apéndice H.</b> Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de proteína por el método de Biuret.....	- 120 -
<b>Apéndice I.</b> Procesamiento de la imagen.....	- 130 -
<b>Apéndice J.</b> Histogramas del tamaño para las emulsiones dobles .....	- 133 -
<b>Apéndice K.</b> Histogramas del tamaño para las microcápsulas .....	- 135 -
<b>Apéndice L.</b> ANOVA robusto con el estimador-M de Huber de las emulsiones dobles y microcápsulas - 137 -	
<b>Apéndice M.</b> Micrografías de los tratamientos a lo largo del tiempo. ....	- 137 -

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Partes del fruto de jitomate.....	- 18 -
<b>Figura 2.</b> Diferentes tipos de jitomate.....	- 18 -
<b>Figura 3.</b> Estados productores de jitomate cherry en México durante 2020.....	- 19 -
<b>Figura 4.</b> Contenido de licopeno durante la maduración del jitomate cherry.....	- 23 -
<b>Figura 5.</b> Dos formas principales de encapsulación.....	- 26 -
<b>Figura 6.</b> Diagrama esquemático de un proceso de encapsulación complejo por coacervación.....	- 28 -
<b>Figura 7.</b> Reacciones catalizadas por TGasa.....	- 29 -
<b>Figura 8.</b> Propiedades funcionales de la proteína de soya y chícharo.....	- 32 -
<b>Figura 9.</b> Emulsión <i>w/o/w</i> .....	- 38 -
<b>Figura 10.</b> Proceso de preparación en dos pasos de una emulsión doble.....	- 39 -
<b>Figura 11.</b> Clasificación de los tensoactivos (a) Según la carga iónica en su grupo polar (b) De acuerdo a su estructura.....	- 40 -
<b>Figura 12.</b> Reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	- 42 -
<b>Figura 13.</b> Diagrama básico de espectroscopía de UV-Visible.....	- 44 -
<b>Figura 14.</b> Quelato violeta formado a partir de la reacción de cuatro moléculas del reactivo de Biuret con una disolución alcalina de $\text{CuSO}_4$ .....	- 45 -
<b>Figura 15.</b> Esquema general de la metodología que se utilizó en este proyecto.....	- 47 -
<b>Figura 16.</b> Coordenadas $L^*a^*b^*$ del jitomate cherry Rubino Top.....	- 62 -
<b>Figura 17.</b> Microcápsulas suspendidas en medio acuoso.....	- 67 -
<b>Figura 18.</b> Gráficos generados a partir del estimador modificado de Huber para las dobles emulsiones-	71 -
-	
<b>Figura 19.</b> Gráficos generados a partir del estimador modificado de Huber para las microcápsulas ..	- 72 -
<b>Figura 20.</b> Micrografías del tratamiento Chícharo-Pectina (a) emulsiones dobles (b) microcápsulas con un aumento 100x.....	- 74 -
<b>Figura 21.</b> Micrografías de las microcápsulas obtenidas del tratamiento Chícharo-Pectina después de la fragmentación (a) Metanol: NaCl acuoso al 10 % 1:1 ( <i>m/v</i> ), (b) Acetona con un aumento 40x. -	75 -

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Variedades de jitomate cherry.....	- 20 -
<b>Tabla 2.</b> Características fisicoquímicas del jitomate Sweet cherry de acuerdo a sus diferentes etapas de madurez .....	- 21 -
<b>Tabla 3.</b> Composición proximal en fruta fresca de jitomate cherry (g/100 g masa húmeda.....	- 22 -
<b>Tabla 4.</b> Contenido de carotenoides en cinco variedades de jitomate cherry (mg/100 g masa seca)....	- 24 -
<b>Tabla 5.</b> Compuestos fenólicos en cinco variedades de jitomate cherry (mg/100 g masa seca).....	- 24 -
<b>Tabla 6.</b> Composición fraccional de proteínas extraídas de semillas de soya y chícharo .....	- 31 -
<b>Tabla 7.</b> Composición y algunas propiedades de la goma de <i>Acacia senegal</i> y <i>A. seyal</i> .....	- 34 -
<b>Tabla 8.</b> Materiales de encapsulación de licopeno en diferentes estudios .....	- 35 -
<b>Tabla 9.</b> Materiales de encapsulación de compuestos fenólicos en diferentes estudios.....	- 36 -
<b>Tabla 10.</b> Mecanismos de inestabilidad más comunes que ocurren en las emulsiones.....	- 41 -
<b>Tabla 11.</b> Caracterización física del jitomate cherry Rubino Top.....	- 61 -
<b>Tabla 12.</b> Caracterización fisicoquímica del jitomate cherry Rubino Top.....	- 62 -
<b>Tabla 13.</b> Contenido de Licopeno en jitomate cherry .....	- 64 -
<b>Tabla 14.</b> Contenido de fenoles totales en jitomate cherry .....	- 64 -
<b>Tabla 15.</b> Perfil de compuestos fenólicos presentes en jitomates cherry (mg/100 g masa seca) .....	- 65 -
<b>Tabla 16.</b> Comparación del % de proteína obtenida por el método de Biuret y la indicada por el proveedor .....	- 66 -
<b>Tabla 17.</b> Resultados obtenidos para las emulsiones dobles.....	- 68 -
<b>Tabla 18.</b> Resultados obtenidos para las microcápsulas .....	- 69 -

## Lista de abreviaturas

APC	Aislado de proteína de chícharo
APS	Aislado de proteína de soya
$d_p/d_e$	Diámetro polar/diámetro ecuatorial
TCC	Compuestos Carotenoides Totales, por sus siglas en inglés <i>Total Carotenoid Compounds</i>
TPC	Compuestos Fenólicos Totales, por sus siglas en inglés <i>Total Phenolic Compounds</i>
TGasa	Transglutaminasa
HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, por sus siglas en inglés <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>

# Capítulo 1. Introducción

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) y los productos a base de estos frutos son una excelente fuente de fitoquímicos, entre ellos se encuentran los tetraterpenos como el licopeno y los compuestos fenólicos. Estos compuestos bioactivos tienen relevancia en la actualidad debido a sus efectos benéficos relacionados con la prevención y tratamiento contra enfermedades crónicas degenerativas, como el cáncer y la diabetes, los cuales son atribuidos principalmente a los compuestos fenólicos y licopeno (Domínguez et al., 2020). Sin embargo, estos compuestos son sensibles a factores ambientales que tienden a degradarlos durante su almacenamiento (Rivas et al., 2020). Por lo cual, se han desarrollado técnicas como la encapsulación que permite estabilizarlos mediante el empleo de agentes encapsulantes, como las proteínas y/o polisacáridos, que logran una protección y liberación controlada del material central en condiciones específicas. Además, permite el enmascaramiento de olores y sabores desagradables, dilución y dispersión uniforme del ingrediente activo, así como una manipulación fácil (Can Karaca et al., 2015).

La selección del método de encapsulación influye en la retención de compuestos bioactivos antes del consumo y en su bioaccesibilidad. La coacervación compleja es un método de procesamiento que ofrece ventajas con respecto a otros métodos, tales como condiciones de preparación suaves (no se requieren disolventes orgánicos ni temperaturas drásticas), integridad alta de los agentes encapsulantes, eficiencia de encapsulación alta y excelentes características de liberación controlada (Yan & Zhang, 2014). Consiste básicamente en la utilización de dos polímeros cargados de manera opuesta, que al mezclarse en disolución forman un recubrimiento alrededor del compuesto de interés utilizando cambios de pH, temperatura o adición de componentes electrolíticos (Dias et al., 2017).

Por lo anterior, el objetivo del estudio consistió en obtener microcápsulas ricas en licopeno y compuestos fenólicos a partir de extractos de jitomate cherry (*S. lycopersicum*) mediante una coacervación compleja con emulsión doble y empleando la enzima transglutaminasa (TGasa) como agente reticulante. Para ello, se elaboraron cuatro tratamientos diferentes, cuyas variables a considerar fueron los agentes encapsulantes utilizados, es decir, dos proteínas (chícharo y soya) y dos polisacáridos (goma arábiga y pectina de alto grado de esterificación).

La cuantificación de licopeno y fenoles totales presentes en el extracto, se realizó mediante métodos espectrofotométricos. Mientras que, para la determinación de los compuestos fenólicos mayoritarios se empleó HPLC-UV. Por otra parte, la determinación de proteína en los aislados utilizados en el proceso de microencapsulación se realizó por medio de un método modificado de Biuret. Mientras tanto, la morfología de las microcápsulas obtenidas se evaluó utilizando microscopía óptica. Por último, se realizaron pruebas de fragmentación a los microencapsulados para determinar la factibilidad de determinar la eficiencia y rendimiento del proceso de microencapsulación.

## **1.1. Originalidad**

En la literatura existen reportes relacionados con la obtención de microcápsulas tanto para el licopeno como para compuestos fenólicos empleando el método de coacervación compleja. Sin embargo, hasta el momento sólo se ha encontrado un número limitado de reportes de encapsulación de mezclas de carotenoides y compuestos fenólicos extraídos a partir de una misma fuente, es decir, compuestos de polaridades diferentes. Y en la actualidad no existen reportes relacionados con la microencapsulación del licopeno y compuestos fenólicos obtenidos a partir de extractos de *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme empleando una emulsión doble seguida de una coacervación compleja y usando como agentes encapsulantes las proteínas de chícharo o de soya con polisacáridos como la goma arábiga o pectina de alto grado de esterificación en presencia de la enzima TGasa. Por lo que, el presente estudio permitió conocer el efecto de la interacción de estos agentes sobre la estabilidad de microcápsulas de extractos ricos en licopeno y compuestos fenólicos suspendidos en aceite de aguacate comercial.

## **1.2. Hipótesis**

La combinación de una proteína (de chícharo o soya) con un polisacárido (goma arábiga o pectina) como material de pared, influirá significativamente en las características morfológicas y la eficiencia de microencapsulación, a partir de una coacervación compleja, de extractos de jitomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) ricos en licopeno y compuestos fenólicos a un  $\alpha = 0.05$ .

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo general**

Determinar el efecto que tienen las distintas combinaciones de una proteína (chicharo o soya) con un polisacárido (goma arábiga o pectina) para obtener microcápsulas de extractos de jitomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) ricos en licopeno y compuestos fenólicos, mediante un método de coacervación compleja empleando como agente de reticulación a la enzima TGasa.

### **1.3.2. Objetivos particulares**

1. Obtener y caracterizar un extracto de jitomate rico en licopeno y compuestos fenólicos para producir microencapsulados.
2. Establecer condiciones para la producción de emulsiones dobles y microencapsulados de extractos del jitomate cherry ricos en licopeno y compuestos fenólicos.
3. Determinar el efecto del material de pared sobre la distribución de tamaño de las dobles emulsiones y las microcápsulas.
4. Evaluar el efecto del material de pared sobre la eficiencia de microencapsulación de licopeno y compuestos fenólicos totales y mayoritarios.

## **1.4. Importancia del estudio**

El jitomate cherry contiene compuestos antioxidantes, principalmente licopeno y compuestos fenólicos tales como los ácidos clorogénico, *p*-cumárico y gálico. Estos compuestos interrumpen reacciones iniciadas por radicales libres por lo que se utilizan para la prevención y tratamiento auxiliar de enfermedades crónicas degenerativas como la aterosclerosis, la diabetes, el cáncer y la osteoporosis. Sin embargo, estos compuestos bioactivos son susceptibles a factores ambientales como la temperatura, la luz, el oxígeno y la humedad afectando su estabilidad durante el almacenamiento. Por esta razón, se han desarrollado métodos que permitan incrementar su estabilidad como la microencapsulación por coacervación compleja ya que el proceso de obtención se lleva a cabo en condiciones de temperaturas bajas, a pH controlado y con agentes encapsulantes de costo bajo. Además, a las microcápsulas formadas les confiere una biaccesibilidad alta durante el proceso de digestión in vitro.

## **1.5. Limitaciones del estudio**

La obtención de microcápsulas ricas en licopeno y compuestos fenólicos se llevó a cabo a partir de extractos provenientes de jitomates cherry. Éstos fueron obtenidos de un invernadero ubicado en la comunidad San Baltazar Chichicapam perteneciente al Municipio de Ocotlán, Oaxaca en un único estado de madurez. Para la producción de las microcápsulas se utilizó aceite de aguacate comercial y se fijaron las mismas condiciones de concentración para las dos fuentes de proteínas (chícharo y soya) y los dos polisacáridos (goma arábica y pectina) empleados. La concentración de la proteína en los aislados utilizados en el proceso de microencapsulación se determinó por el método modificado de Biuret. Mientras que, la cuantificación del licopeno presente en el extracto y las microcápsulas se llevó a cabo por espectrofotometría, los fenoles totales por medio del método del reactivo de Folin-Ciocalteu y los compuestos fenólicos mayoritarios mediante HPLC-UV.

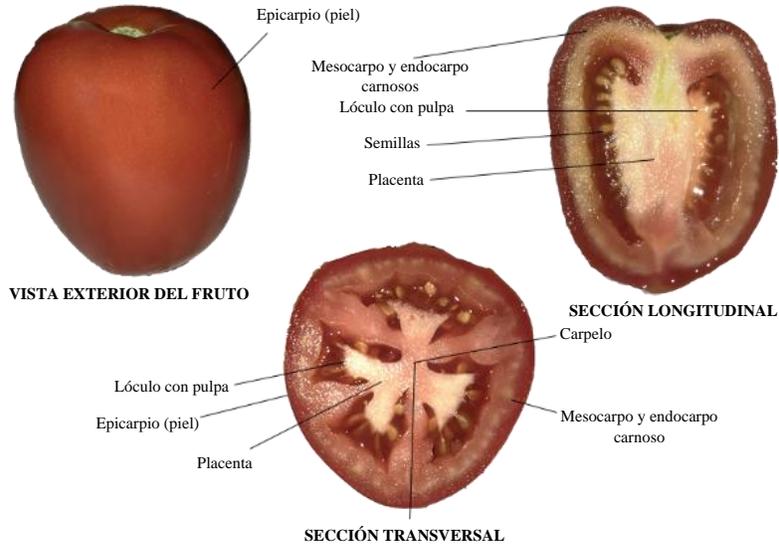
## Capítulo 2. Marco teórico

En la presente sección se describe la importancia, composición y aplicaciones que tiene el jitomate. Posteriormente, se menciona al licopeno y los compuestos fenólicos presentes en el fruto. Después, se describe el proceso de encapsulación, los tipos de encapsulación y la clasificación de las cápsulas de acuerdo a su forma y constitución. También se describen los tipos de emulsiones, sus mecanismos de inestabilidad y a los agentes tensoactivos que ayudan a su estabilización. Por último, se abordan los métodos para la caracterización química y física, así como la determinación de la eficiencia en las microcápsulas.

### 2.1. Generalidades del jitomate (*Solanum lycopersicum*)

El centro de origen del jitomate parece ser las regiones montañosas de los Andes. Sin embargo, su nombre es de origen mexicano y fue aquí donde se domesticó y cultivó por primera vez (Acquaah, 2012). Para el caso de los estados del centro y sur de México se conoce como jitomate, proveniente de la palabra náhuatl xictomatl que significa “ombbligo de fruta de agua”. Mientras que, en las entidades del norte es conocido como tomate rojo, proveniente de la palabra náhuatl tomatl que significa “fruto de agua” agregándole además que es de color rojo (SIAP, 2017).

El jitomate es una baya que presenta dos o varios carpelos con semillas que nacen en los tallos placentarios dentro de los lóculos y rodeadas por el gel locular, todo contenido dentro de un pericarpio carnoso (Figura 1) (Yahia & Brecht, 2012).



**Figura 1.** Partes del fruto de jitomate<sup>1</sup>.

Este fruto se puede clasificar de acuerdo a su comercialización en jitomates para procesamiento y para mercado fresco. De acuerdo a su forma, color y tamaño se clasifica en jitomate de bola, ciruela, ternera, reliquia y pequeños (cherry y uva) (Figura 2) (Acquaah, 2012).



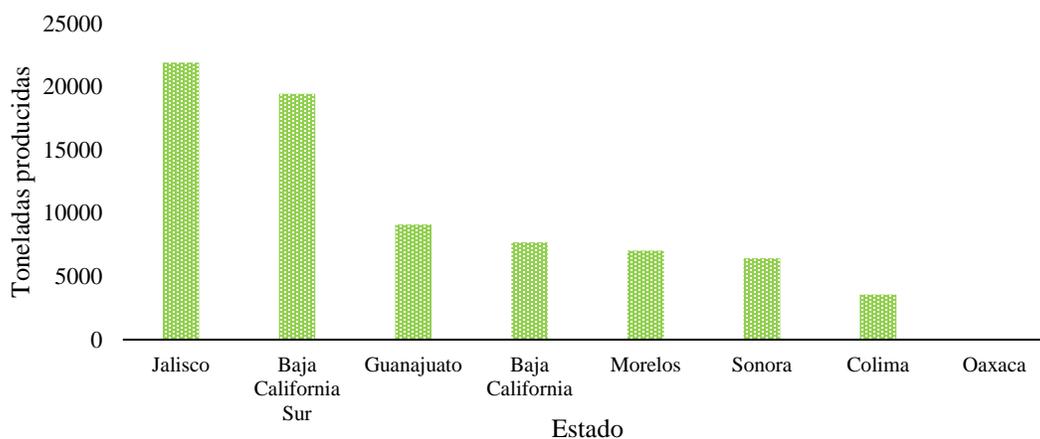
**Figura 2.** Diferentes tipos de jitomate<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> <https://www.facebook.com/infoagronomo/posts/partes-del-fruto-detomatewwwinfoagronomonet/1090690607729727/> Consultado el 20/enero/2021.

<sup>2</sup> <https://www.efectofruta.com>, <https://www.istockphoto.com>, <https://www.casapanchojardines.com> y <https://specialtyproduce.com>. Consultados el 20/febrero/2022.

### 2.1.1. Producción

En el año 2020, en México, la producción total de jitomates cherry fue de 75,179.29 Ton. De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), el 54.98 % de la producción total se concentró en los estados de Jalisco y Baja California Sur. Por otra parte, en Oaxaca se produjo el 0.04 % de la producción total específicamente en la región del Istmo (Figura 3).



**Figura 3.** Estados productores de jitomate cherry en México durante 2020<sup>3</sup>.

### 2.1.2. Jitomate cherry

Se especula que los jitomates tipo cherry son los ancestros más probables de los que se derivaron los cultivares de frutos más grandes. Debido a que con el transcurrir del tiempo, este jitomate se fue mejorando en tamaño a partir de la cruce y selección de las variedades de mayor tamaño. Su punto de partida es Sudamérica y se fue diseminando por fuga de cultivo a otras regiones del mundo, como Centro América, África, Borneo y Hawai (Argerich & Gaviola, 1995). El jitomate cherry se diferencia del jitomate común por su tamaño pequeño (1.5-3.5 cm de diámetro), su sabor agradable y conservación post-cosecha (Hobson & Bedford, 1989). Su aspecto atractivo lo hace idóneo para decorar platos (ensaladas o cocteles). Existen variedades diferentes de jitomate cherry y algunas de estas se muestran en la Tabla 1.

<sup>3</sup> <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Consultado el 16/junio/2020.

**Tabla 1.** Variedades de jitomate cherry

Nombre de variedad	Tipos de semilla	Descripción	Tipo de crecimiento	Referencia
Babytom 	Híbrido	Frutos rojizos redondos de 12-14 g, en racimos de 18-20 unidades	Indeterminado	(Escaff G. et al., 2005)
Black cherry 	Híbrido	Frutos morados redondos de 15-20 g, con un sabor dulce.	Indeterminado	(Bonnewitz, 2007)
Cupid 	Híbrido	Frutos rojizos tipo pera, con gran número de frutos/racimo y con un contenido alto de azúcar	Indeterminado	(Escaff G. et al., 2005)
Green grape 	Heirloom	Frutos verdes pálido, translúcidos en el interior en racimos de 6-12 unidades similares a uvas.	Semi-indeterminado	(Bonnewitz, 2007)
Snow white 	Híbrido	Frutos amarillo pálido. Con un sabor dulce sin ser azucarados.	Indeterminado	(Bonnewitz, 2007)
Sun sugar FT hybrid 	Híbrido	Frutos color naranja de sabor muy dulce. Nacen en racimos largos. Posee resistencia al agrietamiento.	Indeterminado	(Bonnewitz, 2007)
Sweet 100 	Híbrido	Frutos redondos de 12-14 g que se presentan en racimos con 18-20 unidades.	Indeterminado	(Escaff G. et al., 2005).
Sweet baby Girl 	Híbrido	Frutos que presentan un sabor dulce y crecen en racimos largos.	Indeterminado	(Bonnewitz, 2007)
Sweet gold FT hybrid 	Híbrido	Frutos de color amarillo dorado brillante de 14 g, más dulces que las variedades cherry rojas.	Indeterminado	(Bonnewitz, 2007)

Indeterminado (Altura de alrededor de 1.5 m, a menudo más); Semi-indeterminado (Altura de hasta 1.2 m).

### 2.1.3. Composición

*Composición fisicoquímica.* La composición de los jitomates se ve afectada por las etapas de madurez, por el genotipo y por el método de cultivo. En un estudio realizado por Opara et al. (2012) evaluaron los efectos de la etapa de maduración de la fruta sobre las propiedades fisicoquímicas de tres variedades de jitomate cultivados en invernadero, uno de estos cultivos fue el jitomate Sweet cherry. Para el estudio seleccionaron una muestra de 40 frutos para cada una de las cinco etapas de madurez. La masa de cada fruto (g) se midió individualmente. El color de la piel se midió en lados opuestos y se expresó en el sistema CIE  $L^*a^*b^*$ , reportando la luminosidad ( $L^*$ ), rojez ( $a^*$ ) y amarillez ( $b^*$ ). Los sólidos solubles totales se midieron a 20 °C y se expresaron en °Brix, también reportaron el pH.

Los resultados obtenidos a partir de ese estudio se presentan en la Tabla 2, los cuales mostraron que el tamaño y el pH del jitomate cherry no varían significativamente ( $p > 0.05$ ) durante las diferentes etapas de maduración. Sin embargo, los sólidos solubles totales sí varían significativamente ( $p < 0.05$ ) aumenta de 6.0 a 8.7 °Brix. Con respecto a los parámetros de color, observaron que conforme se lleva a cabo el proceso de maduración, la luminosidad ( $L^*$ ) del jitomate disminuye de  $48.33 \pm 3.53$  a  $30.43 \pm 4.56$ . Mientras que, el parámetro  $a^*$  aumenta de  $-11.41 \pm 1.26$  (color verde) a  $17.22 \pm 2.93$  (color rojo). Por otro lado, el parámetro  $b^*$  tuvo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a lo largo de las diferentes etapas de maduración.

**Tabla 2.** Características fisicoquímicas del jitomate Sweet cherry de acuerdo a sus diferentes etapas de madurez

Características	Etapa de madurez					
	Verde	Quebrado	Rayado	Rosa	Rojo claro	Rojo
Masa (g)	$3.20 \pm 0.68^a$	$2.80 \pm 0.33^a$	$2.88 \pm 0.28^a$	$3.20 \pm 0.23^a$	$3.69 \pm 0.60^a$	$3.63 \pm 0.76^a$
TSS (°Brix)	$6.00 \pm 0.10^a$	$6.37 \pm 0.06^b$	$7.23 \pm 0.12^c$	$7.33 \pm 0.06^{dc}$	$7.97 \pm 0.06^e$	$8.77 \pm 0.12^f$
pH	$3.68 \pm 0.03^a$	$3.62 \pm 0.02^a$	$3.53 \pm 0.02^a$	$3.63 \pm 0.03^a$	$3.65 \pm 0.03^a$	$3.84 \pm 0.04^b$
$L^*$	$48.33 \pm 3.53^a$	$47.65 \pm 8.14^a$	$41.31 \pm 3.82^b$	$36.17 \pm 2.32^c$	$33.85 \pm 1.57^d$	$30.43 \pm 4.56^e$
$a^*$	$-11.41 \pm 1.26^a$	$-9.28 \pm 1.54^b$	$-0.59 \pm 3.83^c$	$9.73 \pm 3.83^d$	$13.74 \pm 2.69^e$	$17.22 \pm 2.93^f$
$b^*$	$17.87 \pm 1.64^a$	$19.66 \pm 2.93^b$	$20.00 \pm 2.59^{cb}$	$17.07 \pm 1.97^a$	$15.02 \pm 1.47^d$	$12.38 \pm 1.23^e$

Las medias de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar en la misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes estadísticamente con  $p < 0.05$ .

Fuente: Opara et al. (2012).

*Composición proximal.* Opara et al. (2012) también determinaron la composición proximal de jitomate cherry empleando métodos de la AOAC (2000). La humedad fue determinada en horno a 105 °C durante 24 h. Las cenizas mediante calcinación a 550 °C durante 24 h, a partir del residuo

obtenido en la determinación de la humedad. El contenido de proteínas mediante el método Kjeldahl. El contenido de grasa fue cuantificado por el método Soxhlet y la fibra cruda utilizando el Tecator-Fibertec System 1010.

Los resultados obtenidos en el estudio se presentan en la Tabla 3, los cuales mostraron que el contenido de cenizas y de proteína para el jitomate cherry no varía significativamente ( $p > 0.05$ ) durante el proceso de maduración. Mientras que la humedad y la fibra sí ( $p < 0.05$ ), disminuyendo de  $89.09 \pm 0.15$  a  $88.78 \pm 0.35$  y aumentado de  $1.42 \pm 0.02$  a  $1.53 \pm 0.02$ , respectivamente. Para al contenido de grasa, se encontró que las etapas quebrado y rayado presentaron un menor contenido de grasa que en las otras etapas de maduración.

**Tabla 3.** Composición proximal en fruta fresca de jitomate cherry (g/100 g masa húmeda)

Composición (%)	Etapa de madurez					
	Verde	Quebrado	Rayado	Rosa	Rojo claro	Rojo
Ceniza	$0.08 \pm 0.01^a$	$0.08 \pm 0.01^a$	$0.09 \pm 0.00^a$	$0.07 \pm 0.01^b$	$0.09 \pm 0.01^a$	$0.09 \pm 0.02^a$
Humedad	$89.09 \pm 0.15^a$	$89.21 \pm 0.27^a$	$88.94 \pm 0.25^{ac}$	$89.69 \pm 0.09^b$	$89.01 \pm 0.09^{ac}$	$88.78 \pm 0.35^c$
Proteína	$1.40 \pm 0.06^a$	$1.46 \pm 0.00^a$	$1.40 \pm 0.00^a$	$1.32 \pm 0.09^a$	$1.43 \pm 0.01^a$	$1.38 \pm 0.01^a$
Grasa	$2.81 \pm 0.14^a$	$1.53 \pm 1.29^b$	$1.28 \pm 0.94^{cb}$	$2.17 \pm 0.09^{ab}$	$2.89 \pm 0.71^a$	$2.29 \pm 0.09^{ab}$
Fibra	$1.42 \pm 0.02^a$	$1.30 \pm 0.04^b$	$1.55 \pm 0.04^c$	$1.36 \pm 0.02^d$	$1.55 \pm 0.01^{ce}$	$1.53 \pm 0.02^{cf}$

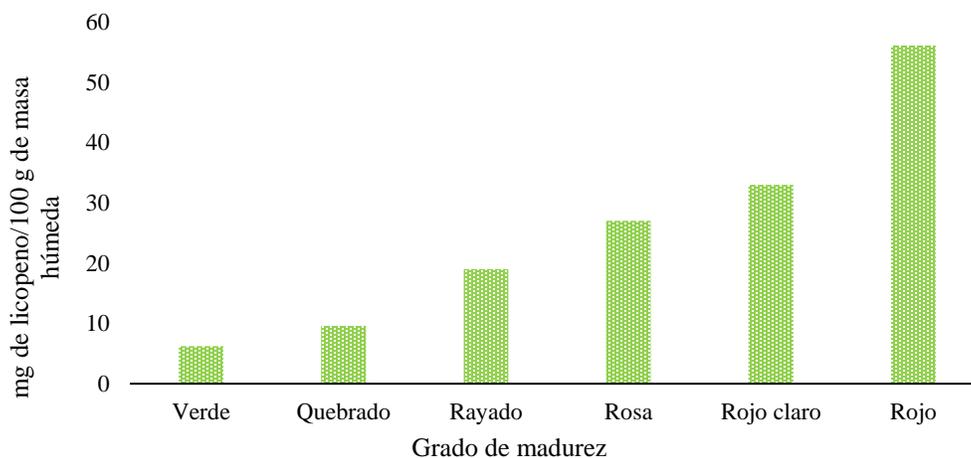
Las medias de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar en la misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes estadísticamente con  $p < 0.05$ .

Fuente: Opara et al. (2012).

*Antioxidantes.* Los jitomates contienen una gran variedad de componentes bioactivos entre ellos los que actúan como antioxidantes, tal como las vitaminas C y E, además de carotenoides. En general, el licopeno es el carotenoide principal y representa más del 80 % del contenido total en la etapa roja (Raffo et al., 2002). Mientras tanto, los compuestos fenólicos como los flavonoles se encuentran contenidos en un 98 % en la piel (Canene-Adams et al., 2005).

En un estudio realizado por Opara et al. (2012) investigaron los efectos que tiene la etapa de maduración del jitomate cherry sobre el contenido de licopeno. La cuantificación se llevó a cabo a través de un método espectrofotométrico. La absorbencia de los extractos de hexano correspondiente a los frutos se midió a una longitud de onda de 472 nm, empleando como estándar licopeno comercial. Los resultados obtenidos por el estudio se presentan en la Figura 4, los cuales muestran que el contenido de licopeno en el jitomate cherry aumentó significativamente desde el

estado verde hasta el estado rojo de 6.2 a 56.1 mg/100 g masa húmeda, respectivamente, aumentando un 40.7 % desde la etapa rojo claro a la etapa rojo.



**Figura 4.** Contenido de licopeno durante la maduración del jitomate cherry. Modificada de Opara et al. (2012)

Coyago-Cruz et al. (2019) cuantificaron los compuestos fenólicos y carotenoides de once variedades de jitomate (*S. lycopersicum* L.), entre ellas cinco variedades de cherry (amarillo, pera clásico, pera naranja, minichocmato pera y cereza). En la Tabla 4 se muestran los resultados del contenido de carotenoides obtenidos por HPLC equipado con un detector de matriz de diodos. La cuantificación de fitoeno, fitoflueno y el resto de carotenoides (luteína, licopeno y  $\beta$ -caroteno) se llevó a cabo a partir de la medición de las absorbencias a longitudes de onda de 285, 350 y 450 nm, respectivamente. Los resultados mostraron que el contenido más alto de licopeno se encuentra en la variedad minichocmato pera con  $77.5 \pm 3.3$  mg/100 g masa seca seguida por la variedad cereza con  $69.2 \pm 0.9$  mg/100 g masa seca. Estas diferencias cuantitativas de carotenoides dependen de múltiples factores (genéticos, climáticos, agronómicos, entre otros).

**Tabla 4.** Contenido de carotenoides en cinco variedades de jitomate cherry (mg/100 g masa seca)

Variedad	Fitoeno	Fitoflueno	Luteína	Licopeno	$\beta$ -caroteno	TCC
Amarillo	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	nd	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	nd	1.2 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	2.5 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>
Pera clásico	8.1 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	0.7 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.5 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	4.7 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	0.5 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	14.4 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>
Pera naranja	25.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	nd	0.5 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	29.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
Minichocmato pera	11.6 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	nd	6.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	77.5 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	6.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	102.0 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>
Cereza	14.1 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	3.2 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.6 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	69.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	2.4 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	90.7 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>

Los valores medios son resultado de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar seguidos de la misma letra en la fila no difieren significativamente estadísticamente con un  $p = 0.01$ . TCC: carotenoides totales; nd: no detectado.

Fuente: Coyago-Cruz et al. (2019).

Respecto a los compuestos fenólicos, Coyago-Cruz et al. (2019) llevaron a cabo la cuantificación de estos compuestos mediante el uso de UHPLC equipado con un detector de matriz de diodos y una columna C18 (1.8  $\mu$ m, 2.1  $\times$  5 mm). La fase móvil consistió de ácido fórmico al 0.01 % en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) con un flujo de 1 mL/min. La cuantificación de *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido gálico y quercetina se llevó a cabo a partir de la medición de las absorbencias a longitudes de onda de 280, 320 y 370 nm. Los compuestos fenólicos se identificaron con estándares de referencia comparando su tiempo de retención y los espectros UV/vis. Mientras que, los compuestos fenólicos totales (TPC) se calcularon como la suma de los fenoles individuales. Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que el jitomate cherry pera naranja obtuvo el mayor contenido de TPC con 307.7  $\pm$  0.1 mg/100 g masa seca (Tabla 5).

**Tabla 5.** Compuestos fenólicos en cinco variedades de jitomate cherry (mg/100 g masa seca)

Variedad	Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	Ác. <i>p</i> -cumárico	Ác. cafeico	Ác. clorogénico	Ác. gálico	Quercetina	TPC
Amarillo	130.2 $\pm$ 1.19 <sup>d</sup>	30.7 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	20.7 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	23.1 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	9.3 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	49.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	263.5 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
Pera clásico	173.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	6.3 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	4.3 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	4.3 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	12.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	38.4 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	239.8 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>
Pera naranja	165.0 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	6.4 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	15.3 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	68.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	42.0 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	307.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Minichocmato pera	136.4 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>	33.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	3.9 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	13.3 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	7.8 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	26.4 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>	220.9 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>
Cereza	86.2 $\pm$ 0.7 <sup>e</sup>	5.6 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	20.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	3.8 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	12.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	22.4 $\pm$ 0.7 <sup>e</sup>	150.2 $\pm$ 2.0 <sup>e</sup>

Los valores medios de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar seguidos de la misma letra en la columna no difieren significativamente estadísticamente con un  $p = 0.01$ . La naringina, crisina y ácido ferúlico no se detectaron; La quercetrina se detectó en cantidades traza. TPC: compuestos fenólicos totales.

Fuente: Coyago-Cruz et al. (2019).

Los compuestos fenólicos y el licopeno en el jitomate pueden ser afectados por factores pre- y post-cosecha. Los primeros incluyen, intensidad de la luz, temperatura, etapa de maduración en la cosecha y sistema de riego.

La calidad y la cantidad de luz determinan la cantidad de carotenoides producidos durante la etapa de maduración. La irradiación con luz roja en combinación con luz azul durante intervalos de 3 a 5 min es efectiva para aumentar la producción de licopeno (indicado por un color rojo en la fruta). Mientras que, la irradiación del rojo lejano de  $38 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  durante 3 a 5 min tiene un efecto retardante en la producción de licopeno debido a que la reacción se desvía hacia la formación de fitoeno (indicado por un color amarillo en la fruta). Así la luz de baja intensidad da como resultado una reducción del contenido de licopeno, lo que produce frutos con un color heterogéneo no deseable. Por otro lado, las temperaturas de plantación entre 12-32 °C aumentan el contenido de licopeno en el jitomate, en tanto que fuera de este intervalo se inhibe. En cambio, la biosíntesis de licopeno se ve inhibida cuando la temperatura del fruto supera los 30 °C y favorecida entre 12-21 °C (Santos-Sánchez et al., 2013).

Asimismo, Santos-Sánchez et al. (2013), veáse Ilahy et al. (2011) mencionan un estudio acerca de los cambios en los compuestos antioxidantes en un cultivar ordinario (Rio Grande) y tres cultivares de jitomate con un contenido alto de licopeno (HLY 13, HLY 18 y Lyco 2) en cuatro etapas diferentes de maduración de la fruta (verde, quebrado, rosa y rojo). Ilahy et al. (2011) encontraron que la etapa de maduración influye significativamente tanto en el contenido total de carotenoides como de licopeno. Durante el rebrote, los frutos de los cultivares HLY 13 y HLY 18 exhibieron más de un 1100 % más de contenido total de carotenoides y licopeno en comparación con los frutos de Rio Grande. Mientras que, los frutos del cultivar HLY 18 acumularon las cantidades más altas de fenoles y flavonoides.

Finalmente, Santos-Sánchez et al. (2013), veáse Pernice et al. (2010) mencionan un estudio acerca del efecto del riego en el perfil de contenido de antioxidantes en cultivares de jitomate donde se aplicaron tres regímenes de riego (ninguno, riego reducido y riego normal) al cultivo de dos variedades de jitomate pequeño Cobarini (biotipos PC01 y PC05). Los resultados mostraron diferencias en los contenidos de carotenoides y flavonoides entre las dos variedades. El contenido de carotenoides aumentó 50.6 % y 34.9 % para los biotipos PC01 y PC05, respectivamente, cuando las plantaciones de jitomate no se regaron en comparación con las plantas con riego normal. Por otra parte, el régimen de riego reducido produjo un incremento del 70.4 % y 57 % en el contenido de flavonoides de frutos biotipo PC01 y PC 05, respectivamente, con respecto al tratamiento de

riego normal. Los resultados muestran que es posible modular la concentración de antioxidantes en el fruto de jitomate utilizando un sistema de riego controlado.

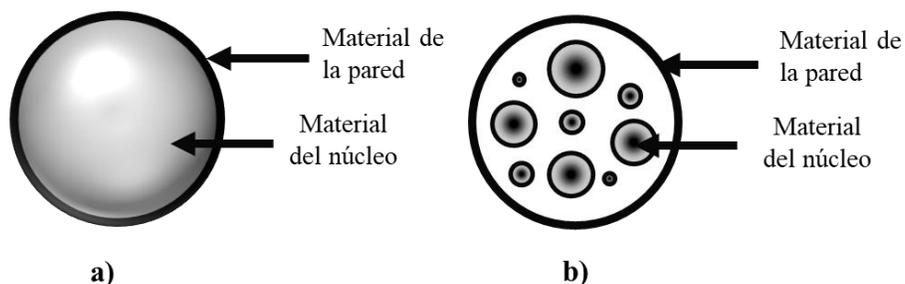
Una vez descrito el origen del jitomate, su composición y los factores que influyen en el contenido de compuestos antioxidantes presentes en este, es necesario conocer acerca de la encapsulación, los diferentes métodos de encapsulación, los agentes encapsulantes, los tensoactivos y los tipos de emulsiones que se utilizan para llevar a cabo la microencapsulación. Por lo cual, la siguiente sección abarcará los puntos anteriormente mencionados.

## 2.2. Encapsulación

La encapsulación es un proceso en el cual se crea una barrera sobre un componente activo para protegerlo de factores ambientales y enmascarar algunos atributos sensoriales indeseables, al mismo tiempo que permite su liberación controlada en determinadas condiciones. Sin embargo, presenta ciertas desventajas, como por ejemplo, que la estabilidad química de la cápsula formada sea tal que no permita la liberación del núcleo encapsulado (Rodrigues do Amaral et al., 2019).

Los compuestos bioactivos usados para encapsular pueden clasificarse en hidrofílicos o lipofílicos. Los primeros son compuestos insolubles en lípidos o disolventes orgánicos, por ejemplo, los compuestos fenólicos y el ácido ascórbico. Mientras que los segundos son insolubles en agua, pero solubles en lípidos y disolventes orgánicos, tal es el caso del licopeno (Kwak, 2014).

Las cápsulas obtenidas mediante este proceso pueden presentar una naturaleza mononuclear o multinuclear (Figura 5). En las primeras, los componentes bioactivos se encuentran en el centro, mientras que en las segundas el centro se encuentra disperso en forma de gotas o a lo largo de los agentes encapsulantes. Esto es dependiente del método, las condiciones de preparación y los materiales utilizados en la producción de la pared (Can Karaca et al., 2015).



**Figura 5.** Dos formas principales de encapsulación.  
Adaptado de Salaün, (2016)

### 2.2.1. Métodos de encapsulación

Existen diferentes métodos para la encapsulación de compuestos bioactivos y su elección depende principalmente de las propiedades del material que conformará al núcleo de la cápsula, de las características buscadas en el producto final y el material de pared de la cápsula debido a que tiene una gran influencia en las propiedades de la sustancia encapsulada, especialmente en la eficiencia de la encapsulación (Dias et al., 2017). En general, la encapsulación se divide en los grupos principales siguientes (Bratovic & Suljagic, 2019):

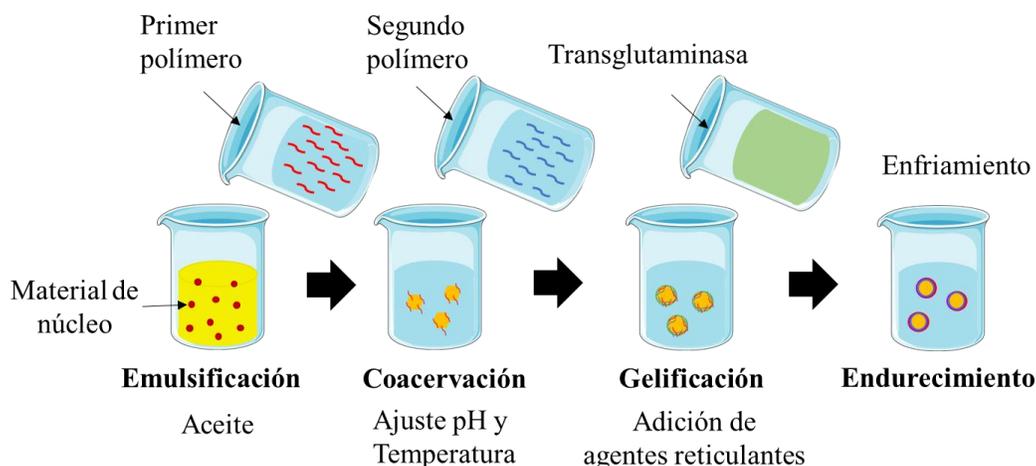
1. Físicos. Secado por atomización-recubrimiento, extrusión, secado por atomización, y uso de fluidos supercríticos.
2. Fisicoquímicos. Coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas.
3. Químicos. Polimerización interfacial e inclusión molecular, evaporación de disolventes.

*Encapsulación por coacervación.* La coacervación es una técnica que implica la agregación de un polímero alrededor de un núcleo mediante la modificación de propiedades fisicoquímicas del medio como temperatura, fuerza iónica, pH y polaridad. Esto ocurre mediante un fenómeno coloidal que se realiza bajo agitación continua para encapsular líquidos y sólidos. Es un proceso simple y de costo bajo que no requiere temperaturas altas (4-50 °C) y generalmente tampoco disolventes orgánicos (Bratovic & Suljagic, 2019).

La coacervación se clasifica en simple o compleja, esto dependiendo del número de polímeros utilizados. En la primera se utiliza solamente un polímero y para inducir la separación de fases se suelen añadir sales orgánicas o disolventes miscibles en agua. En cambio para la segunda se utilizan dos polímeros cargados de manera opuesta, generalmente proteínas y polisacáridos mezclados en disolución para formar un recubrimiento alrededor del componente central, utilizando cambios de pH, temperatura o adición de componentes electrolíticos (Dias et al., 2017).

El proceso de encapsulación por coacervación compleja se desarrolla en cuatro pasos, la emulsificación, la coacervación, la gelificación y el endurecimiento (Figura 6). En algunas ocasiones se utilizan agentes reticulantes, como la TGasa, o el tripolifosfato de sodio para aumentar la resistencia de la pared de la cápsula durante las etapas de gelificación y endurecimiento. Este tipo de coacervación se ha utilizado principalmente para la microencapsulación de principios

bioactivos inestables como los carotenoides, aceite omega 3 y compuestos fenólicos. Las microcápsulas producidas por esta técnica pueden presentar diversas morfologías y tamaños de 5 a 200  $\mu\text{m}$  dependiendo de los cambios de pH, concentración iónica, método de formación de la emulsión, el tipo y concentración de materiales de pared, así como la naturaleza de los compuestos bioactivos (Corrêa-Filho et al., 2019).



**Figura 6.** Diagrama esquemático de un proceso de encapsulación complejo por coacervación. Adaptado de Bruyninckx & Dusselier, (2019)

**Transglutaminasa (TGasa).** Las TGasas forman una gran familia de enzimas intracelulares y extracelulares que están ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en animales (vertebrados e invertebrados), plantas y microorganismos (Duarte et al., 2020).

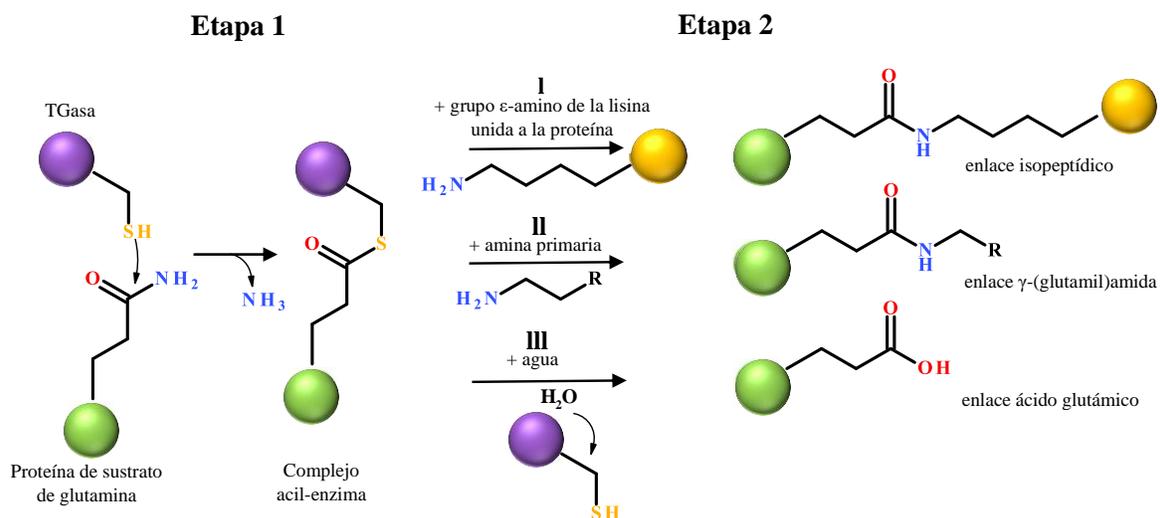
Las TGasas de origen animal son activadas por el  $\text{Ca}^{2+}$  y producidas en forma zimogénica. Se encuentra comprendida por ocho enzimas activas (TG1 a TG7 y el factor XIII) y una que carece de actividad enzimática (llamada “la banda 4.2”). Las cuales presentan una pigmentación rojiza que afecta a la apariencia de los productos. Por esta razón, se utilizan fuentes microbianas que son más fáciles y baratas de producir (Duarte et al., 2020).

