



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**



**ESTABILIDAD DE EMULSIONES O/W RICAS EN CAROTENOIDES
PREPARADAS CON MEZCLAS DE HIDROCOLOIDES SELECTOS Y
ULTRASONIDO DE POTENCIA**

TESIS DE LICENCIATURA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

BERENICE SANTAMARIA XOCHIPILTECA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HÉCTOR RUIZ ESPINOSA

PUEBLA, PUE. DICIEMBRE 2020

Agradecimientos

Mis padres: Por todo el esfuerzo, la confianza, el amor, el respaldo y las enseñanzas que día a día lograron formarme como la persona que soy. Gracias mami por tu amor incondicional y porque eres el mejor ejemplo en mi vida. A ti papi, por siempre estar y por apoyarme hasta el final.

Mi hermana: Por que tus cuidados y consejos los atesoro en el fondo de mi corazón, por ser mi guía, mi ejemplo y mis fuerzas, porque sé que hoy y siempre estarás ahí, te amo. Gracias por no dudar de mi jamás.

Mi asesor de tesis Dr. Héctor Ruiz Espinosa: Por su confianza, paciencia e importante apoyo en el peldaño que ahora alcanzo, dejo patente ante usted, mi agradecimiento sincero.

Dr. Irving Israel Ruiz López: Por las aportaciones a esta tesis, y sus observaciones puntuales, por lo que quedo sumamente agradecida.

Dra. Ma. Leticia Calderón Fernández: Por sus comentarios y observaciones específicas, gracias a ello hoy es posible cumplir una meta más en mi vida.

M.I. Montserrat González Limón: Por su valioso aporte, tiempo y dedicación para la culminación de este trabajo.

Mi universidad: Mi agradecimiento profundo, por haberme dado cabida escolar, hasta formarme profesionalmente.

Finalmente, gracias, Henoc: Por acompañarme en todo este trayecto, por tu paciencia, por tus cuidados, porque siempre estuviste ahí y no me dejaste sola, sin ti no hubiera logrado esta meta. Te amo.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Compuestos bioactivos y enfermedades crónico-degenerativas	3
1.2 Mamey	4
1.3 Compuestos antioxidantes en mamey	6
1.4 Encapsulamiento de bioactivos	8
1.5 Materiales encapsulantes	9
1.5.1 WPC.....	10
1.5.2 Almidón	14
1.6 Técnicas de encapsulación	16
1.7 Emulsificación	17
1.7.1 Conceptos básicos de emulsión	17
1.7.2 Procesos para la formación de emulsiones	17
1.7.3 Mecanismos de estabilidad	18
1.8 Fundamentos del ultrasonido	19
1.8.1 Definición y clasificación	19
1.8.2 Cavitación	21
1.9 Aplicaciones del ultrasonido de alta intensidad	23
1.10 Ultrasonido de potencia como técnica de emulsificación y encapsulamiento de compuestos bioactivos.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
HIPÓTESIS	26
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA	27
2.1 Plan de trabajo	27
2.2 Materiales.....	27
2.3 Métodos.....	29
2.3.1 Preparación de emulsiones.....	29
2.3.2 Determinación del tiempo de sonicación.....	32
2.3.3 Implementación del diseño experimental de mezclas	32
2.3.4 Caracterización de estabilidad de emulsiones	34
.....	36

2.3.5. Determinación de actividad antioxidante.....	36
2.3.6 Análisis de datos.....	37
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.1 Redefinición del espacio experimental del diseño de mezclas	38
3.2 Determinación del tiempo de sonicación.....	39
3.2.1 Potencial Z de centroide	39
3.2.2 Diámetros promedio, área de partícula y medidas de dispersión de centroide.....	41
3.2.3 Turbidez de emulsión preparada con mezcla de centroide.....	43
3.3 Determinación de formulaciones óptimas de emulsiones O/W preparadas por USP	45
3.3.1 Caracterización por DLS de emulsiones O/W preparadas por ultrasonido de potencia ..	45
3.3.2 Optimización mediante análisis de regresión lineal.	49
3.4 Optimización de formulación de emulsiones.....	55
3.4.1 Adición de compuestos bioactivos en formulaciones óptimas	55
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	58
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXO A	66
ANEXO B	77
ANEXO C.....	87
ANEXO C.....	97
ANEXO D	98
ANEXO E.....	108
ANEXO F.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes del fruto de mamey (<i>Pouteria sapota</i>).	4
Figura 2. Estructura química del almidón.....	14
Figura 3. Formación de una emulsión.	18
Figura 4. Mecanismos de inestabilidad en emulsiones.....	19
Figura 5. Diagrama del plan de trabajo.	28
Figura 6. Mezcladora de inmersión KitchenAid.....	29
Figura 7. Distribución de equipos para el proceso de homogeneización por ultrasonido de potencia. A) Procesador ultrasónico, B) reactor enchaquetado y C) baño recirculador (Díaz González, 2018) ..	30
Figura 8. Representación gráfica del diseño de mezclas aceite: agua: estabilizantes implementado.	33
Figura 9. Turbidímetro HACH 2100N.	34
Figura 10. Nanotracs Wave II; Microtracs.	36
Figura 11. Distribuciones de tamaño de emulsiones O/W estabilizadas por emulsificantes y USP con formulaciones establecidas de acuerdo con el diseño de mezclas.....	55
Figura 12: Gráficas de valores predichos vs observados de los parámetros de estabilidad de emulsiones sonicadas.....	56
Figura 13: Gráficas de Cox de respuestas estimadas a lo largo de los rayos x_i ($i = 1,2,3$).....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje promedio en masa (g/ 100 g) de partes del mamey en estado maduro.....	5
Tabla 2. Contenido nutrimental del mamey (g/100g).....	5
Tabla 3. Estructura química de carotenos.....	7
Tabla 4. Materiales empleados en la encapsulación de compuestos activos.....	10
Tabla 5. Materiales y mezcla de materiales usados para la encapsulación en la industria alimentaria.	11
Tabla 6. Características de la fracción de proteínas de suero en la leche bovina.....	11
Tabla 7. Composición general del suero.....	12
Tabla 8. Modificación de almidones.....	15
Tabla 9. Composición química de WPC Lacprodan 80.....	28
Tabla 10. Parámetros experimentales estudiados y niveles empleados.....	30
Tabla 11. Mezcla de componentes para definir el tiempo de sonicación de la emulsión O/W (%).....	32
Tabla 12. Diseño para mezclas de emulsiones O/W.....	33
Tabla 13. Mezclas para emulsiones (%).....	38
Tabla 14. Potencial Z de la emulsión correspondiente al centroide a diferentes tiempos de sonicación	39
Tabla 15. Valores de diámetro promedio (formulación centroide) a diferentes tiempos de sonicación	42
Tabla 16. Valores de turbidez de la muestra centroide a diferentes tiempos de sonicación.....	44
Tabla 17. Medidas de diámetros promedio de formulaciones de emulsiones O/W ultrasonificadas preparadas de acuerdo con un diseño de mezclas.....	45
Tabla 18. Índice de polidispersión, potencial Z, sesgo (ski) y superficie en emulsiones sonicadas.....	47
Tabla 19. Coeficientes originales del modelo predictivo (componentes con respecto a x).....	56
Tabla 20. Coeficientes del modelo con respecto a las z (L-pseudocomponentes).....	57
Tabla 21. Valores experimentales y predichos para las variables de respuesta significativa.....	58
Tabla 22. Composiciones transformadas Z.....	58
Tabla 23. Composición de fórmulas óptimas.....	61
Tabla 24. Actividad antioxidante por prueba de DPPH de emulsiones sonicadas preparadas con las formulaciones optimizadas adicionadas con extractos de bioactivos de cáscara y pulpa de mamey.....	63

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades crónico degenerativas (ECDs) han desplazado a las infecciosas como principales causas de mortandad, por lo cual, la sociedad ha comenzado a preocuparse sobre la posible relación entre el estado de salud personal y la alimentación que recibe. Según datos del INEGI y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los principales padecimientos de este tipo en México son: enfermedades cardiovasculares, hipertensión, cáncer, diabetes, muchas de ellas relacionadas o potenciadas por la alta incidencia de sobrepeso y obesidad entre la población (Barba-Evia, 2018). Se estima que 54% de las muertes registradas en México en 2017 estuvieron asociadas a enfermedades cardiovasculares.

De manera paralela, y como una respuesta al incremento en la tasa de ECDs, en los últimos años ha habido un aumento en el consumo de alimentos funcionales y nutraceuticos, aquellos que se considera no solo aportan nutrientes al consumidor, sino que también influyen en el cuidado de la salud, previniendo la aparición de algunas de estas enfermedades. Los alimentos funcionales son aquellos alimentos procesados que contienen ingredientes que desempeñan funciones fisiológicas en el organismo humano (Alvídéz *et al.*, 2002); los nutraceuticos son compuestos cuyo consumo se ha relacionado con la prevención, en algunos casos, de ciertas enfermedades y como complemento de fármacos (Valenzuela *et al.*, 2014). Recientemente, numerosas investigaciones se han abocado a la búsqueda de nuevas fuentes de productos bioactivos, a la recuperación de compuestos nutraceuticos de desechos agroindustriales y de materias primas subutilizadas y al desarrollo de productos alimenticios que contengan dichas sustancias. Dentro de los compuestos bioactivos más frecuentemente explorados se encuentran los de naturaleza antioxidante, como carotenoides, clorofilas, compuestos fenólicos, glucosinolatos y vitaminas selectas, como E y C.

Evidencias recientes indican que los compuestos antioxidantes naturales presentes en frutas y vegetales ayudan a disminuir la incidencia de ECD's. Por tanto, es imperativo identificar el tipo de antioxidantes presentes en productos alimenticios (donde destacan aquellos de origen vegetal) para posteriormente asociarlos con beneficios específicos a la salud por su consumo habitual, para generar conciencia de la relevancia de su consumo y a la par para favorecer que se empleen como materias primas para generar productos que diversifiquen y enriquezcan la dieta del consumidor (Alia *et al.*, 2004). La percepción positiva entre los consumidores de los antioxidantes naturales ha impulsado la investigación en esta área y de manera alterna ha renovado el interés en brindar valor agregado a recursos sub aprovechados, como el mamey.

El mamey (*Pouteria sapota*) es una fruta tropical nativa de México y Centroamérica; este fruto ha recibido poca atención en materia de investigación a pesar de su popularidad como ingrediente en

varios tipos de productos (incluyendo yogurt, licuados, helados y otros productos lácteos), de un alto potencial de comercialización como producto fresco y de su alto valor nutraceútico, dado que contiene cantidades considerables de carotenoides (uno de los principales grupos de compuestos bioactivos antioxidantes) lo que la hace atractiva desde puntos de vista nutricional, funcional y económico. Los carotenoides del mamey están presentes tanto en la pulpa como en la cáscara del fruto (Yahia *et al.*, 2011). Actualmente, ciertos aspectos tecnológicamente relevantes para la industrialización del mamey no han sido estudiados en su totalidad; dentro de estos destacan los mecanismos bioquímicos involucrados en la maduración del fruto, así como las formas adecuadas de almacenamiento. Debido a su origen tropical, el mamey puede presentar problemas de daño por frío los cuales influyen en la composición de ácidos grasos de los lípidos de la membrana celular, la cantidad de carotenoides totales, los niveles de azúcares y prolina, así como las etapas de maduración, lo cual conlleva un posible deterioro por manejo postcosecha y una consecuente pérdida de valor comercial. De igual forma se sabe poco sobre su comportamiento bajo tecnologías de conservación distintas a la refrigeración (Alía *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2008).