Las TGasas microbianas tienen la misma triada catalítica de aminoácidos que las TGasas animal (Cys-His-Asp), pero con un orden de secuencia diferente (Cys-Asp-His). A diferencia de las TGasas animal, estas no se encuentran reguladas por el calcio por lo que no precipitan fácilmente, lo que las vuelve muy útiles en la industria alimentaria (Duarte et al., 2020). En la industria alimentaria se han empleado para la mejora de la firmeza, elasticidad y capacidad de retención de agua en los productos alimentarios mientras que en la microencapsulación han sido utilizadas para

reforzar las interacciones entre los polímeros empleados debido a que los enlaces formados en esta técnica son débiles (Gharibzahedi et al., 2018).

El mecanismo de acción de la TGasa consta de dos etapas (Duarte et al., 2020). En la primera etapa, se produce el complejo TGasa-proteína generado a partir de la interacción del grupo tiol de la cisteína presente en el sitio activo de la enzima y el residuo de glutamina (aceptor de acilo) en el sustrato proteico. En la segunda etapa, se pueden producir tres reacciones diferentes, descritas a continuación:

1. Reacción de reticulación entre el complejo acil-enzima que contiene al grupo  $\gamma$ -glutamilo y un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys en una proteína (Figura 7, Etapa 2, reacción I). Este tipo de reacción está favorecida a  $\text{pH} > 7$ .
2. Reacción entre el complejo acil-enzima que contiene  $\gamma$ -glutamilo y el sustrato con un grupo amino primario, la enzima cataliza la incorporación del grupo amino primario conduciendo a una  $\gamma$ -(glutamil)amida en el sustrato proteico inicial (Figura 7, Etapa 2, reacción II).
3. Reacción de hidrólisis donde el agua actúa como aceptor de acilo del complejo acil-enzima para producir un residuo de ácido glutámico en el sustrato proteico inicial (Figura 7, Etapa 2, reacción III).



**Figura 7.** Reacciones catalizadas por TGasa<sup>4</sup>.

<sup>4</sup> <https://zedira.com/Assays-and-substrates>. Consultado el 06/03/2021.

Estas reacciones muestran la versatilidad de la TGasa, por lo que al involucrar reacciones con esta enzima se vuelve importante conocer la composición y propiedades de las proteínas que se utilizarán como sustrato en las reacciones enzimáticas, así como las condiciones a emplear. Consecuentemente, en la subsección siguiente se describirán la composición y las propiedades funcionales de los agentes encapsulantes que se emplearon en el presente proyecto.

### **2.2.2. Agentes encapsulantes**

*Proteína de soya.* La soya (*Glycine max*) produce una semilla oleaginosa que contiene aproximadamente 36 % de proteína, 15 % de carbohidratos solubles, 15 % de carbohidratos insolubles (fibra dietética) y 18 % de aceite (0.3 % lecitina). Estos valores están en función de la variedad, la ubicación geográfica y el clima (Thrane et al., 2017).

La soya contiene una mezcla de varias proteínas que pertenecen a cuatro categorías según sus coeficientes de sedimentación 2S, 7S, 11S y 15S (S como unidad de Svedberg) que sedimentan a diferentes fuerzas gravitatorias cuando la disolución se somete a un campo centrífugo (Tabla 6) (Nishinari et al., 2014). Entre estas cuatro proteínas, la globulina 7S ( $\beta$ -conglucina) y la globulina 11S (glicina) representan del 65 al 89 % del total de proteínas de la semilla y se caracterizan por ser solubles en medios salinos. La 11S es la fracción individual más grande de la proteína total de la semilla de soya (25-35 %), tiene una masa molecular alta (350 kDa) y sus propiedades distintivas son una viscosidad baja y una estabilidad térmica alta. Por otra parte, la globulina 7S posee aproximadamente la mitad del tamaño molecular de la glicina (175 kDa) y sus propiedades distintivas son una viscosidad alta y una estabilidad térmica baja (Thrane et al., 2017).

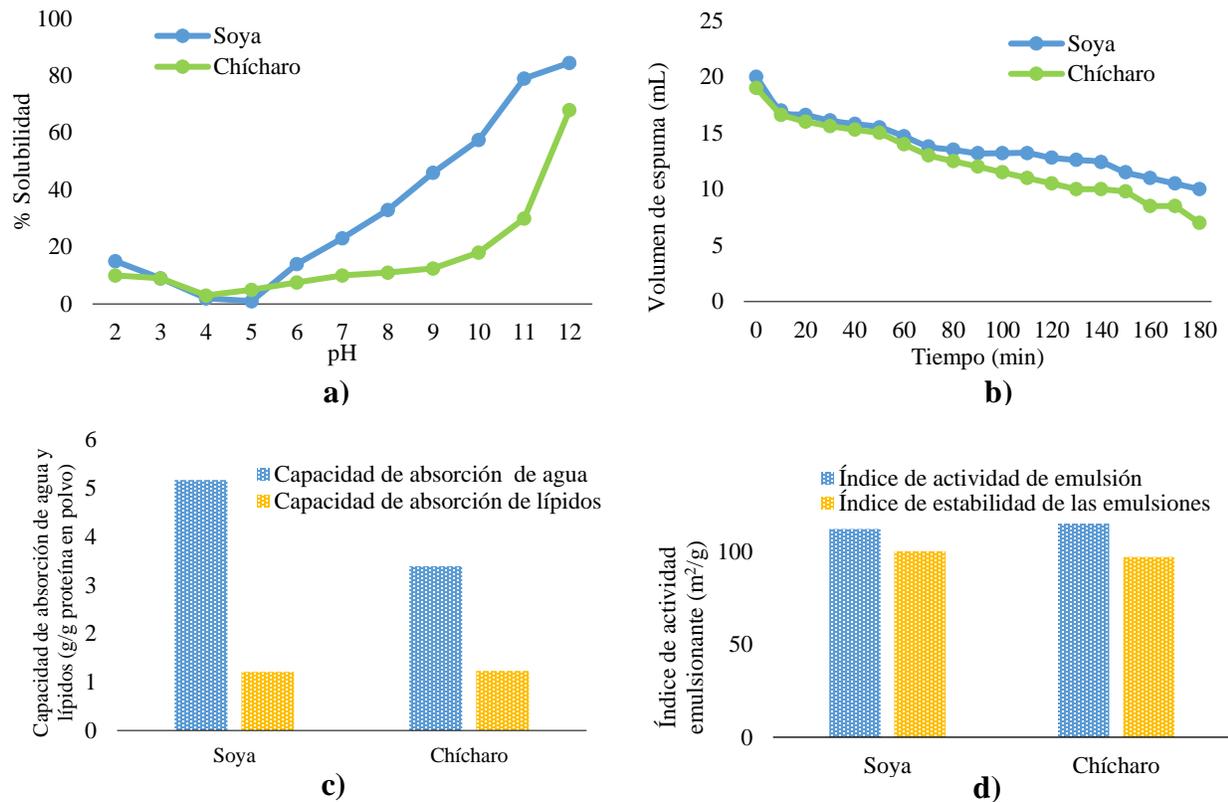
*Proteína de chícharo.* La semilla del chícharo (*Pisum sativum L.*) contienen 20-25 % de proteína, 40-50 % de almidón y 10-20 % de fibra. Estos valores pueden variar debido a los diferentes genotipos existentes y por factores ambientales. La proteína de chícharo pertenece a cuatro grupos principales, globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas (Tabla 6). En donde las globulinas son las proteínas de almacenamiento principal y representan del 55-65 % de las proteínas totales y son solubles en disoluciones salinas (Lu et al., 2020).

**Tabla 6.** Composición fraccional de proteínas extraídas de semillas de soya y chícharo

Especie	2S albuminas	7S globulinas "vicilinas"	11S globulinas "leguminas"	Glutelinas
Chícharo	*	**	**	*
Soya	*	** ( $\beta$ -conglucina)	** (Glicina)	*

\* Componentes minoritarios; \*\* Componentes principales. Las prolaminas son raras o ausentes en las especies.  
Fuente: Le Priol et al. (2019).

Un estudio realizado por Zhao et al. (2020) comparó las propiedades funcionales del aislado de proteína de soya (APS) con el aislado de proteína de chícharo (APC) que tenían un contenido de proteína de  $86.36 \pm 0.08$  % y  $78.01 \pm 0.10$  %, respectivamente (Figura 8). Los resultados reportados en el estudio, mostraron que para el APS y el APC la solubilidad mínima ocurre en los puntos isoeléctricos (pI) de pH 4-5 y 4-6, respectivamente (Figura 8a). Asimismo, mostraron una capacidad similar de formación de espuma, en un período de 3 h (Figura 8b) y estimaron la estabilidad de esta en 82.44 %, 89.74 % para el APS y APC, respectivamente, a partir de espuma remanente en un tiempo de 30 min. Además, determinaron una capacidad de absorción de aceite similar, situándose en torno a 1.2 g de aceite/g de proteína, pero diferente en el caso del agua, siendo aproximadamente 1.5 veces mayor para APS (Figura 8c). Por otra parte, el índice de actividad de emulsión y el índice de estabilidad de emulsión del APS fueron significativamente iguales a los equivalentes del APC (Figura 8d). Por último, determinaron la concentración mínima de gelatinización obteniendo que para el APS gelatiniza a una concentración del 12 % (p/v) mientras que el APC lo hace a 14 % (p/v). Por lo que, este estudio demostró que la funcionalidad global de la proteína del chícharo era muy cercana a la de la proteína de soya, lo que indica que la proteína de chícharo es un prometedor sustituto de la proteína de soya, especialmente en los aspectos de funcionalidad asociados a la hidratación.



**Figura 8.** Propiedades funcionales de la proteína de soya y chícharo. Modificado de H. Zhao et al. (2020)

Existe la posibilidad de mejorar las limitadas propiedades funcionales de las proteínas vegetales en los sistemas alimentarios combinándolas con polisacáridos. En particular, la solubilidad baja en torno al pI, las propiedades interfaciales en emulsiones y espuma, así como una capacidad restringida para la encapsulación de ingredientes, pueden mejorarse considerablemente (Einhorn-Stoll et al., 2021).

*Pectina.* La pectina comercial se obtiene principalmente de materiales de desechos de los cítricos y las manzanas (Einhorn-Stoll et al., 2021). El orujo de manzana contiene alrededor de 10-15 % de pectina mientras que la cáscara de cítricos contiene 20-30 %. Asimismo, existen fuentes alternativas como los desechos de remolacha azucarera de la fabricación de azúcar y desechos de mango (Rolin, 2012).

Estructuralmente, las pectinas son heteropolisacáridos lineales con masas moleculares elevadas (80–400 kDa) constituidos por tres fracciones principales. La primer fracción (65 % del total) es un homogalacturonano (HG) que está basado en unidades de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico (D-GalA) unidas a través de enlaces  $\alpha$ -(1→4). La cadena de galacturonano puede contener monómeros con un grupo carboxílico (C-6) esterificado y/o un grupo hidroxilo (en la posición *O*-2/*O*-3). La segunda fracción (20-35 % del total) es un ramnogalacturonano I (RG-I) que se encuentra construido con unidades del dímero  $\alpha$ -(1→4)- $\alpha$ -D-GalA- $\alpha$ -(1→2)- $\alpha$ -L-ramnosa con arabinano, galactano y/o cadenas laterales de arabinogalactano con los grupos carboxilo de D-GalA esterificados. La última fracción (< 10 % del total) llamada ramnogalacturonano I (RG-IL) posee una columna vertebral lineal de fragmentos de D-GalA unidos a través de enlaces  $\alpha$ -(1→4) y además, llevan cuatro cadenas laterales de oligosacáridos. Cabe mencionar que la estructura química de las pectinas cambia entre diferentes frutos y sus etapas de crecimiento (Ayala-López et al., 2020).

Las pectinas se pueden esterificar con diferentes grupos, incluidos los grupos metilo. Por lo cual, estas se clasifican en dos tipos según su grado de esterificación (GE), en pectinas de GE altos ( $\geq$  50 %) y GE bajos (< 50 %). Las primeras generan geles a pH bajo, estabilizadas por interacciones hidrofóbicas, mientras que las segundas forman geles electrostáticamente estabilizados por cationes metálicos (Ayala-López et al., 2020).

Por otro lado, las pectinas son utilizadas ampliamente en la industria alimentaria debido a sus propiedades funcionales. Una concentración máxima del 5 % aumenta la viscosidad de un sistema sin comprometer fuertemente el comportamiento de agitación y transporte de los productos. Mientras que, cuando se utilizan como espesantes que aumentan la viscosidad en bebidas de frutas, refrescos, salsas y sorbetes se deben utilizar a concentraciones más bajas (0.01-0.5 %). Además, se utilizan principalmente como agentes gelificantes por lo que son responsables de la consistencia gelatinosa de las confituras, jaleas y mermeladas. Varios aspectos de la estructura molecular de las pectinas influyen en la capacidad de gelificación, como el contenido de GalA, las cadenas laterales, grado de esterificación y la distribución de los metilos a lo largo de la cadena. Los factores externos, como el pH, la temperatura y su naturaleza también afectan a la gelificación (Reichembach & de Oliveira Petkowicz, 2021).

La mayoría de las interacciones en los sistemas pectina-proteína vegetal son no covalentes, por lo que predominan las interacciones electrostáticas, que dependen principalmente del pH del sistema. En general, pueden ser el resultado de una fuerte atracción entre una proteína cargada positivamente y un polisacárido cargado negativamente a  $\text{pH} < \text{pI}$  de la proteína, de interacciones atractivas débiles entre proteínas no cargadas o cargadas negativamente y polisacáridos cargados positivamente a  $\text{pH} > \text{pI}$ , así como de la formación de complejos locales entre regiones cargadas positivamente de las moléculas de proteína y un polisacárido cargado negativamente a  $\text{pH} > \text{pI}$  (Einhorn-Stoll et al., 2021). Dado que la pectina es un polisacárido aniónico, el primer y tercer tipo de interacción electrostática son posibles. Por lo que, las proteínas vegetales pueden formar coacervados con la pectina en la región de pH intermedio, donde las dos macromoléculas llevan cargas netas opuestas, es decir, a un pH que cumpla con el criterio siguiente,  $\text{pI}$  del polisacárido  $< \text{pH} < \text{pI}$  de la proteína (Gentile, 2020).

*La goma arábiga (GA)*. Es un biopolímero obtenido como exudado de árboles maduros de *Acacia Senegal* y *Acacia seyal* que crecen principalmente en Sudán. Su composición química es compleja y puede variar dependiendo de su origen, clima, temporada de cosecha, edad del árbol y condiciones de procesamiento. Por lo tanto, a pesar de que ambas gomas tienen los mismos residuos de azúcar, existen parámetros que pueden detectar las diferencias entre las dos especies (Tabla 7) (Montenegro et al., 2012).

**Tabla 7.** Composición y algunas propiedades de la goma de *Acacia senegal* y *A. seyal*

	<i>A. senegal</i>	<i>A. seyal</i>
% Ramnosa	14.00	3.00
% Arabinosa	29.00	41.00
% Galactosa	36.00	32.00
% Ácido glucurónico	14.50	6.50
% Nitrógeno	0.36	0.15
% Proteína	2.41	0.97
Rotación específica (grados)	-30	+ 51
Masa molecular promedio (kDa)	380	850

Fuente: Montenegro et al. (2012)

Por otro lado, estructuralmente la goma *Acacia senegal* consta de tres fracciones principales. Una fracción principal (88.4 % del total) con unidades de ramnosa, arabinosa y ácido glucurónico altamente ramificada, baja en proteínas (0.35 % en peso) y con una masa molar de 279 kDa

denominada arabinogalactano (AG). Una fracción secundaria (10.4 % del total) con un contenido de proteína del (11.8 % en peso) y con una masa molar de 1450 kDa, correspondiente a un complejo arabinogalactano-proteína (AGP). Finalmente, una tercera fracción más pequeña (1.24 % del total) compuesta por una o dos glicoproteínas (GP) (Renard et al., 2006).

La goma arábiga en polvo se disuelve fácilmente en agua con una viscosidad baja por lo que, se pueden hacer disoluciones de hasta el 50 % (*m/v*) y a concentraciones mayores la dispersión es algo similar a un gel. Las viscosidades más altas se producen a un pH = 6. Al igual que con otros polisacáridos que contienen grupos ácido carboxílico, su solubilidad es mínima cuando se suprime la ionización de los grupos carboxilo (por debajo de un pH ≈ 3). En general, se requieren concentraciones 20-40 veces mayores, en comparación con otros hidrocoloides, para producir viscosidades equivalentes, lo que es una ventaja en sus principales aplicaciones (Phillips & Phillips, 2011). Además, es un excelente emulsionante debido a su carácter anfifílico. En el proceso de encapsulación, la goma arábiga actúa reduciendo la tensión interfacial aceite-agua, facilitando así el rompimiento de las gotas de emulsión durante la homogeneización. La proteína se adsorbe fuertemente en la superficie de las gotas de aceite, mientras que las cadenas de polisacáridos se extienden hacia la fase acuosa, impidiendo la floculación y la coalescencia de las gotas mediante fuerzas de repulsión electrostáticas y estéricas (López-Franco et al., 2015).

Respecto a los materiales más utilizados en estudios con distintos métodos de encapsulación para el licopeno y los compuestos fenólicos se muestran en las Tablas 8 y 9, respectivamente.

**Tabla 8.** Materiales de encapsulación de licopeno en diferentes estudios

Material de la pared	Fuente	Método	Eficiencia (%)	Referencia
Goma arábiga y sacarosa	Jitomate fresco	Secado por aspersión	94.0-96.0	(Nunes & Mercadante, 2007)
Gelatina y ácido poli ( $\gamma$ -glutámico)	Cáscaras de jitomate	Liofilización	NR	(Chiu et al., 2007)
Gelatina y pectina	Dispersión oleosa de licopeno	Coacervación compleja	93.2	(Silva et al., 2012)
Gelatina y goma arábiga	Licopeno disperso en aceite	Coacervación compleja	90.0	(Rocha-Selmi et al., 2013)
Proteína de suero y goma de acacia	Cáscaras de jitomate	Coacervación compleja y liofilización	83.6	(Gheonea et al., 2021)

NR: No reportada.

**Tabla 9.** Materiales de encapsulación de compuestos fenólicos en diferentes estudios

Material de la pared	Fuente	Método	Eficiencia (%)	Referencia
Proteína de suero y maltodextrina	Hojas de <i>Orthosiphon stamineus</i>	Secado por aspersión	86.7	(Pang et al., 2014)
Goma arábica y gelatina	Brócoli	Coacervación compleja	60.0	(Sánchez et al., 2016)
Maltodextrina y gelatina	<i>Terminalia arjuna</i>	Secado por aspersión/congelación	51.0-79.0	(Sawale et al., 2017)
Maltodextrina y goma arábica	<i>Terminalia arjuna</i>	Secado por aspersión/congelación	97.0	
Maltodextrina y goma arábica	Piel de cebolla	Liofilización	84.4-89.2	(Akdeniz et al., 2018)
Maltodextrina, proteína de suero y goma arábica	Cáscara de manzana ( <i>Amasya</i> )	Liofilización y ultrasonido	86.9	(El-Messery et al., 2019)
		Secado por aspersión	80.2	

### 2.2.3. Clasificación de las cápsulas

Las cápsulas se pueden clasificar de acuerdo a su forma, en microcápsulas y microesferas. Las primeras poseen internamente un reservorio hueco mientras que, las segundas poseen un sistema de matriz en la que el núcleo se dispersa y/o disuelve uniformemente en una red de polímeros (Santos-Sánchez et al., 2020). Mientras que de acuerdo a su tamaño se pueden clasificar en macrocápsulas (> 5000  $\mu\text{m}$ ), microcápsulas (1-5000  $\mu\text{m}$ ) y nanocápsulas (< 1  $\mu\text{m}$ ) (Santos-Sánchez et al., 2020). El tamaño de las cápsulas se encuentra estrechamente relacionado con el tamaño de las gotas producidas durante las emulsiones. Estas determinan la estabilidad, apariencia, textura, sabor y destino gastrointestinal del producto final; sin embargo, existen diferentes factores que influyen en el tamaño de las gotas, tal como el tensoactivo, el homogeneizador, la temperatura y las propiedades fisicoquímicas de las fases.

**Tensoactivo.** El tensoactivo influye en el tamaño de las gotas al reducir la tensión interfacial entre la fase oleosa y la acuosa, lo que facilita la ruptura de las gotas durante la agitación. En consecuencia, el tensoactivo se absorbe con mayor rapidez haciendo que las gotas producidas, con una energía constante de dispersión del homogeneizador, sean más pequeñas. Por otra parte, cuando la concentración del tensoactivo no es suficiente para cubrir toda el área de las gotas creadas por el homogeneizador, el tamaño de las gotas se rige principalmente por la concentración del emulsionante en lugar de la entrada de energía del homogeneizador. Mientras que, cuando la concentración del tensoactivo presente es el necesario para cubrir completamente toda el área de

la superficie de las gotas creadas por el homogeneizador, el tamaño de las gotas es independiente de la concentración del emulsionante y depende principalmente de la energía de entrada del homogeneizador. En estas circunstancias, el diámetro medio de gota que se puede producir depende de las condiciones de la velocidad de agitación (McClements, 2015).

**Homogeneizador.** El homogeneizador utilizado debe ser capaz de generar un gradiente de presión lo suficientemente grande como para romper cualquier gota de tamaño mayor. Asimismo, la emulsión debe pasar suficiente tiempo dentro de la zona de homogenización para que todas las gotas se rompan por completo. Cuando una emulsión pasa a través de un homogeneizador demasiado rápido o si hay una distribución desigual de la energía disruptiva dentro de la zona de homogeneización, es posible que algunas de las gotas no se rompan (McClements, 2015).

**Propiedades de las fases de los componentes.** La composición y las propiedades fisicoquímicas de las fases oleosa y acuosa también influyen en el tamaño de las gotas producidas durante la homogeneización, la variación en el tipo de aceite o en la fase acuosa alteran la relación de viscosidad. Los aceites presentan diferentes tensiones interfaciales cuando se ponen en contacto con el agua debido a que presentan distintas estructuras moleculares o porque contienen diferentes cantidades de impurezas activadas en la superficie, como ácidos grasos libres. Estas impurezas tenderán a acumularse en la interfase aceite-agua y disminuirán la tensión interfacial. Por otra parte, la fase acuosa de una emulsión puede contener una variedad de componentes, incluidos minerales, ácidos, bases, biopolímeros, azúcares, alcoholes y burbujas de gas. Estos componentes pueden alterar el tamaño de las gotas producidas durante la homogeneización debido a su influencia en la reología, la tensión interfacial y en la coalescencia (McClements, 2015).

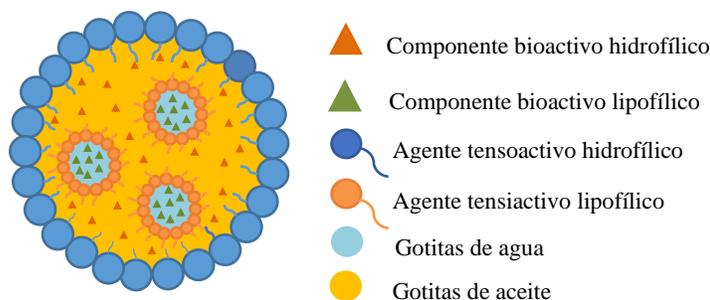
**Temperatura.** La viscosidad de las fases oleosa y acuosa depende de la temperatura y, por lo tanto, el tamaño mínimo de gota que se puede producir puede verse alterado debido a una variación en la relación de viscosidades entre las fases. Por lo general, la viscosidad de los aceites disminuye más rápidamente al aumentar la temperatura que la viscosidad del agua; por lo tanto, para una emulsión de aceite en agua la viscosidad tiende a disminuir, lo que facilita la ruptura de las microgotas a temperaturas más altas. Además, el calentamiento de una emulsión generalmente provoca una ligera reducción en la tensión interfacial entre las fases de aceite-agua lo que facilita la producción de pequeñas gotas (McClements, 2015).

## 2.3. Emulsiones

Una emulsión consta de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se dispersa como pequeñas gotas en el otro. Las emulsiones se pueden clasificar de acuerdo a su número de fases en simples y dobles, o de acuerdo al tamaño de las gotas en macro, micro y nanoemulsiones (McClements, 2007).

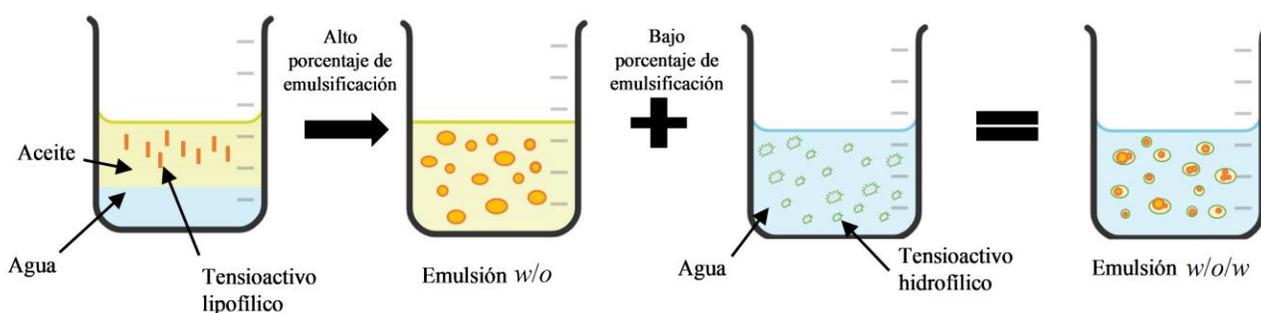
Las emulsiones simples constan de gotas de aceite dispersas en una fase acuosa (*o/w*), por ejemplo: leche, crema, mayonesa, o de gotas de agua dispersas en una fase de aceite (*w/o*), por ejemplo: mantequilla (McClements, 2007). En tanto que, las emulsiones dobles son emulsiones dentro de emulsiones, es decir, la fase dispersa es una emulsión en sí. De acuerdo a su morfología las emulsiones dobles se pueden clasificar en emulsiones de agua en aceite en agua (*w/o/w*) o en emulsiones de aceite en agua en aceite (*o/w/o*). La primeras son sistemas continuos de agua que contienen gotas de aceite con gotas de agua más pequeñas dispersas en su interior. Mientras que las segundas son sistemas continuos de aceite que contienen gotas de agua con gotas de aceite más pequeñas en su interior (Furuta & Neoh, 2021).

Las emulsiones *w/o/w* ofrecen varias ventajas, como la posibilidad de cargar materiales centrales hidrofílicos e hidrofóbicos simultáneamente (Figura 9), el desarrollo de productos alimentarios reducidos en grasa mediante la sustitución parcial de la fase dispersa lipofílica por una fase acuosa y la liberación controlada de materiales de núcleo encapsulados. Dentro de las desventajas se puede encontrar que son más difíciles y costosas de preparar que las emulsiones convencionales, y suelen ser muy susceptibles a romperse durante el almacenamiento (Salvia-Trujillo et al., 2018).



**Figura 9.** Emulsión *w/o/w*.  
Adaptado de Salvia-Trujillo et al., (2018)

El procedimiento estándar para producir una emulsión doble implica dos etapas separadas. Se utiliza un tensioactivo lipofílico (polirricinoleato de poliglicerol (PGPR), lecitina o Span 80) en la primera etapa para preparar la emulsión primaria *w/o*, y posteriormente se utiliza un tensioactivo hidrofílico (etoxilatos como el tween 80 y tween 20 o el dodecilsulfato de sodio) diferente en la segunda etapa para hacer la emulsión secundaria *w/o/w*. La elección de la metodología en la etapa de emulsión secundaria es crítica para la preparación de una formulación con buen comportamiento, (Figura 10) (Muschiolik & Dickinson, 2017).



**Figura 10.** Proceso de preparación en dos pasos de una emulsión doble.  
Adaptado de Mudrić et al. (2019)

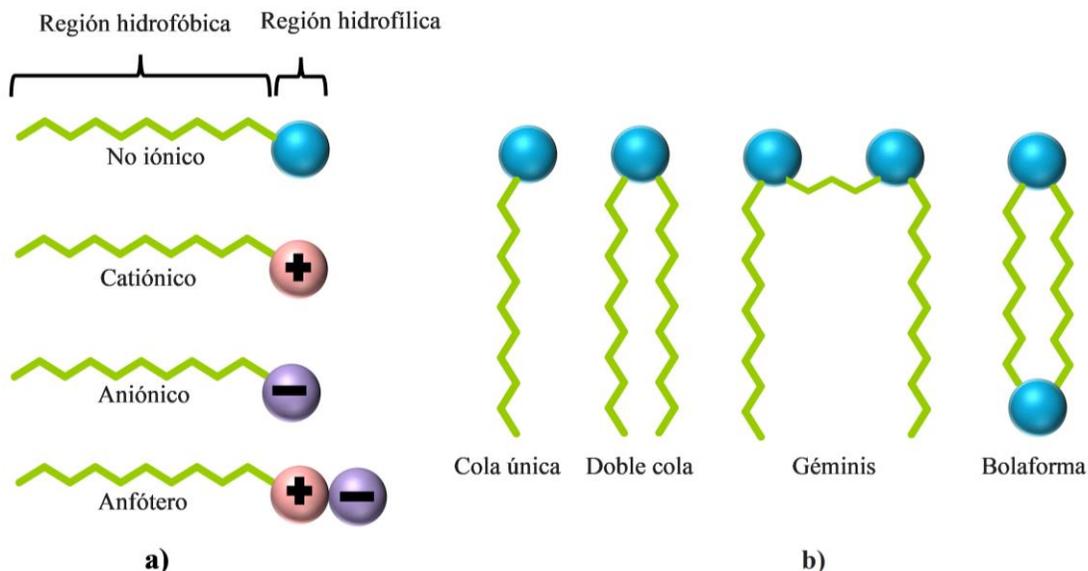
### 2.3.1. Tensioactivos

Los tensioactivos son moléculas que disminuyen la tensión superficial e interfacial en las interfases entre sólidos, líquidos y gases. Pueden mantener la estabilidad de las fases dispersas, regulando el intercambio de energía y materia en procesos naturales y sintéticos. Por lo cual, la adición de estos en fases incompatibles es crucial (Cortés et al., 2021). Para mostrar estas dos propiedades físicas, un tensioactivo debe tener una estructura química con dos grupos funcionales diferentes con distinta afinidad dentro de la misma molécula, un grupo funcional hidrofóbico y otro hidrofílico.

Los tensioactivos se clasifican en tensioactivos iónicos y no iónicos (Figura 11a). Los primeros se subclasifican en tensioactivos aniónicos, en los que el grupo hidrofílico se disocia en aniones en disoluciones acuosas; tensioactivos catiónicos, que se disocian en cationes, y tensioactivos anfóteros que se disocian en aniones y cationes, a menudo en función del pH (Nakama, 2017). Además, pueden presentar dos cadenas de hidrocarburos unidas a una cabeza polar y se denominan

tensoactivos de doble cadena. Mientras que, aquellos que contienen dos grupos hidrofóbicos y dos hidrofílicos se denominan tensoactivos "gemínicos". Por otra parte, las moléculas anfifílicas pueden tener dos grupos de cabeza (ambos aniónicos, ambos catiónicos o uno aniónico y otro catiónico) unidos por un espaciador hidrofóbico. Este tipo de moléculas se denominan "bola-anfífilas", comúnmente conocidas como "bolaformas"(Figura 11b) (Ghosh et al., 2020).

Por otro lado, los tensoactivos pueden clasificarse en función del balance hidrofílico-lipofílico (BHL), que indica su tendencia relativa a la solubilidad en fases oleosas o acuosas (regla de Bancroft). Aquellos tensoactivos con un número BHL de 3-6 tienen tendencia a la formación de emulsiones de agua en aceite, por ejemplo, los ésteres de glicerol, los ésteres de ácidos grasos de propilenglicol, los ésteres de poliglicerol y los ésteres de ácidos grasos de sorbitol. Mientras que, aquellos con un BHL de 10-18 tienen tendencia a la formación de emulsiones de aceite en agua, por ejemplos, las proteínas, los fosfolípidos, las sales de sodio y potasio, los hidrocoloides, los alginatos, los ésteres de ácidos grasos polioxietilénicos (tweens) y la carboximetilcelulosa. Por otra parte, los tensoactivos con un número BHL de 7-9 se conocen como "agentes humectantes", como el dioleato de hexaglicerol, el monolaurato de sorbitán, la lecitina de soya y el monoestearato de triglicerol. Estos agentes no tienen una preferencia particular por el aceite o el agua (Marhamati et al., 2021).

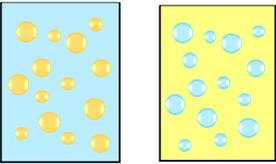
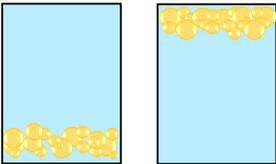
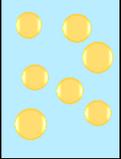


**Figura 11.** Clasificación de los tensoactivos (a) Según la carga iónica en su grupo polar (b) De acuerdo a su estructura. Adaptada de Ghosh et al. (2020) y Cortés et al. (2021)

### 2.3.2. Estabilidad de las emulsiones

El grado de estabilidad de una emulsión está determinada por factores como el tamaño de las partículas, la distribución del tamaño de las partículas, la diferencia de densidad entre las fases dispersa y continua, y por la integridad química de la fase dispersa (Maphosa & Jideani, 2018). Varios fenómenos como la separación gravitacional, floculación, coalescencia, maduración de Ostwald y la inversión de fase son responsables de la desestabilización de las emulsiones (Tabla 10) (McClements, 2007).

**Tabla 10.** Mecanismos de inestabilidad más comunes que ocurren en las emulsiones

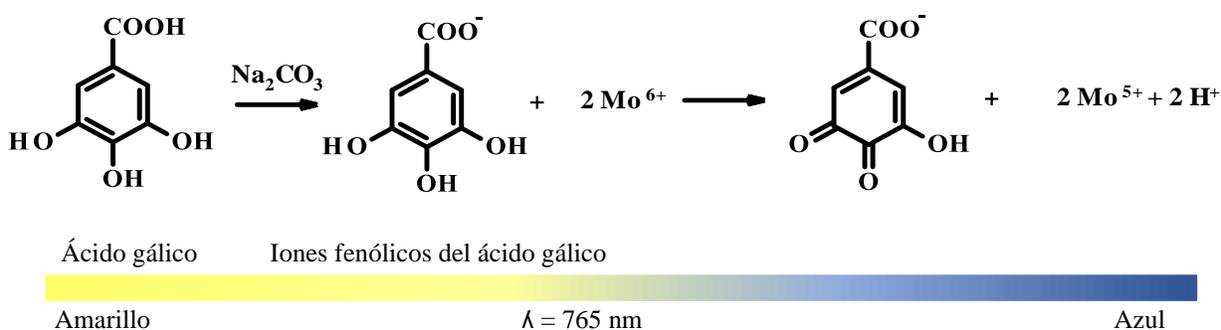
Mecanismo	Definición
<p data-bbox="383 716 584 743">Inversión de fase</p> 	<p data-bbox="721 793 1349 863">Una emulsión de aceite en agua cambia a una emulsión de agua en aceite, o viceversa</p>
<p data-bbox="347 936 620 963">Separación gravitatoria</p> 	<p data-bbox="721 978 1349 1119">Las gotas se mueven hacia arriba ("crema") o hacia abajo ("sedimentación") debido a que tienen una densidad más baja o más alta que el líquido que las rodea</p>
<p data-bbox="410 1157 553 1184">Floculación</p> 	<p data-bbox="721 1192 1349 1304">Dos o más gotas se juntan para formar un agregado en el que cada una de las gotas iniciales conserva su integridad individual</p>
<p data-bbox="407 1367 560 1394">Coalescencia</p> 	<p data-bbox="721 1444 1349 1514">Dos o más gotas se fusionan para formar una sola gota más grande</p>
<p data-bbox="342 1577 626 1604">Maduración de Ostwald</p> 	<p data-bbox="721 1619 1349 1730">Las gotas más grandes crecen a expensas de las gotas más pequeñas, debido al transporte masivo del material de la fase dispersa a través de la fase continua</p>

Fuente: McClements, (2007).

## 2.4. Caracterización de las microcápsulas

### 2.4.1. Contenido de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales generalmente se lleva a cabo empleando el método de Folin-Ciocalteu. Este método evalúa la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes (Santos-Sánchez et al., 2019). La naturaleza química precisa del reactivo de Folin-Ciocalteu no se encuentra claramente definida, pero se piensa que puede contener un complejo de ácido fosfomolibdato-fosfotungstato que se reduce para obtener un cromóforo azul con máxima absorbencia a 765 nm. La intensidad de color es proporcional al número de grupos hidroxilos de la molécula. En la medición, se agrega  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  porque los compuestos fenólicos solo reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu en condiciones alcalinas, los protones en los compuestos fenólicos se disocian en iones fenólicos (Martono et al., 2020). El ion molibdato central del complejo es aceptado como sitio reductor, donde el ion  $\text{Mo}^{6+}$  se reduce a  $\text{Mo}^{5+}$  al aceptar un electrón donado por el antioxidante fenólico (Figura 12). El ensayo de Folin-Ciocalteu para la medición del contenido de fenoles totales (TPC) presenta ventajas como la sencillez y reproducibilidad del método. Sin embargo, también tiene algunos inconvenientes. El ensayo puede presentar sobreestimación del TPC debido a la contribución de agentes reductores no fenólicos presentes en el sistema al reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu, tal como los azúcares reductores y ciertos aminoácidos (Munteanu & Apetrei, 2021).



**Figura 12.** Reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu  
Adaptado de Martono et al. (2020)

### 2.4.2. Microscopía óptica

La microscopía es una técnica de imagen ampliamente utilizada en la investigación, la farmacéutica, en el desarrollo de procesos y en el control de la calidad de productos fabricados.

Una de sus principales aplicaciones es la caracterización del tamaño, la morfología y la cristalinidad de las partículas presentes en la muestra analizada (Kulkarni & Shaw, 2016).

La mayoría de los microscopios ópticos utilizan al menos dos lentes. La primera resolución se denomina lente objetivo y se coloca junto a la muestra. El usuario puede elegir entre varios lentes objetivo para utilizar el grado de aumento deseado normalmente de 4x 10x, 40x o 100x. La segunda lente se encuentra en el ocular y se denomina lente ocular, este lente suele ajustarse a 10x. Aunque cada microscopio óptico compuesto es único, manipulan la luz de manera similar para ampliar una muestra. Un condensador concentra los rayos luminosos sobre una muestra y, la luz transmitida a través de la muestra posteriormente es recolectada y magnificada por la lente del objetivo. Esta imagen ampliada se enfoca en la lente ocular, que esencialmente actúa como una lupa para ampliar aún más la imagen de la lente del objetivo (Carter & Shieh, 2015)

El límite teórico de resolución de un microscopio es de aproximadamente 0.2  $\mu\text{m}$ , pero en la práctica es difícil obtener mediciones confiables por debajo de 1  $\mu\text{m}$ . Otro de los inconvenientes de la microscopía óptica es la posibilidad de que la preparación de la muestra altere la estructura de la muestra analizada. Sin embargo, puede proporcionar información valiosa sobre la distribución del tamaño de las partículas, para distinguir fenómenos como la floculación y la coalescencia que suelen ser difíciles de detectar por técnicas que se basan en la dispersión de la luz (McClements, 2015).

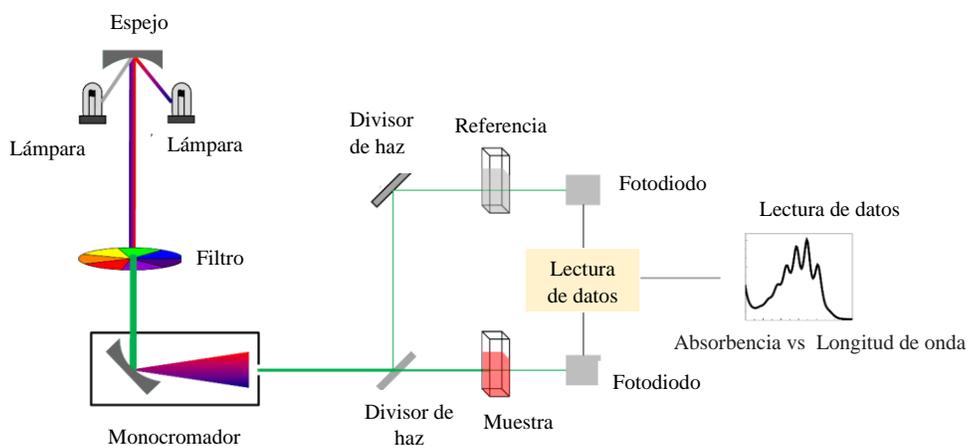
En la actualidad, la mayoría de los microscopios ópticos modernos están conectados a computadoras personales que pueden almacenar y analizar imágenes digitales rápidamente y, por lo tanto, facilitar su operación.

### **2.4.3. Espectroscopía UV/visible**

La espectroscopía UV/vis es una técnica que permite medir diversas interacciones entre la energía radiante y la materia, una de ellas es la absorción, en un intervalo de longitud de onda de 200-780 nm. La absorción de la luz UV/vis está condicionada a moléculas con grupos que presentan transiciones electrónicas. El análisis cuantitativo basado en la espectroscopía de UV/vis se describe mediante la ley de Lambert-Beer que consiste en la correlación entre la cantidad de luz absorbida por la muestra y la concentración del compuesto o molécula absorbente en la matriz en un intervalo

lineal. Las mediciones analíticas pueden ser afectadas por diferentes factores, como la naturaleza compleja de la muestra, debido a que la matriz puede contener sustancias interferentes. Por otra parte, las mediciones deben realizarse en disoluciones homogéneas, debido a que las disoluciones heterogéneas pueden provocar interferencias por absorción y dispersión de la luz debido a partículas suspendidas en el medio (Power et al., 2019).

El espectrofotómetro de UV/vis de doble haz tiene una fuente que emite todas las frecuencias de la luz UV/vis, posteriormente un monocromador selecciona una longitud de onda de luz, la cual se separa en dos haces. Un haz pasa a través de la celda de la muestra, mientras que el otro pasa a través de la celda de referencia. El detector mide la relación de los dos haces y esta información es procesada como una relación de absorbencia *versus* longitud de onda que da origen a un espectro de UV/vis (Wade, 2011), Figura 13.



**Figura 13.** Diagrama básico de espectroscopía de UV-Visible<sup>5</sup>

## 2.5. Cuantificación de la eficiencia de la encapsulación

*Eficiencia de encapsulación (EE)*. La EE se calcula como una relación entre la cantidad de compuesto bioactivo presente en las microcápsulas respecto al compuesto bioactivo utilizado inicialmente en su producción (Raveern et al., 2015). La eficiencia de encapsulación se calcula de la manera siguiente:

$$\% EE = \frac{(TCB - SCP) \times 100}{TCB}$$

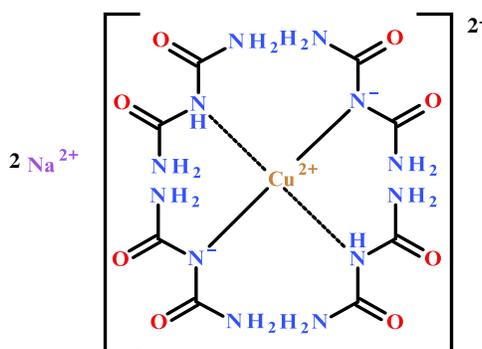
<sup>5</sup> <https://miseptiembrerojo.wordpress.com/2018/01/29/espectroscopia-uv-visible-uv-vis/>. Consultado el 10/12/2020

Donde, TCB = contenido del compuesto bioactivo de una cantidad conocida de microcápsulas después de la ruptura, y SCP = contenido del compuesto bioactivo en la superficie de las microcápsulas.

## 2.6. Cuantificación de proteína por Biuret

Para determinar la cantidad de proteína en los alimentos, es importante contar con métodos analíticos estandarizados. En la industria alimentaria, existen varios métodos para cuantificar el contenido de proteínas, estos incluyen los métodos de Kjeldahl y los métodos de medición directa que utilizan espectroscopía UV/vis; Biuret, Bradford y Lowry. Estos últimos son fáciles de usar, no son costosos y pueden cuantificar pequeñas cantidades de proteína (Hayes, 2020).

El método de Biuret se basa en la formación de un complejo de  $\text{Cu}^{2+}$  con los grupos funcionales de los enlaces peptídicos de la proteína a partir del reactivo de Biuret- $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 14). La formación de un complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína requiere dos enlaces peptídicos y produce un quelato de color violeta, producto que se mide por espectroscopía de absorción a 540 nm. También es posible realizar determinaciones de proteína a longitudes de onda de hasta 650 nm (Hortin & Meilinger, 2005). Siempre y cuando el intervalo de concentración evaluado manifieste un comportamiento lineal con respecto a la concentración del total de proteínas. Esta relación permite una curva estándar que es utilizada para calcular la concentración de una muestra desconocida (Keppy & Allen, 2009).



**Figura 14.** Quelato violeta formado a partir de la reacción de cuatro moléculas del reactivo de Biuret con una disolución alcalina de  $\text{CuSO}_4$ <sup>6</sup>.

<sup>6</sup> <https://study.com/academy/lesson/what-does-biuret-test-for-method-equation.html>



## Capítulo 3. Metodología

En esta sección se presenta el proceso empleado para la obtención de microcápsulas de los extractos de *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme ricos en compuestos fenólicos y licopeno.

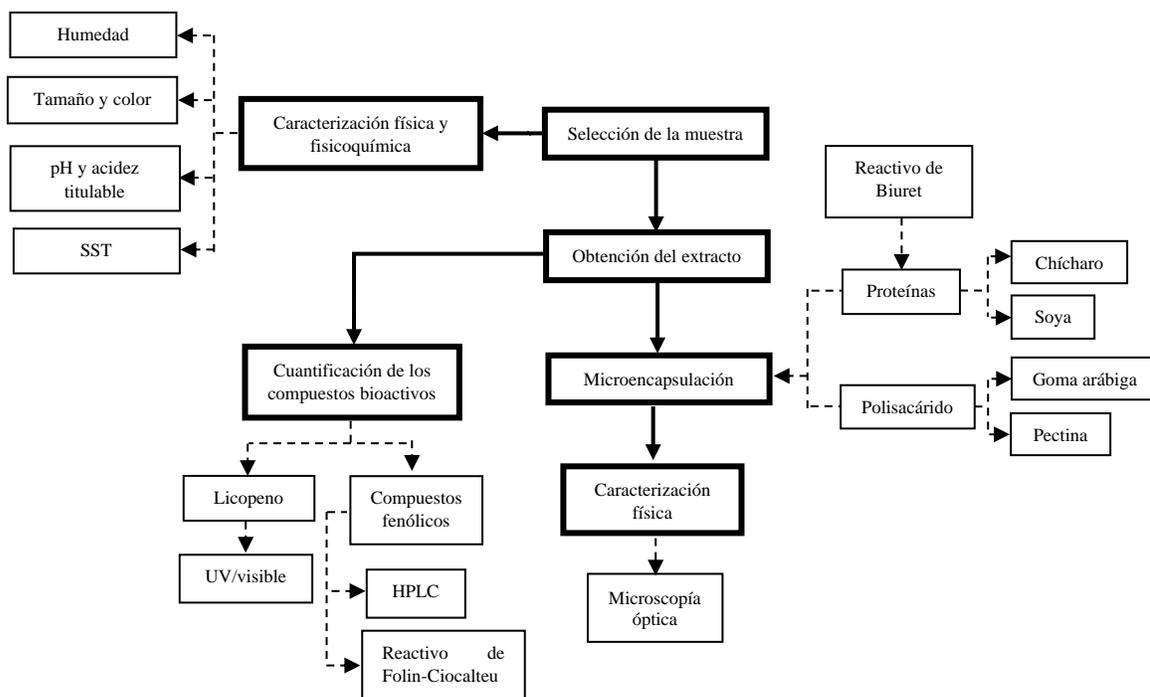


Figura 15. Esquema general de la metodología que se utilizó en este proyecto.