A la fecha, se han descrito más de 600 carotenoides diferentes, de fuentes alimenticias y no alimenticias, de los cuales solo algunos tienen efectos preventivos contra ECDs y propiedades antioxidantes. Sin embargo, su bioactividad está restringida por su estabilidad frente a la degradación por oxidación, luz y calor durante el almacenamiento, la biodisponibilidad de la matriz vegetal durante la digestión, su deficiente capacidad de dispersión en agua y su estabilidad química (Jan & Nedović, 2010; Chen *et al.*, 2017; Jain *et al.*, 2016). Por tanto, y ante estas limitantes, resulta de gran importancia diversificar los productos derivados de materias primas subutilizadas como el mamey, para maximizar su aprovechamiento. El desarrollo de productos alimenticios funcionales contempla el uso de diferentes matrices alimenticias que favorezcan la estabilidad de los bioactivos, protegiéndolos del entorno. Dentro de las alternativas exploradas para preservar la actividad biológica de los antioxidantes de mamey se han propuesto procesos como microencapsulación, nanoencapsulación y su empleo como fase dispersa en sistemas coloidales como geles y emulsiones alimenticias. La incorporación de estos componentes bioactivos a sistemas acuosos puede realizarse por medios tradicionales (homogeneización, mezclado de alta energía) y emergentes (procesos de alta presión dinámica, ultrasonido de potencia) que pueden mejorar y/o hacer más eficiente la formación de estos sistemas dispersos. El presente proyecto explora el uso de extractos antioxidantes de pulpa y cáscara de mamey en sistemas emulsivos estabilizados por diversos hidrocoloides alimenticios (almidones modificados, proteínas de suero) empleando ultrasonido de potencia como técnica de dispersión, comparando los resultados con procesos de mezclado convencional.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1 Compuestos bioactivos y enfermedades crónico-degenerativas

Hoy en día, el consumo de frutas tropicales está aumentando en los mercados nacionales e internacionales debido al creciente reconocimiento de su valor nutricional y terapéutico asociado a la presencia de sustancias bioactivas capaces de prevenir algunas enfermedades. La exposición o formación descontrolada de radicales libres se relaciona con la alta incidencia de diversas enfermedades no transmisibles como el cáncer, la artritis reumatoide y el proceso degenerativo asociado con el envejecimiento, que incluye las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Recientes estudios indican que el consumo frecuente de frutas se asocia con un menor riesgo de enfermedades crónicas debido a la combinación de vitaminas, minerales, antioxidantes fenólicos y fibra (Estrada *et al.*, 2014).

Los antioxidantes son sustancias que al estar presentes en los alimentos o en el cuerpo a bajas concentraciones retardan, previenen o evitan marcadamente la formación de radicales libres y la oxidación (Young & Woodside, 2001). Estas sustancias bioactivas o metabolitos secundarios de origen vegetal se denominan también fitoquímicos o fitonutrientes. En el reino vegetal, se pueden distinguir cuatro grupos de compuestos bioactivos, entre los que se incluyen sustancias de diversas familias químicas, como son las nitrogenadas, las azufradas, las terpénicas y, las más ampliamente estudiadas, las fenólicas. Los compuestos nitrogenados suelen ser biológicamente muy activos, y pueden dar problemas de toxicidad, como en el caso de la solanina de la papa. Sin embargo, los presentes en las frutas pertenecen en su mayoría a los últimos dos grupos: sustancias terpénicas y fenólicas. Entre los terpenos se encuentran sustancias como el d-limoneno, los carotenoides y los fitoesteroles. Los carotenoides agrupan a compuestos como el α -caroteno y β -caroteno, la luteína, el licopeno, la β -criptoxantina y la zeaxantina, mientras que, dentro de los fitoesteroles, se han estudiado compuestos como sitosterol, estigmasterol y campesterol. Además de los efectos en la salud, muchos compuestos fenólicos tienen un impacto directo en la calidad de los productos que los contienen, pues también pueden tener un efecto protector de sus propiedades sensoriales (Martínez *et al.*, 2008).

Algunas frutas tropicales como el mango, papaya, chirimoya y mamey han sido objeto de varios estudios sobre sus valores nutricionales en relación con la evaluación de la actividad antioxidante. De acuerdo con algunos reportes, el consumo de mamey ayuda a prevenir el daño celular, proteger al organismo de enfermedades degenerativas, así como prevenir enfermedades crónicas, problemas cardiovasculares y otras ECDs debido a su contenido rico en antioxidantes como ácido gálico, catequina, polifenoles, carotenoides y flavonoides (Paulín *et al.*, 2017); por su parte, Alia

Tejagal *et al.* (2005) también identificaron la presencia de fenoles en la pulpa del fruto. Velázquez *et al.* (2017) reportó que dentro de los antioxidantes presentes en el mamey los carotenoides y flavonoides tienen una mayor actividad antioxidante. Una revisión completa de las características botánicas, composicionales y fisicoquímicas del fruto del mamey se incluye a continuación.

1.2 Mamey

El zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) es un miembro del género Sapotaceae, nativo de América Central; su origen se extiende desde el sur de México, a través de Belice, El Salvador, Guatemala, Honduras hasta Nicaragua. Actualmente se le encuentra en países como Estados Unidos (incluyendo Hawaii), Colombia, Venezuela, Filipinas, Cuba, Vietnam y Bahamas. México se coloca entre los principales países productores con un estimado de 18 000 toneladas anuales (SAGARPA, 2018); los estados de mayor producción son: Yucatán, Campeche, Morelos y Veracruz, seguidos del Estado de México, Puebla, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí y Chiapas; entre los países del mundo que más demandan mamey esta Alemania, Francia e Italia.

La familia Sapotaceae está constituida por 540 especies distribuidas en el sur de Estados Unidos, México y Centroamérica. En México, hay siete géneros y 41 especies (Villegas y Granados, 2012). El árbol de mamey puede alcanzar hasta 20–25 m de altura; comúnmente es de copa simétrica, de ramas gruesas, follaje denso y produce latex. El fruto es redondo, ovalado o elíptico, mide de 7.5 a 22.8 cm de largo, pesa de 0.227 a 2.3 Kg; tiene una cáscara áspera, firme y de color marrón oscuro, normalmente contiene de una hasta tres semillas grandes y de color marrón oscuro brillante; su pulpa es dulce, de consistencia suave, cremosa y de color naranja o rojo intenso debido a la presencia de carotenoides, específicamente β -caroteno como compuesto de mayor concentración, seguido de α y ζ -carotenoides (Alia *et al.*, 2004), De acuerdo a Alia *et al* (2000) la concentración de éstos tiende a aumentar durante la maduración.



Figura 1. Partes del fruto de mamey (*Pouteria sapota*).

En la Tabla 1 se presenta el porcentaje en masa de los principales componentes del fruto en estado maduro, de acuerdo con la información de Solís *et al.* (2001). En la Tabla 2 se muestra el contenido de los principales macronutrientes de acuerdo con lo reportado por Yahia y Orozco (2011); es importante citar que el mamey contiene cantidades importantes de vitaminas del grupo B, así como vitamina C.