### 3.1. Materiales, reactivos y equipos

#### 3.1.1. Materiales, reactivos y disolventes

**Material vegetal.** Para el presente estudio se utilizó el jitomate cherry Rubino Top (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme). El fruto fue recolectado de un invernadero el viernes 10 de junio del 2021, ubicado en la comunidad San Baltazar Chichicapam perteneciente al Municipio de Ocotlán, Oaxaca, México. Localización: 47°33'11"N 10°44'07"E, 275 MSNM. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Agroindustrias el 13 de junio del 2021.

**Reactivos.** Albúmina de huevo (99.8 %), azida de sodio (99.7 %), lauril sulfato de sodio; tartrato de Na y K (99.0-102.0 %), todos de la marca FAGALAB; ácido ferúlico (99.0 %), ácido *p*-hidroxibenzoico ( $\geq 99.0$  %), ácido cafeico ( $\geq 98.0$  %), ácido *p*-cumárico ( $\geq 98.0$  %), quercetina ( $\geq 95.0$  %), ácido clorhídrico ( $\geq 37.0$  %), ácido gálico monohidratado (98 %), 2,6-di-*tert*-butil-4-

metilfenol (BHT) todos de la marca Sigma-Aldrich; fosfato monobásico de sodio cristales (100.2 %), yoduro de potasio (99.5 %) ambos de la marca J.T. Baker; fosfato dibásico de sodio dodecahidratado cristales, sulfato cúprico (99.0 %) ambos de la marca Baker Analyzed; aceite de aguacate, carbonato de sodio (Bashkir Soda company), cloruro de sodio anhidro (Merck,  $\geq 99.5$  %), ftalato ácido de potasio (Merck), goma arábica (Quial, 100.0 %), hidróxido de sodio (Golden Bell, 98.0 %), pectina de alto grado de esterificación (Ma Baker and Chef, lote 62433.1), proteína de chícharo (lote 040119, 80.0 %), proteína aislada de soya (Food Technologies Trading, lote 20200727, 90.0 %), reactivo de Folin-ciocalteu (Fluka, 2M), transglutaminasa MCS.

*Disolventes.* Acetona ( $\geq 99.5$  %), metanol (98.2 %), ambos de Química Rique S.A. de C.V.; acetonitrilo (J.T. Baker, 99.98 %), etanol (Conquimex, 96 %), hexano (Meyer,  $\geq 98.5$  %), tolueno (Sigma-Aldrich,  $\geq 99.5$  %), agua tipo 1.

### **3.1.2. Equipos**

Agitador de vórtex (IKA modelo: VORTEX 3); balanza analítica (Sartorius, modelo: BL 210 S); batidora de inmersión (BRAUN); bomba de vacío (vacuubrand, modelo: MZ 2C); centrífuga (CAPP-Rondo, modelo: CR-68X); centrífuga (VELAB prime); centrífuga (AOSHEN, modelo: Mlnl-10k); espectrofotómetro colorímetro (HunterLab UltraScanVis); espectrofotómetro de FT-IR-ATR (Bruker, modelo: Alpha platinum); espectrofotómetro UV/vis (WAVELENGTH, modelo: 721); evaporador rotatorio (BUCHI, Modelo: R-3); evaporador rotatorio (IKA, modelo: RU10); fuente de sodas (OSTER, modelo 002523-013-00); horno de secado y esterilizado (PRENDO, modelo: HSCF-30); Sistema de HPLC (GBC Scientific Equipenmet Pty Ltd, Australia) constituido de una bomba de gradiente cuaternario (GBC LC 1150), un detector de UV/vis GBC LC 1205, un degasificador de disolventes (GBC Scientific Equipment, LC 1460), una precolumna de fase reversa C18 (GL Science Inertsil ODS-3, 5  $\mu\text{m}$ , 10 mm x 4.6 mm) y una columna C18 de 4.6 mm x 250 mm (GL Science Inertsil ODS-3, 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4.6 mm, C/N 5020-01732 S/N 2EI86110), equipado con el software PCChrom versión 4.7.0 (H&A Scientific, Inc., USA) empleado como interfase; lector de microplacas (BioTek Instruments, modelo: ELx808); microscopio óptico (Omax, modelo: DC5V); minimezclador (Norpro); parrilla de agitación (Thermolyne, modelo: SP-131325); potenciómetro (Ohaus, modelo: Started 3100);

refractómetro (Abbe); baño de ultrasonido (Ultrasonic Cleaner, modelo: SB-3200 DTN); baño de ultrasonido (Baku, modelo: Bk 2400); vernier digital.

### 3.2. Caracterización física de la muestra de jitomate cherry

Los jitomates cherry (*S. lycopersicum* var. cerasiforme) se seleccionaron después de una inspección visual en función del tamaño y el color, verificando que los frutos no presentaran daños físicos y se encontraran en una tonalidad rojiza del 60-90 % de su superficie de acuerdo con la escala de colores de la USDA, (1997). Posteriormente, se lavaron con jabón y agua.

El tamaño del fruto se midió con un vernier digital y posteriormente, se calculó la relación entre el diámetro ecuatorial y el diámetro axial. Los jitomates que presentaron una variación igual o menor al 5 % con respecto a la media poblacional de la relación  $d_p/d_e$ , fueron utilizados para realizar las pruebas posteriores.

Para determinar el volumen de los jitomates se utilizó el método del desplazamiento de tolueno, el cual consistió en colocar 60 mL de tolueno dentro de una probeta de 100 mL y posteriormente, sumergir dentro un jitomate. El volumen del jitomate se calculó realizando la diferencia entre el volumen final del tolueno en la probeta después de sumergir el jitomate y volumen inicial de tolueno presente en la probeta. La determinación se realizó a 10 diferentes jitomates seleccionados al azar y el contenido se expresó como el promedio de todas las mediciones  $\pm$  desviación estándar (Ukey et al., 2010).

Los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  de la muestra se midieron a 10 diferentes frutos en un colorímetro espectrofotómetro; utilizando el iluminante D65, un ángulo de visión de  $10^\circ$  y con un diámetro de observación de 1.25 cm. Estos parámetros se utilizaron para calcular el ángulo de tono  $h_{ab}^\circ$  y el valor de cromaticidad  $C_{ab}^*$ , con las fórmulas siguientes (Julián-Loeza et al., 2011):

$$h_{ab}^\circ = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right)$$

$$C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$$

### 3.3. Caracterización fisicoquímica de la muestra de jitomate cherry

*Porcentaje de humedad* (AOAC 934.06). Se pesaron  $5.0 \pm 0.1$  g de jitomate cherry en crisoles previamente llevados a peso constante. Después, las muestras fueron colocadas en un horno a  $105^{\circ}\text{C}$  durante 6 h. Posteriormente, las muestras secas se colocaron en un desecador durante 10 min a temperatura ambiente y condiciones anhidras para finalmente ser pesadas. La humedad se reportó en porcentaje. Las determinaciones se realizaron por triplicado y el contenido de humedad reportado fue el promedio de las tres mediciones  $\pm$  desviación estándar.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Masa húmeda del jitomate (g)} - \text{Masa seca del jitomate (g)}}{\text{Masa húmeda del jitomate (g)}} \times 100$$

Dentro de las características fisicoquímicas de los jitomates cherry se evaluaron el contenido de sólidos solubles totales, la acidez titulable y el pH.

*Contenido de sólidos solubles totales* (Angón-Galván, 2006). Primero, el refractómetro se calibró. Para esto, en el prisma de Amici se colocó agua tipo 1 procurando cubrir completamente la superficie de este. Posteriormente, se cerró el cubreobjetos y se ajustó el tornillo de ajuste de manera que la línea de división blanco/azul coincidiera con la línea de cero  $^{\circ}\text{Brix}$ . Finalmente se limpió la superficie con un pañuelo de papel. Una vez realizada la calibración, al puré del jitomate previamente elaborado se centrifugó por 10 min a 900 g y dos gotas del sobrenadante se colocaron sobre el prisma. Finalmente, los sólidos solubles se midieron y se expresaron en  $^{\circ}\text{Brix}$ . Las determinaciones se realizaron por triplicado y el contenido se expresó como el promedio de las tres mediciones  $\pm$  desviación estándar.

*Acidez titulable por un método potenciométrico* (Nielsen, 2017). Para la determinación de la acidez titulable, en un vaso de precipitados de 100 mL se agregaron 20 mL del puré de jitomate y 50 mL de agua libre de  $\text{CO}_2$ . El vaso de precipitados se colocó sobre una parrilla de agitación y se introdujo un electrodo a la disolución. Posteriormente, la muestra se tituló con una disolución valorada de  $\text{NaOH}$  0.1 N, agitando la disolución continuamente con ayuda de una barra de agitación magnética. El pH de la muestra se registró previo al inicio de la titulación y después de adicionar volúmenes de disolución de  $\text{NaOH}$  0.1 N a intervalos de 0.5 mL. Las lecturas de pH se registraron después de un tiempo de reposo de 1.5 min. La titulación se concluyó cuando la disolución de la muestra alcanzó un pH de 9.0. Por último, se construyeron curvas de volumen de agente titulante vs el pH

y volumen *vs* dpH/dV. Las determinaciones se realizaron por triplicado, y se expresaron como el promedio  $\pm$  desviación estándar.

La acidez titulable (TA) se expresó como % de ácido cítrico.

$$\% \left( \frac{m}{m} \right) \text{ de ácido cítrico} = \frac{N \times V \times mEq}{m \times 1000} \times 100$$

Donde, N = Normalidad del NaOH (mEq/mL), V = Volumen de NaOH (mL), mEq = masa equivalente del ácido cítrico (64.06 mg/mEq), m = masa de muestra (g) y 1,000 = Factor que relaciona mg con gramos (mg/g).

*El pH* (AOAC 981.12), Primeramente, se realizó una homogeneización de la muestra molida y posteriormente se leyó el pH con un potenciómetro previamente calibrado. Las determinaciones se realizaron por triplicado y el contenido fue el promedio de las tres mediciones  $\pm$  desviación estándar.

Para llevar a cabo las pruebas posteriores se efectuó una homogeneización de la muestra mediante la realización de una molienda durante 3 min para posteriormente realizar una pausterización lenta a  $75 \pm 3$  °C durante 5 min (Deak, 2014).

### **3.4. Obtención del extracto de jitomate cherry**

Una vez caracterizada físicamente la fruta se procedió a la obtención de un extracto rico en licopeno y compuestos fenólicos. La obtención del extracto se llevó a cabo de acuerdo con el método utilizado por Jiménez-Durán et al. (2020) con algunas modificaciones. A una mezcla de 4 g del puré de jitomate cherry y 30 mL de una disolución de etanol:acetona 2:3 % (v/v) se sonicó durante 30 min a temperatura ambiente; después, se retiró el sobrenadante y los sedimentos se volvieron a extraer por una segunda y tercera vez, de forma consecutiva. Para asistir la extracción, las mezclas antes mencionadas se sonicaron durante 15 min con 30 mL y 10 mL de una disolución de etanol:acetona 2:3 % (v/v), respectivamente. Los sobrenadantes se filtraron a través de un papel filtro de 0.45  $\mu$ m. A continuación, los filtrados se recuperaron, se combinaron y se evaporaron a vacío en un evaporador rotatorio a 40 °C, hasta que se obtuvo el extracto libre de disolvente como un líquido viscoso de color rojizo. Finalmente, este extracto se almacenó a -20 °C para su conservación hasta su uso posterior.

## **3.5. Determinación de licopeno y fenoles en el extracto de jitomate cherry**

### **3.5.1. Cuantificación de licopeno**

*Disolución al 0.05 % de hidroxitolueno butilado (BHT).* Para inhibir la oxidación del licopeno durante la etapa de cuantificación, se utilizó una disolución de BHT. En un matraz aforado de 10 mL se colocaron 10 mg del antioxidante y se aforó con acetona. A partir de esta disolución se preparó el BHT al 0.05 %.

*Disolución de etanol acuoso al 95 % (v/v).* En un matraz volumétrico de 50 mL se colocaron 2.5 mL de agua y se aforó con etanol.

La cuantificación de licopeno se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Santos-Sánchez et al. (2012). A  $80 \pm 1$  mg de los extractos obtenidos en la sección 3.4 se les adicionaron 5 mL de BHT al 0.05 % en acetona. Posteriormente, se agregaron 5 mL de etanol acuoso al 95 % (v/v) y 10 mL de hexano. Los tubos con la mezcla anterior se agitaron con vórtex durante 10 min para la extracción de licopeno. Una alícuota de 3.5 mL del sobrenadante fue transferida a una celda espectrofotométrica de cuarzo. Posteriormente, se midió la absorbencia del sobrenadante en un espectrofotómetro de UV/vis a 503 nm contra un blanco de hexano. El contenido de licopeno presente en el extracto de jitomate se calculó de acuerdo a Fish et al. (2002), empleando la ecuación siguiente:

$$\text{Licopeno} \left( \frac{\text{mg}}{100\text{g muestra}} \right) = \left( \frac{A_{503} \times 312}{\text{g muestra}} \right)$$

Las determinaciones se realizaron por triplicado y el contenido se expresó en mg/100 g de muestra seca y fue el promedio de las tres mediciones  $\pm$  desviación estándar.

### **3.5.2. Cuantificación de los compuestos fenólicos totales**

*Disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 0.5 % (m/v).* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 50 mg de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y después el matraz se aforó con agua tipo 1.

*Reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M.* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M y posteriormente el matraz se aforó con agua tipo 1.

*Disolución stock ácido gálico 100 µg/mL.* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 10 mg de ácido gálico y después el matraz se aforó con agua tipo 1. A partir de esta disolución se preparó la disolución ácido gálico de 100 µg/mL.

*Disoluciones estándares de ácido gálico.* La preparación de los cinco estándares a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL se llevó a cabo partiendo de la disolución de 100 µg/mL de ácido gálico.

*Disolución del extracto.* En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 40 mg de extracto obtenido en la sección 3.4 después el matraz se aforó con etanol al 90 %.

Para la cuantificación de TPC presentes en el extracto se utilizó el método reportado por Oropeza-Guerrero, (2012). En una microplaca de 96 pozos con capacidad de 360 µL, se colocaron 40 µL de la disolución del extracto o del estándar y se le adicionaron 40 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 0.1 M. Posteriormente, la microplaca se dejó reposar por 3 min a temperatura ambiente y se agitó por 15 s a velocidad baja en el lector de microplacas. Transcurrido este tiempo, a la mezcla se le adicionaron 40 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 0.5 %, se dejó reposar 30 min a 40 °C y se agitó por 1 min a velocidad media. Al blanco de la muestra o del estándar se le adicionó agua en lugar del reactivo de Folin-Ciocalteu. Para el blanco del estándar se utilizó el estándar de 25 µg/mL. La lectura de absorbencia se determinó a una longitud de onda de 750 nm. La curva de calibración se construyó con los datos de absorbencia de los estándares de ácido gálico y a partir de la ecuación de calibración se obtuvo el contenido de fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE/100 g masa de muestra seca). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y el contenido de compuestos fenólicos en la muestra fue expresado como el promedio ± desviación estándar.

### **3.5.3. Cuantificación de los compuestos fenólicos mayoritarios por HPLC**

#### **Preparación de la muestra**

A 3 g de jitomate se le realizó la extracción de los compuestos fenólicos y licopeno de acuerdo con la sección 3.4. Los extractos obtenidos se conservaron en un matraz bola de 250 mL. A continuación, al matraz que contenía al extracto se le adicionaron 12.5 mL de etanol, 12.5 mL de acetona, 25 mL de hexano y 3.5 mL de agua tipo 1. Esta mezcla se agitó en vórtex durante 1.5 min

para promover la separación de la fase polar de la no polar contenidas en el extracto. A continuación, esta mezcla se retiró del matraz y se resguardó en ausencia de luz. Para asegurar la completa recuperación del extracto contenido en el matraz se adicionaron 6 mL de etanol, 6 mL de acetona y 1.5 mL de agua tipo 1, y la mezcla se sonicó durante 30 s. Posteriormente, los dos extractos se combinaron y se colocaron en un embudo de separación para retirar la fase no polar rica en licopeno de la fase polar rica en los compuestos fenólicos de interés. Esta última fase se evaporó en un evaporador rotatorio a 40 °C y presión reducida. Esta fracción de fenoles, libre de disolvente se llevó a un volumen de 1 mL empleando como disolvente la mezcla de agua/acetonitrilo/ácido fórmico/metanol 81.60:16.81:1.16:0.43 % (v/v). Esta disolución se filtró a través de acrodiscos de 0.45 µm antes de ser inyectada al HPLC. Para el caso del ácido clorogénico se utilizó un factor de dilución tres, mientras que para todos los demás ácidos el factor de dilución fue uno. Las fracciones ricas en compuestos fenólicos se prepararon por duplicado

La cuantificación de ácidos fenólicos libres se realizó en un sistema de HPLC. La separación de los ácidos fenólicos se realizó en una columna C-18 de fase reversa, empleando una precolumna C-18 para maximizar la vida útil la columna.

Los estándares cuantificados fueron los ácidos gálico, clorogénico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico, *p*-cumárico y ferúlico. Para cada estándar se realizó una curva de calibración con un intervalo de concentración de 10–30 µg/mL. Tanto para los estándares como para la muestra se utilizó un volumen de inyección de 20 µL y un flujo de 1 mL/min, empleando como fase móvil agua/acetonitrilo/ácido fórmico/metanol 81.60:16.81:1.16:0.43 % (v/v) en una corrida isocrática y utilizando una longitud de onda de 280 nm. Todos los disolventes se destilaron, desgasificaron y filtraron a través de un filtro de 0.45 µm y utilizando una bomba de vacío a 0.04 MPa antes de su uso.

A partir de las ecuaciones de regresión lineal de los datos de concentración vs absorbencia de los estándares se calculó el contenido de los ácidos gálico, clorogénico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico, *p*-cumárico y ferúlico de las muestras. Las concentraciones de cada uno de los compuestos se expresaron como mg del compuesto de interés/100 g masa de muestra seca. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y el contenido fue el promedio ± desviación estándar (Jiménez-Durán et al., 2020).

### **3.6. Cuantificación de proteína soluble por el método modificado de Biuret**

*Disolución de NaOH 6 M.* En un matraz volumétrico de 50 mL se colocaron 11.999 g de NaOH y después el matraz se aforó con agua tipo 1.

*Disolución de Tartrato alcalino.* En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 0.225 g de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 0.125 g de KI. Después se añadieron 2.5 mL de NaOH 6 M y el matraz se aforó con agua tipo 1. La disolución se transfirió a un frasco de plástico y se almacenó a 4 °C.

*Reactivo de Biuret.* En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 75 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.225 g de  $\text{KNaH}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 0.125 g de KI. Después se añadieron 2.5 mL de NaOH 6 M y se aforó con agua tipo 1. El reactivo de Biuret se transfirió a un frasco de plástico y se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso.

*Disolución stock de albúmina.* Se mezclaron 0.250 g de albúmina al 99.8 % y 10 mg de lauril sulfato de sodio en 8 mL de NaOH 6 M y se dejó en agitación durante 24 h con barra de agitación magnética. En el transcurso de la primera hora, la mezcla se agitó cada 30 min en vortex por 1 min, seguido de una agitación en un baño de ultrasonido durante 3 min. Finalizado este tiempo, la disolución se aforó a 10 mL y posteriormente se le efectuó una centrifugación durante 25 min a 2000 g. Al sobrenadante resultante se le realizó nuevamente una centrifugación en iguales condiciones. Por último, se llevó a cabo una filtración empleando acrodiscos de 0.45  $\mu\text{m}$ .

**Curva de calibración.** A partir de esta disolución stock de albúmina se prepararon disoluciones a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/mL para la construcción de la curva de calibración. Posteriormente, en una microplaca de 96 pozos con capacidad de 360  $\mu\text{L}$ , se colocaron 30  $\mu\text{L}$  de cada uno de los estándares y 120  $\mu\text{L}$  del reactivo de Biuret. Para la preparación del blanco de la curva se añadieron 30  $\mu\text{L}$  del estándar de 25 mg/mL y 120  $\mu\text{L}$  de tartrato de sodio alcalino. Por último, la microplaca se colocó en el lector de microplacas, dejando reposar por 1 min para posteriormente llevar a una agitación rápida por 5 min. La lectura de absorbencia se determinó a una longitud de onda de 595 nm, para minimizar interferencias por pigmentos presentes en la matriz de la muestra. Las determinaciones se realizaron por triplicado y el contenido fue el promedio de las tres mediciones  $\pm$  desviación estándar (Guzmán-Martínez, 2020).

**Disolución de proteína de soya.** 150 mg de proteína de soya al 90 % se mezclaron con 10 mg de lauril sulfato de sodio en 8 mL de NaOH 6 M. La mezcla se dejó en agitación 24 h con barra de agitación magnética a temperatura ambiente y con exposición a la luz. Posteriormente, la mezcla se sometió a las mismas condiciones que la disolución stock de albúmina, *vide supra*. Las reacciones colorimétricas con el reactivo de Biuret, mediciones de absorbencia y las cuantificaciones de proteínas se realizaron de acuerdo con el procedimiento empleado para los estándares.

**Proteína de chícharo desengrasada.** Para el desengrasado de la proteína de chícharo se pesó  $1 \pm 10$  mg de proteína de chícharo al 80 % en un tubo de ensayo y se le adicionaron 5 mL de acetona. Posteriormente se sonicó por 12 min y se centrifugó a 1300 g por 15 min. A continuación, se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso una segunda vez.

**Disolución de proteína de chícharo.** 150 mg de proteína de chícharo al 80 % desengrasada se mezclaron con 8 mL de NaOH 6 M. Esta mezcla se dejó en agitación durante 24 h con barra de agitación magnética a temperatura ambiente. Durante la primera hora de ese período de tiempo, cada 30 min la mezcla se agitó con vórtex 3 min seguida de una sonicación de 3 min. Transcurridas las 24 h de agitación, la disolución se aforó a 10 mL y posteriormente se le efectuó una centrifugación de 25 min a 2000 g. Al sobrenadante resultante se le realizó nuevamente una centrifugación en iguales condiciones.

Para la determinación de la absorbencia se colocaron 0.2 mL de la disolución de proteína de chícharo y 0.8 mL del reactivo de Biuret en un tubo para microcentrífuga, se agitó 10 s en vórtex y se dejó reposar 20 min. Posteriormente, la proteína insoluble presente en la mezcla de reacción se retiró empleando un acrodisco con una membrana de  $0.45 \mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{L}$  del filtrado se colocaron en una microplaca. Para la preparación del blanco se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de la mezcla y 120  $\mu\text{L}$  de tartrato de sodio alcalino. Por último, la microplaca se colocó en el lector de microplacas, dejando reposar por 1 min, para después llevar a una agitación rápida por 5 min. La lectura de absorbencia se determinó a una longitud de onda de 595 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado y el contenido fue el promedio de las tres mediciones  $\pm$  desviación estándar.

Con las absorbencias obtenidas de las cinco disoluciones a diferentes concentraciones se obtuvo la ecuación de regresión lineal. La concentración de proteína en los aislados se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ aislado de proteína} = \frac{\text{mg de proteína/mL}}{\text{mg de muestra/mL}} * 100$$

### 3.7. Obtención de las microcápsulas

**Disolución de proteína de chícharo al 2.5 % (m/v).** Se pesaron 3.456 g de proteína de chícharo desengrasado y 0.01 g de azida de sodio. Posteriormente, se disolvieron en 100 mL de fosfato de sodio 0.2 M a pH = 8 y se dejó agitando durante 12 h en parrilla magnética. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 30 min a 1300 g y se realizó la recuperación del sobrenadante.

**Disolución de proteína de soya al 2.5 % (m/v).** Se pesaron 2.968 g de proteína de soya y 0.01 g de azida de sodio. Posteriormente, se disolvieron en 100 mL de fosfato de sodio 0.2 M a pH = 8 y se dejó agitando durante 12 h en parrilla magnética. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 30 min a 1300 g y se realizó la recuperación del sobrenadante.

**Disolución de polisacáridos al 2.5 % (m/v).** Se pesaron 2.5 g de del polisacárido (goma arábica o pectina) y se disolvieron en 100 mL de agua tipo 1. Posteriormente, para el caso de la disolución de goma arábica se centrifugó durante 20 min a 1300 g y se realizó la recuperación del sobrenadante.

**Disolución del extracto de jitomate al 3 % (m/v).** Se pesaron 0.75 g de extracto de jitomate obtenidos en la sección 3.4 y se disolvieron en 25 mL de agua tipo 1.

**Disolución de lecitina en aceite al 4.5 % (m/v).** Se pesaron 1.75 g de lecitina y se disolvieron en 50 mL de aceite de aguacate.

**Proceso de microencapsulación.** Para obtener el proceso de microencapsulación propuesto en el presente trabajo se utilizaron como punto de partida los métodos descritos por Shaddel et al. (2018) y Mutaliyeva et al. (2017). Los tensoactivos (PGPR y tween 80) usados por los autores antes mencionados se sustituyeron por lecitina y/o carboximetilcelulosa debido a que son más accesibles en el mercado y son GRAS. Además, se variaron las concentraciones de cada uno de estos tensoactivos hasta lograr estabilizar las emulsiones simples (w/o) y dobles (w/o/w). Después de realizar una serie de pruebas se encontró que, de todas las condiciones evaluadas para la obtención de las microcápsulas, las mejores están descritas en los cuatro pasos siguientes:

**Primer paso** (Formación de emulsión simple *w/o*). A 50 mL de una disolución al 3 % (*m/v*) de extracto de jitomate se le adicionaron 100 mL de una disolución de lecitina al 4.5 % (*m/v*). Posteriormente, la mezcla se homogeneizó a 13,500 rpm durante 2 min.

**Segundo paso** (Formación de la emulsión doble *w/o/w* y la reticulación enzimática). Para ello, a 250 mL de la disolución de proteína (de chícharo o de soya) al 2.5 % (*m/v*), se le añadieron 50 mL de la emulsión simple obtenida en el paso 1. La emulsión doble se preparó a 13,500 rpm durante 1 min. Posteriormente, se le adicionaron 8 g de enzima TGasa y se agitó 3 h a 450 rpm. Transcurrido este tiempo, se retiraron 10 mL del sobrenadante con 50 mL del medio y se resguardaron en refrigeración para su posterior análisis por microscopía óptica. Por último, a la mezcla restante se le adicionó la carboximetilcelulosa al 0.04 g y se agitó 15 min a 450 rpm con una barra de agitación magnética.

**Tercer paso** (Formación de la cubierta). A la emulsión *w/o/w* formada en el segundo paso se le adicionaron 200 mL de la disolución de polisacárido (Goma arábica o pectina) al 2.5 % (*m/v*). Posteriormente la mezcla se agitó durante 15 min a 450 rpm con una barra de agitación magnética.

**Cuarto paso** (Coacervación compleja). A la disolución obtenida en el tercer paso se le realizó un ajuste de pH a  $4.00 \pm 0.03$  mediante la adición lenta de HCl 1 M. El seguimiento del pH se llevó a cabo con un potenciómetro manual. Finalmente, la mezcla se almacenó en refrigeración a 4 °C.

### **3.8. Pruebas de ruptura de las microcápsulas**

Para generar la ruptura de las microcápsulas se suspendieron 2 mL de microcápsulas en 5 mL de una disolución metanol: NaCl acuoso al 10 % 1:1 (*v/v*) o en acetona. Estas mezclas se sonicaron durante un período de 30 min. Para evaluar la ruptura de las microcápsulas, se sometieron a un análisis de microscopía óptica de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 3.10. Las pruebas se realizaron por duplicado.

### **3.9. Análisis de la morfología y distribución de tamaño de partículas**

Para la obtención del tamaño de las emulsiones dobles y de las microcápsulas. Se tomaron 20  $\mu$ L del coacervado y 10  $\mu$ L de la fase de equilibrio en un tubo eppendorf y se agitó manualmente durante 10 s para suspender los coacervados en el medio. Posteriormente, se colocaron alrededor

de 4  $\mu\text{L}$  de la mezcla en un portaobjetos de vidrio y se observó en un microscopio con un aumento 100x. Para el procesamiento de la imagen se utilizó el software imageJ 1.5.0. de acuerdo al procedimiento descrito en el *Ápndice I* (Ach et al., 2015). El tamaño fue reportado como el promedio del diámetro de las tres mediciones  $\pm$  desviación estándar.

### **3.10. Análisis estadístico**

#### **3.10.1. Procedimiento para el análisis de los datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación por espectrofotometría y HPLC**

A partir de los datos obtenidos para cada uno de los estándares, se evaluó la correlación entre la variable dependiente e independiente a través de la Prueba de correlación de Pearson. Posteriormente, se utilizó la Prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de la varianza de los datos iniciales (Fox & Weisberg, 2019). Cabe mencionar que cuando los datos resultaron homocedásticos se aplicó una regresión lineal simple y, en caso contrario se aplicó una regresión lineal ponderada.

A continuación, se generó la gráfica de regresión lineal con su respectiva ecuación y por consiguiente, se procedió a realizar la validación y diagnóstico del modelo. Para ello, como primer paso se realizó la comprobación de que los coeficientes fueran significativos y como segundo paso, la comprobación de cuatro supuestos: linealidad, normalidad, homocedasticidad e independencia en los residuos.

En el primer paso, se planteó como hipótesis nula que el valor de alguno de los coeficientes de la ecuación de regresión lineal simple pudieran ser cero y por tanto, los valores encontrados se deban a fluctuaciones aleatorias. Por lo cual, se esperaba que la hipótesis nula fuera rechazada para ambos casos y por tanto, el modelo de regresión lineal puede ser aplicado.

El segundo paso se realizó a través de métodos gráficos e inferenciales a los residuos generados del modelo de regresión lineal correspondiente (*R Core Team*, 2021). El supuesto de linealidad se confirmó a través del diagrama de dispersión, el cual mostró una relación lineal entre la variable dependiente e independiente. El supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la Prueba Breusch-Pagan (Zeileis & Hothorn, 2002) y, las gráficas residuos *vs* valores ajustados y escala-

ubicación (Tang et al., 2016). Asimismo, el supuesto de normalidad se demostró por medio de la Prueba de Shapiro-Wilk (*R Core Team*, 2021) y la gráfica cuantil-cuantil (Q-Q) de residuos estandarizados (Tang et al., 2016). Finalmente, el supuesto de independencia se confirmó a través de las Prueba de Durbin-Watson (Fox & Weisberg, 2019) y Breusch-Godfrey (Zeileis & Hothorn, 2002).

Además, se evaluó la presencia de valores atípicos e influyentes a través de las gráficas de distancia de Cook ( $\text{Cook} > \frac{4}{n}$ ,  $n$  = número total de puntos de datos) (Hebbali, 2020), de residuos vs apalancamiento (Tang et al., 2016), gráficas de DFBETAS (valor de la diferencia en beta estandarizada,  $\text{DFBETAS} > \frac{2}{\sqrt{n}}$ ,  $n$  = número total de puntos de datos); para medir las diferencias en la estimación de cada parámetro con y sin el punto influyente (Hebbali, 2020), residuos estudentizados eliminados vs valores predichos (Hebbali, 2020) y los residuos estudentizados eliminados vs valores predichos ( $\text{Cook} > \frac{4}{n}$ ,  $n$  = número total de puntos de datos) (Hebbali, 2020).

### **3.10.2. Procedimiento para el análisis de los datos de tamaño de las microcápsulas**

Para determinar si las emulsiones y las microcápsulas seguían una distribución normal se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk y la de Jarque-Bera (*R Core Team*, 2021). Mientras que, para el caso de la comprobación de la homogeneidad de las varianzas se utilizó la prueba de Levene (Fox & Weisberg, 2019) y Bartlett (Fox & Weisberg, 2019).

Posteriormente para determinar si existían diferencias o similitudes entre los tratamientos se utilizaron métodos robustos. Estos métodos son menos potentes que los métodos paramétricos; sin embargo, son superiores a los métodos no paramétricos. Entendiendo como potencia, la capacidad para encontrar diferencias cuando existen. Su principal ventaja es que no se ve afectada por la falta de normalidad, homocedasticidad y la presencia de valores atípicos. Estas pruebas utilizan como medida de tendencia central a la mediana o estimadores  $M$  como el de Huber que emplea como estadístico de prueba la  $\Psi$  de Huber basada en la mediana, el cual fue empleado en este estudio (Wilcox, 2012).

## Capítulo 4. Resultados y discusión

### 4.1. Caracterización de la materia prima

#### 4.1.1. Caracterización fisicoquímica del jitomate cherry Rubino Top

Los resultados obtenidos para el jitomate cherry Rubino Top en lo que respecta a estos parámetros se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Caracterización física del jitomate cherry Rubino Top

Parámetro	Resultado
Diámetro ecuatorial (mm)	27.96 ± 1.97
Diámetro polar (mm)	25.81 ± 1.79
Índice de forma	0.92 ± 0.02
Masa (g)	13.78 ± 2.32
Volumen (mL)	13.67 ± 2.35
Densidad (g/mL)	1.01 ± 0.04
<i>L*</i>	36.75 ± 1.35
<i>a*</i>	14.73 ± 2.25
<i>b*</i>	20.49 ± 1.98
Angulo Hue ( <i>h</i> °)	54.32 ± 5.54
<i>C*</i>	25.34 ± 1.78

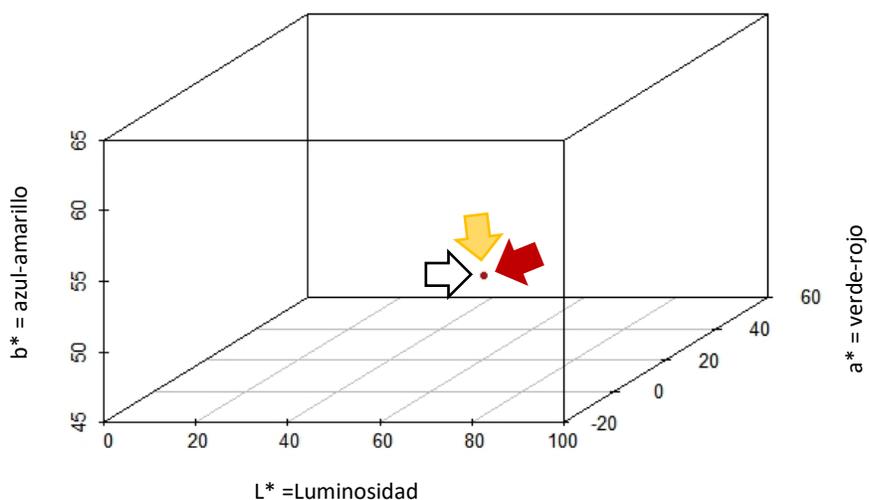
Valor medio de diez mediciones ± desviación estándar.

Cabe señalar que los comparativos realizados a continuación se llevaron a cabo con variedades de jitomates cherry con características similares a las estudiadas en el presente trabajo, debido a que no se encontró información en la literatura revisada sobre la caracterización física y fisicoquímica para la variedad Rubino Top.

*Masa.* La masa del jitomate cherry Rubino Top ( $13.78 \pm 2.32$  g) estudiado fue estadísticamente igual ( $p > 0.05$ ) a lo reportado por Pérez-Marín et al. (2021) para cuatro variedades diferentes de jitomates cherry tipo redondo (13.7-15.5 g), así como a lo reportado por Coyago-Cruz et al. (2019) (9-12 g) y Choi et al. (2014) (12-22 g), en ambos casos para seis variedades de jitomate cherry.

*Forma.* Con base en su índice de forma ( $0.92 \pm 0.02$ ) y de acuerdo con la norma mexicana NMX-FF-031-1997-SCFI el jitomate cherry Rubino Top del presente estudio es tipo bola ( $0.92 \pm 0.02$ ). Este resultado fue similar al reportado por Pérez-Marín et al. (2021) para los cultivares Katalina y Sweet Star (con un índice de forma de 0.95 y 1.00, respectivamente).

*Color.* En lo que se refiere al valor del parámetro  $b^*$ , éste aumenta desde la etapa verde del jitomate hasta la etapa rosa debido a la presencia de  $\beta$ -caroteno (predominando el color amarillo) y disminuye desde la etapa rosa hasta la etapa roja debido a la presencia del licopeno en el fruto, y como consecuencia, aumenta el parámetro  $a^*$  (Joung & Shin, 2021). Por lo cual, de acuerdo con esta información se puede decir que el fruto analizado presentó una coloración previa a la maduración. Dando como resultado que los valores de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  obtenidos para el jitomate cherry Rubino Top fueron valores similares a los reportados por (Pérez-Marín et al., 2021) para los cultivares Katalina y Sweet Star. En la Figura 16 se representa la ubicación de la muestra de jitomate cherry estudiada en el espacio de color  $L^*a^*b^*$  señalada con las flechas e indicando un color rojo relativamente intenso y una luminosidad alta.



**Figura 16.** Coordenadas  $L^*a^*b^*$  del jitomate cherry Rubino Top

Los resultados obtenidos para el jitomate cherry Rubino Top en lo que respecta a su caracterización fisicoquímica se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Caracterización fisicoquímica del jitomate cherry Rubino Top

Parámetro	Resultado
Humedad (%)	$89.490 \pm 0.001$
Sólidos solubles totales (° Brix)	$5.08 \pm 0.03$
pH	$4.24 \pm 0.02$
Acidez titulable (%)	$0.424 \pm 0.001$

Valor medio de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar

*Humedad.* El porcentaje de humedad de los frutos del jitomate cherry Rubino Top de este estudio ( $89.49 \pm 0.00$  %) fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) a lo reportado por Opara et al. (2012) ( $89.01 \pm 0.09$ ) (Tabla 12). Sin embargo, esta diferencia se debió principalmente a la baja dispersión de los valores obtenidos en el presente trabajo, las medias de ambos resultados apenas difieren en aproximadamente 0.4%.

*pH y Acidez titulable.* El pH de jitomate cherry Rubino Top de este estudio tuvo un valor de  $4.25 \pm 0.03$ , por lo cual cumplió con lo establecido en el CODEX STAN 57-1981 que señala para el jitomate un pH inferior a 4.6. Respecto a la acidez titulable se obtuvo un valor de  $0.424 \pm 0.001$  % de ácido cítrico, valor significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a lo reportado por Pérez-Marín et al. (2021) para las variedades Katalina y Sweet Star (0.108 y 0.115% de ácido cítrico, respectivamente) (Tabla 12). Estas diferencias se pueden atribuir principalmente a diferencias en el estado de madurez de los frutos.

*Sólidos solubles totales.* El valor de los sólidos solubles totales del jitomate cherry Rubino Top ( $5.08 \pm 0.03$  °Brix) (Tabla 12) fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a lo reportado por Coyago-Cruz et al. (2019) para las seis variedades de jitomate cherry reportadas (3 a 4 °Brix). Sin embargo, de acuerdo con lo reportado por Pérez-Marín et al. (2021) el contenido de sólidos solubles obtenidos en el presente estudio fue 0.5 veces menor con respecto a las variedades Katalina ( $8.88^\circ$  Brix) y Sweet Star ( $8.94^\circ$  Brix). Estas diferencias podrían deberse en gran medida a la variedad y al estado de madurez del fruto. De acuerdo a lo reportado por Opara et al. (2012), los °Brix de los jitomates cambian a lo largo de las diferentes etapas de maduración debido a que aumenta la cantidad de azúcares (fructosa y glucosa) presentes en el fruto. Por otra parte, cabe señalar que de acuerdo con lo reportado por De Oliveira et al. (2016), las concentraciones de sólidos solubles superiores a  $5.0^\circ$  Brix son un indicador de frutos de jitomates de calidad alta.

#### **4.1.2. Contenido de licopeno**

El contenido de licopeno total determinado para el extracto del jitomate cherry se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Contenido de Licopeno en jitomate cherry

<b>Jitomate cherry</b>	<b>mg Licopeno/100 g masa seca</b>	<b>Referencia</b>
Rubino Top	54.47 ± 3.74	En este estudio
Rubino Top	50	Lenucci et al. (2006)
Cereja	69.2 ± 0.9	Coyago-Cruz et al. (2019)

Valor medio de tres mediciones ± desviación estándar

Un estudio realizado por Lenucci et al. (2006) mostró una variación de entre 1 a 3 veces en el contenido de licopeno en 14 diferentes variedades de jitomate analizadas, donde el contenido de licopeno de la variedad Rubino Top fue de 50 mg de licopeno/100 g de masa seca, estadísticamente igual a lo obtenido por este estudio ( $p > 0.05$ ). Así mismo, Coyago-Cruz et al. (2019) obtuvo para el jitomate cherry cereja una cantidad de licopeno de  $69.2 \pm 0.9$  mg/100 g masa seca, un valor superior al encontrado en el jitomate estudiado en el presente trabajo ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.3. Contenido de compuestos fenólicos

El contenido total de compuestos fenólicos determinado para el extracto del jitomate cherry se muestra en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Contenido de fenoles totales en jitomate cherry

<b>Jitomate cherry</b>	<b>mg GAE/g extracto</b>	<b>mg GAE /100 g masa seca</b>	<b>Referencia</b>
Rubino Top	3.01 ± 0.14	117.98 ± 5.54	En este estudio
Rubino Top	-	1200	Lenucci et al. (2006)
var. Moscatel RZ	-	56.7	Fernandes et al. (2021)

mg GAE. Miligramos equivalentes de ácido gálico. Valor medio de tres mediciones ± desviación estándar

El contenido de fenoles totales de la muestra de jitomate cherry Rubino Top es 10 veces menor que el reportado por Lenucci et al. (2006). Mientras que, respecto a la variedad Moscatel RZ reportada por Fernandes et al. (2021) fue de alrededor de dos veces superior (Tabla 14). Estas diferencias podrían deberse al método de preparación de la muestra, las condiciones de cultivo y el estado de madurez del fruto. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que existe una relación aproximada de 1:2 entre la cantidad de licopeno y los compuestos fenólicos cuantificados en el extracto de jitomate cherry Rubino Top.

#### 4.1.4. Cuantificación de compuestos fenólicos mayoritarios en el extracto de jitomate cherry

Los datos cuantitativos sobre los compuestos fenólicos individuales presentes en diferentes variedades de jitomate cherry y en este estudio se presentan en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Perfil de compuestos fenólicos presentes en jitomates cherry (mg/100 g masa seca)

Ácido	Lazano <sup>1</sup>	Summerbrix <sup>1</sup>	Cereja <sup>2</sup>	Pera clásico <sup>2</sup>	Rubino Top <sup>3</sup>
Clorogénico	25.9 ± 1.3	18.6 ± 0.2	3.8 ± 0.2	23.1 ± 1.7	18.55 ± 0.49
Gálico	94.5 ± 2.6	69.9 ± 2.0	12.0 ± 0.1	9.3 ± 0.1	3.64 ± 0.50
Cafeico	18.8 ± 0.8	27.3 ± 0.8	20.3 ± 0.2	20.7 ± 1.5	0.91 ± 0.04
<i>p</i> -Cumárico	22.79 ± 0.1	20.8 ± 0.9	5.6 ± 0.2	30.7 ± 1.1	0.49 ± 0.00
<i>p</i> -Hidroxibenzoico	224.8 ± 2.0	150.7 ± 2.9	86.2 ± 0.7	130.2 ± 1.19	ND
Ferúlico	NR	NR	ND	ND	ND

Valor medio de dos mediciones ± desviación estándar. ND = No detectado. LOQ = límite de cuantificación. *p*-hidroxibenzoico (LOQ = 1.20 µg/mL); gálico (LOQ = 1.55 µg/mL); clorogénico (LOQ = 1.35 µg/mL); cafeico (LOQ = 1.52 µg/mL); *p*-cumárico (LOQ = 1.54 µg/mL); ferúlico (LOQ = 1.70 µg/mL).

Fuente: <sup>1</sup> Coyago-Cruz et al. (2017); <sup>2</sup> Coyago-Cruz et al. (2019); <sup>3</sup> En este estudio

Se identificaron y cuantificaron cuatro de los seis compuestos fenólicos estudiados (Tabla 15). El jitomate cherry Rubino Top de este estudio presentó un contenido de ácido clorogénico igual ( $p > 0.05$ ) al reportado por Coyago-Cruz et al. (2017) para el jitomate cherry Summerbrix tipo pera ( $18.6 \pm 0.2$  mg/100 g masa seca), y menor ( $p < 0.05$ ) que en el jitomate cherry Lazano tipo redondo ( $25.9 \pm 1.3$  mg/100 g masa seca) reportado en el mismo estudio. Mientras que, respecto al obtenido por Coyago-Cruz et al. (2019) donde evaluaron seis variedades diferentes de jitomate cherry se encontró un contenido de ácido clorogénico 4.5 veces superior respecto a las variedades de cherry cereja ( $3.8 \pm 0.2$  mg/100g masa seca) y cherry pera clásico ( $4.3 \pm 0.1$  mg/100 g masa seca). Por otra parte, el contenido ácido *p*-cumárico ( $0.49 \pm 0.00$  mg/100 g masa seca) de la muestra estudiada fue igual ( $p > 0.05$ ) al reportado por Raffo et al. (2006) para un jitomate cherry de la variedad Naomi F1 y significativamente diferente a los reportados por Coyago-Cruz et al. (2019), (2017). para las diferentes variedades de jitomate estudiados. En cuanto al ácido cafeico ( $0.91 \pm 0.04$ ) fue diferente ( $p < 0.05$ ) al reportado por Coyago-Cruz et al. (2019) y Coyago-Cruz et al. (2017). Finalmente, no se detectó la presencia del ácido *p*-hidroxibenzoico ni el ácido ferúlico en el extracto. La ausencia del ácido ferúlico concuerda con lo reportado por Coyago-Cruz et al. (2019) ya que en ninguna de las seis diferentes variedades de jitomate cherry estudiadas se encontró la presencia de este compuesto. Sin embargo, de acuerdo con Raj & Singh (2022), este ácido se encuentra presente en las paredes celulares del material vegetal, por lo cual, la no detección podría

atribuirse al método empleado para su extracción. El caso contrario a esto, ocurre con el ácido *p*-hidroxibenzoico ya que es uno de los compuestos fenólicos más abundantes tanto en jitomates comunes como en los cherry de acuerdo a lo reportado por Coyago-Cruz et al. (2019). Estas diferencias podrían deberse a varios factores, ya que la presencia y concentración de los compuestos dependen del genotipo y de condiciones ambientales en las que fueron cultivados los jitomates (Santos-Sánchez et al., 2013), así como al método de obtención del extracto y al hecho de que la cuantificación se realizó sobre su fracción fenólica soluble.