Tabla 1. Porcentaje promedio en masa (g/ 100 g) de partes del mamey en estado maduro.

Partes de la fruta	%
Pulpa	70.95
Cáscara	14.54
Hueso	14.31

Tabla 2. Contenido nutrimental del mamey (g/100g).

Componente	Cantidad aproximada
Agua	63.8
Proteína	3.1
Grasa	0.1
Carbohidratos	31.8
Fibra	1.2
Cenizas	1.2
Calcio	0.12
Fosforo	0.03
<i>Calorías</i>	<i>126 cal/100g</i>

En la industria alimentaria, el mamey se consume como fruta fresca, generalmente mezclado con otros ingredientes para obtener batidos, helados, jaleas, pastas, pulpa deshidratada y conservas; la semilla se emplea para la elaboración de bebidas y saborizantes, también es fuente de aceite para usos cosmetológicos por las propiedades suavizantes e hidratantes que se le atribuyen. Finalmente, la cáscara de mamey se ha propuesto como agente para la absorción de contaminantes ambientales, y como fertilizante, pues el látex extraído de la corteza y de la cáscara de la fruta verde junto con las infusiones de las semillas pulverizadas, se usan como insecticidas o repelente para mosquitos.

A pesar de sus limitantes en cuanto a conservación post cosecha, el mamey tiene una alta demanda debido a su alto valor nutritivo como alimento fresco y al uso de todas las partes del fruto dentro de la industria cosmetológica, ambiental y alimentaria. Sin embargo, el comportamiento climatérico del fruto lo hace altamente perecedero y al presentar un periodo de maduración entre 3,5 y 7 días, a 20-27 °C, repercute en una corta vida comercial, además, es propenso a sufrir daños por frío, a consecuencia presentan áreas oscuras, acuosas y endurecidas cerca de la semilla, maduración irregular y pulpa adherida a la semilla (Díaz *et al.*, 2000), estos daños estimulan la síntesis de etileno y aceleran la respiración, maduración y senescencia, facilitando la entrada de patógenos por el agrietamiento de la corteza y causando oxidaciones por ruptura. Por ende, la industria alimentaria está buscando técnicas y métodos para aprovechar las propiedades del fruto, alargar vida útil e incorporar sus nutrientes, como antioxidantes a otros productos alimenticios.

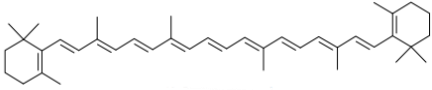
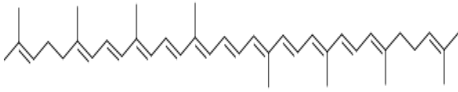
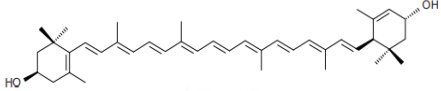
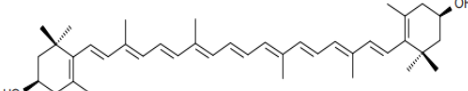
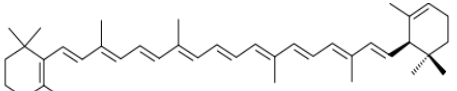
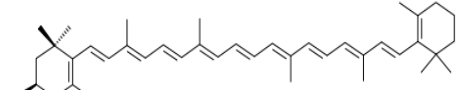
1.3 Compuestos antioxidantes en mamey

Los carotenoides son pigmentos tetraterpenoides, derivados de la unión de 8 unidades de isopreno que origina un esqueleto de 40 átomos de carbono (Tanumihardjo, 2013). En general los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenos (estrictamente hidrocarburos) y xantofilas, derivados de los anteriores por incorporación de funciones oxigenadas. Los carotenoides pueden presentar una estructura acíclica como licopeno, o poseer distintas estructuras cíclicas de cinco o seis carbonos en uno o ambos extremos, como β -caroteno. En la Tabla 3 se representa la estructura de los carotenos de mayor importancia biológica.

La principal función biológica de los carotenoides es la de servir como pigmentos y como sustancias fotoprotectoras, inhibiendo la propagación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, por tanto, impidiendo la acción nociva de éstos a nivel celular.

Debido a que los carotenos son moléculas lipofílicas altamente insaturadas e inestables, tienden a degradarse fundamentalmente por procesos oxidativos (Martínez *et al.*, 2004). Por esta misma inestabilidad, en frutas, se ve afectado por diversas condiciones del medio como temperatura,

Tabla 3. Estructura química de carotenos.

Estructura	Descripción
 <p style="text-align: center;">β-caroteno</p>	<p>Es un miembro de la familia de los carotenoides, está compuesto por dos grupos retinilo y se descompone como la mucosa del intestino delgado humano en vitamina A. Son compuestos liposolubles con pigmentación intensa (roja, naranja o amarilla) presentes de forma natural en muchas frutas, cereales, aceites y verduras.</p>
 <p style="text-align: center;">Licopeno</p>	<p>Caroteno rojo brillante que se encuentra en los tomates (tomate fresco: 0.72- 20 mg / 100 g base húmeda) y otras frutas y verduras de color rojo, como las zanahorias, pimiento rojo, sandías, y papayas; se sintetiza exclusivamente por plantas y microorganismos. Una de las funciones es la de absorber la luz durante la fotosíntesis, protegiendo a la planta contra la fotosensibilización.</p>
 <p style="text-align: center;">Luteína</p>	<p>Pigmento amarillo que pertenece al grupo de las de xantófilas. Se encuentra en pimientos rojos, coles, lechuga, espinacas, maíz, mostaza, yemas de huevo y kiwis.</p>
 <p style="text-align: center;">Zeaxantina</p>	<p>Pigmento liposoluble de color amarillo, pertenece al grupo las xantofilas que aparece en las algas, bacterias y en la yema de huevo.</p>
 <p style="text-align: center;">α-caroteno</p>	<p>Segunda forma más común de carotenos, formado por un anillo β- ionona en un extremo y un anillo α- ionona en el opuesto. Se encuentra en verduras como calabaza, brócoli, ejotes y coles.</p>
 <p style="text-align: center;">B-criptoxantina</p>	<p>Pertenece a la familia de carotenos, aparece de forma natural en algunos pétalos de flores, en algunas frutas como nectarinas, melón, naranjas y manzanas.</p>