#### 4.1.5. Cuantificación de proteína total en los aislados de proteína de chícharo y soya

Los resultados de la cuantificación de proteína total por el método de Biuret se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Comparación del % de proteína obtenida por el método de Biuret y la indicada por el proveedor

Proteína	Etiquetado (%)	Método de Biuret (%)
Soya	90	84.23 ± 6.80
Chícharo	80	68.24 ± 1.68

Valor medio de tres mediciones ± desviación estándar

El contenido de proteína en el APS fue estadísticamente igual ( $p > 0.05$ ) al reportado por el proveedor. Mientras que, para el caso del APC el contenido de proteína fue un 20 % menor ( $p < 0.05$ ) (Tabla 16), estas diferencias podrían atribuirse al método empleado. Por ejemplo, el proveedor pudo haber utilizado el método Kjeldahl para cuantificar el contenido de proteína presente en el APS y el APC, debido a que es un método de referencia utilizado universalmente para cuantificar proteína debido a su costo bajo, precisión alta y buena reproducibilidad. Sin embargo, este método requiere de tiempos prolongados de análisis y su medición se basa en la medición de el nitrógeno orgánico total, y no solo el nitrógeno proteico; además, requiere del uso de un factor de correlación que está en función de la composición de aminoácidos presentes en la proteína (Hayes, 2020). Mientras que, el método de biuret se basa en la formación de un complejo de  $\text{Cu}^{2+}$  con los grupos funcionales de los enlaces peptídicos de la proteína a partir del reactivo de Biuret- $\text{Cu}^{2+}$  (Keppy & Allen, 2009). Por lo tanto, al utilizar métodos con un fundamento diferente

el resultado de la cuantificación difiere. Para fines específicos del estudio, se utilizó el % proteínas obtenido por el método de Biuret para la preparación de las disoluciones de proteínas al 2.5 % empleadas en el proceso de microencapsulación.

## 4.2. Caracterización de las microcápsulas

En la Figura 17 se pueden observar las disoluciones con microcápsulas obtenidas a partir del método de coacervación compleja y empleando emulsiones dobles. Las suspensiones obtenidas, ricas en microcápsulas después del proceso de coacervación favorecieron la producción de una fase líquida densa denominada “crema” con una concentración alta en microcápsulas, y una fase líquida diluida denominada “disolución de equilibrio” con una concentración baja en microcápsulas (W. Zhao & Wang, 2016).



**Figura 17.** Microcápsulas suspendidas en medio acuoso.

### 4.2.1. Tamaño de las emulsiones y las microcápsulas

Los resultados obtenidos para el tamaño de las emulsiones dobles y las microcápsulas, así como los resultados de los análisis estadísticos realizados como promedio, mediana, pruebas de normalidad y de homocedasticidad se presentan en las Tablas 17 y 18, respectivamente.

**Tabla 17.** Resultados obtenidos para las emulsiones dobles

Tiempo de almacenamiento	n (número de microgotas)	Diámetro (µm) (media ± Desv. Std.)	Mediana (µm)
<b>Chícharo-Pectina</b>			
Día_01	883	8.09 ± 4.43	7.22
Día_02	1027	7.82 ± 4.48	6.67
Día_03	764	7.86 ± 4.76	6.66
Día_04	752	6.45 ± 3.86	5.46
Día_05	919	7.89 ± 4.46	6.78
Día_06	799	7.06 ± 4.13	6.25
Día_12	479	6.56 ± 4.05	5.2
<b>Chícharo-Goma arábica</b>			
Día_01	630	5.31 ± 3.21	4.32
Día_02	646	6.68 ± 3.86	5.37
Día_03	793	7.07 ± 3.95	5.98
Día_04	548	6.86 ± 4.24	5.54
Día_05	390	7.19 ± 3.94	6.54
Día_12	339	6.41 ± 3.68	5.2
<b>Soya-Pectina</b>			
Día_01	926	7.02 ± 3.92	6.22
Día_02	847	6.71 ± 3.57	5.95
Día_03	997	6.26 ± 3.51	5.41
Día_04	931	7.41 ± 3.92	6.51
Día_05	833	6.63 ± 3.63	5.85
Día_06	565	5.79 ± 3.04	5.05
Día_12	505	5.61 ± 3.41	4.44
<b>Soya-Goma arábica</b>			
Día_01	658	8.86 ± 5.19	7.74
Día_02	841	7.94 ± 4.50	6.87
Día_03	790	7.34 ± 4.66	5.98
Día_04	505	8.92 ± 4.86	8.17
Día_05	722	7.76 ± 4.70	6.45
Día_06	878	7.19 ± 4.49	5.98
Día_12	595	5.97 ± 5.04	4.35

Normalidad de Shapiro-Wilk y Jarque-Bera ( $p \lll 0.05$ ) y homocedasticidad de Bartlett y Levene ( $p \lll 0.05$ ).

**Tabla 18.** Resultados obtenidos para las microcápsulas

<b>Tiempo de almacenamiento</b>	<b>n (número de microcápsulas)</b>	<b>Diámetro (µm) (media ± Desv. Std.)</b>	<b>Mediana (µm)</b>
<b>Chícharo-Pectina</b>			
Día_01	787	5.72 ± 2.85	5.16
Día_02	506	5.11 ± 2.57	4.48
Día_03	788	5.22 ± 2.74	4.47
Día_04	764	5.55 ± 2.82	4.87
Día_05	227	4.98 ± 2.75	4.23
Día_06	345	5.07 ± 2.78	4.27
Día_12	787	5.72 ± 2.85	5.16
<b>Chícharo-Goma arábica</b>			
Día_01	619	5.58 ± 3.77	4.76
Día_02	687	5.69 ± 4.96	4.48
Día_03	264	5.08 ± 3.22	4.21
Día_04	365	5.10 ± 2.57	4.71
Día_05	288	5.27 ± 3.04	4.56
Día_12	541	4.59 ± 2.53	3.99
<b>Soya-Pectina</b>			
Día_01	645	5.90 ± 2.73	5.51
Día_02	998	5.06 ± 2.41	4.60
Día_03	530	4.74 ± 2.17	4.31
Día_04	570	4.55 ± 2.12	4.05
Día_05	237	4.53 ± 1.93	4.27
Día_06	365	4.16 ± 1.80	3.72
Día_12	229	4.12 ± 1.84	3.62
<b>Soya-Goma arábica</b>			
Día_01	793	5.56 ± 2.83	4.95
Día_02	965	6.52 ± 3.11	5.83
Día_03	651	5.35 ± 2.58	4.80
Día_04	869	5.32 ± 2.72	4.60
Día_05	716	5.03 ± 2.60	4.40
Día_06	397	4.86 ± 2.43	4.27
Día_12	331	4.99 ± 2.37	4.48

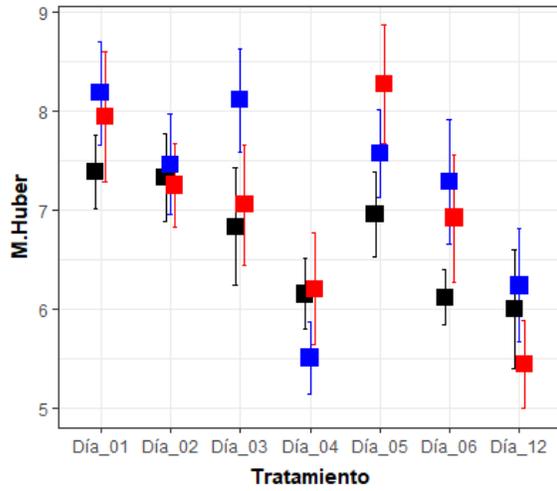
Normalidad de Shapiro-Wilk y Jarque-Bera ( $p \lll 0.05$ ) y homocedasticidad de Bartlett y Levene ( $p \lll 0.05$ ).

A través del análisis estadístico realizado de acuerdo con la sección 3.10.2. se determinó que las repeticiones de cada tratamiento tanto para las emulsiones dobles como para las microcápsulas no presentaron una distribución normal empleando las pruebas de Shapiro Wilk y de Jarque Bera (Tablas 17 y 18). Además, esta falta de normalidad se hace evidente en los histogramas obtenidos para cada uno de los tratamientos a lo largo del tiempo (Apéndice J). Asimismo, se evaluó la

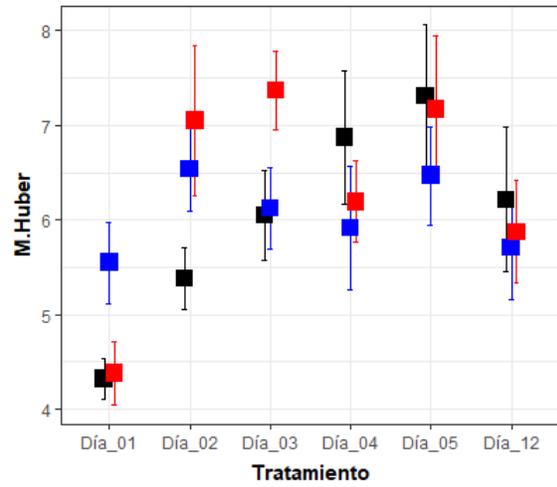
homocedasticidad a través de las pruebas de Bartlett y de Levene, resultó que tanto los datos de las emulsiones dobles como de las microcápsulas son heterocedásticos (Tablas 17 y 18). La falta de normalidad se puede atribuir a la duración del tiempo de agitación durante la etapa de emulsificación debido a que se sabe que la distribución del tamaño de la microgota varía con respecto al tiempo de agitación (Ach et al., 2015). Mientras que, la falta de homocedasticidad en los datos podría atribuirse al diseño del recipiente y la turbulencia generada dentro del recipiente que provocó la formación de microgotas de tamaño diferente (Leimann et al., 2009).

Como consecuencia, a falta de normalidad y de homocedasticidad de los grupos de datos, para detectar diferencias entre los tratamientos de las emulsiones dobles y las microcápsulas se procedió a realizar un ANOVA robusto con el estimador M-modificado (Wilcox, 2012). Este estimador permitió identificar si existían diferencias significativas entre las repeticiones y entre los tratamientos. Dando como resultado, que las repeticiones realizadas para cada tratamiento son significativamente iguales ( $p > 0.05$ ) tanto para las emulsiones dobles como para los microencapsulados y que los tratamientos son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ) (Apéndice L). Por lo tanto, se puede afirmar que experimentalmente no existen errores sistemáticos significativos durante la obtención de las emulsiones y de los microencapsulados.

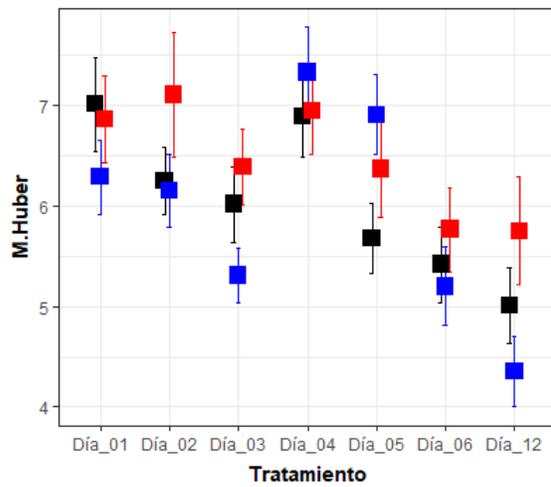
También, se puede apreciar a través de los gráficos generados del estimador modificado de Huber (Figuras 18 y 19) que los tratamientos se comportan de forma distinta indicando que existe un efecto de las proteínas durante el almacenamiento de las emulsiones dobles y los microencapsulados. Por lo que, a lo largo del tiempo existe una disminución del tamaño de las emulsiones dobles y los respectivos microencapsulados de los tratamientos con Chícharo-Pectina, Soya-Pectina y Soya-Goma arábica. Mientras que, en el tratamiento Chícharo-Goma arábica existe un aumento del tamaño de las emulsiones dobles y se mantiene un tamaño constante para las microcápsulas. En lo que respecta al tratamiento Chícharo-Pectina, existe un aumento de tamaño en el día 12, esto se debe a la formación de aglomerados que son detectados en las micrografías.



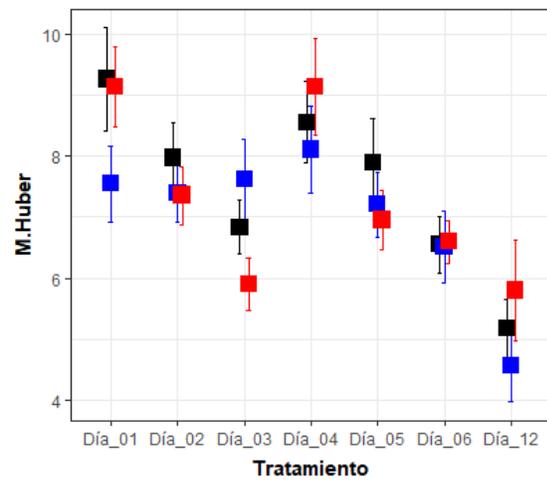
(a) Chicharo-Pectina



(b) Chicharo-Goma arábica



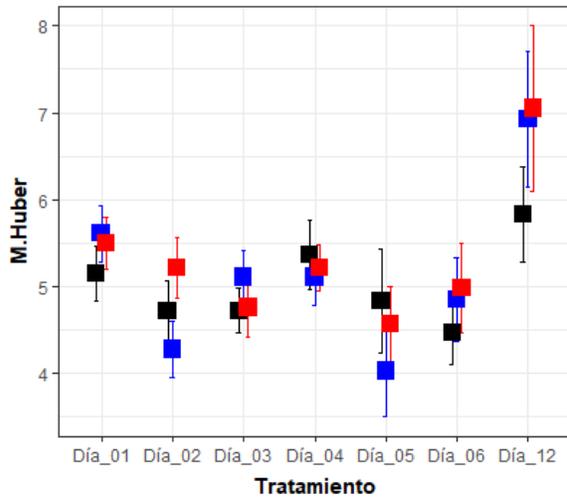
(c) Soya-Pectina



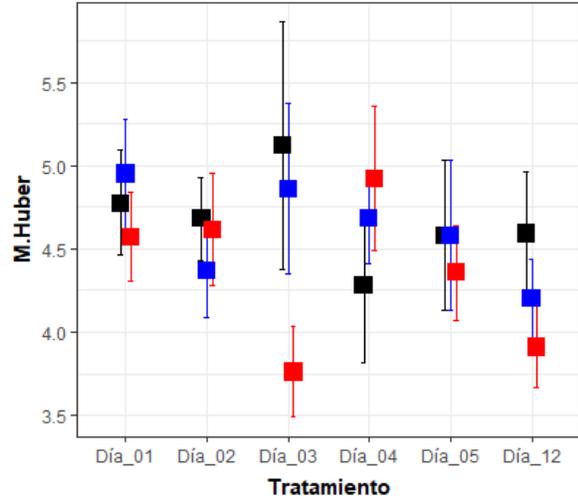
(d) Soya-Goma arábica

Repetición    ■ A    ■ B    ■ C

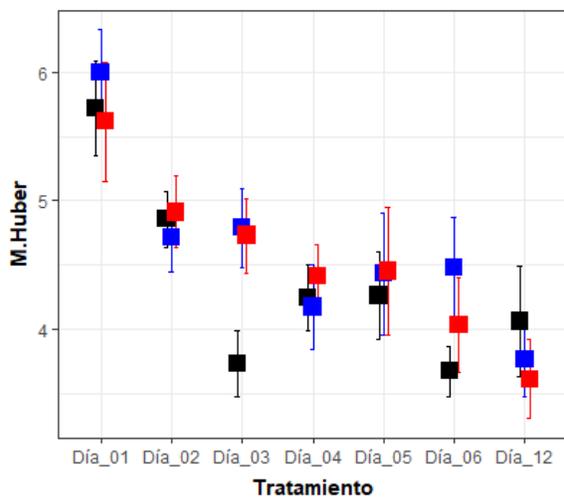
Figura 18. Gráficos generados a partir del estimador modificado de Huber para las dobles emulsiones



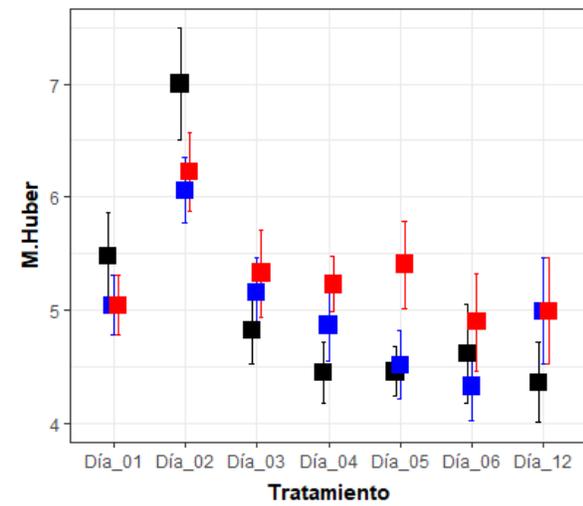
(a) Chicharo-Pectina



(b) Chicharo-Goma arábica



(c) Soya-Pectina



(d) Soya-Goma arábica

Repetición    ■ A    ■ B    ■ C

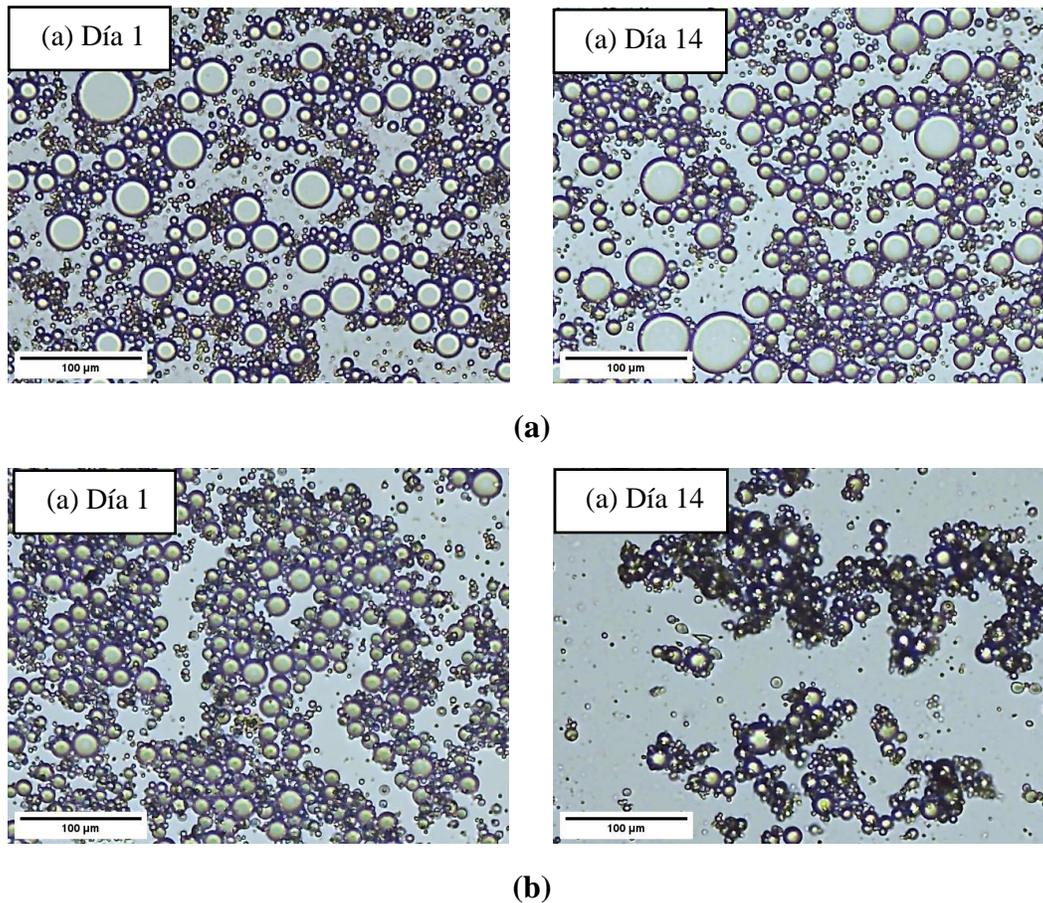
Figura 19. Gráficos generados a partir del estimador modificado de Huber para las microcápsulas

Las emulsiones simples (*w/o*) y las dobles (*w/o/w*) presentaron un diámetro de partícula de  $6.05 \pm 4.17 \mu\text{m}$  y  $7.08 \pm 4.18 \mu\text{m}$ , respectivamente. De acuerdo con lo reportado por Garti & Lutz (2004), las emulsiones primarias presentan un tamaño  $\leq 1 \mu\text{m}$ . Por lo que, el valor obtenido en este estudio fue 6 veces superior. Por otra parte, Shaddel et al. (2018) realizaron un estudio donde utilizaron la técnica de coacervación compleja con emulsión doble y obtuvieron un diámetro de microgota de  $1.84 \pm 0.79 \mu\text{m}$  para las emulsiones primarias y de  $65.86 \pm 3.97 \mu\text{m}$  para las emulsiones dobles. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio difieren significativamente ( $p < 0.05$ ) con lo reportado por estos autores. Estas diferencias se pueden atribuir a los materiales de pared y a los tensoactivos utilizados en los distintos estudios. Esto hace casi imposible determinar los factores que están influyendo de manera significativa en las diferencias entre las muestras estudiadas y las reportadas en la literatura.

Por otra parte, el diámetro de las microcápsulas húmedas fue de  $5.14 \pm 2.52 \mu\text{m}$ . De acuerdo con lo reportado por Favaro-Trindade et al. (2008) y Mehta et al. (2022), el tamaño de las microcápsulas utilizando el método de coacervación compleja oscila entre 1 - 500  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto, los valores obtenidos en este estudio se encuentran dentro del intervalo. No obstante, mostraron ser significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) a los reportados por Shaddel et al. (2018) y Santos et al. (2015) quienes también utilizaron la emulsión doble seguida de una coacervación compleja a la misma concentración de los biopolímeros empleada en el presente estudio. Shaddel et al. (2018) y Santos et al. (2015) reportaron diámetros de microcápsulas de  $65.86 \pm 3.97 \mu\text{m}$  y  $104.69 \pm 10.78 \mu\text{m}$ , respectivamente. Las velocidades utilizadas para generar tanto la emulsión simple como las emulsiones dobles reportadas por Shaddel et al. (2018) como por Santos et al. (2015) fueron menores a las utilizadas en el presente estudio, así como la concentración de tensoactivo empleado para la formación de las emulsiones simples y dobles. En relación a esto, Leimann et al. (2009) reportaron que el aumento de la velocidad de agitación conduce a la formación de partículas más pequeñas. También, una concentración alta del tensoactivo utilizado podría haber provocado la disminución del diámetro medio de las microcápsulas (McClements, 2015). Por lo tanto, las diferencias en el tamaño de las microcápsulas podrían atribuirse principalmente a estos dos factores.

Por otra parte, de acuerdo con Mehta et al. (2022) el tamaño de las microcápsulas es importante para las aplicaciones alimentarias, debido a que las microcápsulas con un tamaño superior a los

100  $\mu\text{m}$  afectan la textura y las propiedades sensoriales del producto alimenticio, por lo cual, las microcápsulas obtenidas en este estudio tienen un tamaño adecuado para su aplicación alimentaria. Cabe señalar que no se encontraron reportes sobre un posible límite mínimo de tamaño de encapsulados de compuestos bioactivos antioxidantes.



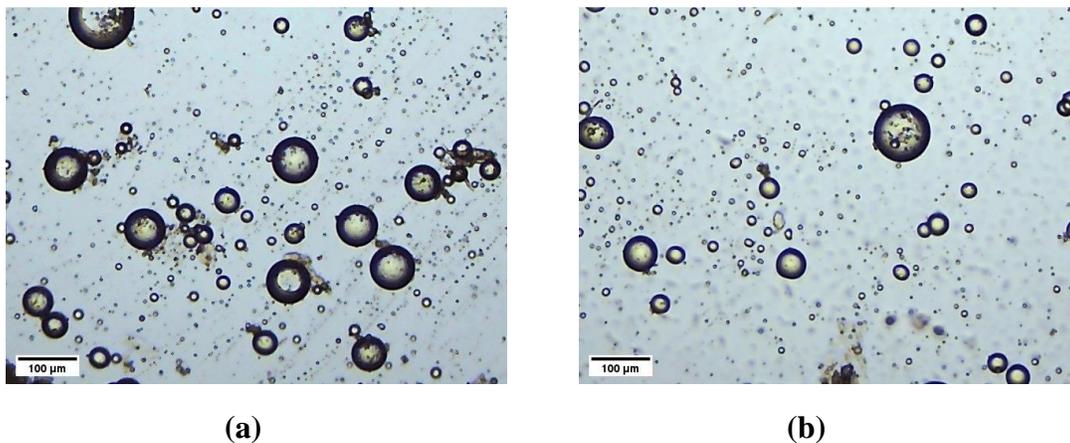
**Figura 20.** Micrografías del tratamiento Chícharo-Pectina (a) emulsiones dobles (b) microcápsulas con un aumento 100x.

De acuerdo con las micrografías obtenidas (Figura 20, Apéndice M), el origen de los aglomerados en las emulsiones dobles en el día 1 y día 14 de almacenamiento, así como en las microcápsulas en el día 1 podrían deberse a fenómenos de coagulación. Mientras que, para el caso de las microcápsulas en el día 14 de almacenamiento podría deberse a la reacción de reticulación entre las proteínas de la microcápsulas, causadas por la presencia de la enzima TGasa en la disolución (Leimann et al., 2009; Khatibi et al., 2021). Estos fenómenos se observaron en todos los tratamientos. Por lo tanto, el seguimiento de la morfología de las microcápsulas y las dobles

emulsiones permitió encontrar diferencias por los materiales de pared utilizados en los tratamientos, y observar la presencia de aglomerados.

### 4.3. Pruebas de fragmentación

Después de obtener los microencapsulados de los diferentes tratamientos, estos fueron sometidos a dos condiciones de fragmentación de microcápsulas típicas, las cuales consistieron en el uso de una disolución de metanol:NaCl acuoso al 10% o acetona, asistida por ultrasonido. Estas pruebas no indujeron la fragmentación de las microcápsulas, tampoco se observó la liberación del aceite al medio. Esto fue posible confirmarlo mediante microscopía óptica (Figura 21). Los resultados de las microfotografías muestran microcápsulas aisladas después de una preparación de la muestra utilizada para minimizar la presencia de los aglomerados. Esta preparación de muestra consistió en deslizar un cubreobjetos sobre la muestra de microencapsulados arracimados previamente colocados sobre un portaobjetos. El arracimado se produjo principalmente en las microcápsulas sometidas a una fragmentación en acetona asistida por ultrasonido. Es importante resaltar que el deslizamiento del cubreobjetos sobre la muestra de microencapsulados en el portaobjetos no provocó la ruptura de las microcápsulas a pesar de que esto implicó un esfuerzo mecánico sobre las partículas. Las microcápsulas de los cuatro tratamientos estudiados presentaron una estabilidad alta, atribuible a la reacción de reticulación de la proteína con la TGasa. Consecuentemente, no fue posible llevar a cabo la prueba de eficiencia de microencapsulación de licopeno y compuestos fenólicos.



**Figura 21.** Micrografías de las microcápsulas obtenidas del tratamiento Chicharo-Pectina después de la fragmentación (a) Metanol: NaCl acuoso al 10 % 1:1 (*m/v*), (b) Acetona con un aumento 40x.



## Capítulo 5. Conclusiones

Se determinaron las características físicas y químicas del jitomate cherry empleado para la obtención de un extracto rico en licopeno y compuestos fenólicos. Asimismo, se logró cuantificar el contenido de proteína soluble presente en los aislados de proteína de chícharo y soya, los cuales fueron utilizados como material de núcleo y agentes de pared para el proceso de microencapsulación.

Se logró establecer una metodología que permitió la obtención de un extracto que contuviera simultáneamente licopeno y compuestos fenólicos. Esto se corroboró a través de la cuantificación de licopeno total, compuestos fenólicos totales y los compuestos fenólicos mayoritarios. El compuesto fenólico predominante fue el ácido clorogénico con un contenido de  $18.55 \pm 0.49$  mg/100 g masa seca de fruto.

Se estableció un procedimiento de microencapsulación de extractos de jitomate cherry Rubino Top mediante la técnica de coacervación compleja con doble emulsión y empleando la enzima TGasa. La formación de las dobles emulsiones y los microencapsulados fue corroborada a través de microscopía óptica. El diámetro que presentaron las emulsiones dobles y las microcápsulas fue de  $7.08 \pm 4.18$   $\mu\text{m}$  y  $5.14 \pm 2.52$   $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Debido a la estabilidad alta de las microcápsulas obtenidas no fue posible determinar la eficiencia de encapsulación y realizar la caracterización química del núcleo de las microcápsulas.



## Capítulo 6. Perspectivas

En esta sección se enumeran las perspectivas planteadas a partir de los resultados obtenidos de esta investigación.

1. Los microencapsulados obtenidos presentaron una estabilidad alta después de ser sometidos a pruebas de fragmentación. Por lo tanto, se recomienda encontrar las condiciones de reacción de reticulación enzimática con TGasa que permitan estabilizar las microcápsulas sin afectar de manera significativa su bioaccesibilidad. Esto deberá involucrar cinéticas de reacción para determinar el tiempo de reacción que favorezca la producción microencapsulados tanto estables como bioaccesibles.
2. Debido a que el monitoreo de la estabilidad de los microencapsulados realizado por microscopía óptica durante 12 días, evidenciaron cambios significativos en el tamaño y distribución de partículas a un  $\alpha = 0.05$ . También, se recomienda realizar un estudio de los fenómenos físicos que desestabilizan a las microcápsulas durante el almacenamiento mediante un seguimiento de las propiedades físicas y químicas de las microcápsulas.
3. También, se recomienda asegurar que los núcleos de las microcápsulas contengan tanto licopeno como compuestos fenólicos realizando las pruebas de fragmentación y la determinación de las eficiencias de encapsulación en función de los compuestos antes mencionados.



## Capítulo 7. Referencias

- Ach, D., Briançon, S., Broze, G., Puel, F., Rivoire, A., Galvan, J. M., & Chevalier, Y. (2015). Formation of microcapsules by complex coacervation. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 93(2), 183–191. <https://doi.org/10.1002/cjce.22086>
- Acquaah, G. (2012). Breeding tomato. In *Principles of Plant Genetics and Breeding* (Second, pp. 667–678). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118313718.ch39>
- Akdeniz, B., Sumnu, G., & Sahin, S. (2018). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from onion (*Allium cepa*) skin. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(7), e13648. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13648>
- Angón-Galván, P. (2006). Caracterización parcial del fruto de *Parmentiera edulis* [Tesis de Licenciatura, Universidad Tecnológica de la Mixteca]. Repositorio UTM [http://jupiter.utm.mx/~tesis\\_dig/9947.pdf](http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/9947.pdf)
- Argerich, C., & Gaviola, J. (1995). Clasificación botánica del tomate. In *Manual de producción de semillas horticolas* (Primera, pp. 5–15). INTA.
- Ayala-López, J. S., Pacheco-Contreras, V. I., Santos-Sánchez, N. F., Hernández-Carlos, B., Lara-Ruiz, G. F., & Salas-Coronado, R. (2020). Characterization of pectin extracted under mild conditions from tempequitle (*Sideroxylon palmeri*) fruit at two maturity stages. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 19(3), 347–357. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.0850>
- Bonnewitz, L. R. (2007). Garden notes [University of California]. In *Garden notes*. <http://sacmg.ucanr.edu/files/74899.pdf>
- Bratovic, A., & Suljagic, J. (2019). Micro- and nano-encapsulation in food industry. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 113–121. <https://doi.org/10.17508/cjfst.2019.11.1.17>
- Can Karaca, A., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2015). Potential use of plant proteins in the microencapsulation of lipophilic materials in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 42(1), 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.002>
- Canene-Adams, K., Campbell, J. K., Zaripheh, S., Jeffery, E. H., & Erdman, J. W. (2005). The tomato as a functional food. *The Journal of Nutrition*, 135(5), 1226–1230. <https://doi.org/10.1093/jn/135.5.1226>
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). *Guide to research techniques in neuroscience* (N. Farra (Ed.); Second). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-06868-5>
- Chiu, Y. T., Chiu, C. P., Chien, J. T., Ho, G. H., Yang, J., & Chen, B. H. (2007). Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly( $\gamma$ -glutamic acid) as carrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5123–5130. <https://doi.org/10.1021/jf0700069>
- Corrêa-Filho, L. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Advances in the application of microcapsules as carriers of functional compounds for food products. *Applied Sciences*, 9(3), 571. <https://doi.org/10.3390/app9030571>
- Cortés, H., Hernández-Parra, H., Bernal-Chávez, S. A., Del Prado-Audelo, M. L., Caballero-Florán, I. H., Borbolla-Jiménez, F. V., González-Torres, M., Magaña, J. J., & Leyva-Gómez, G. (2021). Non-ionic surfactants for stabilization of polymeric nanoparticles for biomedical uses. *Materials*, 14(12), 3197. <https://doi.org/10.3390/ma14123197>
- Coyago-Cruz, E., Corell, M., Moriana, A., Hernanz, D., Stinco, C. M., & Meléndez-Martínez, A. J. (2017).

- Effect of the fruit position on the cluster on fruit quality, carotenoids, phenolics and sugars in cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Food Research International*, 100, 804–813. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.002>
- Coyago-Cruz, E., Corell, M., Moriana, A., Mapelli-Brahm, P., Hernanz, D., Stinco, C. M., Beltrán-Sinchiguano, E., & Meléndez-Martínez, A. J. (2019). Study of commercial quality parameters, sugars, phenolics, carotenoids and plastids in different tomato varieties. *Food Chemistry*, 277, 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.139>
- De Oliveira, C. M., Ferreira, L. M., Do Carmo, M. G. F., & Coneglian, R. C. C. (2016). Influence of maturity stage on fruit longevity of cherry tomatoes stored at ambient and controlled temperature. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(6), 4027–4038. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n6p4027>
- Deak, T. (2014). Thermal Treatment. In *Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry* (pp. 423–442). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00017-2>
- Dias, D. R., Botrel, D. A., Fernandes, R. V. D. B., & Borges, S. V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, 13, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.001>
- Domínguez, R., Gullon, P., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2020). Tomato as potential source of natural additives for meat industry. A review. *Antioxidants*, 9(1), 73.
- Duarte, L., Matte, C. R., Bizarro Valim, C., & Záchia Ayub, M. A. (2020). Transglutaminases: part I—origins, sources, and biotechnological characteristics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2791-x>
- Einhorn-Stoll, U., Archut, A., Eichhorn, M., & Kastner, H. (2021). Pectin - Plant protein systems and their application. *Food Hydrocolloids*, 118, 106783. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106783>
- El-Messery, T. M., El-Said, M. M., Demircan, E., & Ozçelik, B. (2019). Microencapsulation of natural polyphenolic compounds extracted from apple peel and its application in yoghurt. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 18(1), 25–34. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2019.0597>
- Favaro-Trindade, C., Pinho, S., & Rocha, G. (2008). Review: Microencapsulation of food ingredients. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11(2), 103–112.
- Fernandes, I., Leça, J. M., Aguiar, R., Fernandes, T., Marques, J. C., & Cordeiro, N. (2021). Influence of crop system fruit quality, carotenoids, fatty acids and phenolic compounds in cherry tomatoes. *Agricultural Research*, 10, 56–65. <https://doi.org/10.1007/s40003-020-00478-z>
- Fish, W., Perkins-Veazie, P., & Collins, J. K. (2002). A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 309–317. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1069>
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). An {R} Companion to Applied Regression. *R News*, 3. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
- Garti, N., & Lutz, R. (2004). Recent progress in double emulsions. In D. N. Petsev (Ed.), *Interface Science and Technology* (Vol. 4, pp. 557–605). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1573-4285\(04\)80016-4](https://doi.org/10.1016/S1573-4285(04)80016-4)
- Gentile, L. (2020). Protein–polysaccharide interactions and aggregates in food formulations. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 48, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.002>
- Gharibzahedi, S. M. T., George, S., Greiner, R., Estevinho, B. N., Frutos Fernández, M. J., McClements,

- D. J., & Roohinejad, S. (2018). New trends in the microencapsulation of functional fatty acid-rich oils using transglutaminase catalyzed crosslinking. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 274–289. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12324>
- Gheonea, I., Aprodu, I., Cîrciumaru, A., Râpeanu, G., Bahrim, G. E., & Stănciuc, N. (2021). Microencapsulation of lycopene from tomatoes peels by complex coacervation and freeze-drying: Evidences on phytochemical profile, stability and food applications. *Journal of Food Engineering*, 288, 110166. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110166>
- Ghosh, S., Ray, A., & Pramanik, N. (2020). Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry*, 265, 106429. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106429>
- Guzmán-Martínez, O. (2020). Elaboración de yogurt aflanado a partir de una fermentación que emplea como estabilizante un agente gelificante [Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio] <https://rinacional.tecnm.mx/handle/TecNM/3567>
- Hayes, M. (2020). Measuring protein content in food: An overview of methods. *Foods*, 9, 1340. <https://doi.org/10.3390/foods9101340>
- Hebbali, A. (2020). *olsrr: Tools for Building OLS Regression Models* (0.5.3). <https://cran.r-project.org/package=olsrr>
- Hobson, G. E., & Bedford, L. (1989). The composition of cherry tomatoes and its relation to consumer acceptability. *Journal of Horticultural Science*, 64(3), 321–329. <https://doi.org/10.1080/14620316.1989.11515960>
- Hortin, G. L., & Meilinger, B. (2005). Cross-reactivity of amino acids and other compounds in the biuret reaction: Interference with urinary peptide measurements. *Clinical Chemistry*, 51(8), 1411–1419. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.052019>
- Ilahy, R., Hdidder, C., Lenucci, M. S., Tlili, I., & Dalessandro, G. (2011). Antioxidant activity and bioactive compound changes during fruit ripening of high-lycopene tomato cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 588–595. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.11.003>
- Jiménez-Durán, A., Santos-Sánchez, N. F., Hernández-Carlos, B., Juliani, H. R., & Salas-Coronado, R. (2020). Mango-seed extract and sulphites as promoters of color and bioactive compounds retention during tray drying of mango slices. *Italian Journal of Food Science*, 32, 893–911. <https://doi.org/10.14674/IJFS.1787>
- Julián-Loeza, A. P., Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Sánchez-Guzmán, B. S., & Salas-Coronado, R. (2011). Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1262–1268. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.012>
- Keppy, N. K., & Allen, M. W. (2009). The biuret method for the determination of total protein using an evolution array 8-position cell changer. *Thermo Fisher Scientific*.
- Khatibi, S. A., Ehsani, A., Nemati, M., & Javadi, A. (2021). Microencapsulation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil by complex coacervation using gelatin and gum arabic: Characterization, release profile, antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15823>
- Kulkarni, V. S., & Shaw, C. (2016). Microscopy Techniques. *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*, 183–192. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801024-2.00010-8>
- Le Priol, L., Dagmey, A., Morandat, S., Saleh, K., El Kirat, K., & Nesterenko, A. (2019). Comparative

- study of plant protein extracts as wall materials for the improvement of the oxidative stability of sunflower oil by microencapsulation. *Food Hydrocolloids*, 95, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.026>
- Leimann, F. V., Gonçalves, O. H., Machado, R. A. F., & Bolzan, A. (2009). Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering C*, 29(2), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.025>
- Lenucci, M. S., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G., & Dalessandro, G. (2006). Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2606–2613. <https://doi.org/10.1021/jf052920c>
- López-Franco, Y. L., Gooycolea, F. M., & Lizardi-Mendoza, J. (2015). Gum of Prosopis/Acacia Species. In K. G. Ramawat & J. M. Mérillon (Eds.), *Polysaccharides*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6>
- Lu, Z. X., He, J. F., Zhang, Y. C., & Bing, D. J. (2020). Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2593–2605. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1651248>
- Maphosa, Y., & Jideani, V. A. (2018). Factors affecting the stability of emulsions stabilised by biopolymers. *Science and Technology Behind Nanoemulsions*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75308>
- Martono, Y., Novitasari, F., & Aminu, N. R. (2020). Determination of shelf life of herbal products from the combination of *Stevia rebaudiana*, *Curcuma zanthorrhiza* and honey (Stekurmin MD) through the accelerated shelf life test (ASLT) method. *Journal of Scientific and Applied Chemistry*, 23(9), 325–332. <https://doi.org/https://doi.org/10.14710/jksa.23.9.325-332>
- McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>
- McClements, D. J. (2015). *Food Emulsions: Principles, practices and techniques* (Third). CRC Press.
- Mehta, N., Kumar, P., Verma, A. K., Umaraw, P., Kumar, Y., Malav, O. P., Sazili, A. Q., & Lorenzo, J. M. (2022). Microencapsulation as a noble technique for the application of bioactive compounds in the Food Industry : A comprehensive review. *Applied Sciences*, 12(1424).
- Montenegro, M. A., Boiero, M. L., Valle, L., & Borsarelli, C. D. (2012). Gum arabic: more than an edible emulsifier. In *Products and Applications of Biopolymers*. <https://doi.org/10.5772/33783>
- Mudrić, J., Šavikin, K., Ibrić, S., & Đuriš, J. (2019). Double emulsions (W/O/W emulsions): Encapsulation of plant bioactives. *Lekovite Sirovine*, 39, 76–83. <https://doi.org/10.5937/leksir1939076m>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Muschiolik, G., & Dickinson, E. (2017). Double emulsions relevant to food systems: Preparation, stability, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 532–555. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12261>
- Mutaliyeva, B., Grigoriev, D., Madybekova, G., Sharipova, A., Aidarova, S., Sapparbekova, A., & Miller, R. (2017). Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. *Colloids and Surfaces a: Physicochemical and Engineering Aspects*, 521, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.10.041>

- Nielsen, S. S. (2017). *Food analysis laboratory manual* (Third). Springer. <http://cst.ur.ac.rw/library/Food Science books/batch1/Food Analysis Laboratory Manual Second Edition.pdf>
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., & Phillips, G. O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.013>
- Nunes, I. L., & Mercadante, A. Z. (2007). Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(5), 893–900. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000500018>
- Opara, U. L., Al-Ani, M. R., & Al-Rahbi, N. M. (2012). Effect of Fruit ripening stage on physico-chemical properties, nutritional composition and antioxidant components of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 3236–3243. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0693-5>
- Oropeza-Guerrero, M. P. (2012). Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de Ipomoea murucoides (casahuate) [Tesis de Licenciatura, Universidad Tecnológica de la Mixteca]. Repositorio UTM [http://jupiter.utm.mx/~tesis\\_dig/11616.pdf](http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/11616.pdf)
- Pang, S. F., Yusoff, M. M., & Gimbut, J. (2014). Extraction and microencapsulation of polyphenols from *Orthosiphon stamineus* leaves. *Journal of Mechanical Engineering and Sciences*, 7(1), 1033–1041. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15282/jmes.7.2014.2.0100>
- Pérez-Marín, J., Issa-Issa, H., Clemente-Villalba, J., García-Garvía, J. M., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á. A., Calín-Sánchez, Á., & Noguera-Artiaga, L. (2021). Physicochemical, volatile, and sensory characterization of promising cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars: Fresh market aptitudes of pear and round fruits. *Agronomy*, 11(4), 618. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040618>
- Pernice, R., Parisi, M., Giordano, I., Pentangelo, A., Graziani, G., Gallo, M., Fogliano, V., & Ritieni, A. (2010). Antioxidants profile of small tomato fruits: effect of irrigation and industrial process. *Scientia Horticulturae*, 126(2), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.06.021>
- Phillips, G. O., & Phillips, A. O. (2011). Gum arabic and other exudate gums. In *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials* (pp. 166–185). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812069-9.00016-9>
- Power, A. C., Chapman, J., Chandra, S., & Cozzolino, D. (2019). Ultraviolet-visible spectroscopy for food quality analysis. In *Evaluation Technologies for Food Quality*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00006-8>
- R Core Team. (2021). <https://www.r-project.org/>
- Raffo, A., La Malfa, G., Fogliano, V., Maiani, G., & Quaglia, G. (2006). Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.02.003>
- Raj, N. D., & Singh, D. (2022). A critical appraisal on ferulic acid: Biological profile, biopharmaceutical challenges and nano formulations. *Health Sciences Review*, 5, 100063. <https://doi.org/10.1016/j.hsr.2022.100063>
- Raveern, R. C., Gatade, A. A., Kamble, H. A., & Sahoo, A. K. (2015). Microencapsulation and storage stability of lycopene extracted from tomato processing waste. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(6), 953–960. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132015060366>

- Reichembach, L. H., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2021). Pectins from alternative sources and uses beyond sweets and jellies: an overview. *Food Hydrocolloids*, *118*, 106824. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106824>
- Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M. C., & Sanchez, C. (2006). *Acacia senegal* gum: Continuum of molecular species differing by their protein to sugar ratio, molecular weight, and charges. *Biomacromolecules*, *7*(9), 2637–2649. <https://doi.org/10.1021/bm060145j>
- Rivas, J. C., Cabral, L. M. C., & Rocha-Leão, M. H. (2020). Stability of bioactive compounds of microencapsulated mango and passion fruit mixed pulp. *International Journal of Fruit Science*, *20*(S2), S94–S100. <https://doi.org/10.1080/15538362.2019.1707746>
- Rocha-Selmi, G. A., Favaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2013). Morphology, stability, and application of lycopene microcapsules produced by complex coacervation. *Journal of Chemistry*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/982603>
- Rodrigues do Amaral, H. P., Lopes Andrade, P., & Costa de Conto, L. (2019). Microencapsulation and its uses in food science and technology: a review. In *Microencapsulation - Processes, technologies and industrial applications* (pp. 1–18). <https://doi.org/10.5772/intechopen.81997>
- Rolin, C. (2012). Pectin. In *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives* (Third, pp. 257–293). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092654-4.50014-0>
- Salaün, F. (2016). Microencapsulation technology for smart textile coatings. In *Active Coatings for Smart Textiles* (pp. 179–220). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100263-6.00009-5>
- Salvia-Trujillo, L., Artiga-Artigas, M., Molet-Rodríguez, A., Turmo-Ibarz, A., & Martín-Belloso, O. (2018). Emulsion-Based nanostructures for the delivery of active ingredients in foods. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *2*, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00079>
- Sánchez, F. M., García, F., Calvo, P., Bernalte, M. J., & González-Gómez, D. (2016). Optimization of broccoli microencapsulation process by complex coacervation using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *34*, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.02.008>
- Santos-Sánchez, N. F., Hernández-Carlos, B., Torres-Ariño, A., & Salas-Coronado, R. (2020). Astaxanthin and its formulations as potent oxidative stress inhibitors. *Pharmacognosy Reviews*, *14*(27), 8–15.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In E. Shalaby (Ed.), *IntechOpen*.
- Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Gómez-Gómez, M. S., Pérez-Herrera, A., & Salas-Coronado, R. (2012). Effect of rotating tray drying on antioxidant components, color and rehydration ratio of tomato saladette slices. *LWT-Food Science and Technology*, *46*(1), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.015>
- Santos-Sánchez, N. F., Valadez-blanco, R., & Salas-coronado, R. (2013). Factors affecting the antioxidant content of fresh tomatoes and their processed products. In T. Higashide (Ed.), *Tomatoes: Cultivation, varieties and nutrition*. Nova Science Publishers, Inc.
- Santos, M. G., Bozza, F. T., Thomazini, M., & Favaro-Trindade, C. S. (2015). Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. *Food Chemistry*, *171*, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.093>
- Sawale, P. D., Patil, G. R., Hussain, S. A., Singh, A. K., & Singh, R. R. B. (2017). Release characteristics of polyphenols from microencapsulated *Terminalia arjuna* extract: Effects of simulated gastric fluid.