Yahia *et al* (2010) reportan la caracterización de los frutos de mamey con respecto a su capacidad antioxidante y contenido fitoquímico mediante el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas, respectivamente, encontrando que el ácido fenólico p-hidroxibenzoico era el componente antioxidante de más alta concentración (484 mg / 100 g en base seca); otros componentes encontrados fueron: ácido gálico 1.92 mg / 100 g base seca, 0.78 mg / 100 g base seca de epicatequina, catequina, dihidromiricetina, catequina-3-O-galato y miricetina. De estos, se informó la dihidromiricetina en la concentración más alta. En los análisis de HPLC también se encontró que la fruta tenía 3.764 mg de β -caroteno y 0.087 mg de luteína, además de cis-violaxantina, β -criptoxantina y luteoxantina en menor cantidad. Debido al alto contenido de compuestos fenólicos y carotenoides en el mamey se están buscando nuevas opciones para incorporarlos a otros alimentos y a la dieta.

1.4 Encapsulamiento de bioactivos

La encapsulación es un proceso para atrapar agentes activos dentro de un material de soporte, es útil para evitar la pérdida de bioactividad debido a los efectos adversos de procesamiento y almacenamiento en los productos, además mejora las eficiencias biológicas tales como la vida útil, control del suministro de componentes activos y previene la aparición de efectos secundarios (Gonnet *et al.*, 2010). Los diferentes enfoques de encapsulación están dirigidos a la protección de componentes de alimentos bioactivos (Vos *et al.*, 2009). En la mayoría de los procesos de encapsulación, uno o más materiales a encapsular, se dispersan en una composición formadora de caparazón, denominada también composición de cubierta. La composición de la cubierta es un material único o una combinación de materiales que es capaz de formar una fase externa continua. El material activo generalmente está en forma de una fase interna discontinua o dispersa (Pasin, 1972).

En la industria alimenticia, el encapsulamiento se ha ocupado como una técnica para proteger vitaminas liposolubles (A, D, E, y K) (Gonnet *et al.*, 2010) dado que algunas de ellas, como los carotenoides, son costosos y es de interés reducir el costo de capital de los productos finales. La optimización de las condiciones de procesamiento en la formulación de las emulsiones puede prevenir su oxidación, isomerización y mejorar su solubilidad para lograr una biodisponibilidad satisfactoria (Jan & Nedovic, 2010) Por ejemplo, Donhowe *et al* (2013) estudiaron la biodisponibilidad de microcápsulas de b-caroteno con quitosano y alginato de sodio durante una digestión *in vitro* en diversas matrices alimentarias como yogurt y budín. Los resultados mostraron que hubo una reducción significativa de la cápsula que permitió la liberación y la biodisponibilidad de los tipos de b-

caroteno. Otros estudios se han enfocado en la encapsulación de carotenoides para incrementar sus propiedades antioxidantes y evitar la degradación (Zhang *et al.*, 2016; Thakur *et al.*, 2017).

De acuerdo con Jan & Nedović (2010) la demanda de los encapsulados ha estado creciendo durante las últimas décadas; algunos de los beneficios de los ingredientes micro o nano encapsulados en la industria alimentaria incluyen a los siguientes:

- Inmovilidad del agente activo en los sistemas de procesamiento de alimentos.
- Mejora de la estabilidad en el producto final y durante el procesamiento.
- Mejoras visibles y texturales del producto.
- Propiedades ajustables de los componentes activos (tamaño de partícula, estructura, soluble en agua o aceite, color).
- Liberación de bioactivos controlada.

Sin embargo, el principal desafío para la industria alimenticia en el ramo de los encapsulados continúa siendo la selección apropiada de la técnica de encapsulación y el o los materiales de recubrimiento a utilizarse.

1.5 Materiales encapsulantes

Se conoce una multitud de sustancias que pueden usarse para atrapar, recubrir o encapsular sólidos, líquidos o gases de diferentes tipos, orígenes y propiedades. Sin embargo, solo un número limitado ha sido certificado para aplicaciones alimentarias. Además, diversas regulaciones pueden existir para diferentes continentes, economías o países, lo cual representa un problema para las empresas que producen alimentos y desean exportar sus productos o expandir sus mercados (Jan & Nedović, 2010).

Los materiales que se emplean para la cubierta protectora de los encapsulados deben ser de calidad alimentaria, biodegradables y capaces de formar una barrera entre la fase interna y su entorno, además de estar certificadas para aplicaciones alimentarias. Entre todos los materiales para encapsular, los más utilizados son los polisacáridos, proteínas y lípidos (Nedovic *et al.*, 2011). En la Tabla 4 se muestran los principales materiales para el encapsulamiento de compuestos activos.

Los hidrocoloides son polisacáridos de alto peso molecular que actúan como espesantes o gelificantes en sistemas alimenticios (Rodríguez *et al.*, 2003), cambiando las propiedades físicas de una solución, además, de permitir la emulsificación, el recubrimiento y la estabilización. Estos hidrocoloides se pueden agrupar en tres categorías principales según Glicksman (1982): gomas

naturales encontradas en la naturaleza, gomas modificadas (semisintéticas) que se basan en modificaciones químicas de gomas naturales y gomas sintéticas que se fabrican por síntesis química. Dentro de la segunda clasificación se encuentran los almidones modificados quienes se modifican químicamente para mejorar su funcionalidad y expandir sus usos, algunos de ellos se obtienen de numerosas fuentes, incluyendo maíz, tapioca, papa, trigo, arroz y maíz ceroso.

Tabla 4. Materiales empleados en la encapsulación de compuestos activos.

Categoría	Material encapsulante
Carbohidratos	Almidón, maltodextrina, quitosano, solidos de jarabe de maíz, dextrina, almidón modificado, ciclodextrina
Celulosa	Carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, acetilcelulosa
Gomas	Goma acacia, agar, alginato de sodio, carragenina, goma guar, goma arábica, goma xantana
Lípidos	Cera, parafina, cera de abeja, aceites esenciales, grasas
Proteínas	Caseína, gelatina, albumina, péptidos, proteína de suero de leche

Entre las proteínas más utilizadas para el encapsulamiento de bioactivos destacan numerosos estudios con proteína concentrada de suero de leche bovina (WPC), como Silva *et al* (2015) quienes hacen una encapsulación asistida por ultrasonido del aceite de semilla de achiote con aislado de proteína de suero contra un almidón modificado. Por su parte, Gunasekaran *et al* (2007) usaron WPC para encapsular cafeína y lograr una entrega controlada de ésta. En la Tabla 5 se muestran algunos materiales o mezclas de materiales que se han reportado compatibles con cierto compuesto activo.

1.5.1 WPC

El suero de leche, también llamado lactosuero es un subproducto que se obtiene durante la coagulación de la leche en la fabricación del queso o caseína; representa del 80 % al 90 % del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 50 % de los nutrientes de esta. Se caracteriza por el color amarillo-verdoso, turbio y el alto valor nutritivo y funcional debido a la presencia de proteínas (destacan la α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, inmunoglobulinas y albumina sérica; proteínas globulares), vitaminas del complejo B, lactosa y minerales como calcio y fosforo (Miranda *et al.*, 2014). En la Tabla 6 se resumen las características principales de las proteínas de la fracción proteína de suero (Ennis y Mulvihill, 2000) y en la Tabla 7 se describe la composición promedio del suero de leche (Pomeda, 2013).

Tabla 5. Materiales y mezcla de materiales usados para la encapsulación en la industria alimentaria.

Material encapsulante	Compuesto activo	Fuente
Mezcla proteína aislada de suero de leche (WPI) y goma arábica	Omega 3	Aratte <i>et al.</i> , (2015)
Quitosano, alginato de sodio	Aceite de tomillo	Shen <i>et al.</i> , (2016)
Gelatina, alginato de sodio	Extracto de hoja de olivo (oleuropeína)	Rasim <i>et al.</i> , (2016)
Goma arábica	Aceite de girasol	Liu <i>et al.</i> , (2014)
Almidón nativo de tapioca, maltodextrina	β -caroteno	Loksuwan (2007)
Almidones modificados (HI-CAP® y CAPSUL®)	β -caroteno	Liang <i>et al.</i> , (2013)
Gelatina	Carotenoides de pulpa de zanahoria	Chen <i>et al.</i> , (1998)
Goma arábica y maltodextrina	Carotenoides de pimiento	Guadarrama <i>et al.</i> , (2012)

Tabla 6. Características de la fracción de proteínas de suero en la leche bovina.

Parámetro	α -lactoalbumina	B-lactoglobulina	Inmunoglobulina	Albúmina de suero
Concentración (% peso)	0.07-0.05	0.2-0.4	0.06-0.1	0.01-0.04
Punto Isoeléctrico	4.2-4.5	5.2		5.3
Peso molecular (g/mol)	1.4	1.8	15-90	6.6

La producción mundial de suero de queso asciende a aproximadamente 200 millones de ton/año (estimado con base en la producción total de queso), de la cual Europa produce cerca del 50%, Estados Unidos el 3% y México apenas el 0.6% (FAOSTAT, 2017). Actualmente el suero lácteo es tratado por medio de diversas tecnologías para la purificación y separación, como la tecnología de membranas y el secado por atomización. El suero pasa por un tratamiento para remover la caseína, así como para garantizar la inactivación de microorganismos y enzimas provenientes de la quesería y, posteriormente, los concentrados de suero son obtenidos mediante el proceso de ultrafiltración (UF)

y secado por aspersión. Previo al proceso de UF se realiza un pretratamiento de microfiltración (MF) del suero, una vez pasteurizado y clarificado, para así eliminar las grasas y, ya concluida la UF, el suero es enviado a secado por aspersión. El aislado de suero es obtenido al tratar el concentrado resultante mediante la aplicación de diferentes tecnologías de membrana. De estos procesos se obtienen concentrados de proteína de suero con un 40% a 80% de proteínas, y aislados con porcentajes proteínicos mayores al 80%, lo que permite el amplio uso de estos productos, principalmente, en la industria alimentaria (Nedovic *et al.*, 2011).

Tabla 7. Composición general del suero.

Componente	Observaciones
Lactosa	95 % de la lactosa de la leche, en una proporción de 4.5-5.0 % p/v. 46.0-52.0 g/L en lactosuero dulce y 44.0-46.0 g/L en lactosuero ácido.
Proteína	En una proporción de 0.8-1.0 % p/v. 6.0 g/L en lactosuero dulce y 6.0-8.0 g/L en lactosuero ácido. Alto contenido de aminoácidos como leucina, isoleucina, lisina y valina.
α -lactoalbúmina	30 % del total del contenido proteico.
β -lactoglobulina	Tiene propiedades emulsificantes e interactúa con compuestos como retinol y ácidos grasos.
Globulina	Corresponde al 10 % del total de proteínas.
Proteasas-peptonas	10 % del total de proteína. Lactoferrinas, albumina, inmunoglobulinas, glicoproteínas y enzimas (nucleasas, lactoperoxidasas, xantina oxidasa, lipasa estearasa, amilasa, fosfatasa ácida y alcalina, lisozima, aldolasa, catalasa, inhibidor de la tripsina, lactosa y otras).
Lípidos	0.5 % y 0.8 % de la materia grasa de la leche.
Vitaminas	Tiamina, Riboflavina, Ácido nicotínico, Ácido ascórbico, Ácido pantoténico.
Minerales	8-10 % del extracto seco. Calcio 0.4-0.6 g/L en lactosuero dulce y 1.2-1.6 g/L en lactosuero ácido, potasio, fósforo, sodio y magnesio.
Agua	~ 93 %

El suero se puede clasificar en 2 grupos: dulce y ácido. El primero se obtiene de la coagulación enzimática de la leche al elaborar queso Chihuahua, Cheddar y manchego, entre otros, y el segundo se produce por acidificación de ácidos orgánicos. Ambos sueros presentan diferencias en su composición; el dulce tiene un pH de 5.8 a 6.6, mayor contenido de proteínas, lactosa, lípidos y menor cantidad de ácido láctico, lactosa, calcio y fósforo. Por medio de este lactosuero se obtienen los

siguientes sueros: suero líquido clarificado, líquido pasteurizado, concentrado de ultrafiltración, líquido desmineralizado y crema de suero.