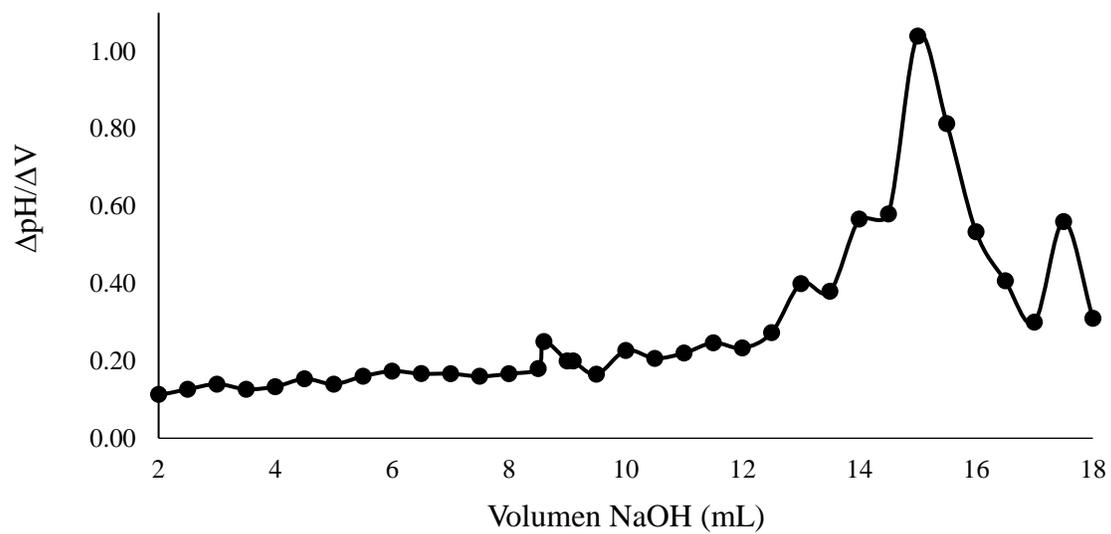
*International Journal of Food Properties*, 20(12), 3170–3178.  
<https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1280677>

- Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi-Achachlouei, B., & Huang, Q. (2018). Double emulsion followed by complex coacervation as a promising method for protection of black raspberry anthocyanins. *Food Hydrocolloids*, 77, 803–816.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.024>
- SIAP. (2017). *Tomate rojo o jitomate: ¿cómo lo llaman donde radicas? | Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera | Gobierno | gob.mx*. <https://www.gob.mx/siap/articulos/tomate-rojo-o-jitomate-como-lo-llaman-donde-radicas>
- Silva, D. F., Favaro-Trindade, C. S., Rocha, G. A., & Thomazini, M. (2012). Microencapsulation of lycopene by gelatin-pectin complex coacervation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(2), 185–190. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00575.x>
- Tang, Y., Horikoshi, M., & Li, W. (2016). ggfortify: Unified Interface to Visualize Statistical Result of Popular R Packages. *The R Journal*, 8(2), 474–485. <https://doi.org/10.32614/RJ-2016-060>
- Thrane, M., Paulsen, P. V., Orcutt, M. W., & Krieger, T. M. (2017). Soy Protein: Impacts, production, and applications. In *Sustainable Protein Sources* (pp. 23–45). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00002-0>
- Ukey, P. D., Patil, A. P., & Sawant, S. K. (2010). Study of moisture based physical properties of Indian bean. *International Journal of Agricultural Engineering*, 3(2), 312–316.  
[http://www.researchjournal.co.in/upload/assignments/3\\_312-316.pdf](http://www.researchjournal.co.in/upload/assignments/3_312-316.pdf)
- USDA. (1997). *United States Department of Agriculture. Agricultural Marketing Service. United States standards for grades of fresh tomatoes*. [https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/ Tomato\\_Standard%5B1%5D.pdf](https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/ Tomato_Standard%5B1%5D.pdf)
- Wade, L. G. (2011). *Química orgánica* (Séptima). Pearson educación.
- Wilcox, R. (2012). No Title. In *Introduction to Robust Estimation and Hypothesis* (3rd ed). Elsevier.
- Yahia, E. M., & Brecht, J. K. (2012). Tomatoes. In R. Debbie, G. Farrell, & J. Orchard (Eds.), *Science and Technology* (First, pp. 5–23). Blackwell Publishing Ltd.
- Yan, C., & Zhang, W. (2014). Coacervation processes. In A. V. Gaonkar, A. Niraj Khare, & R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the food industry: A practical implementation guide* (pp. 125–137). Elsevier.
- Zeileis, A., & Hothorn, T. (2002). *Regresión Lineal*. Diagnostic Checking in Regression Relationships. <https://cran.r-project.org/doc/Rnews/>
- Zhao, H., Shen, C., Wu, Z., Zhang, Z., & Xu, C. (2020). Comparison of wheat, soybean, rice, and pea protein properties for effective applications in food products. *Journal of Food Biochemistry*, 44(4), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13157>
- Zhao, W., & Wang, Y. (2016). Coacervation with surfactants: From single-chain surfactants to gemini surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.04.005>



## Capítulo 8. Apéndices

**Apéndice A.** Gráfico para la obtención del punto final de la valoración



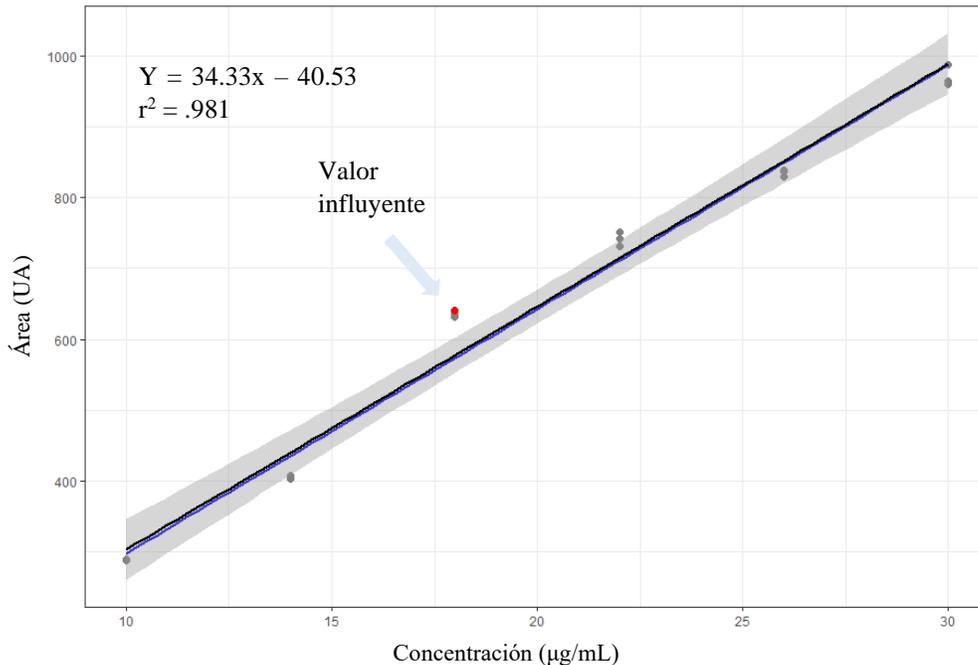
**Apéndice B.** Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido gálico por HPLC

En la **Tabla A** se presentan las áreas bajo la curva obtenidas a partir de diferentes concentraciones del estándar de ácido gálico por HPLC. La prueba de correlación de Pearson mostró que existe una correlación positiva y fuerte entre las variables área y concentración ( $r = 0.99$ ) a un  $\alpha = 0.05$ . Asimismo, la Prueba de Levene realizada a lo datos iniciales indicaron la presencia de homocedasticidad ( $p = 0.48$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

**Tabla A.** Áreas bajo la curva obtenidas a partir del estándar del ácido gálico a diferentes concentraciones.

Réplica	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	10	14	18	22	26	30
1	287.71	407.34	636.07	751.81	837.30	964.13
2	289.14	403.52	630.96	742.52	838.11	959.57
3	288.99	403.21	640.15	731.07	829.78	987.45

Posteriormente, se procedió a obtener la gráfica de regresión lineal simple (**Figura A**) y su respectiva ecuación  $y = 34.33x - 40.53$  y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.981.

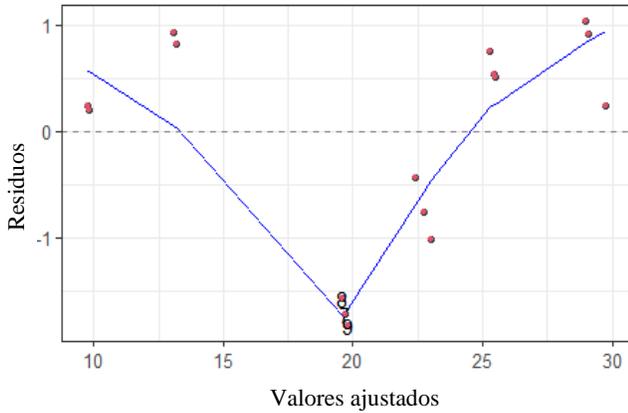


**Figura A.** Curva de calibración del estándar de ácido gálico.

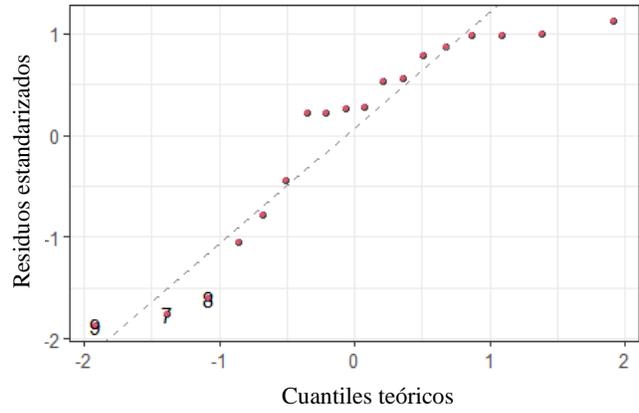
A continuación, se procedió con la validación y diagnóstico del modelo. Se obtuvo como resultado que el modelo de regresión lineal puede ser aplicado de acuerdo con los valores de  $p$  presentados por el intercepto ( $p = 0.040$ ) y de la pendiente ( $p = 3.79e^{-15}$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

El supuesto de linealidad se confirmó mediante la **Figura A**, la cual mostró una relación lineal entre la variable dependiente e independiente. El supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la Prueba Breusch-Pagan ( $p = 0.76$ ) a un  $\alpha = 0.05$  y por las gráficas residuales vs ajustados (**Figura B1**) y escala-ubicación (**Figura B3**) donde, además se observaron a los residuos distribuirse de manera aleatoria. Por otro lado, el supuesto de normalidad se demostró con la ayuda de la Prueba de Shapiro-Wilk ( $p = 0.012$ ) a un  $\alpha = 0.01$  y por la gráfica cuantil-cuantil (Q-Q) de residuos estandarizados (**Figura B2**). Con respecto a el supuesto de independencia, no se logró confirmar a través de la prueba de Durbin-Watson ( $p = 0.002$ ) y por Breusch-Godfrey ( $p = 3.49e^{-03}$ ) a un  $\alpha = 0.05$  cuando fue aplicado a las repeticiones de las diferentes concentraciones. Sin embargo, al aplicar las prueba a los promedios de las áreas para cada concentración (Durbin-Watson  $p = 0.45$ , Breusch-Godfrey  $p = 0.97$ ) se comprobó que si existe independencia entre los residuos. Estas diferencias podrían deberse a la falta de aleatoriedad al momento de realizar las inyecciones al equipo de HPLC.

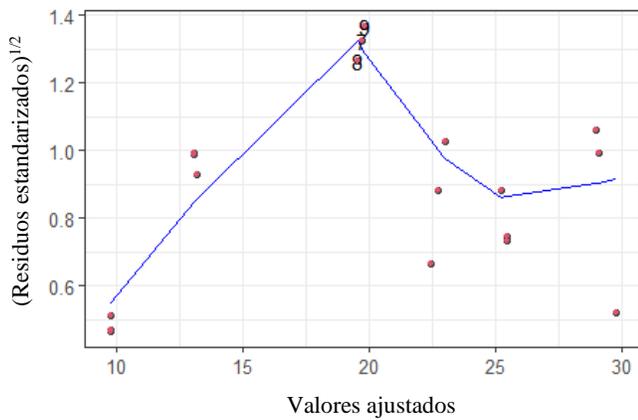
Por otra parte, de acuerdo con la gráfica de barras de distancia de Cook (**Figura B5**) se confirma que no existe la presencia de valores atípicos pero si de datos potencialmente influyentes que corresponden a los valores 7 (la réplica 1 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ), 9 (la réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ) y 17 (la réplica 2 de la concentración 30  $\mu\text{g/mL}$ ). De igual modo, se observó en la gráfica de residuos frente al apalancamiento (**Figura B4**) que dichos valores se encontraron lejos del centroide y por lo tanto, como se señaló anteriormente estos valores podrían influir en la regresión lineal. Por lo que, se procedió a realizar las gráficas de DFBETAS, de residuos eliminados estudentizados y residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para confirmar la información obtenida.



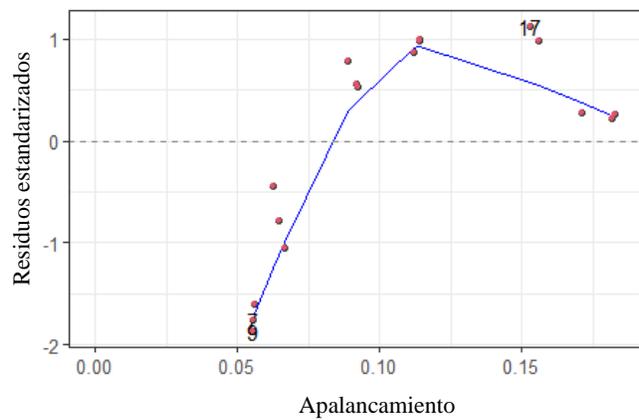
1) Gráfica valor ajustado vs Residual



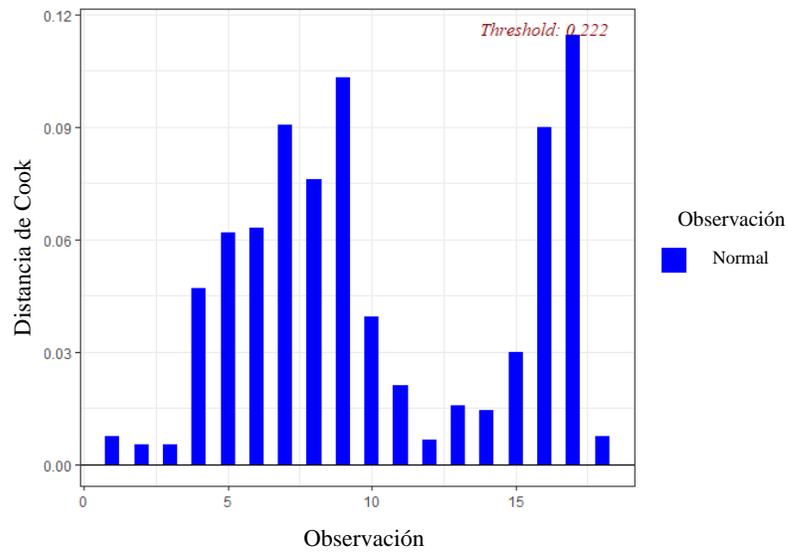
2) Gráfica de normalidad Q-Q



3) Gráfica escala-ubicación



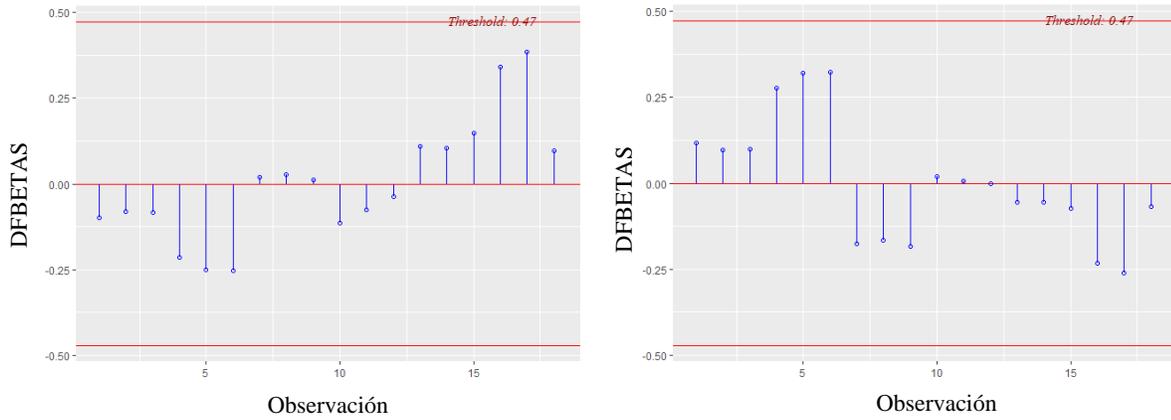
4) Gráfica de residuos frente al apalancamiento



5) Gráfica de barra de la distancia de Cook

**Figura B.** Gráficas de diagnóstico de regresión para el estándar de ácido gálico

Asimismo, mediante las gráficas DFBETAS (**Figura C**) se descartaron la presencia de valores influyentes en las estimaciones de cada uno de las variables.

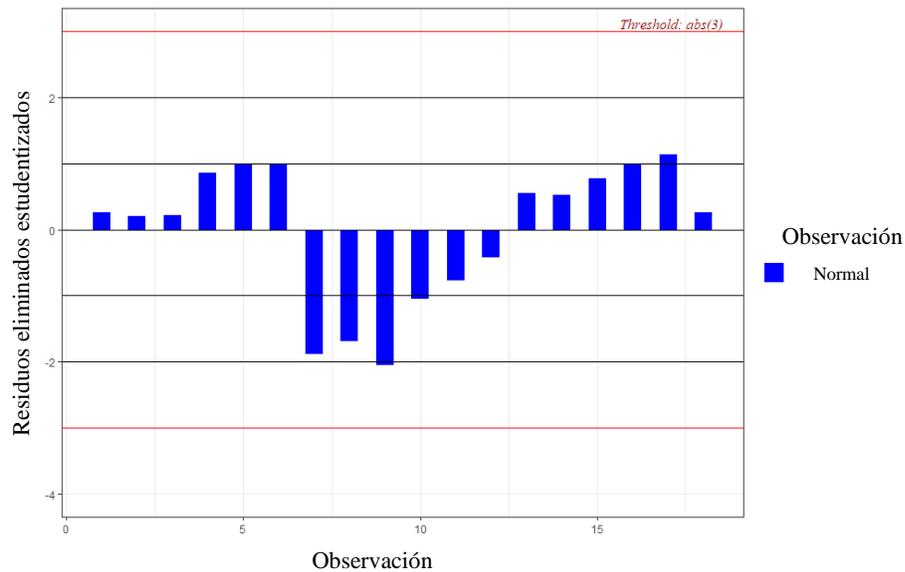


1) Diagnóstico de influencia para el área

2) Diagnóstico de influencia para la concentración

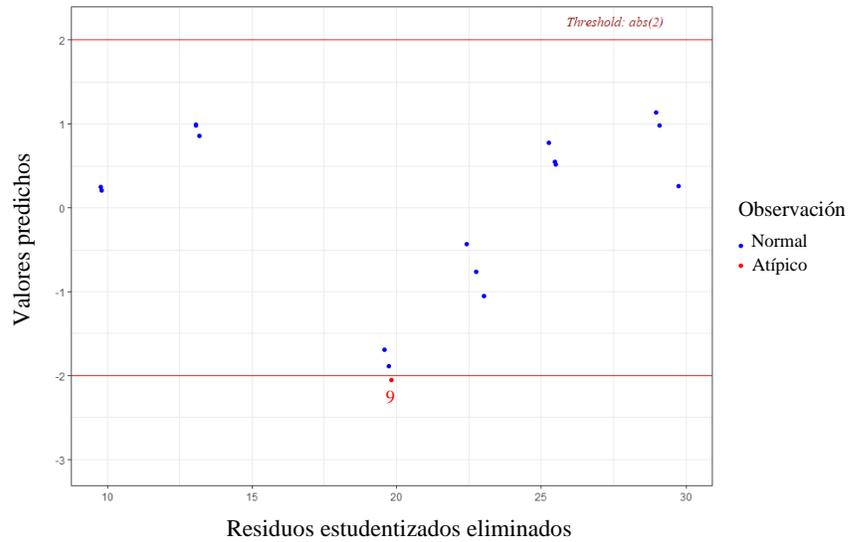
**Figura C.** Panel de DFBETA para identificar puntos influyentes del estándar de ácido gálico

Mientras que, para corroborar con una prueba más confiable la falta de valores atípicos en la variable independiente se utilizó la gráfica de residuos eliminados estudentizados (**Figura D**). Además, en esta misma gráfica se observó que los datos presentaron aleatoriedad.



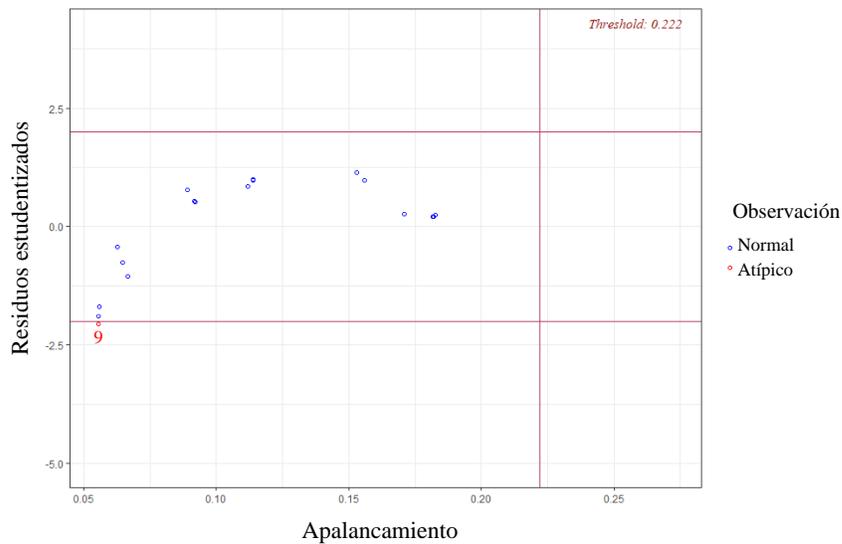
**Figura D.** Gráfica de residuos eliminados estudentizados del estándar del ácido gálico

Por otro lado, se obtuvo la gráfica de residuos estudentizados eliminados (**Figura E**) donde se encontró un valor atípico correspondiente al número 9 (la réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura E.** Residuos estudentizados eliminados vs valores predichos del estándar de ácido gálico

Además, en la gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento (**Figura F**), también se observa el valor atípico anteriormente mencionado. No obstante, su influencia no fue importante y esto se verificó aplicando el modelo antes y después del valor influyente.



**Figura F.** Gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento del estándar de ácido gálico

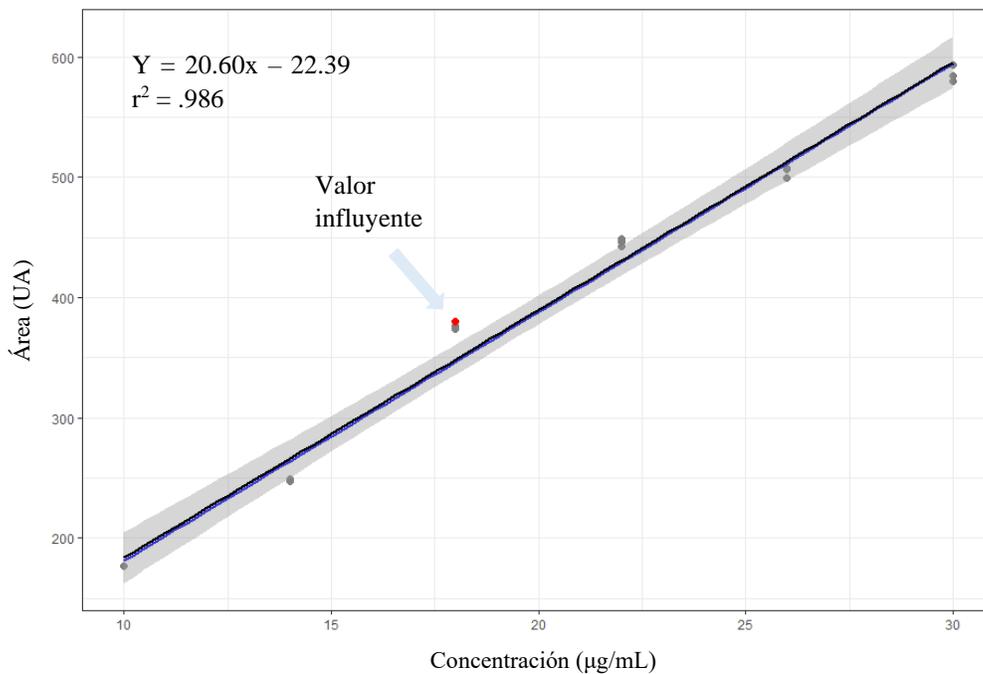
### Apéndice C. Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido clorogénico por HPLC

En la **Tabla B** se presentan las áreas bajo la curva obtenidas a partir de diferentes concentraciones del estándar de ácido clorogénico por HPLC. La Prueba de correlación de Pearson mostró que existe una correlación positiva y fuerte entre las variables área y concentración ( $r = 0.99$ ) a un  $\alpha = 0.05$ . Asimismo, la Prueba de Levene realizada a los datos iniciales indicaron la presencia de homocedasticidad ( $p = 0.44$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

**Tabla B.** Áreas bajo la curva obtenidas a partir del estándar del ácido clorogénico a diferentes concentraciones.

Réplica	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	10	14	18	22	26	30
1	176.72	248.88	373.84	448.68	507.20	584.25
2	176.57	247.46	376.26	445.84	507.08	579.51
3	176.37	248.40	379.94	442.49	499.92	593.15

Posteriormente, se procedió a obtener la gráfica de regresión lineal simple (**Figura G**) con su respectiva ecuación  $y = 20.60x - 22.39$  y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.986.

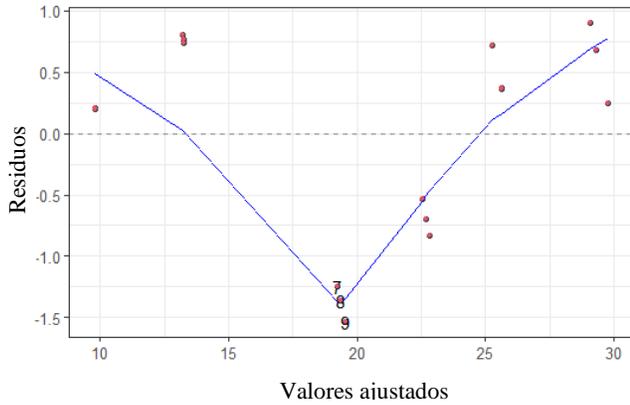


**Figura G.** Curva de calibración del estándar de ácido clorogénico

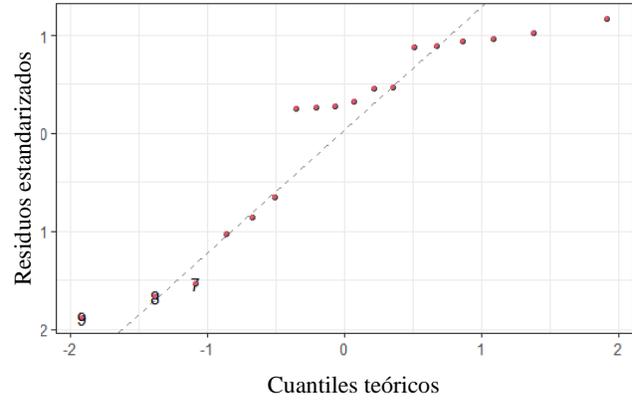
A continuación, se procedió con la validación y diagnóstico del modelo. Se obtuvo como resultado que el modelo de regresión lineal puede ser aplicado de acuerdo con los valores de  $p$  presentados por el intercepto ( $p = 0.034$ ) y de la pendiente ( $p = 2e^{-16}$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

El supuesto de linealidad se confirmó mediante la **Figura G**, la cual mostró una relación lineal entre la variable dependiente e independiente. El supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la Prueba Breusch-Pagan ( $p = 0.84$ ) a un  $\alpha = 0.05$  y por las gráficas residuales vs ajustados (**Figura H1**) y escala-ubicación (**Figura H3**) donde además, se observó a los residuos distribuirse de manera aleatoria. Por otro lado, el supuesto de normalidad se demostró con la ayuda de la Prueba de Shapiro-Wilk ( $p = 0.015$ ) a un  $\alpha = 0.01$  y por la gráfica cuantil-cuantil (Q-Q) de residuos estandarizados (**Figura H2**). Por último, el supuesto de independencia no se logró confirmar a través de la prueba de Durbin-Watson ( $p = 0.002$ ) y por Breusch-Godfrey ( $p = 2.35e^{-03}$ ) a un  $\alpha = 0.05$  cuando fue aplicando a las repeticiones de las diferentes concentraciones. Sin embargo, al aplicar las pruebas a los promedios de las áreas para cada concentración (Durbin-Watson  $p = 0.43$ , Breusch-Godfrey  $p = 0.998$ ) se comprobó que si existe independencia entre los residuos. Estas diferencias podrían deberse a la falta de aleatoriedad al momento de realizar las inyecciones al equipo de HPLC.

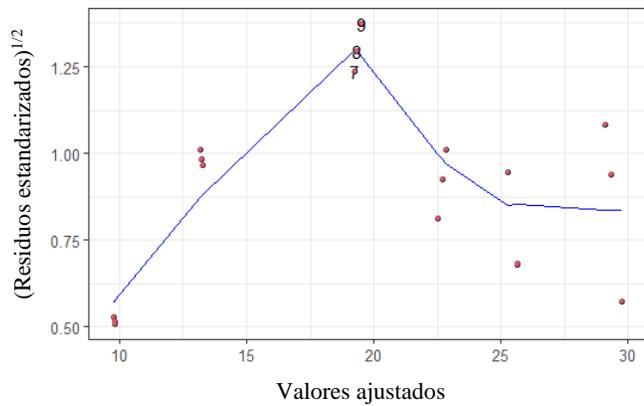
Por otra parte, de acuerdo con la gráfica de barras de distancia de Cook (**Figura H5**) se confirma que no existe la presencia de valores atípicos pero si de datos potencialmente influyentes que corresponden a los valores 8 (la réplica 2 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ), 9 (la réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ) y 17 (la réplica 2 de la concentración 30  $\mu\text{g/mL}$ ). De igual modo, se observó en la gráfica de residuos frente al apalancamiento (**Figura 4**) que dichos valores se encontraron lejos del centroide y por lo tanto, como se señaló anteriormente podrían influir en la regresión lineal. Por lo que, se procedió a realizar las gráficas de DFBETAS, de residuos eliminados estudentizados y residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para confirmar la información obtenida.



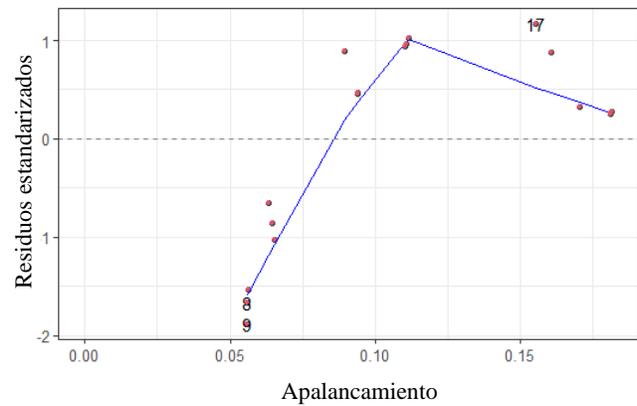
1) Gráfica valor ajustado vs Residual



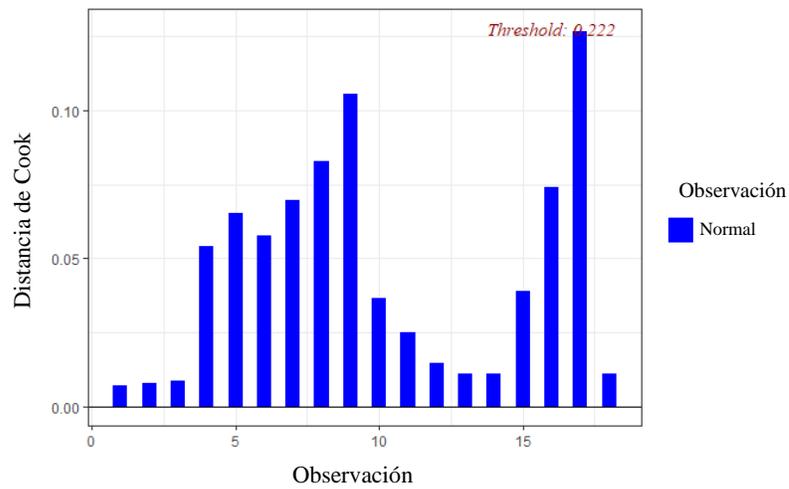
2) Gráfica de normalidad Q-Q



3) Gráfica escala-ubicación



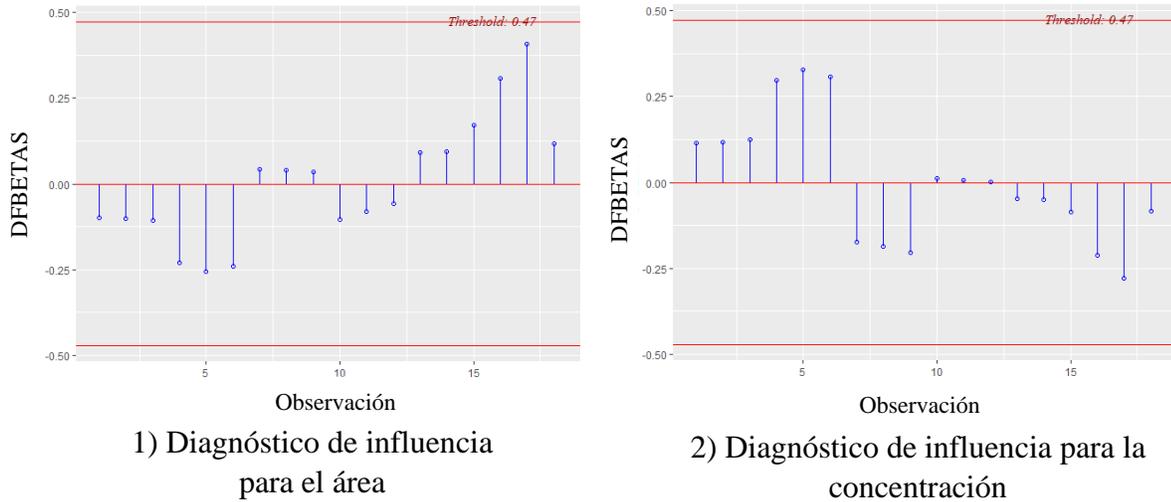
4) Gráfica de residuos frente al apalancamiento



5) Gráfica de barra de la distancia de Cook

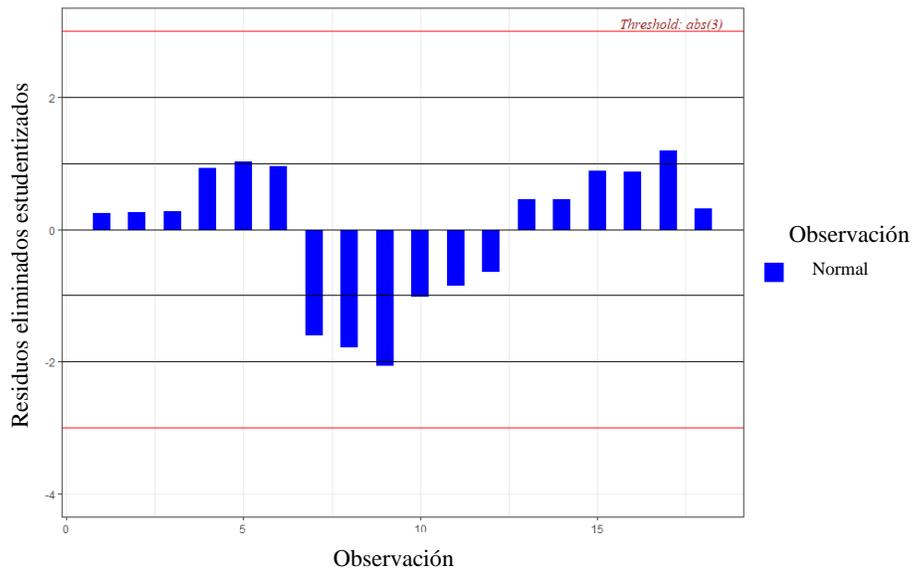
**Figura H.** Gráficas de diagnóstico de regresión para el ácido clorogénico

Asimismo, mediante las gráficas DFBETAS (**Figura I**) se descartó la presencia de valores influyentes en las estimaciones de cada uno de las variables.



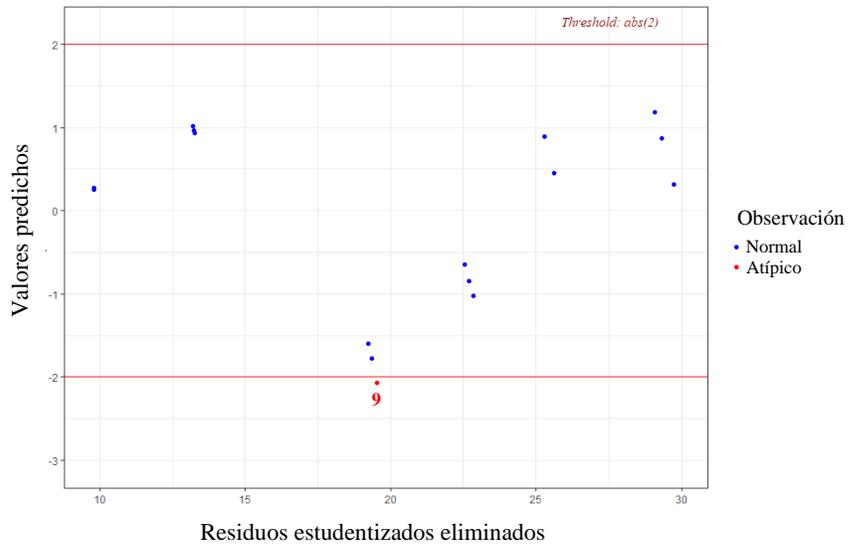
**Figura I.** Panel de DFBETA para identificar puntos influyentes del estándar de ácido clorogénico

Mientras que, para corroborar con una prueba más confiable la falta de valores atípicos en la variable independiente se utilizó la gráfica de residuos eliminados estudentizados (**Figura J**). Además, en esta misma gráfica se observó que los datos presentaron aleatoriedad.



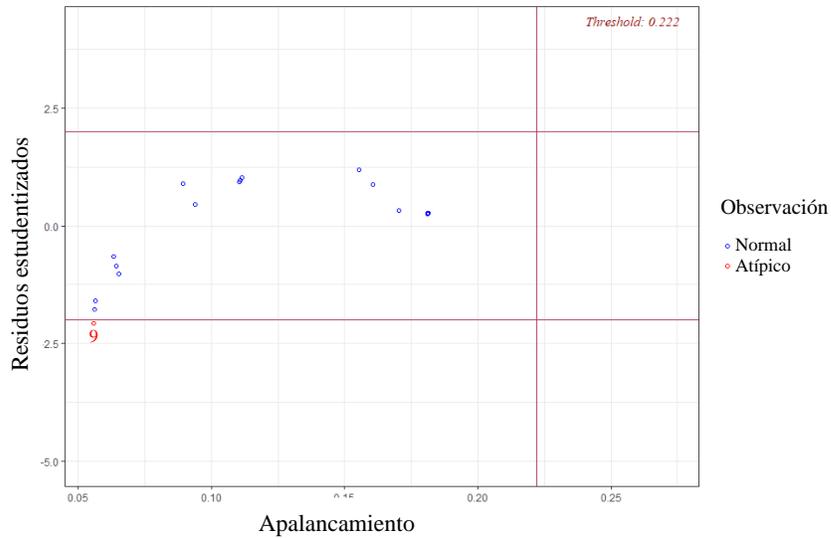
**Figura J.** Gráfica de residuos eliminados estudentizados del estándar del ácido clorogénico.

Por otro lado, se obtuvo la gráfica de residuos estudentizados eliminados (**Figura K**) donde se encontró un valor atípico que corresponde al número 9 (réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura K.** Residuos estudentizados eliminados vs valores predichos del estándar de ácido clorogénico

Además, en la gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento **Figura L**, también se observa el valor atípico anteriormente mencionado. No obstante, su influencia no fue importante y esto se verificó aplicando el modelo antes y después del valor influyente.



**Figura L.** Gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento del estándar de ácido clorogénico

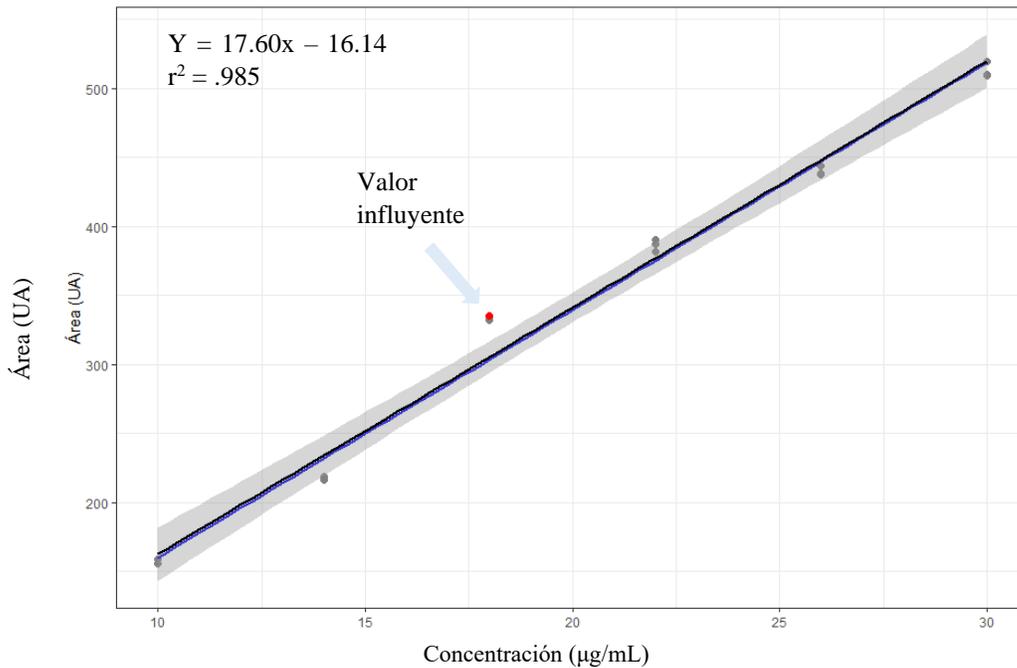
**Apéndice D.** Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido 4-hidroxibenzoico por HPLC

En la **Tabla C** se presentan las áreas bajo la curva obtenidas a partir de diferentes concentraciones del estándar de ácido 4-hidroxibenzoico por HPLC. La Prueba de correlación de Pearson mostró que existe una correlación positiva y fuerte entre las variables área y concentración ( $r = 0.99$ ) a un  $\alpha = 0.05$ . Asimismo, la Prueba de Levene realizada a los datos iniciales indicaron la presencia de homocedasticidad ( $p = 0.78$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

**Tabla C.** Áreas bajo la curva obtenidas a partir del estándar del ácido 4-hidroxibenzoico a diferentes concentraciones

Réplica	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	10	14	18	22	26	30
1	155.59	218.92	334.99	390.25	438.59	510.15
2	158.87	217.46	332.31	387.07	443.93	509.00
3	155.84	216.31	332.86	381.56	437.98	519.44

Posteriormente, se procedió a obtener la gráfica de regresión lineal simple (**Figura M**) y su respectiva ecuación  $y = 17.87x - 16.14$  y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.985.