El suero ácido contiene más del 80% de los minerales de la leche de partida por lo que para algunas de sus aplicaciones debe neutralizar, tiene un gran contenido de ácido láctico y gran cantidad de minerales. Este puede ser utilizado para la elaboración de bebidas cítricas de sabor a limón o naranja por su bajo pH, elaboración de queso *ricotta* o quesillo. (López *et al.*, 2018).

Una de las aplicaciones más comunes, dadas las propiedades de las proteínas que lo componen, es como sustituto de otros ingredientes y componentes usados en esta industria. Algunas de las aplicaciones del suero lácteo tienen lugar en la industria de bebidas, yogur, quesos untables, en la industria cárnica en embutidos, panificación, confitería e, inclusive, en la industria farmacéutica. Actualmente se están desarrollando nuevas y diversas aplicaciones que aprovechan las propiedades funcionales de sus proteínas, especialmente aquellas relativas a su composición química. Estas propiedades son: gelificación, retención de agua, solubilidad, emulsificación, espesado, espumado, absorción y retención de lípidos, y ciertos aromas y sabores.

Se ha demostrado que las proteínas son excelentes agentes encapsulantes, y se han investigado para producir emulsiones estables cuando se combinan con carbohidratos. El concentrado de proteína de suero (WPC), debido a su flexibilidad y naturaleza anfifílica de las proteínas globulares se pueden adsorber rápidamente en la interfaz de las emulsiones, donde se agregan automáticamente y forman membranas continuas y homogéneas alrededor de las gotas de aceite a través de interacciones intermoleculares. Al recubrir las gotas de aceite con capas cargadas, las películas de proteínas proporcionan una barrera electrostática contra la floculación y la coalescencia. Varios procedimientos pueden producir microcápsulas a partir de proteínas de suero; así, Gunasekaran *et al* (2007) utilizaron proteína de suero en sistemas de nanopartículas para la encapsulación y el suministro controlado de compuestos bioactivos concluyendo que las proteínas pueden usarse como sistemas de hidrogeles o nanopartículas para la liberación controlada de compuestos bioactivos. Por su parte, Mohammadi *et al* (2016), trabajaron con la nanoencapsulación de compuestos fenólicos de hoja de olivo donde emplearon WPC y pectina, evaluando su tasa de liberación resultando una alta estabilidad y una liberación controlada de los compuestos encapsulados. Jamshidi *et al* (2018) caracterizaron emulsiones dobles que contenían aceite de pescado estabilizado mediante complejos de WPC con inulina, observaron que los complejos mejoraron la estabilidad de la doble emulsión, disminuyendo la tensión interfacial del aceite y el agua. Estos y otros estudios previos donde se emplea suero de leche en la emulsificación y encapsulación de bioactivos son el motivo por el cual se seleccionó esta proteína para el presente trabajo.

1.5.2 Almidón

En la actualidad la ingesta de alimentos bajos en carbohidratos aumenta cada día, debido a la conciencia de los consumidores por el cuidado de su salud, por ende, los alimentos ricos en carbohidratos son culpados por causar o empeorar la diabetes y el aumento de peso. Sin embargo, la presencia de almidones modificados en los alimentos ha adquirido gran importancia debido a sus propiedades funcionales únicas y beneficios para la salud ya que su velocidad de absorción mejora la digestión favoreciendo el control glucémico, control de los niveles de colesterol y ayuda en la absorción de minerales (Khoozani *et al.*, 2018).

El almidón es un polisacárido de reserva de energía de las plantas, se acumula principalmente en los tallos, raíces y frutos. El almidón está formado por dos compuestos, amilosa (20-25%) cadena lineal de α -D-glucopiranosas unida mediante enlaces α -(1 \rightarrow 4) y amilopectina (70-75%) formada por α -D-glucopiranosas, con uniones α -(1 \rightarrow 4) y enlaces α -(1 \rightarrow 6) que originan lugares de ramificaciones cada doce monómeros. La calidad del almidón depende de la proporción y organización de estas dos moléculas en los gránulos.

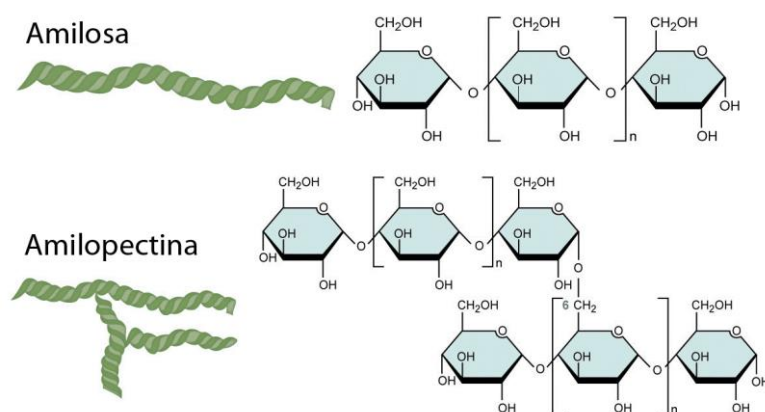


Figura 2. Estructura química del almidón.

En su estado nativo, el almidón es insoluble en agua, sus gránulos son parcialmente cristalinos cuya morfología y composición depende de cada especie en particular (anexar micrografía), estos almidones presentan ciertas limitaciones para uso industrial, por lo tanto, son modificados para mejorar sus propiedades funcionales y tener un amplio rango de aplicaciones en la industria no solo alimentaria si no algunas otras como la industria del papel, adhesivos, textil, farmacéutica, etc.