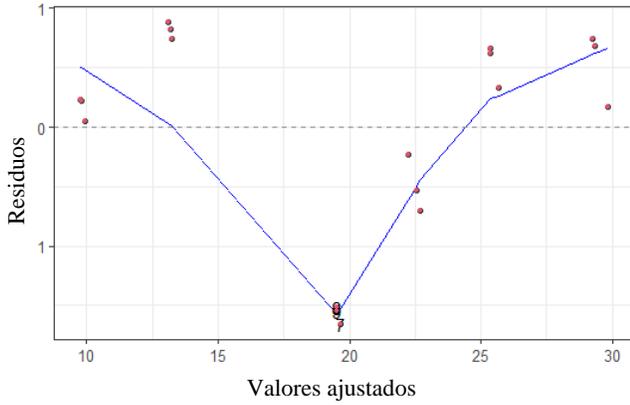


**Figura M.** Curva de calibración del estándar de ácido 4-hidroxibenzoico

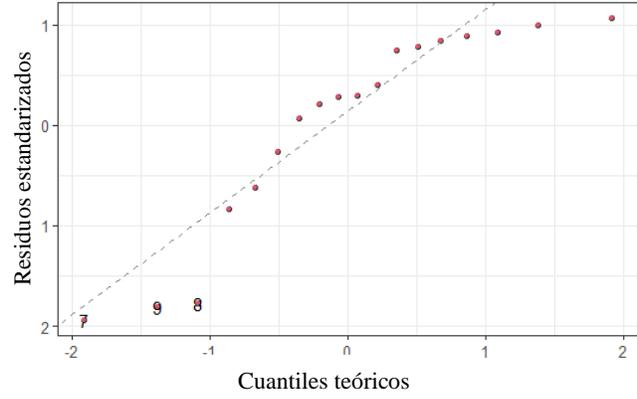
A continuación, se procedió con la validación y diagnóstico del modelo. El resultado del diagnóstico para el intercepto generó un valor  $p = 0.070$ , indicando que no es confiable. Sin embargo, el resultado del diagnóstico de la pendiente produjo un valor de  $p = 3.79e^{-15}$ , que demostró una pendiente del modelo confiable. Cabe resaltar que el descriptor de un modelo de regresión lineal más importante es la pendiente y por lo tanto, este puede ser aplicado.

El supuesto de linealidad se confirmó mediante la **Figura M**, la cual mostró una relación lineal entre la variable dependiente e independiente. El supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la Prueba Breusch-Pagan ( $p = 0.97$ ) a un  $\alpha = 0.05$  y por las gráficas residuales vs ajustados (**Figura N1**) y escala-ubicación donde, además se observa a los residuos distribuirse de manera aleatoria (**Figura N3**). Sin embargo, el supuesto de normalidad se quedó bastante cercano a cumplirse mediante la Prueba de Shapiro-Wilk ( $p = 0.008$ ) a un  $\alpha = 0.01$  y por la gráfica cuantil-cuantil (Q-Q) de residuos estandarizados (**Figura N2**). Con respecto a el supuesto de independencia, no se logró confirmar a través de la prueba de Durbin-Watson ( $p = 8e^{-03}$ ) y por Breusch-Godfrey ( $p = 6.93e^{-03}$ ) a un  $\alpha = 0.05$  cuando fue aplicando a las repeticiones de las diferentes concentraciones. Sin embargo, al aplicar las pruebas a los promedios de las áreas para cada concentración (Durbin-Watson  $p = 0.63$ , Breusch-Godfrey  $p = 0.82$ ) se comprobó que si existe independencia entre los residuos. Estas diferencias podrían deberse a la falta de aleatoriedad al momento de realizar las inyecciones al equipo de HPLC.

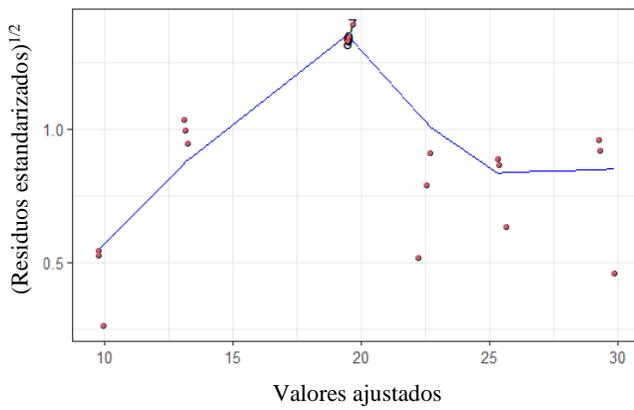
Por otra parte, de acuerdo con la gráfica de barras de distancia de Cook (**Figura N4**) se confirma que no existe la presencia de valores atípicos pero si de datos potencialmente influyentes que corresponden a los valores 7 (la réplica 1 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ), 8 (la réplica 2 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ) y 9 (la réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ). De igual modo, se observó en la gráfica de residuos frente al apalancamiento (**Figura N5**) que dichos valores se encuentran lejos del centroide y por lo tanto, como se señaló anteriormente podrían influir en la regresión lineal. Por lo que, se procedió a realizar las gráficas de DFBETAS, de residuos eliminados estudentizados y residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para confirmar la información obtenida.



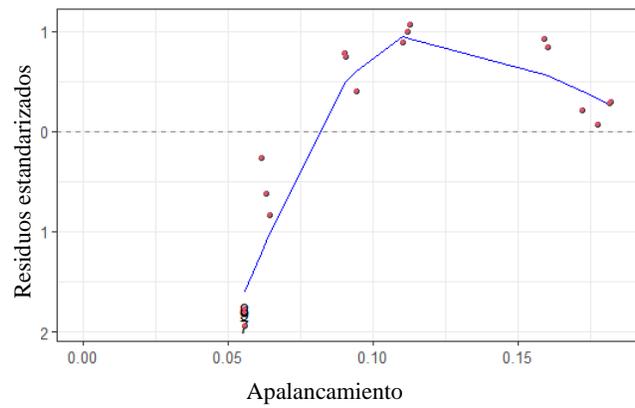
1) Gráfica valor ajustado vs Residual



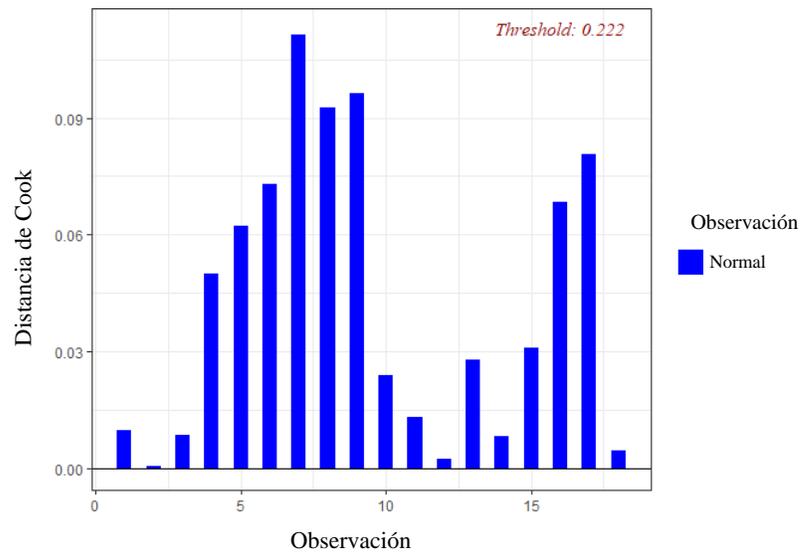
2) Gráfica de normalidad Q-Q



3) Gráfica escala-ubicación



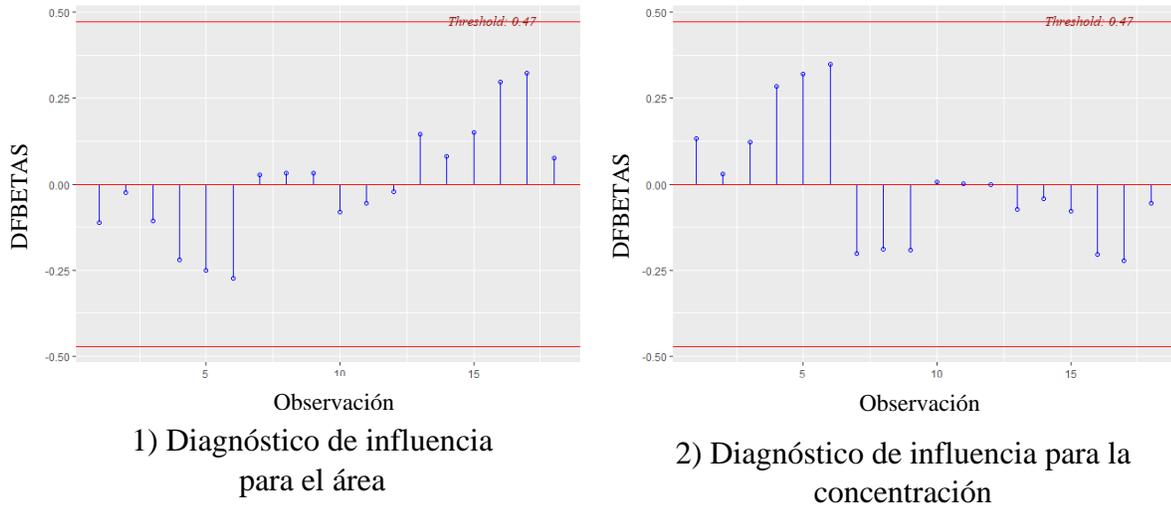
4) Gráfica de residuos frente al apalancamiento



5) Gráfica de barra de la distancia de Cook

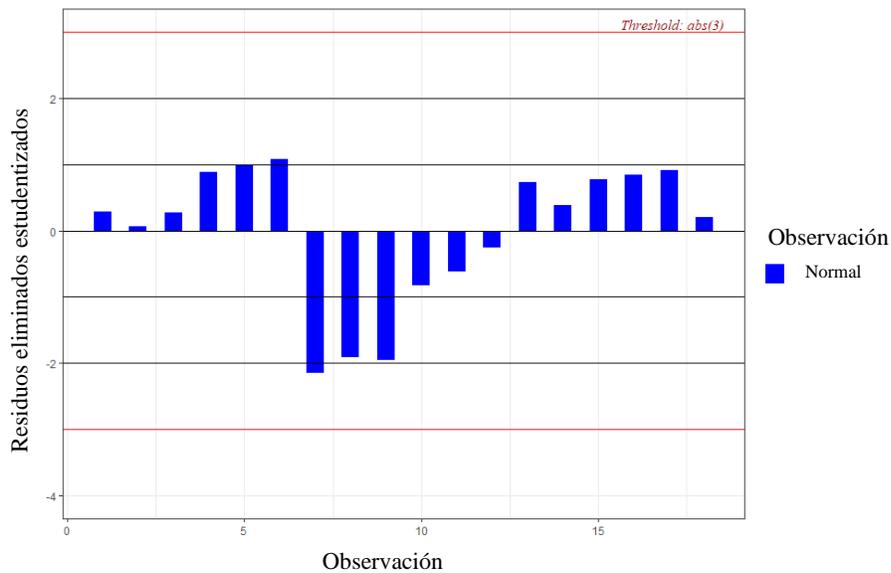
**Figura N.** Gráficas de diagnóstico de regresión para el estándar de ácido *p*-hidroxibenzoico

Asimismo, mediante las gráficas DFBETAS (**Figura O**) se descartó la presencia de valores influyentes en las estimaciones de cada uno de las variables.



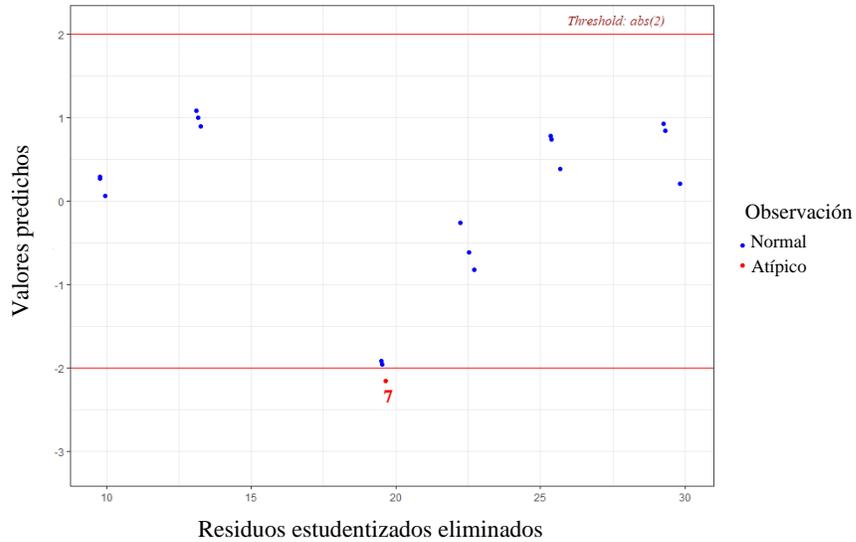
**Figura O.** Panel de DFBETA para identificar puntos influyentes del estándar de ácido *p*-hidroxibenzoico

Mientras que, para corroborar con una prueba más confiable la falta de valores atípicos en la variable independiente se utilizó la gráfica de residuos eliminados estudentizados (**Figura P**). Además, en esta misma gráfica se observó que los datos presentaron aleatoriedad.



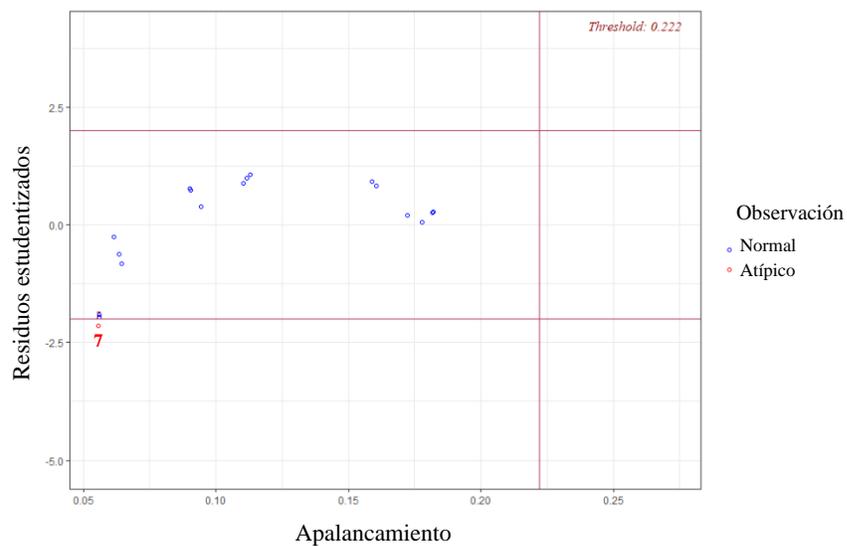
**Figura P.** Gráfica de residuos eliminados estudentizados del estándar del ácido *p*-hidroxibenzoico.

Por otro lado, se obtuvo la gráfica de residuos estudentizados eliminados (**Figura Q**) donde se encontró un valor atípico que corresponde al número 7 ((la réplica 1 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura Q.** Residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para el estándar de ácido *p*-hidroxibenzoico

Además, en la gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento (**Figura R**), también se observa que el valor atípico anteriormente mencionado. No obstante, su influencia no fue importante y esto, se verificó aplicando el modelo antes y después del valor influyente.



**Figura R.** Gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento del estándar de ácido *p*-hidroxibenzoico

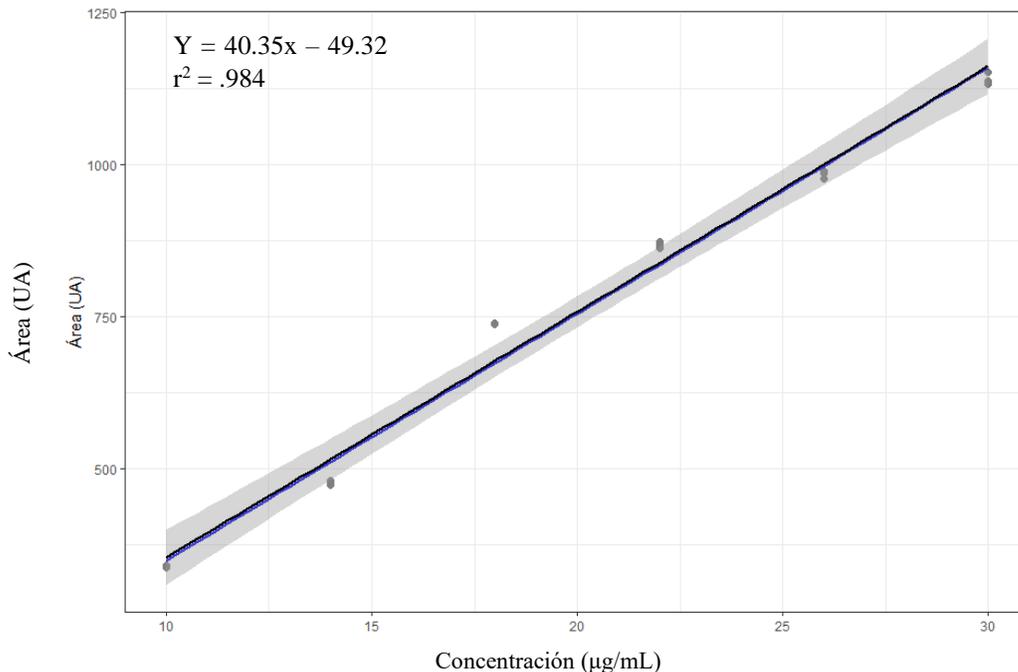
**Apéndice E.** Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido cafeico por HPLC

En la **Tabla D** se presentan las áreas bajo la curva obtenidas a partir de diferentes concentraciones del estándar de ácido cafeico por HPLC. La Prueba de correlación de Pearson mostró que existe una correlación positiva y fuerte entre las variables área y concentración ( $r = 0.99$ ) a un  $\alpha = 0.05$ . Asimismo, la Prueba de Levene realizada a lo datos iniciales indicaron la presencia de homocedasticidad ( $p = 0.47$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

**Tabla D.** Áreas bajo la curva obtenidas a partir del estándar del ácido cafeico a diferentes concentraciones

Réplica	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	10	14	18	22	26	30
1	341.55	479.55	739.14	873.45	985.37	1136.91
2	341.56	473.75	737.58	868.22	989.67	1131.27
3	337.35	475.69	738.08	862.91	975.49	1150.83

Posteriormente, se procedió a obtener la gráfica de regresión lineal simple (**Figura S**) y su respectiva ecuación  $y = 40.35x - 49.32$  y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.984.

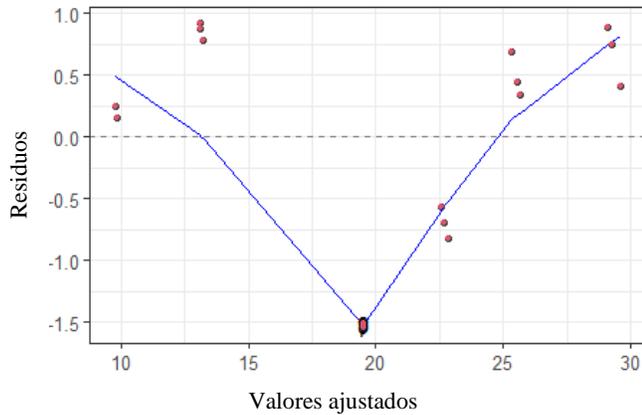


**Figura S.** Curva de calibración del estándar de ácido cafeico

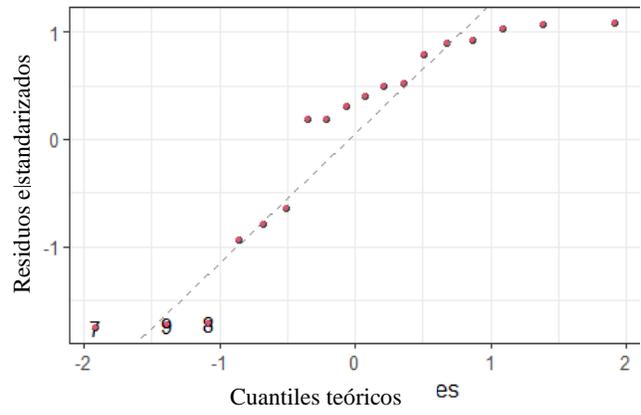
A continuación, se procedió con la validación y diagnóstico del modelo. Se obtuvo como resultado que el modelo de regresión lineal puede ser aplicado de acuerdo con los valores de  $p$  presentados por el intercepto ( $p = 0.027$ ) y de la pendiente ( $p = 7.06e^{-16}$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

El supuesto de linealidad se confirmó mediante la **Figura S**, la cual mostró una relación lineal entre la variable dependiente e independiente. El supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la Prueba Breusch-Pagan ( $p = 0.91$ ) a un  $\alpha = 0.05$  y por las gráficas residuales vs ajustados (**Figura T1**) y escala-ubicación donde además, se observa a los residuos distribuirse de manera aleatoria (**Figura T3**). Sin embargo, el supuesto de normalidad se queda cercano a cumplirse mediante la Prueba de Shapiro-Wilk ( $p = 9.2e^{-3}$ ) a un  $\alpha = 0.01$  y por la gráfica cuantil-cuantil (Q-Q) de residuos estandarizados (**Figura T2**). Con respecto a el supuesto de independencia, no se logró confirmar a través de la prueba de Durbin-Watson ( $p = 2e^{-03}$ ) y por Breusch-Godfrey ( $p = 3.52e^{-03}$ ) a un  $\alpha = 0.05$  cuando fue aplicando a las repeticiones de las diferentes concentraciones. Sin embargo, al aplicar las pruebas a los promedios de las áreas para cada concentración (Durbin-Watson  $p = 0.49$ , Breusch-Godfrey  $p = 0.95$ ) se comprobó que si existe independencia entre los residuos. Estas diferencias podrían deberse a la falta de aleatoridad al momento de realizar las inyecciones al equipo de HPLC.

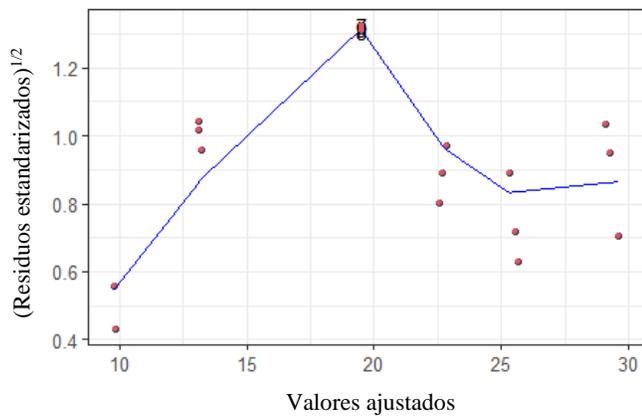
Por otra parte, de acuerdo con la gráfica de barras de distancia de Cook (**Figura T5**) se confirma que no existe la presencia de valores atípicos pero si de datos potencialmente influyentes que corresponden a los valores 7 (la réplica 1 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ), 9 (la réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ) y 17 (la réplica 2 de la concentración 30  $\mu\text{g/mL}$ ). De igual modo, se observó en la gráfica de residuos frente al apalancamiento (**Figura T4**) que dichos valores se encuentran lejos del centroide y por lo tanto, como se señaló anteriormente podrían influir en la regresión lineal. Por lo que, se procedió a realizar las gráficas de DFBETAS, de residuos eliminados estudentizados y residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para confirmar la información obtenida.



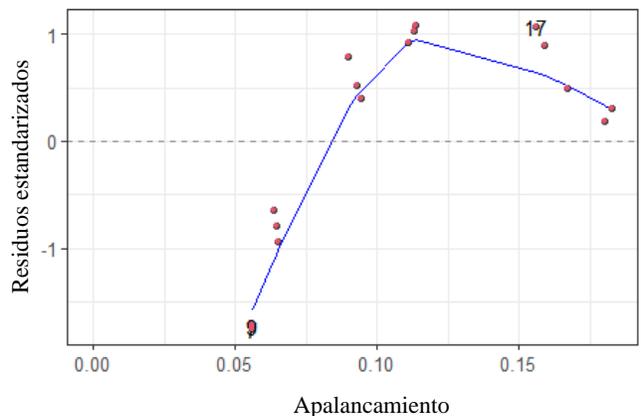
1) Gráfica valor ajustado vs Residual



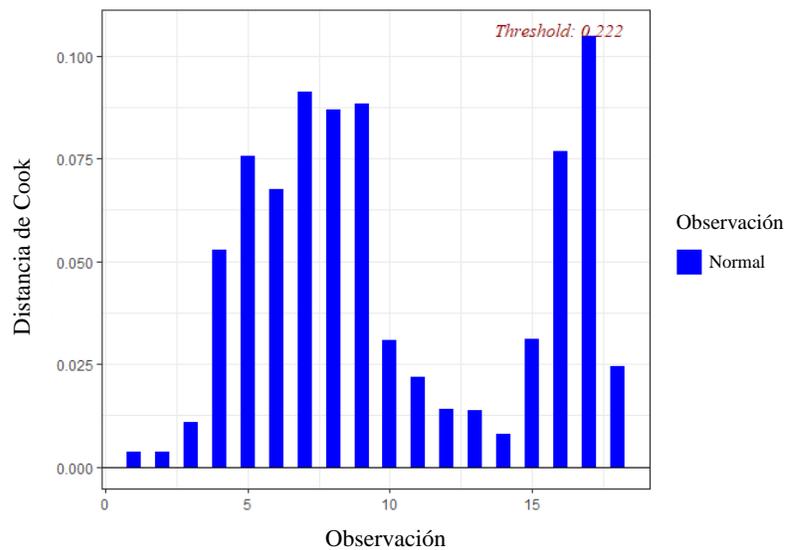
2) Gráfica de normalidad Q-Q



3) Gráfica escala-ubicación



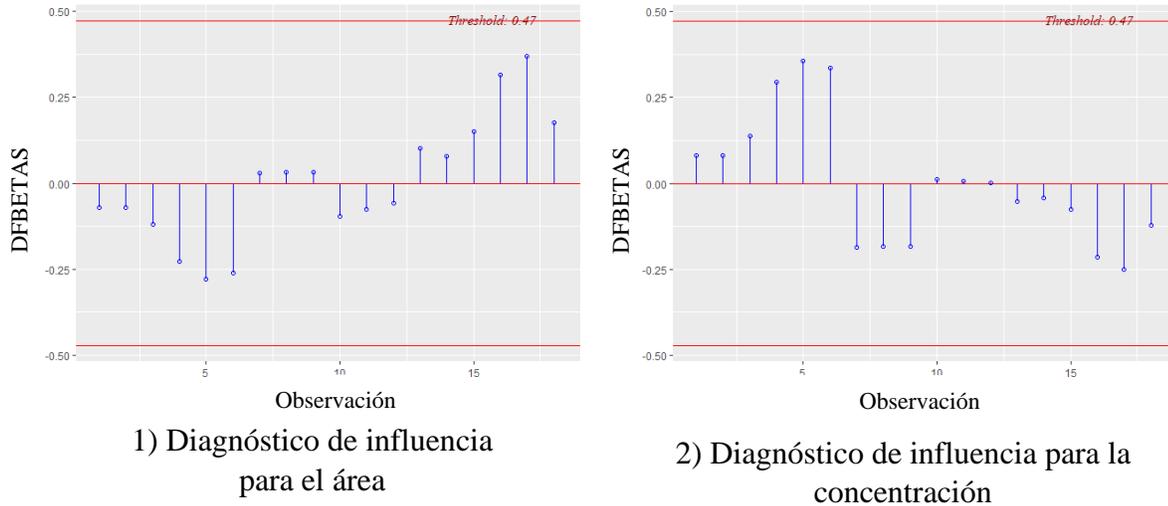
4) Gráfica de residuos frente al apalancamiento



5) Gráfica de barra de la distancia de Cook

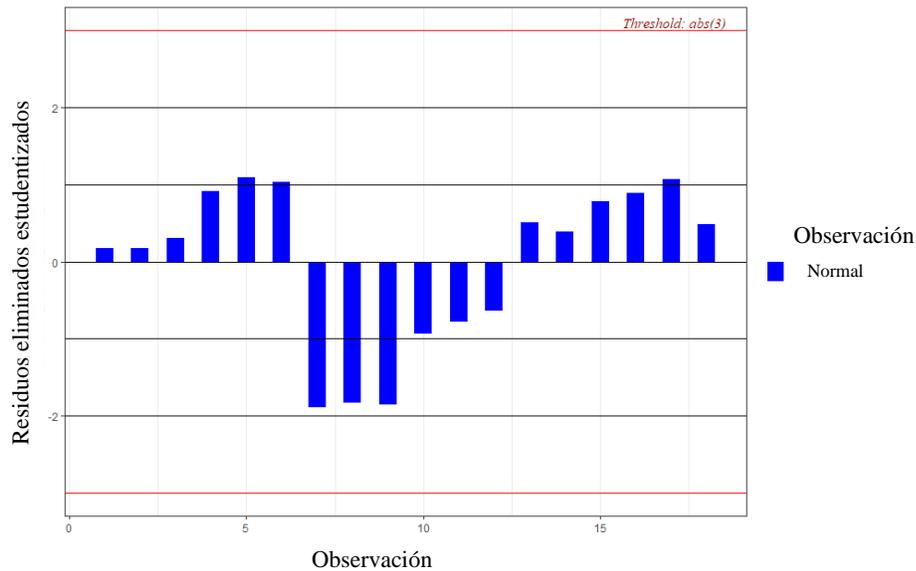
**Figura T.** Gráficas de diagnóstico de regresión para el estándar de ácido cafeico

Asimismo, mediante las gráficas DFBETAS (**Figura U**) se descartó la presencia de valores influyentes en las estimaciones de cada uno de las variables.



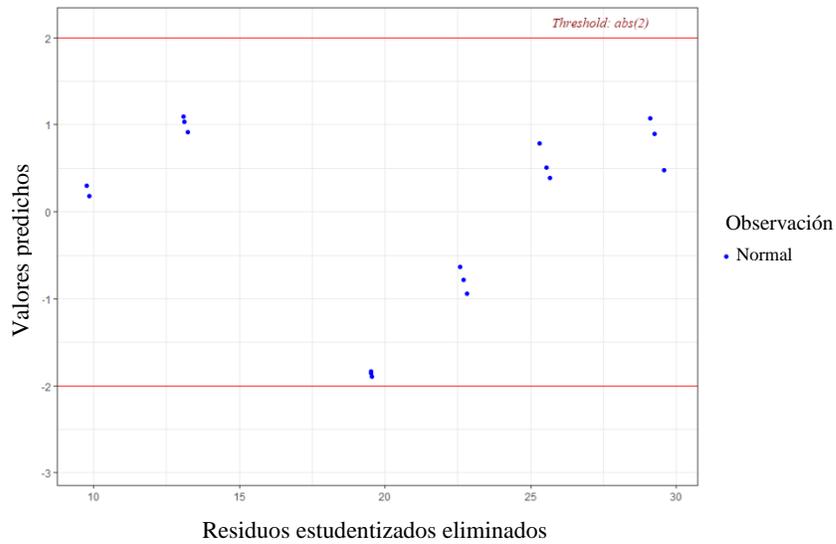
**Figura U.** Panel de DFBETA para identificar puntos influyentes del estándar de ácido cafeico

Mientras que, para corroborar con una prueba más confiable la falta de valores atípicos en la variable independiente se utilizó la gráfica de residuos eliminados estudentizados (**Figura V**). Además, en esta misma gráfica se observó que los datos presentaron aleatoriedad.



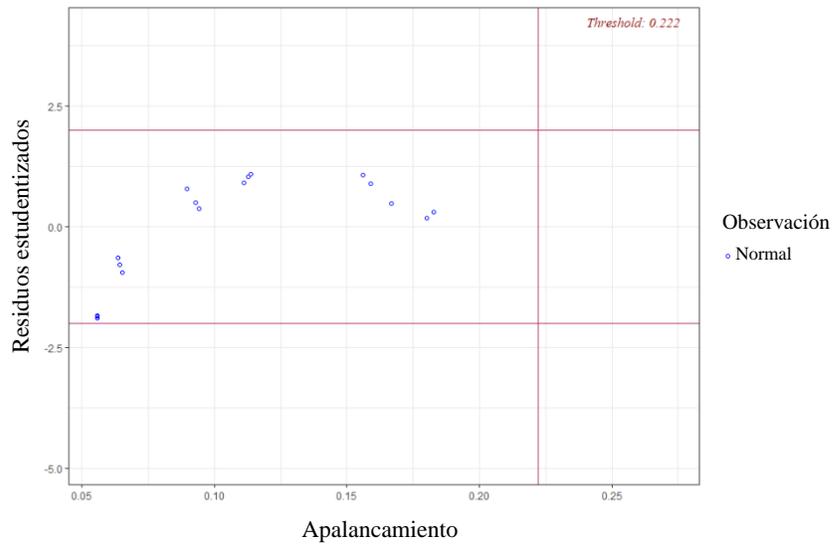
**Figura V.** Gráfica de residuos eliminados estudentizados del estándar del ácido cafeico.

Por otro lado, se obtuvo la gráfica de residuos estudentizados eliminados (**Figura W**) donde no se encontraron valores atípicos.



**Figura W.** Residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para el estándar de ácido cafeico

Asimismo, de acuerdo con la gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento **Figura X**, se observa que no hay valores atípicos ni de apalancamiento que influyan en el modelo de regresión lineal.



**Figura X.** Gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento para el estándar de ácido cafeico

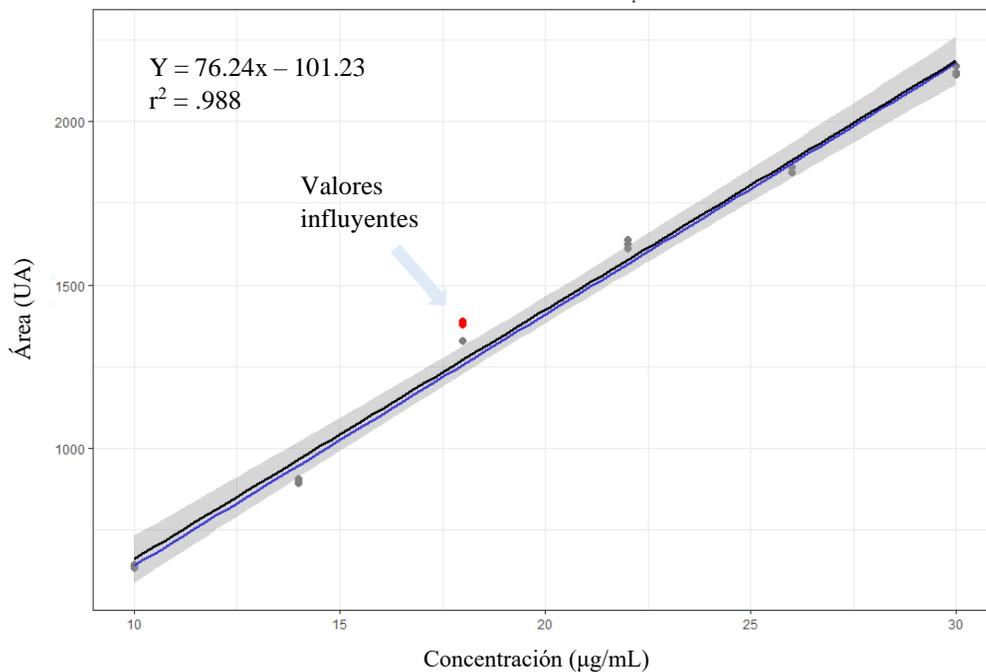
## Apéndice F. Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido *p*-cumárico por HPLC

En la **Tabla E** se presentan las áreas bajo la curva obtenidas a partir de diferentes concentraciones del estándar de ácido *p*-cumárico por HPLC. La Prueba de correlación de Pearson mostró que existe una correlación positiva y fuerte entre las variables área y concentración ( $r = 0.99$ ) a un  $\alpha = 0.05$ . Asimismo, la Prueba de Levene realizada a los datos iniciales indicaron la presencia de homocedasticidad ( $p = 0.74$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

**Tabla E.** Áreas bajo la curva obtenidas a partir del estándar del ácido *p*-cumárico a diferentes concentraciones.

Réplica	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	10	14	18	22	26	30
1	646.36	908.22	1328.51	1638.67	1859.88	2148.50
2	645.91	901.63	1380.44	1622.92	1860.88	2141.96
3	635.42	893.69	1387.70	1609.62	1842.57	2170.35

Posteriormente, se procedió a obtener la gráfica de regresión lineal simple (**Figura Y**) y su respectiva ecuación  $y = 76.24x - 101.23$  y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.988.

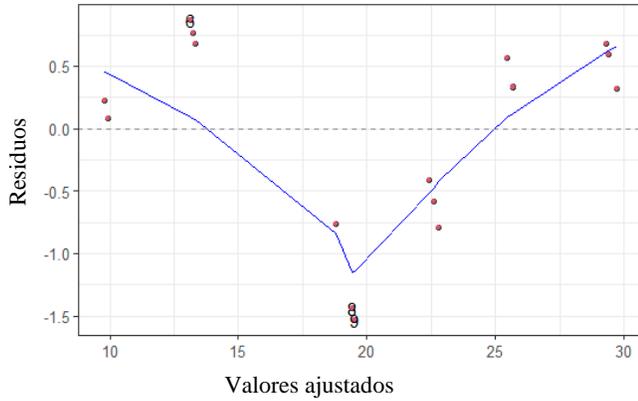


**Figura Y.** Curva de calibración del estándar de ácido *p*-cumárico.

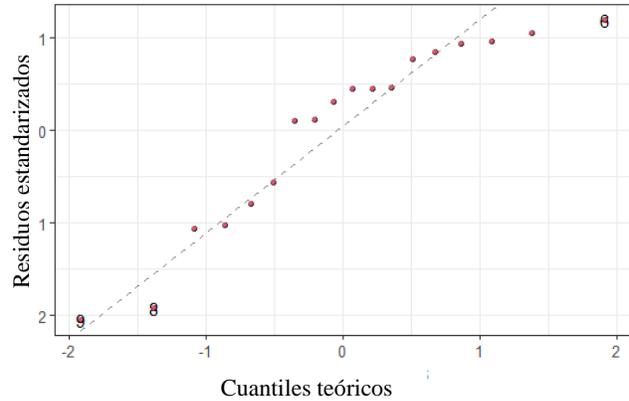
A continuación, se procedió con la validación y diagnóstico del modelo. Se obtuvo como resultado que el modelo de regresión lineal puede ser aplicado de acuerdo con los valores de  $p$  presentados por el intercepto ( $p = 9.91e^{-03}$ ) y de la pendiente ( $p = 2e^{-16}$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

El supuesto de linealidad se confirmó mediante la **Figura Y**, la cual mostró una relación lineal entre la variable dependiente e independiente. El supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la Prueba Breusch-Pagan ( $p = 0.94$ ) a un  $\alpha = 0.05$  y por las gráficas residuales vs ajustados (**Figura Z1**) y escala-ubicación donde además, se observa a los residuos distribuirse de manera aleatoria (**Figura Z3**). Por otro lado, el supuesto de normalidad se demostró mediante la Prueba de Shapiro-Wilk ( $p = 0.036$ ) a un  $\alpha = 0.01$  y por la gráfica cuantil-cuantil (Q-Q) de residuos estandarizados (**Figura Z2**). Con respecto a el supuesto de independencia, no se logró confirmar a través de la prueba de Durbin-Watson ( $p = 2e^{-03}$ ) y por Breusch-Godfrey ( $p = 1.54e^{-03}$ ) a un  $\alpha = .05$  cuando fue aplicando a las repeticiones de las diferentes concentraciones. Sin embargo, al aplicar las pruebas a los promedios de las áreas para cada concentración (Durbin-Watson  $p = 0.57$ , Breusch-Godfrey  $p = 0.90$ ) se comprobó que si existe independencia entre los residuos. Estas diferencias podrían deberse a la falta de aleatoriedad al momento de realizar las inyecciones al equipo de HPLC.

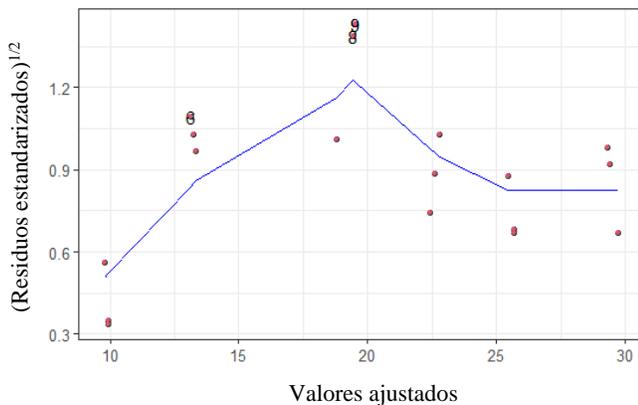
Por otra parte, de acuerdo con la gráfica de barras de distancia de Cook (**Figura Z5**) se confirma que no existe la presencia de valores atípicos pero si de datos potencialmente influyentes que corresponden a los valores 6 (la réplica 3 de la concentración 14  $\mu\text{g/mL}$ ), 8 (la réplica 2 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ) y 9 (la réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ). De igual modo, observó en la gráfica de residuos frente al apalancamiento (**Figura Z4**) que dichos valores se encuentran lejos del centroide y por lo tanto, como se señaló anteriormente podrían influir en la regresión lineal. Por lo que, se procedió a realizar las gráficas de DFBETAS, de residuos eliminados estudentizados y residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para confirmar la información obtenida.



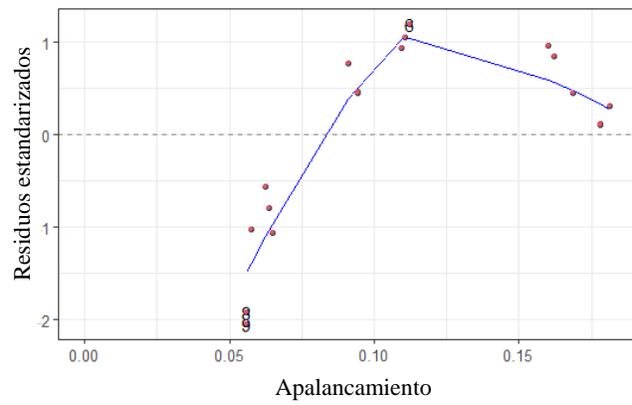
1) Gráfica valor ajustado vs Residual



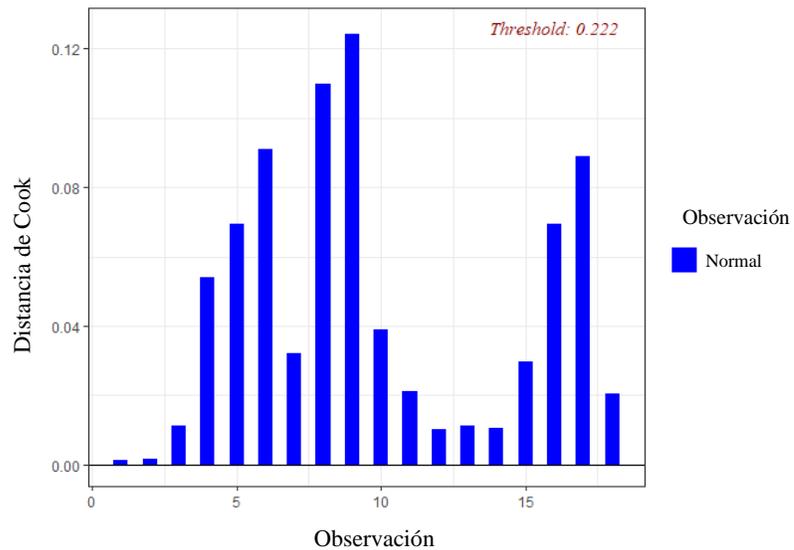
2) Gráfica de normalidad Q-Q



3) Gráfica escala-ubicación



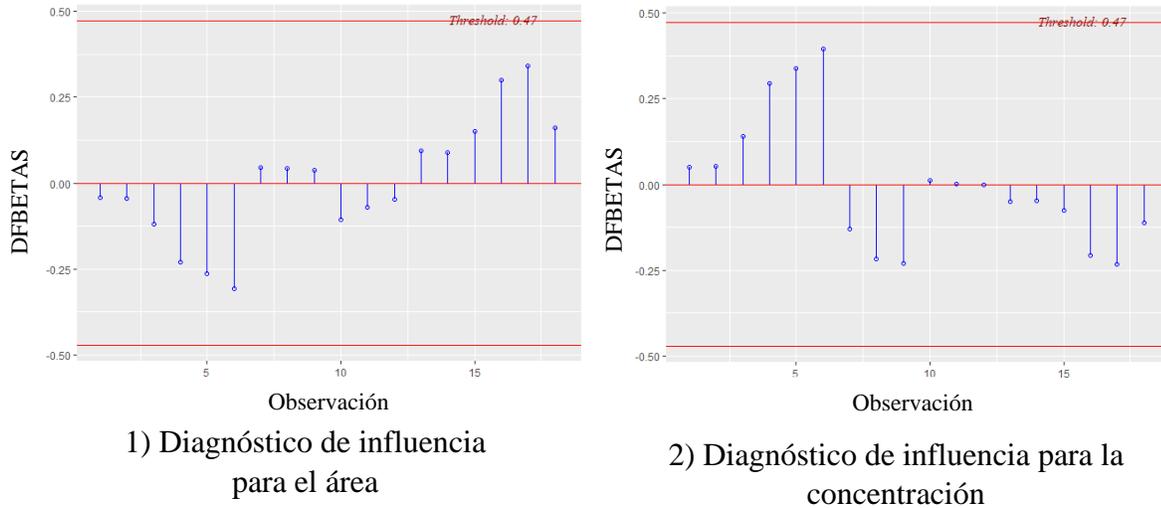
4) Gráfica de residuos frente al apalancamiento



5) Gráfica de barra de la distancia de Cook

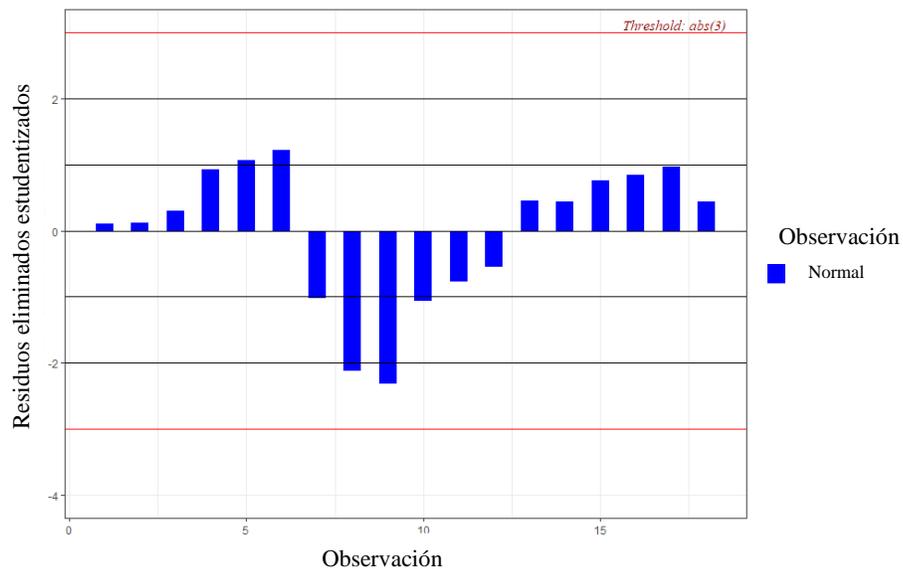
**Figura Z.** Gráficas de diagnóstico de regresión para el estándar de ácido *p*-cumárico

Asimismo, mediante las gráficas DFBETAS (**Figura AA**) se descartó la presencia de valores influyentes en las estimaciones de cada uno de las variables.



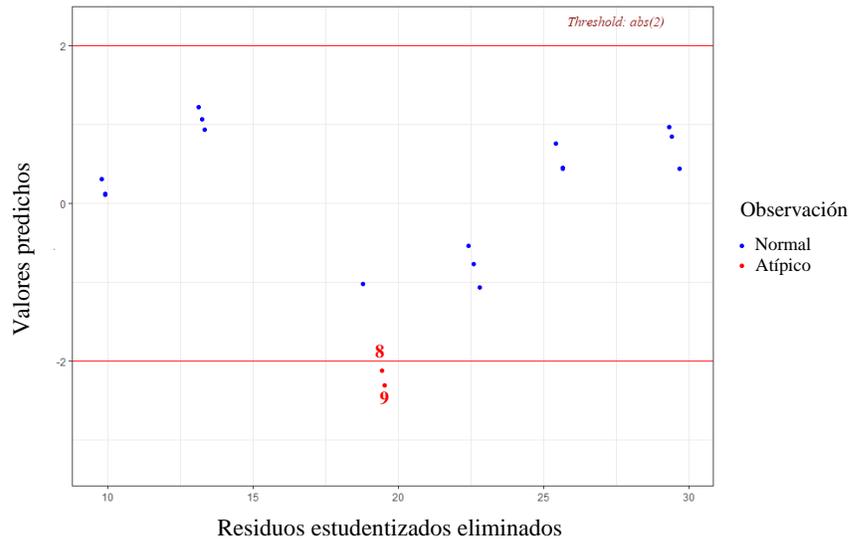
**Figura AA.** Panel de DFBETA para identificar puntos influyentes del estándar de ácido *p*-cumárico

Mientras que, para corroborar con una prueba más confiable la falta de valores atípicos en la variable independiente (residuos eliminados estudentizados < 3) se utilizó la gráfica de residuos eliminados estudentizados (**Figura AB**). Además, en esta misma gráfica se observó que los datos presentaron aleatoriedad.



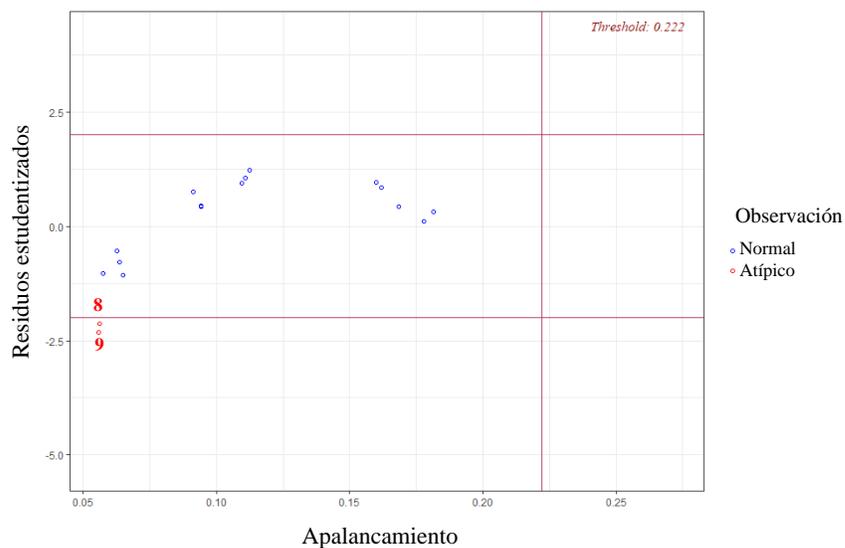
**Figura AB.** Gráfica de residuos eliminados estudentizados del estándar del ácido *p*-cumárico

Por otro lado, se obtuvo la gráfica de residuos estudentizados eliminados (**Figura AC**) donde se encontraron dos valores atípicos que corresponden al número 8 (la réplica 2 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ) y al número 9 (la réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura AC.** Residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para el estándar de ácido *p*-cumárico

Además, en la gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento (**Figura AD**), también se observaron los valores atípicos anteriormente mencionados. No obstante, su influencia no fue importante y esto se verificó aplicando el modelo antes y después del valor influyente.



**Figura AD.** Gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento para el estándar de ácido *p*-cumárico

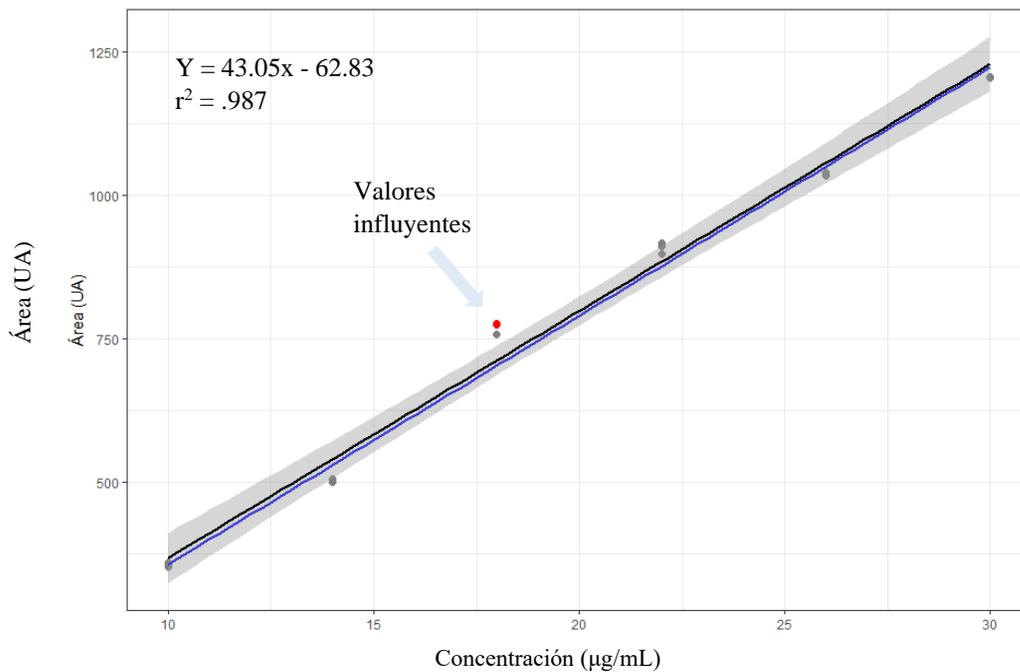
**Apéndice G.** Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido ferúlico por HPLC

En la **Tabla E** se presentan las áreas bajo la curva obtenidas a partir de diferentes concentraciones del estándar de ácido ferúlico por HPLC. La Prueba de correlación de Pearson mostró que existe una correlación positiva y fuerte entre las variables área y concentración ( $r = 0.99$ ) a un  $\alpha = 0.05$ . Asimismo, la Prueba de Levene realizada a lo datos iniciales indicaron la presencia de homocedasticidad ( $p = 0.67$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

**Tabla E.** Áreas bajo la curva obtenidas a partir del estándar del ácido ferúlico a diferentes concentraciones.

Réplica	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	10	14	18	22	26	30
1	357.67	505.53	757.06	916.03	1040.59	1205.21
2	359.75	505.63	777.43	911.03	1039.71	1205.91
3	352.02	499.87	774.24	897.80	1035.10	---

Posteriormente, se procedió a obtener la gráfica de regresión lineal simple (**Figura AE**) y su respectiva ecuación  $y = 43.05x - 62.73$  y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de .987.

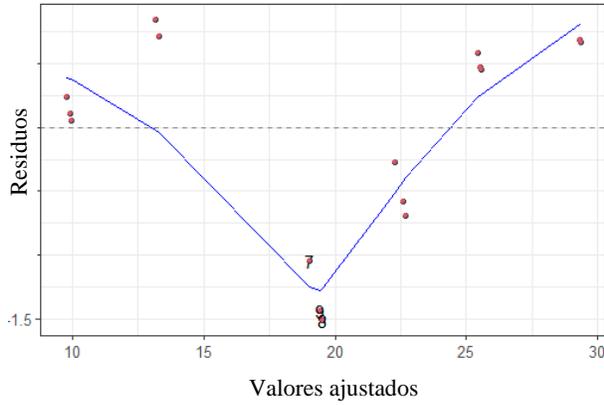


**Figura AE.** Curva de calibración del estándar de ácido ferúlico

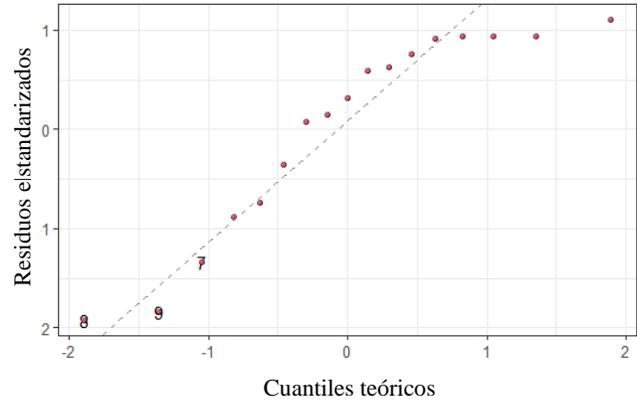
A continuación, se procedió con la validación y diagnóstico del modelo. Se obtuvo como resultado que el modelo de regresión lineal puede ser aplicado de acuerdo con los valores de  $p$  presentados por el intercepto ( $p = 9e^{-03}$ ) y de la pendiente ( $p = 1.83e^{-15}$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

El supuesto de linealidad se confirmó mediante la **Figura AE**, la cual mostró una relación lineal entre la variable dependiente e independiente. El supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la Prueba Breusch-Pagan ( $p = 0.77$ ) a un  $\alpha = 0.05$  y por las gráficas residuales vs ajustados (**Figura AF1**) y escala-ubicación donde además, se observa a los residuos distribuirse de manera aleatoria (**Figura AF3**). Por otro lado, el supuesto de normalidad se demostró mediante la Prueba de Shapiro-Wilk ( $p = 0.022$ ) a un  $\alpha = 0.01$  y por la gráfica cuantil-cuantil (Q-Q) de residuos estandarizados, (**Figura AF2**). Con respecto a el supuesto de independencia, no se logró confirmar a través de la prueba de Durbin-Watson ( $p = 2e^{-03}$ ) y por Breusch-Godfrey ( $p = 2.78e^{-03}$ ) a un  $\alpha = 0.05$  cuando fue aplicando a las repeticiones de las diferentes concentraciones. Sin embargo, al aplicar las pruebas a los promedios de las áreas para cada concentración (Durbin-Watson  $p = 0.50$ , Breusch-Godfrey  $p = 0.91$ ) se comprobó que si existe independencia entre los residuos. Estas diferencias podrían deberse a la falta de aleatoriedad al momento de realizar las inyecciones al equipo de HPLC.

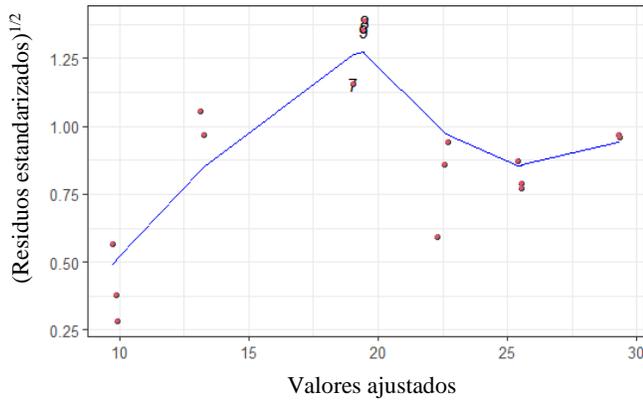
Por otra parte, de acuerdo con la gráfica de barras de distancia de Cook (**Figura A5**) se confirma que no existe la presencia de valores atípicos pero si de datos potencialmente influyentes que corresponden a los valores 8 (la réplica 2 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ), 9 (la réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ) y 16 (la réplica 3 de la concentración 30  $\mu\text{g/mL}$ ). De igual modo, se observó en la gráfica de residuos frente al apalancamiento (**Figura AF4**) que dichos valores se encuentran lejos del centroide y por lo tanto, como se señaló anteriormente podrían influir en la regresión lineal. Por lo que, se procedió a realizar las gráficas de DFBETAS, de residuos eliminados estudentizados y residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para confirmar la información obtenida.



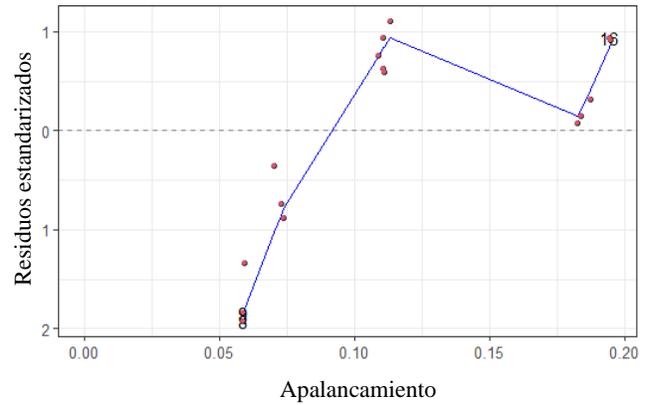
1) Gráfica valor ajustado vs Residual



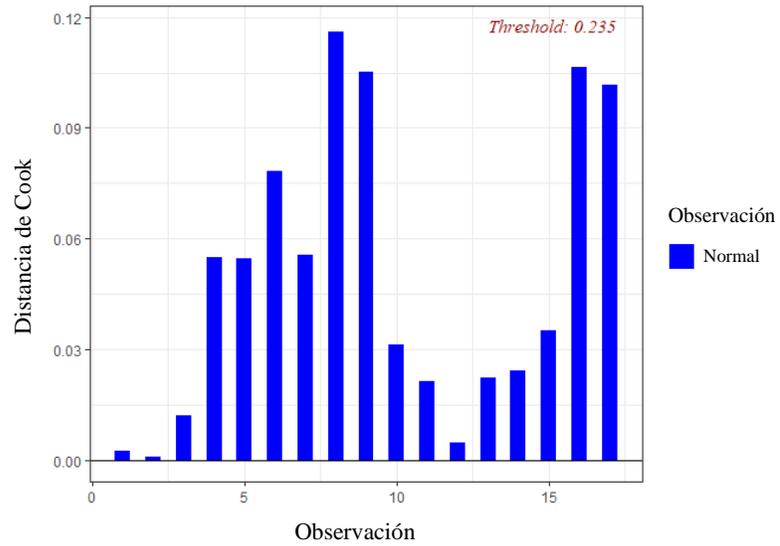
2) Gráfica de normalidad Q-Q



3) Gráfica escala-ubicación



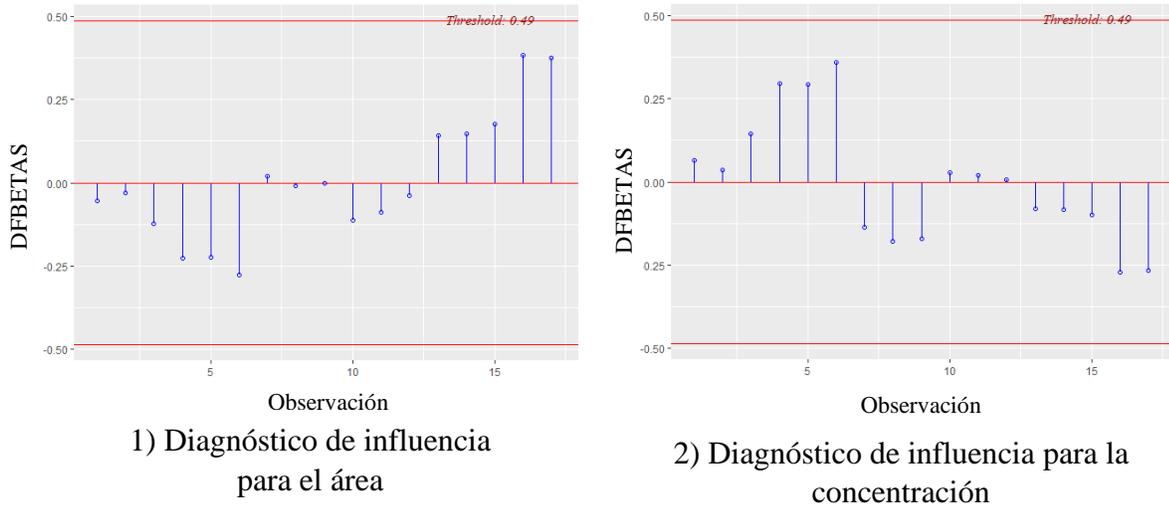
4) Gráfica de residuos frente al apalancamiento



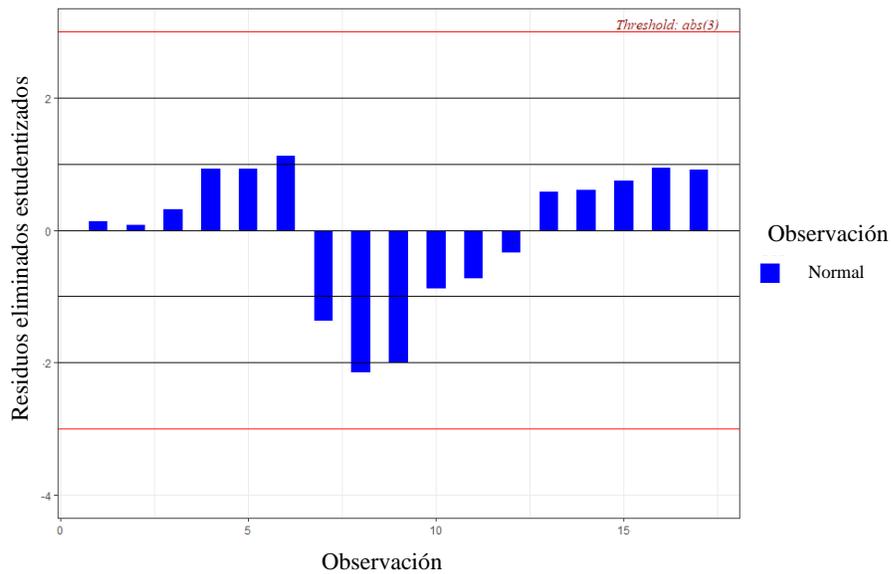
5) Gráfica de barra de la distancia de Cook

**Figura AF.** Gráficas de diagnóstico de regresión para el estándar de ácido cafeico

Asimismo, mediante las gráficas DFBETAS (**Figura AG**) se descartó la presencia de valores influyentes en las estimaciones de cada uno de las variables.

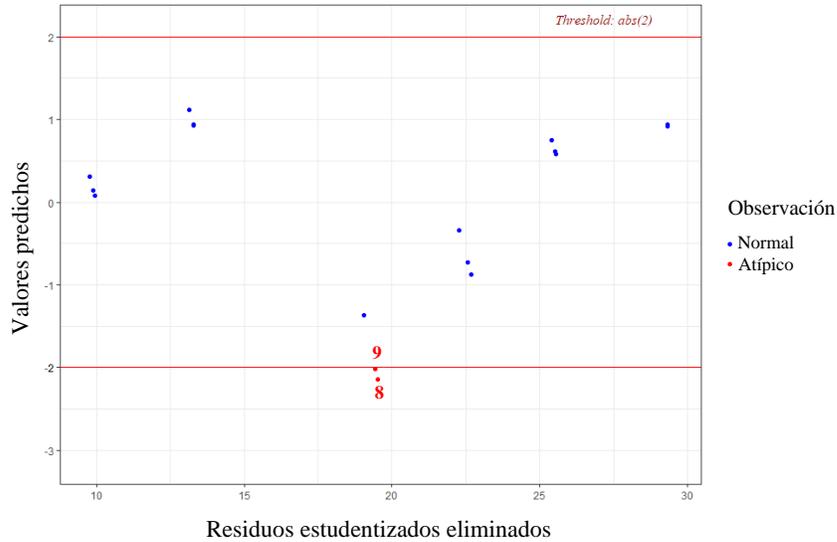


**Figura AG.** Panel de DFBETA para identificar puntos influyentes del estándar de ácido ferúlico. Mientras que, para corroborar con una prueba más confiable la falta de valores atípicos en la variable independiente se utilizó la gráfica de residuos eliminados estudentizados (**Figura AH**). Además, en esta misma gráfica se observó que los datos presentaron aleatoriedad.



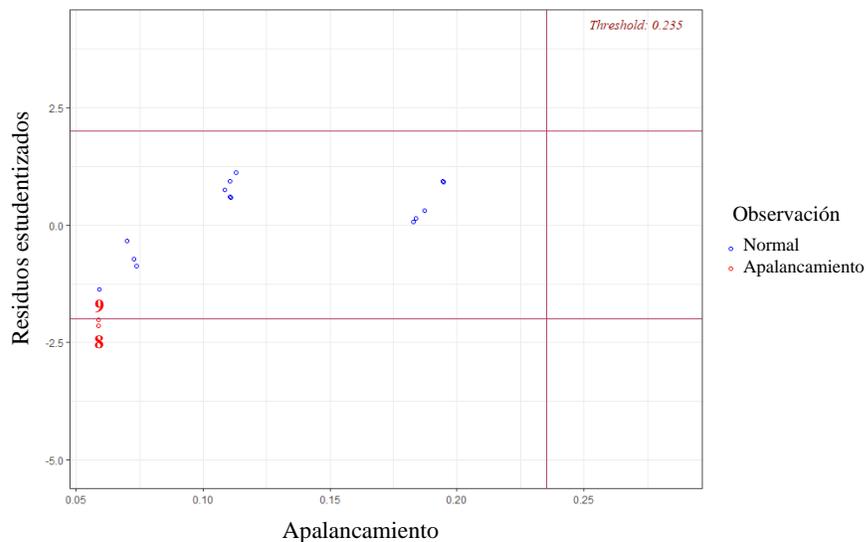
**Figura AH.** Gráfica de residuos eliminados estudentizados del estándar del ácido ferúlico

Por otro lado, se obtuvo la gráfica de residuos estudentizados eliminados (**Figura AI**) donde se encontraron dos valores atípicos que corresponde al número 8 (la réplica 2 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ) y el número 9 (la réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura AI.** Residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para el estándar de ácido ferúlico

Además, en la gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento (**Figura AJ**), también se observaron los valores atípicos anteriormente mencionados. No obstante, su influencia no fue importante y esto se verificó aplicando el modelo antes y después del valor influyente.



**Figura AJ.** Gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento para el estándar de ácido ferúlico

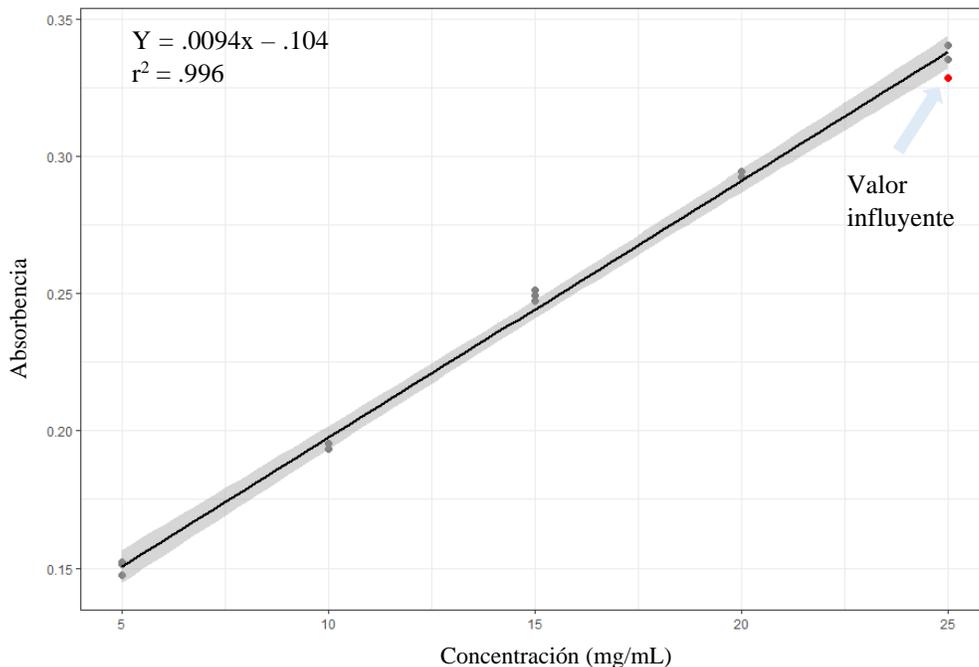
**Apéndice H.** Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de proteína por el método de Biuret

En la **Tabla G** se presentan las absorbencias obtenidas a partir de las diferentes concentraciones del estándar de albúmina de al 99.8 % por el método de Biuret. La Prueba de correlación de Pearson mostró que existe una correlación positiva y fuerte entre las variables absorbencia y concentración ( $r = 0.99$ ) a un  $\alpha = 0.05$ . Asimismo, la Prueba de Levene realizada a lo datos iniciales indicaron la presencia de homocedasticidad ( $p = 0.35$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

**Tabla G.** Áreas bajo la curva obtenidas a partir del estándar de albúmina al 99.8 % a diferentes concentraciones

Réplica	Concentración (mg/mL)				
	5	10	15	20	25
1	0.147	0.193	0.251	0.292	0.340
2	0.151	0.193	0.247	0.292	0.328
3	0.152	0.195	0.249	0.294	0.335

Posteriormente, se procedió a obtener la gráfica de regresión lineal simple (**Figura AK**) y su respectiva ecuación  $y = 0.0094x - 0.104$  y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.996.

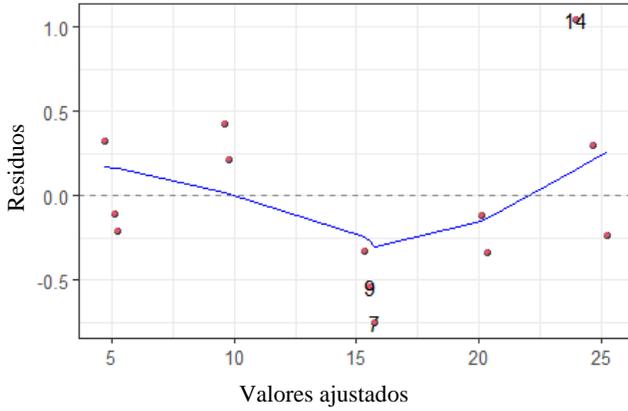


**Figura AK.** Curva de calibración del estándar de albúmina al 99.8 %

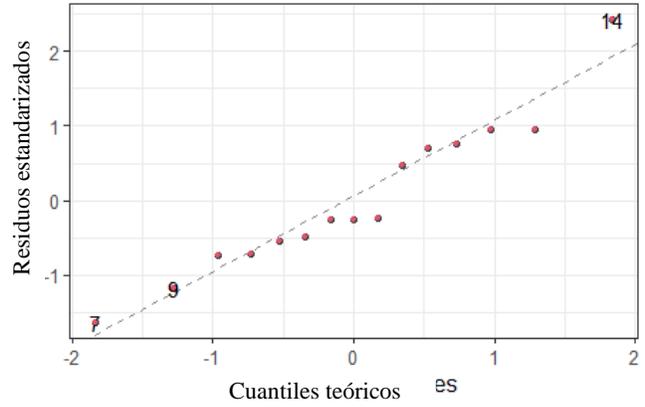
A continuación, se procedió con la validación y diagnóstico del modelo. Se obtuvo como resultado que el modelo de regresión lineal puede ser aplicado de acuerdo con los valores de  $p$  presentados por el intercepto ( $p = 4.61e^{-12}$ ) y de la pendiente ( $p = 2e^{-16}$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

El supuesto de linealidad se confirmó mediante la **Figura AK**, la cual mostró una relación lineal entre la variable dependiente e independiente. El supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la Prueba Breusch-Pagan ( $p = 0.25$ ) a un  $\alpha = 0.05$  y, las gráficas residuales vs ajustados (**Figura AL1**) y escala-ubicación (**Figura AL3**), donde se observa a los residuos distribuirse de manera aleatoria. Por otro lado, el supuesto de normalidad se comprobó mediante la Prueba de Shapiro-Wilk ( $p = 0.61$ ) a un  $\alpha = 0.05$  y por la gráfica cuantil-cuantil (Q-Q) de residuos estandarizados (**Figura AL2**). Con respecto a el supuesto de independencia se logró confirmar a través de la prueba de Durbin-Watson ( $p = 0.15$ ) y por Breusch-Godfrey ( $p = 0.34$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

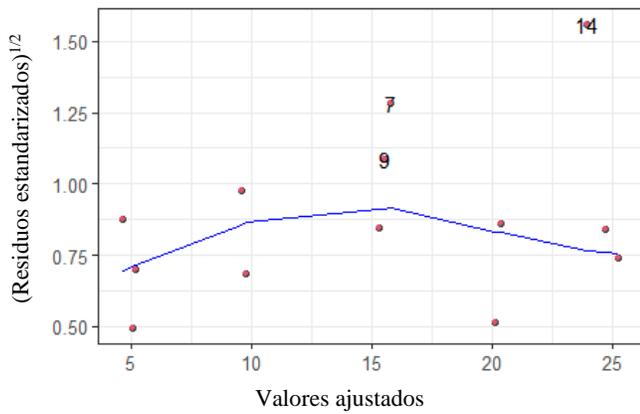
Por otra parte, de acuerdo con la gráfica de barras de distancia de Cook (**Figura AL5**) se confirmó la presencia de un valor atípico y de un dato potencialmente influyente que corresponden a los valores 7 (la réplica 1 de la concentración 15 mg/mL) y 14 (la réplica 2 de la concentración 25 mg/mL). De igual modo, se observó en la gráfica de residuos frente al apalancamiento (**Figura AL4**) que dichos valores se encuentran lejos del centroide y por lo tanto, como se señaló anteriormente podrían influir en la regresión lineal. Por lo que, se procedió a realizar las gráficas de DFBETAS, de residuos eliminados estudentizados y residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para confirmar la información obtenida.



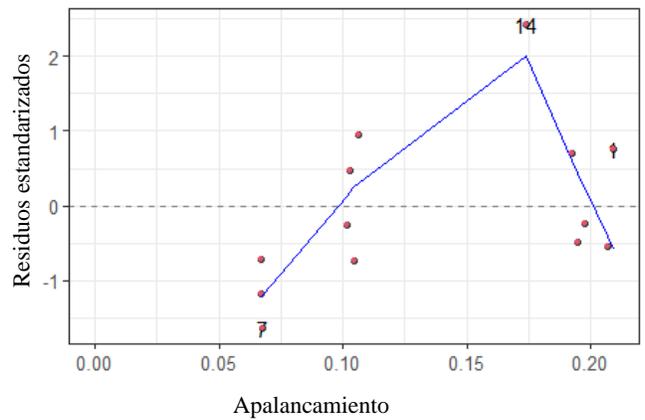
1) Gráfica valor ajustado vs Residual



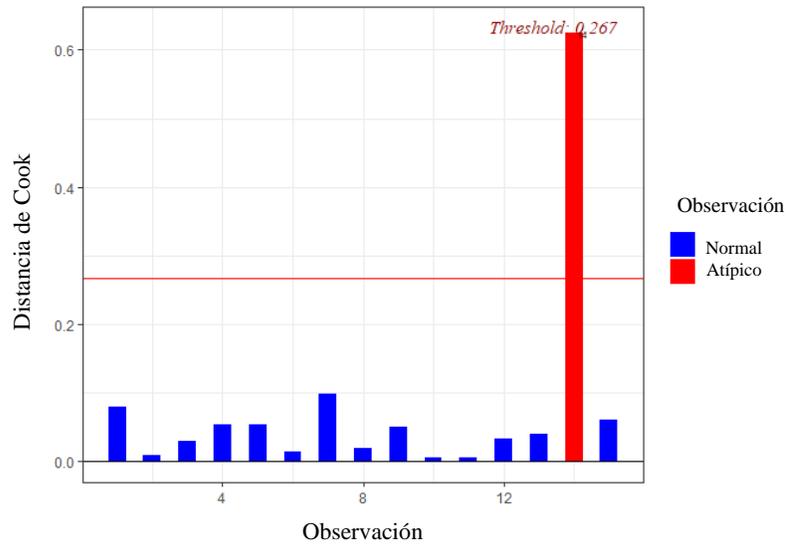
2) Gráfica de normalidad Q-Q



3) Gráfica escala-ubicación



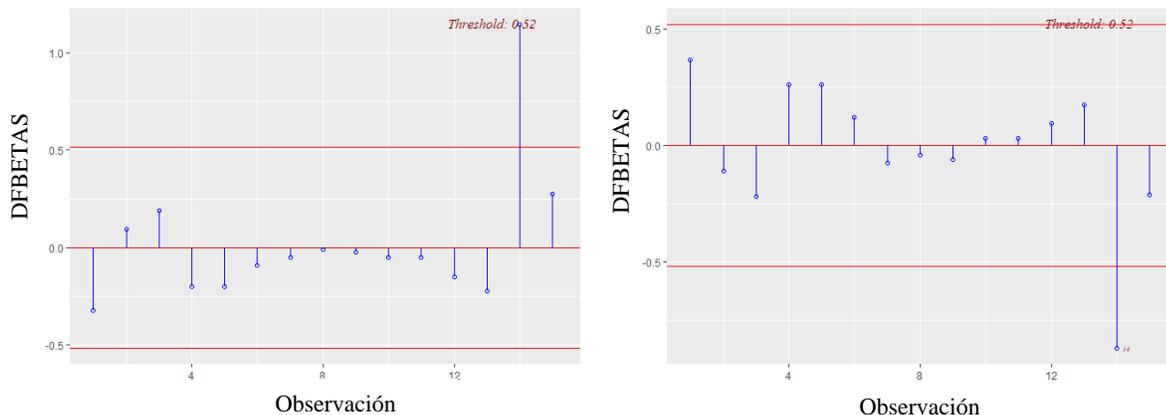
4) Gráfica de residuos frente al apalancamiento



5) Gráfica de barra de la distancia de Cook

**Figura AL.** Gráficas de diagnóstico de regresión para el estándar de albúmina al 99.8 %

Asimismo, mediante las gráficas DFBETAS (**Figura AM**) se confirmó la presencia de un valor influyente en las estimaciones de cada uno de las variables.

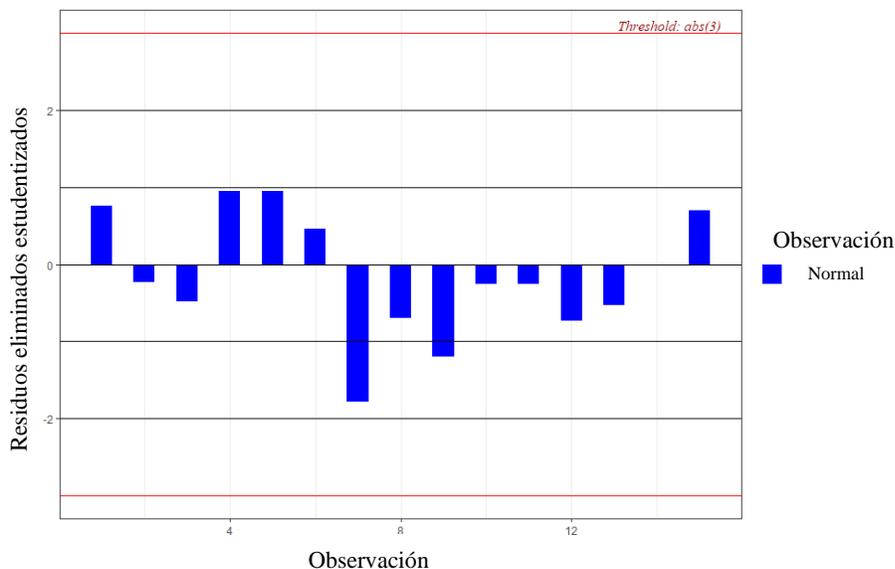


1) Diagnóstico de influencia para la absorbencia

2) Diagnóstico de influencia para la concentración

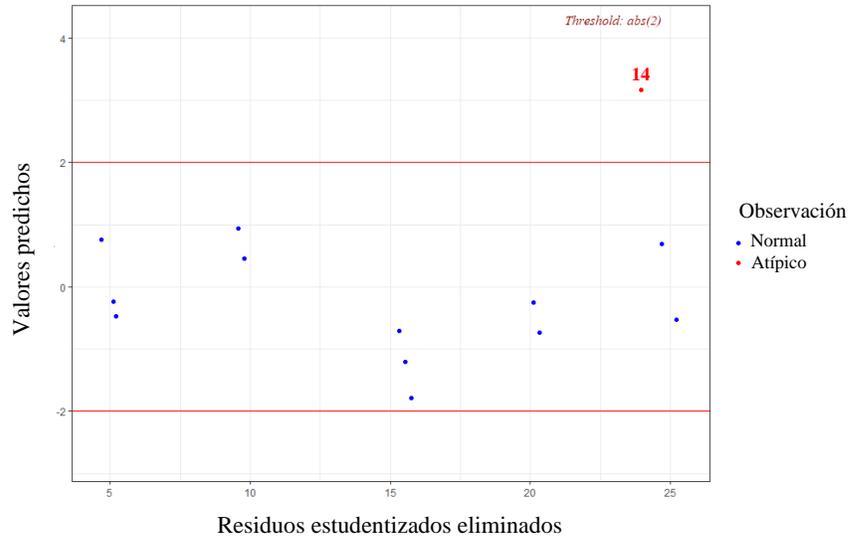
**Figura AM.** Panel de DFBETA para identificar puntos influyentes del estándar de albúmina al 99.8 %

Mientras que, para corroborar con una prueba más confiable la falta de valores atípicos en la variable independiente se utilizó la gráfica de residuos eliminados estudentizados (**Figura AN**). Además, en esta misma gráfica se observó que los datos presentaron aleatoriedad.



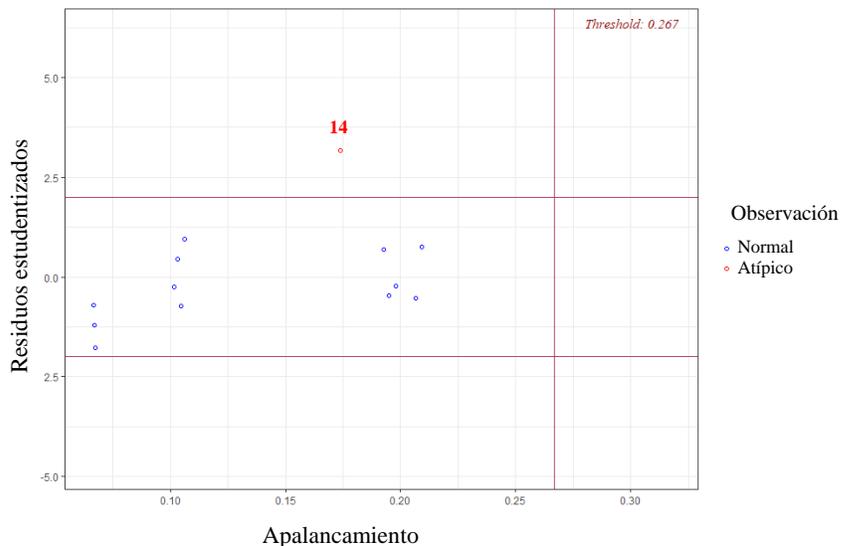
**Figura AN.** Gráfica de residuos eliminados estudentizados de albúmina del 99.8 %

Por otro lado, se obtuvo la gráfica de residuos estudentizados eliminados (**Figura AO**) donde se encontró un valor atípico que corresponde al número 14 (la réplica 3 de la concentración 18  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura AO.** Residuos estudentizados eliminados vs valores predichos del estándar de albúmina al 99.8 %

Además, en la gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento (**Figura AP**), también se observa el valor anteriormente mencionado. No obstante, su influencia no fue importante y esto se verificó aplicando el modelo antes y después del valor influyente.



**Figura AP.** Gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento del estándar de albumina al 99.8 %

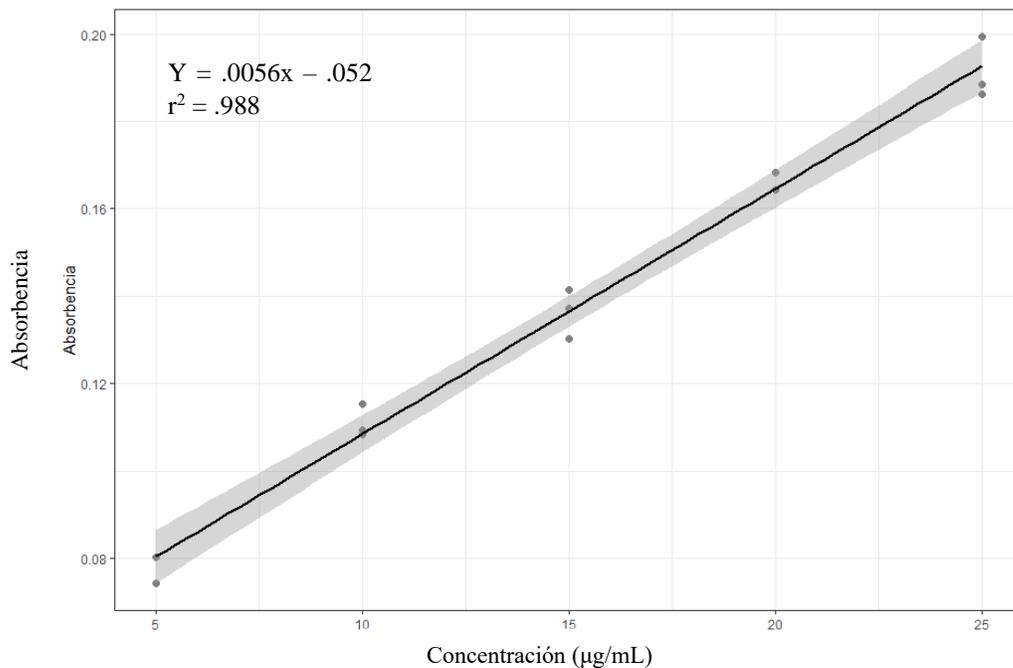
**Apéndice 8.** Datos, modelo y validación del método de calibración para la cuantificación de ácido gálico por Folin-Ciocalteu

En la **Tabla H** se presentan las absorbencias obtenidas a partir de diferentes concentraciones del estándar de ácido gálico por Folin-Ciocalteu. La Prueba de correlación de Pearson mostró que existe una correlación positiva y fuerte entre las variables absorbencia y concentración ( $r = 0.99$ ) a un  $\alpha = 0.05$ . Asimismo, la Prueba de Levene realizada a lo datos iniciales indicaron la presencia de homocedasticidad ( $p = 0.87$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

**Tabla H.** Absorbencias obtenidas a partir del estándar del ácido gálico a diferentes concentraciones.

Réplica	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	5	10	15	20	25
1	0.074	0.115	0.137	0.168	0.199
2	0.080	0.109	0.130	0.164	0.186
3	0.080	0.108	0.141	0.164	0.188

Posteriormente, se procedió a obtener la gráfica de regresión lineal simple (**Figura AQ**) y su respectiva ecuación  $y = 0.0056x - 0.052$  y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.988. Los datos potencialmente influyentes se colocaron en color rojo.

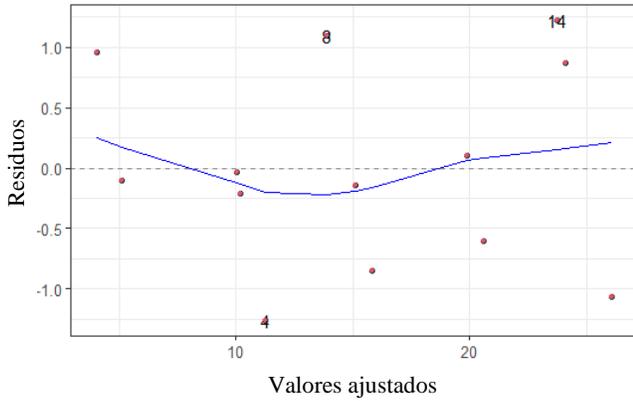


**Figura AQ.** Curva de calibración del estándar de ácido gálico

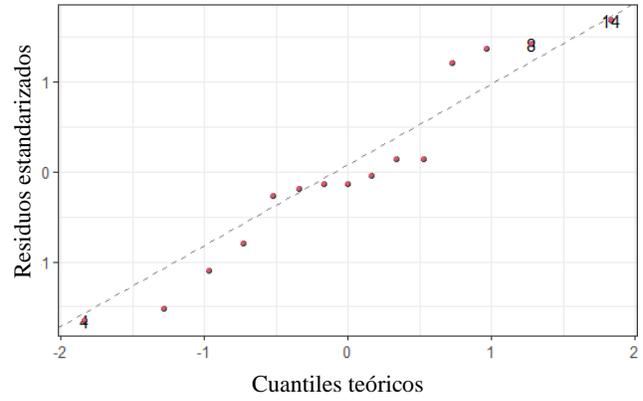
A continuación, se procedió con la validación y diagnóstico del modelo. Se obtuvo como resultado que para los valores de  $p$  del intercepto ( $p = 4.61e^{-12}$ ) y de la pendiente ( $p = 2e^{-16}$ ) a un  $\alpha = 0.05$ . Por lo tanto, el modelo de regresión lineal puede ser aplicado.

El supuesto de linealidad se confirmó mediante la **Figura AQ**, la cual mostró una relación lineal entre la variable dependiente e independiente. El supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la Prueba Breusch-Pagan ( $p = 0.26$ ) a un  $\alpha = 0.05$  y, las gráficas residuales vs ajustados (**Figura AR1**) y escala-ubicación (**Figura AR3**), donde se observa a los residuos distribuirse de manera aleatoria. Por otro lado, el supuesto de normalidad se demostró mediante la Prueba de Shapiro-Wilk ( $p = 0.36$ ) a un  $\alpha = 0.05$  y por la gráfica cuantil-cuantil (Q-Q) de residuos estandarizados (**Figura AR2**). Con respecto a el supuesto de independencia, se confirmó a través de la prueba de Durbin-Watson ( $p = 0.716$ ) y por Breusch-Godfrey ( $p = .75$ ) a un  $\alpha = 0.05$ .

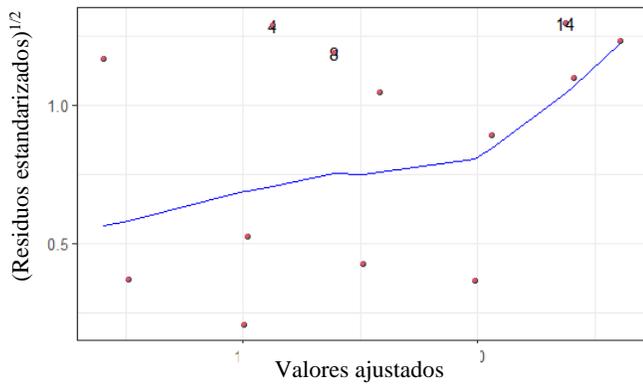
Por otra parte, de acuerdo con la gráfica de barras de distancia de Cook (**Figura AR5**) se confirma que no existe la presencia de valores atípicos pero si de datos potencialmente influyentes que corresponden a los valores 1 (la réplica 1 de la concentración 5  $\mu\text{g/mL}$ ), 13 (la réplica 1 de la concentración 25  $\mu\text{g/mL}$ ) y 14 (la réplica 1 de la concentración 25  $\mu\text{g/mL}$ ). De igual modo, se observó en la gráfica de residuos frente al apalancamiento (**Figura AR4**) que dichos valores se encuentran lejos del centroide y por lo tanto, como se señaló anteriormente podrían influir en la regresión lineal. Por lo que, se procedió a realizar las gráficas de DFBETAS, de residuos eliminados estudentizados y residuos estudentizados eliminados vs valores predichos para confirmar la información obtenida.



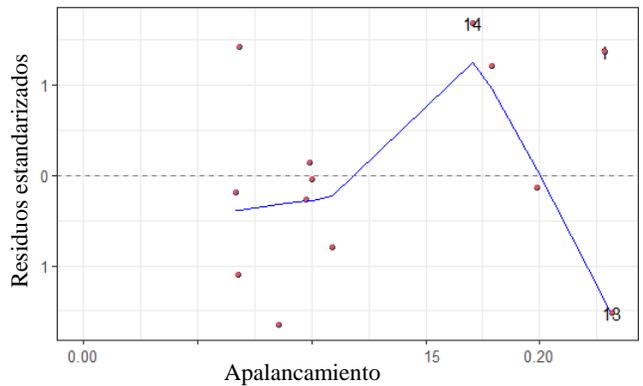
1) Gráfica valor ajustado vs Residual



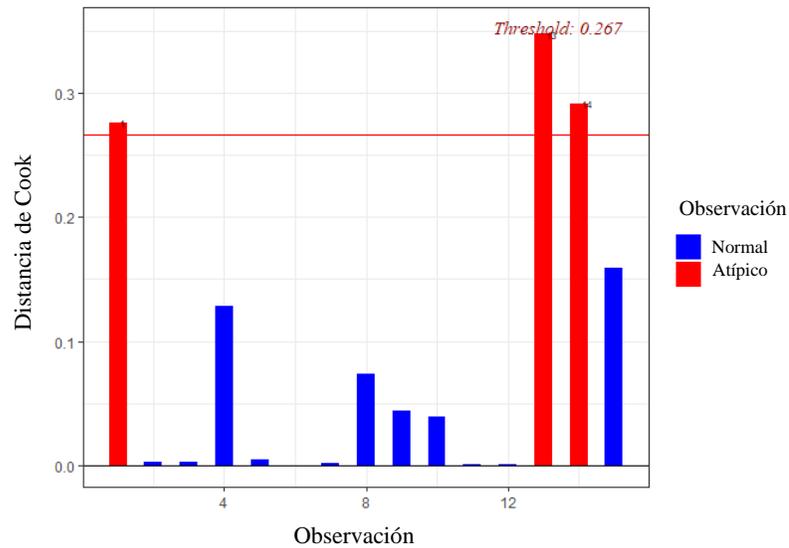
2) Gráfica de normalidad Q-Q



3) Gráfica escala-ubicación



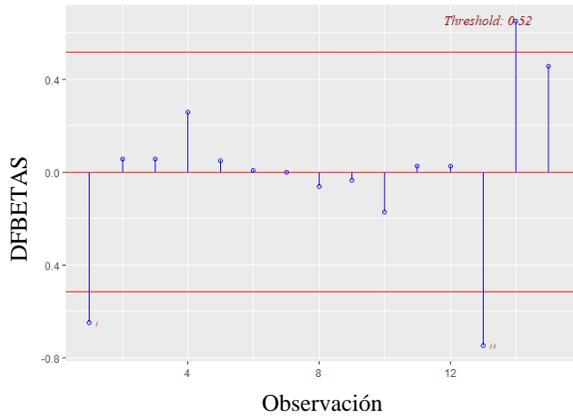
4) Gráfica de residuos frente al apalancamiento



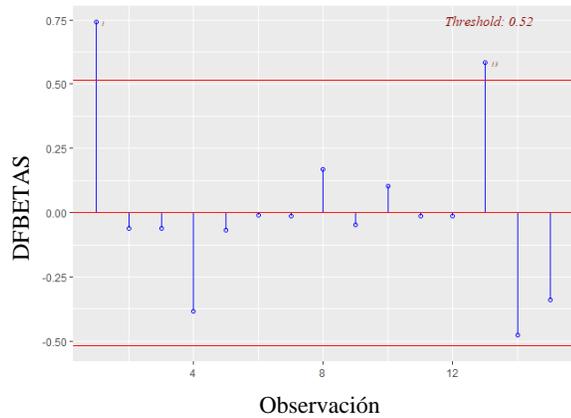
5) Gráfica de barra de la distancia de Cook

**Figura AR.** Gráficas de diagnóstico de regresión para el estándar de ácido gálico

Mediante las gráficas DFBETAS (**Figura AS**) se detectó la presencia de valores influyentes en las estimaciones de cada uno de las variables.

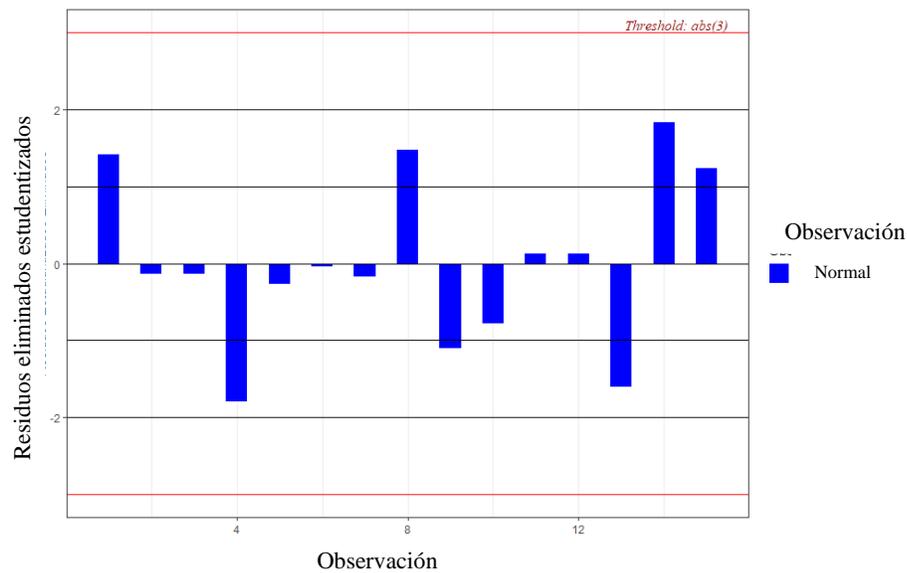


1) Diagnóstico de influencia para la absorbencia



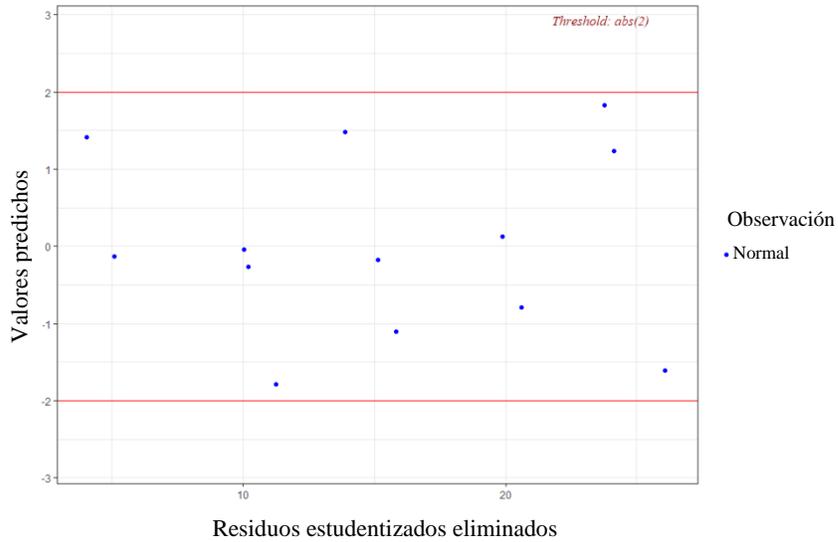
2) Diagnóstico de influencia para la concentración

**Figura AS.** Panel de DFBETA para identificar puntos influyentes del estándar de ácido gálico. Mientras que, para corroborar con una prueba más confiable la falta de valores atípicos en la variable independiente se utilizó la gráfica de residuos eliminados estudentizados (**Figura AT**). Además, en esta misma gráfica observó que los datos presentaron aleatoriedad.



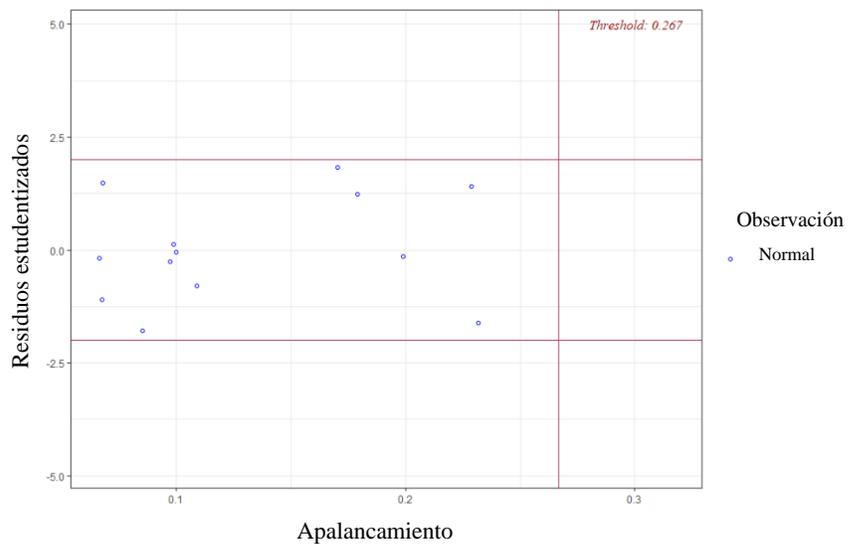
**Figura AT.** Gráfica de residuos eliminados estudentizados del estándar del ácido gálico.

Por otro lado, se obtuvo la gráfica de residuos estudentizados eliminados (**Figura AU**) donde no se encontraron valores atípicos.



**Figura AU.** Residuos estudentizados eliminados vs valores predichos del estándar de ácido gálico

Asimismo, de acuerdo con la gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento (**Figura AV**), no se encontraron valores atípicos ni de apalancamiento.



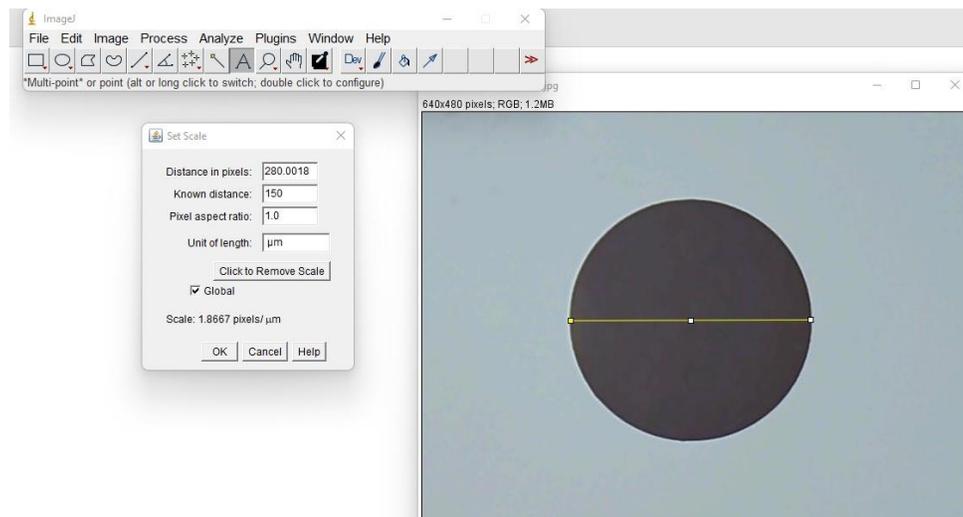
**Figura AV.** Gráfica de residuos estudentizados versus apalancamiento del estándar de ácido gálico

## Apéndice I. Procesamiento de la imagen

Para realizar el procesamiento de la imagen previamente se tuvo que realizar la calibración del software. Para esto, se colocó un cubreobjetos micrométrico en la platina del microscopio. Posteriormente, se ajustaron los oculares de tal manera que la escala grabada en el cubreobjetos micrométrico (círculo estándar grabado de 150  $\mu\text{m}$ ) quedara correctamente enfocada usando el lente del objetivo deseado. A continuación, mediante el software ToupView se guardó la imagen en formato tiff para posteriormente emplearla en la calibración del software imageJ. El análisis de las imágenes se llevó a cabo en el software imageJ y esto consistió en realizar los pasos siguientes:

### Paso 1. Calibrar el software

Primeramente, se cargó la imagen en el software imageJ seleccionando en el menú a “File” -> Open -> “ubicación de la imagen” y posteriormente, se procedió a establecer la escala. Para lo cual, se seleccionó el diámetro del círculo generado en el software Toup View y se procedió a dar click en Analyzed -> Set scale. En la ventana que se desplegó se colocó en el apartado distance known “150” y en unit of length “ $\mu\text{m}$ ”. Por último, se dió click en Global y OK. (**Figura AW**)

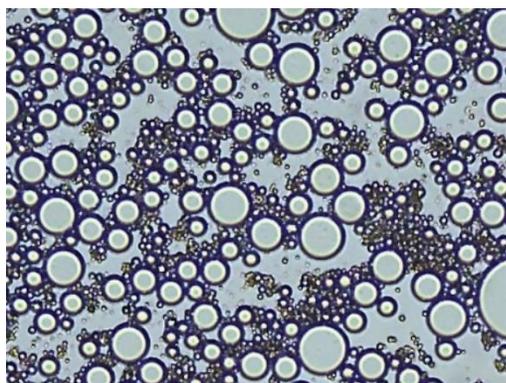


**FiguraAW.** Calibración del software

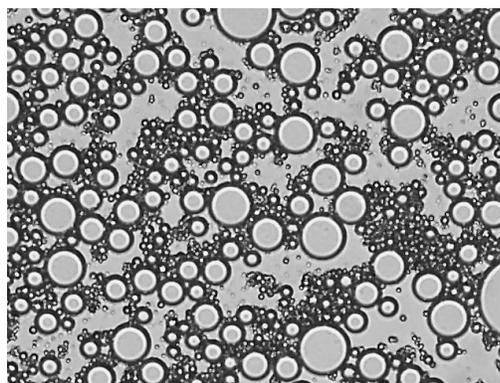
### Paso 2. Procesamiento de la imagen

El procesamiento de la imagen consistió en disminuir la cantidad de color de la micrografía original (**Figura AX**) a una escala de grises al convertir la imagen de 16 bits/píxel a 8 bits/píxel

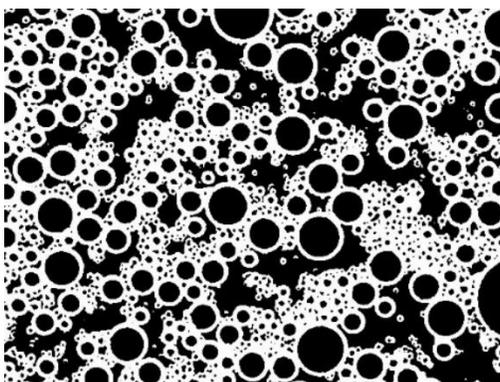
mediante la herramienta Image-> Type -> 8 bits y Process -> Smooth (**Figura AY**) Posteriormente, esta imagen de 8 bits/píxel se transformó a una imagen de 1 bits/píxel mediante la función Process -> Binary -> Make binary e Image -> Adjust -> Threshold, obteniendo como resultado una imagen en blanco y negro (**Figura AZ**) . Esto se realizó con la finalidad de que el software pudiera detectar con mayor facilidad la periferia de las partículas.



**Figura AX.** Imagen original

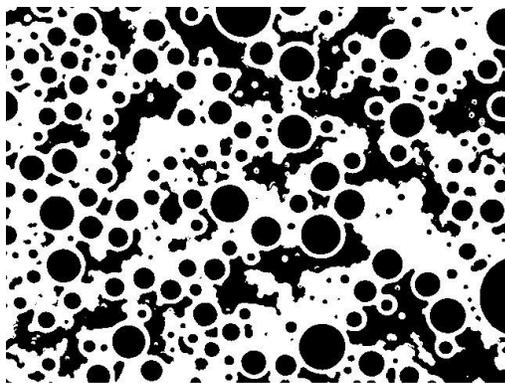


**Figura AY.** Imagen a escala de grises

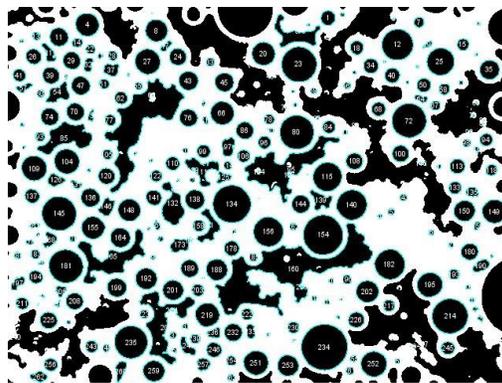


**Figura AZ.** Imagen blanco y negro

Después se realizó la remoción de los píxeles atípicos mediante la función Process -> Noise -> Remove Outliers. En la ventana que se desplegó se colocó en apartado Radius “5” y en Which outliers “Dark” y se dio click en Preview (**Figura BA**). Finalmente, se realizó el análisis del tamaño de los microencapsulados mediante la herramienta Analyze -> Analyze Particles. En la ventana que se desplegó se colocó en el apartado Show “Overlay” y se dio click en “OK” obteniendo como resultado la selección de las partículas en la imagen (**Figura BB**) y la generación de un archivo en formato excel conteniendo las medidas de las partículas seleccionadas en la imagen.



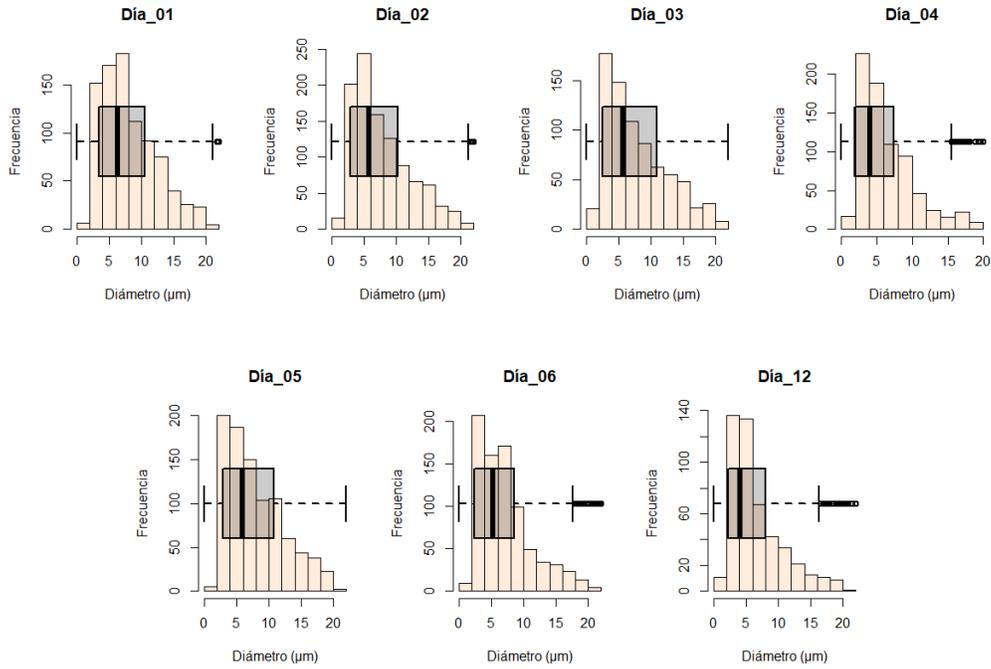
**Figura BA.** Imagen con remoción de píxeles



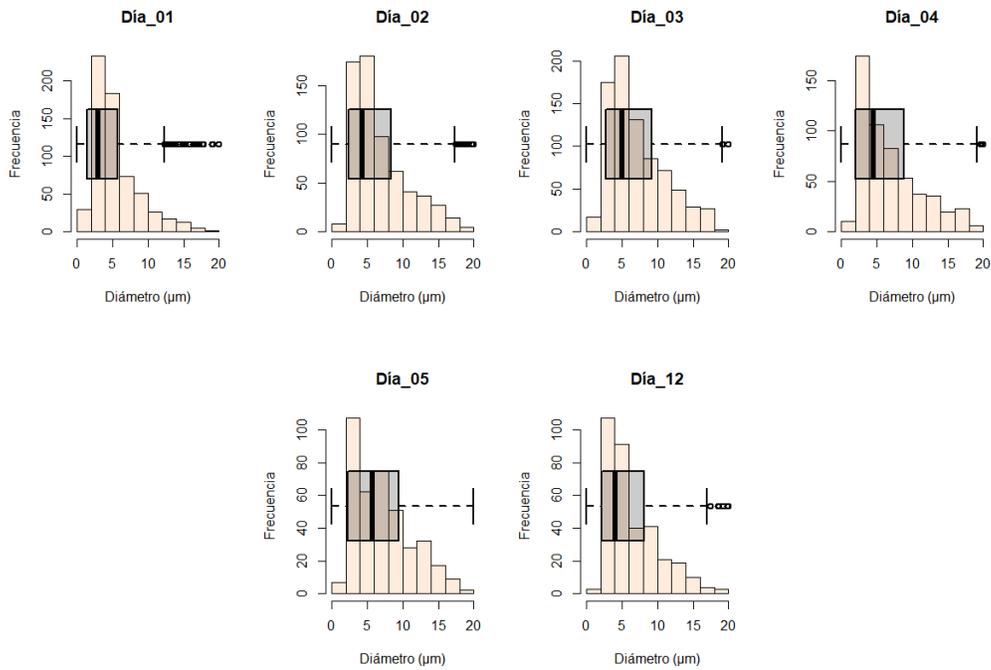
**Figura BB.** Imagen con partículas analizadas

Los datos obtenidos fueron sometidos a un criterio de discriminación basado en la resolución máxima de la cámara OMAX A3503S de 640 x 480 píxeles. La cual se basó en la relación píxeles/unidad de medida obtenida durante la calibración de la escala del software. Por lo tanto, la resolución máxima de la cámara empleada en el estudio fue de 0.53  $\mu\text{m}$ , considerando que en la micrografía 1.87 píxeles equivalen a un  $\mu\text{m}$ .

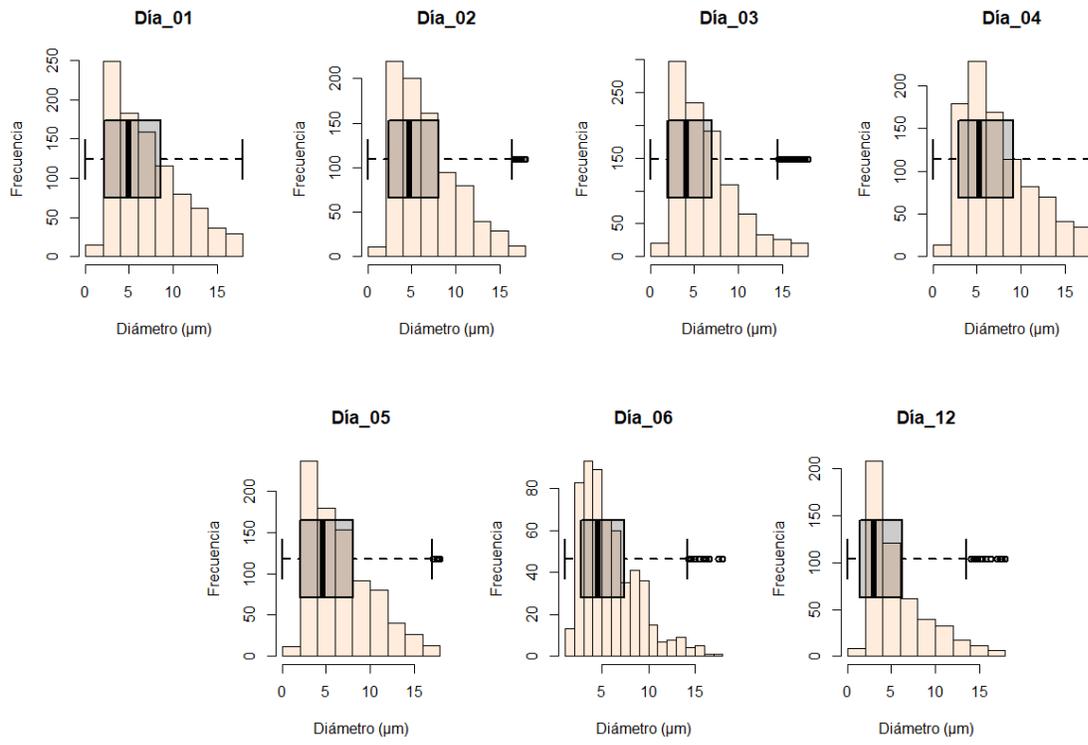
**Apéndice J. Histogramas del tamaño para las emulsiones dobles**



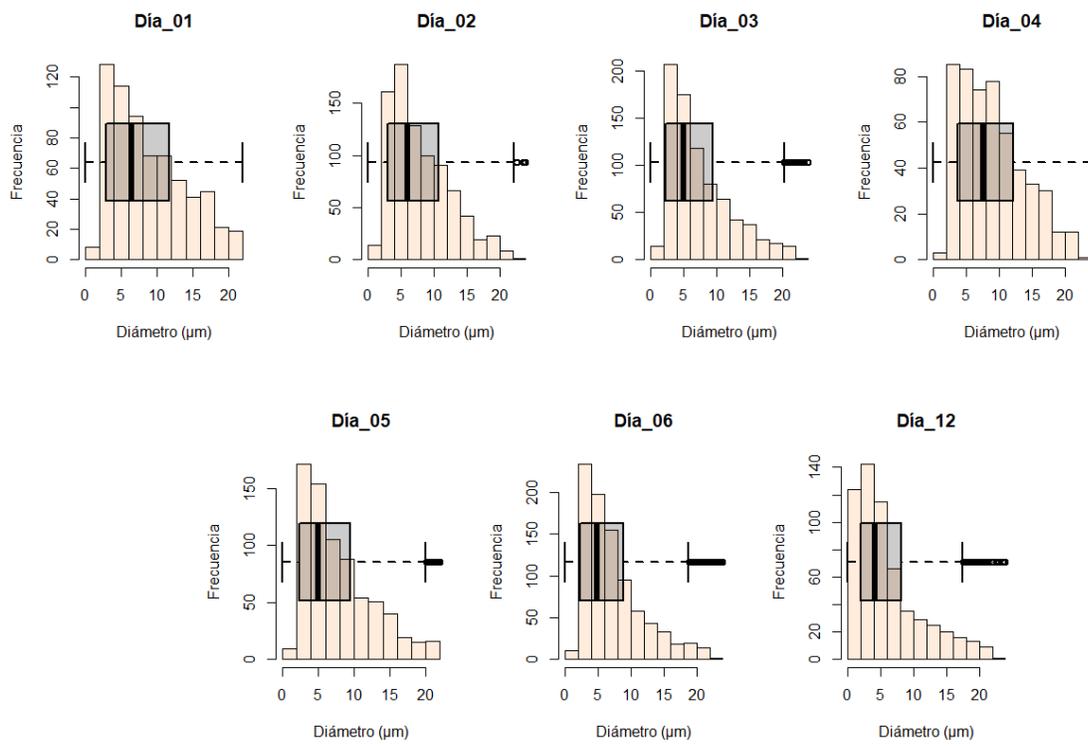
**Figura BC.** Histograma del tamaño de las emulsiones dobles de Chicharo-Pectina



**Figura BD.** Histograma de tamaño de las emulsiones dobles Chicharo-Goma arábica



**Figura BE.** Histograma de tamaño de las dobles emulsiones Soya-Pectina



**Figura BF.** Histograma de tamaño de las emulsiones dobles Soya-Goma arábica

## Apéndice K. Histogramas del tamaño para las microcápsulas

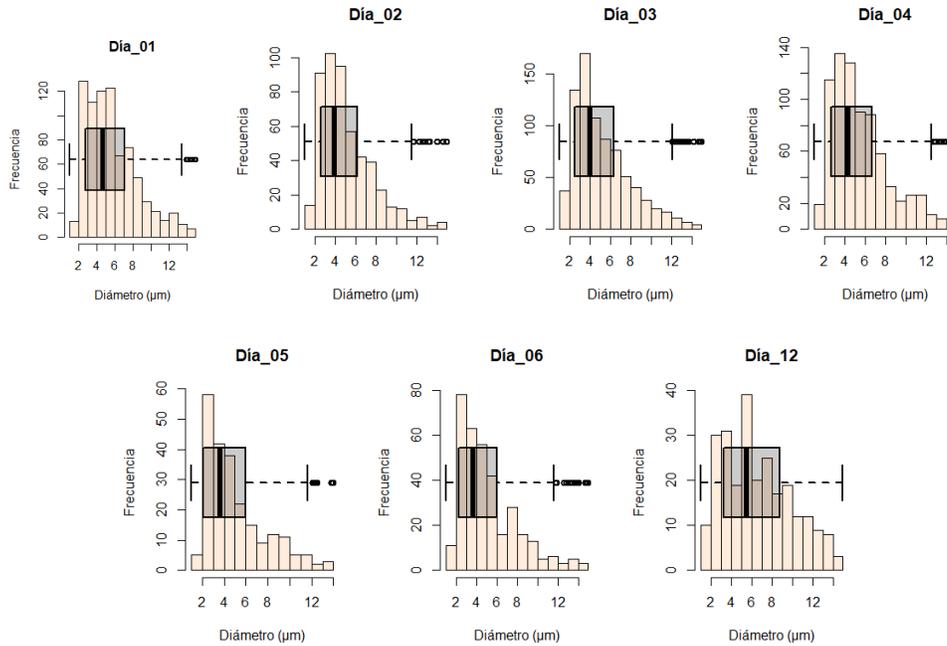


Figura BG. Histograma del tamaño de las microcápsulas Chicharo-Pectina

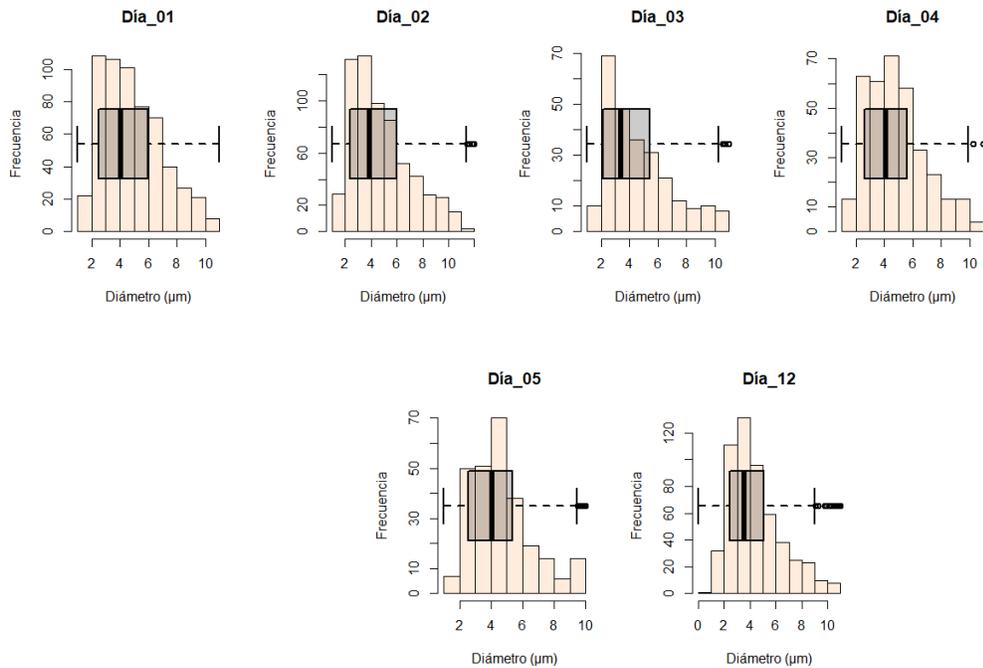
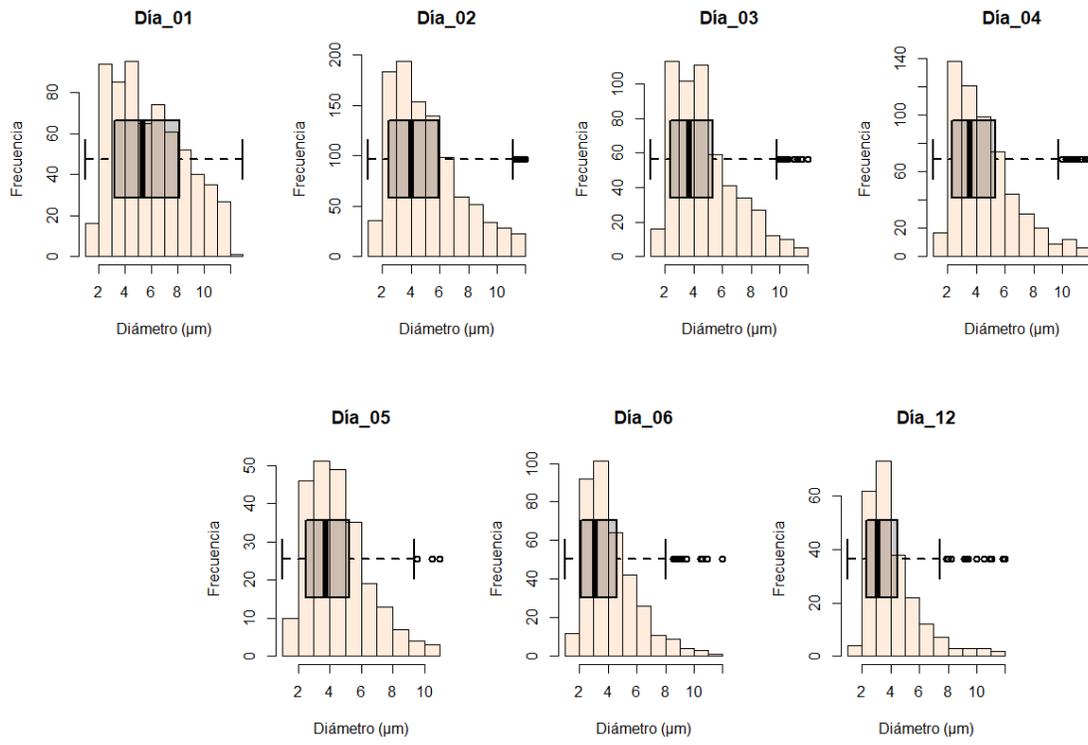
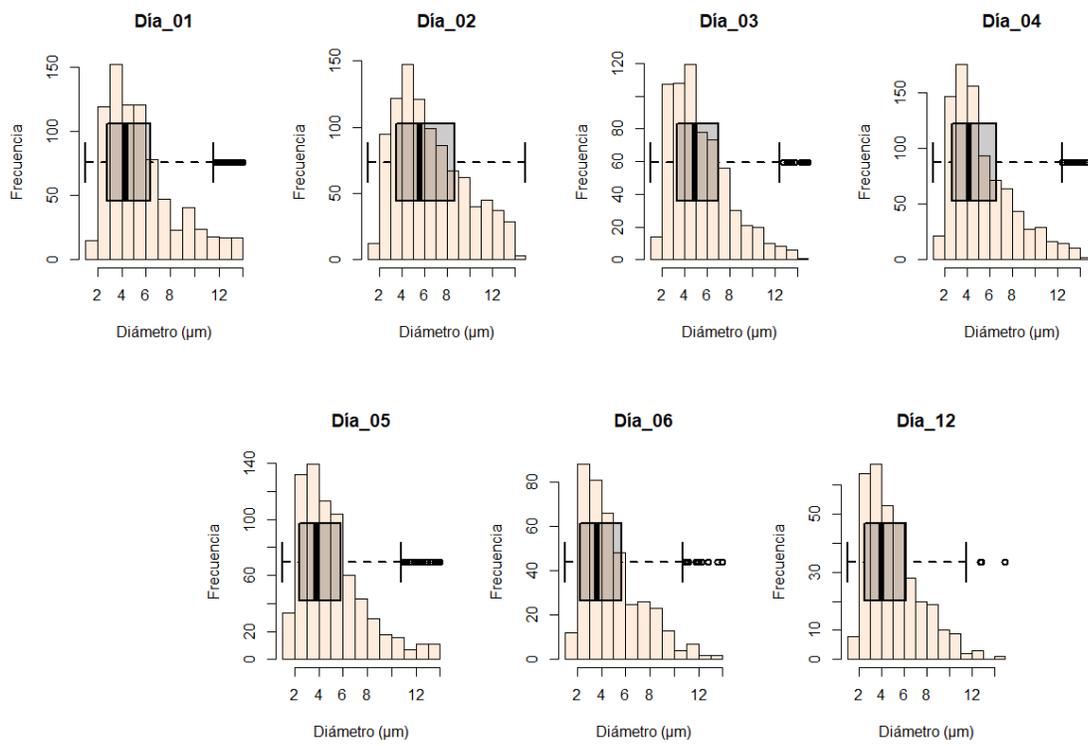


Figura BH. Histograma del tamaño de las microcápsulas Chicharo-Goma arábica



**Figura BI.** Histograma del tamaño de las microcápsulas Soya-Pectina



**Figura BJ.** Histograma del tamaño de las microcápsulas Soya-Goma arábica

**Apéndice L.** ANOVA robusto con el estimador-M de Huber de las emulsiones dobles y microcápsulas

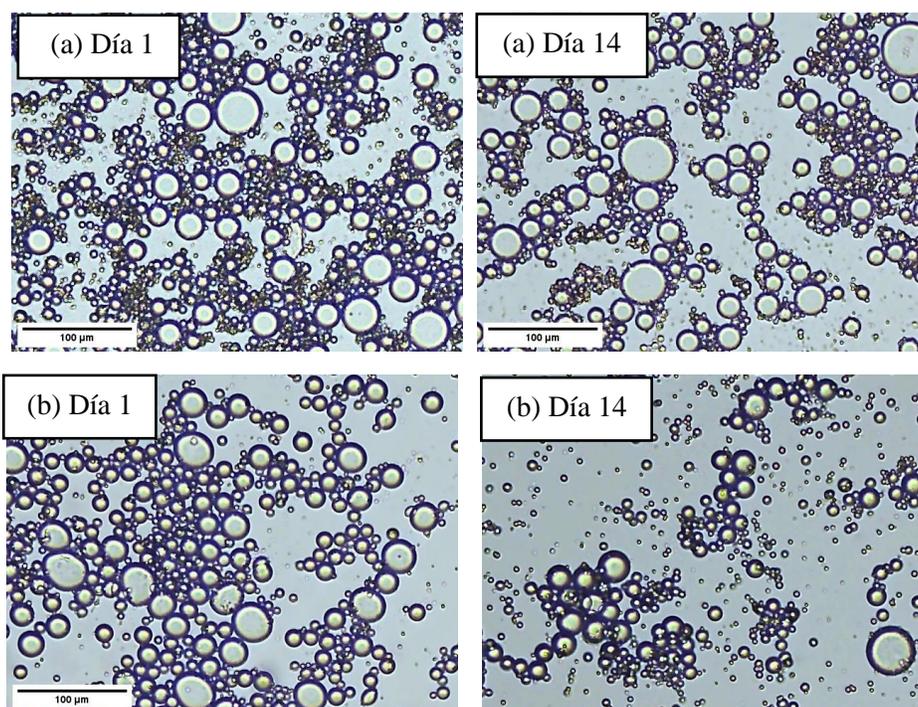
**Tabla I.** Valores de “p” para las emulsiones dobles

Doble emulsión	Tratamiento	Repetición	Tratamiento-Repetición
Chícharo-Pectina	0.00	0.07	0.0138
Chícharo-Goma arábica	0.00	0.11	0.0028
Soya-Pectina	0.00	0.02	0.0012
Soya-Goma arábica	0.00	0.18	0.0596

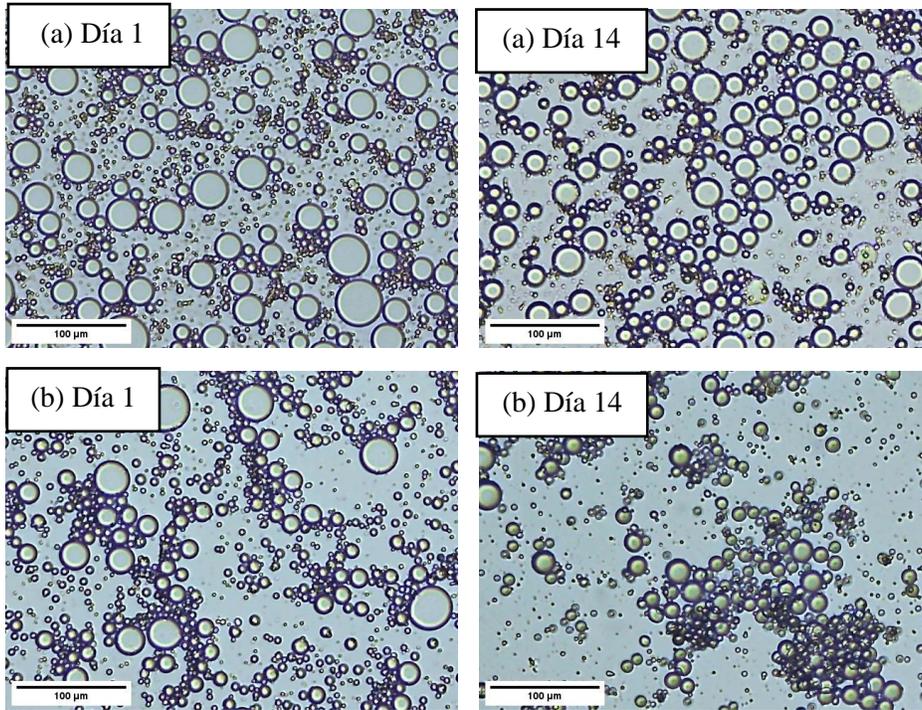
**Tabla J.** Valores de “p” para las microcápsulas

Microcápsulas	Tratamiento	Repetición	Tratamiento-Repetición
Chícharo-Pectina	0.00	0.10	0.0510
Chícharo-Goma arábica	0.00	0.11	0.0028
Soya-Pectina	0.00	0.16	0.0028
Soya-Goma arábica	0.00	0.16	0.0108

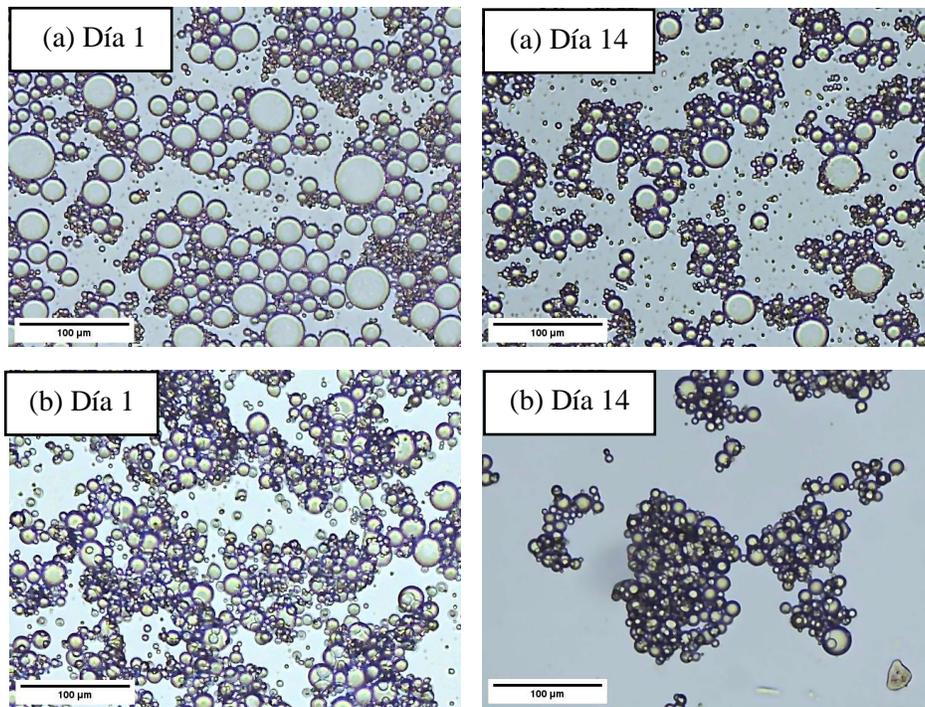
**Apéndice M.** Micrografías de los tratamientos a lo largo del tiempo.



**Figura BK.** Micrografías del tratamiento Soya-Goma arábica (a) Emulsiones dobles (b) Microcápsulas



**Figura BL.** Micrografías del tratamiento Chicharo-Soya (a) Emulsiones dobles (b) Microcápsulas



**Figura BM.** Micrografías del tratamiento Soya-Pectina (a) Emulsiones dobles (b) Microcápsulas

## Anexo A. Prueba antiplagio

# Plagiarism Scan Result Report

## Scanned Text

<i>Input File</i>	<i>Tesis Final YER.pdf</i>
<i>Author</i>	<i>n/a</i>
<i>Scan Date</i>	<i>2023-03-02</i>
<i>Project</i>	<i>n/a</i>
<i>Remarks</i>	<i>n/a</i>

## Result Overview

Percentage of Copied Words / Total Words

*Copied/Total*

Words: 3490/26979  
Sources: 12.9% 92

*Suspicious*

Sources: 0

*Accepted*

Sources: 0

*Excluded*

Overview of Matching Phrases



## Legend and Explanations

Original Text

Text without any identified relevant online or library sources.

Suspicious source

Text containing identified matches in online or library sources. The text might have been paraphrased.

Accepted source

Text containing identified matches in online or library sources. The text might have been paraphrased.

## Capítulo 1. Searched Sources and Settings

Maximum phrase distance	125	Searched in online sources	Yes
Minimum characters per phrase	50	Searched in library sources	Yes
Minimum characters per phrase	15	Minimal Similarity	40%