Los gránulos de almidón son tratados química, física y bioquímicamente para causar la ruptura de algunas o todas las moléculas. La modificación del almidón permite realzar o inhibir propiedades como consistencia, poder aglutinante, estabilidad a cambios en el pH y temperatura y mejorar su gelificación, dispersión o fluidez (FAO 2007). Las principales modificaciones se mencionan en la Tabla

8. De acuerdo con múltiples resultados publicados, los almidones modificados, incluyendo los fosfatados, succinatados y acetilados, han demostrado mejorar la capacidad de estabilización de sistemas coloidales de los almidones nativos, haciéndolos una buena alternativa para la protección de compuestos bioactivos, incluyendo aquellos de naturaleza lipofílica. Al analizar los diversos almidones representativos usualmente empleados en la preparación de emulsiones, se ha evidenciado que los almidones modificados son los más adecuados para la fabricación de emulsiones con alta estabilidad a lo largo del tiempo de almacenamiento. Dentro de estos, se destacan los almidones succinatados, de entre los cuales los más conocidos son aquellos modificados con anhídrido octenil succínico (OSA). Estos polímeros patentados desde inicios de los 1950's se consideran un ingrediente ideal para procesos de emulsificación y encapsulamiento, debido a su eficiencia, bajo costo y carácter como sustancia GRAS. Los almidones OSA, cuya sustitución puede ser de hasta el 3% del peso total del almidón, se consideran especialmente aptos para estabilizar emulsiones aceite en agua (O/W); por su parte, la modificación convierte a este almidón en un excelente encapsulante para compuestos bioactivos, debido a que reduce la actividad de alfa-amilasa, favoreciendo la absorción de compuestos encapsulados hasta que llega al intestino delgado (Cheuk *et al.*, 2015)

Tabla 8. Modificación de almidones.

Modificación	Propiedades y aplicaciones
Pregelatinización	Dispersabilidad en agua fría / Para alimentos instantáneos
Dextrinización	Dextrinas amarillas y blancas / Productos horneados
Sustitución aniónica	Estabilidad a congelación y descongelación / útil en alimentos congelados
Sustitución catiónica	Útil como auxiliar de retención de pigmentos en el papel
Hidroxipropilación	Agente estabilizante / Usado en alimentos procesados, dulces, estabilidad a bajas temperaturas.
Entrecruzamiento	Estabilidad del gránulo, gelificación, resistencia a la retrogradación / Usado en sopas y productos de panadería
Oxidación	Entrecruzado con grupos amino / Curtido de cuero e industria de adhesivos
Acidificación parcial o hidrólisis enzimática	Mayor retrogradación / Confitería

1.6 Técnicas de encapsulación

La encapsulación tiene diferentes propósitos, entre los que destacan: la conservación, fortificación, control de la liberación de bioactivos, convertir una formulación líquida en un sólido que sea más fácil de manejar, mejoramiento de cualidades organolépticas y funcionales de los productos alimenticios, etc., sin embargo, la estabilidad de los ingredientes funcionales es un parámetro crítico para su incorporación exitosa en varios sistemas alimenticios, por lo tanto, la industria alimenticia busca garantizar la estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento.

Por ende, el método de encapsulación se elige tomando en cuenta la aplicación requerida, el tamaño de cápsula deseado, el material a encapsular, el costo y las propiedades físicas y químicas del recubrimiento. Algunas técnicas para formar las capsulas son: secado por aspersión, extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado, coacervación, liposomas, polimerización interfacial, homogeneización de alta presión.

Muchos de los procesos de encapsulación se basan primeramente en hacer gotas al activo y estas gotas son posteriormente rodeadas por un material en fase gaseosa o líquida a través de diferentes procesos fisicoquímicos.

Entre numerosas técnicas de encapsulación, algunas ya están establecidas a nivel industrial como el secado por pulverización, mientras que el rendimiento y la aplicación de algunas otras técnicas se encuentran aún en evaluación

Algunas de estas técnicas se han empleado para encapsular carotenoides, por ejemplo, por secado por aspersión (Donhowe *et al.*, 2013), coacervación compleja (Jain *et al.*, 2016), basados en emulsiones (Chen *et al.*, 2017) y ultrasonido (Paz *et al.*, 2013).

Los encapsulados son básicamente partículas con una estructura núcleo-capa, pero algunos de ellos pueden tener una estructura más compleja en forma de múltiples núcleos integrados en una matriz. Las partículas encapsuladas tienen propiedades físicas, mecánicas y estructurales, que incluyen tamaño de partícula, distribución de tamaño, morfología, carga superficial, espesor de pared, resistencia mecánica, temperatura de transición vítrea, grado de cristalinidad, fluidez y permeabilidad.

Actualmente la tendencia de las investigaciones se centra en la generación de nuevos métodos de encapsulación y en conseguir un material de recubrimiento que garantice las condiciones de protección requeridas para distintos activos encapsulados, permitiendo obtener aplicaciones más diversas y novedosos productos funcionales; uno de estos métodos es la encapsulación a través de la formación de sistemas emulsivos.

1.7 Emulsificación

1.7.1 Conceptos básicos de emulsión

Una emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable de dos líquidos inmiscibles, normalmente de naturaleza apolar y polar, en la que uno de ellos forma gotas de pequeño tamaño que se denomina fase dispersa y el otro, fase continua. Una emulsión debe contener un tercer componente, un emulsionante, sustancia anfifílica que facilita la formación de la emulsión disminuyendo la tensión interfacial entre la fase apolar (oleosa) y la polar (acuosa), además aporta cierta estabilidad física durante un tiempo, dependiendo de la composición, características de procesado y condiciones externas durante el envejecimiento. Las emulsiones encuentran aplicaciones en diversos campos: alimentación, cosmética, farmacia, química agrícola, detergencia, industria de la pintura y polímeros, etc. Dependiendo de la naturaleza de las fases dispersa y continua, las emulsiones se clasifican como aceite en agua (O/W) para gotas de aceite dispersas en agua, agua en aceite (W/O) para gotas de agua dispersas en aceite o múltiples W/O/W y O/W/O, este tipo denota una doble emulsión, que contiene gotas de aceite disperso en gotas acuosas que a su vez se dispersan en una fase oleosa continua. Como ejemplos de emulsiones O/W se pueden citar a las siguientes matrices alimenticias: leche, mayonesa, crema de leche, y herbicidas emulsionados y algunas salsas. Lógicamente en una emulsión agua en aceite (W/O), la fase dispersa es de naturaleza acuosa y la continua oleosa. Algunos ejemplos alimenticios de emulsiones incluyen a productos como mantequilla, margarina y emulsiones para protección solar (Muñoz *et al.*, 2007).

1.7.2 Procesos para la formación de emulsiones

Las emulsiones simples pueden usarse como un vehículo de entrega de agentes activos lipofílicos en productos alimenticios. Sin embargo, hay dos consideraciones que deben temarse en cuenta al formular una emulsión. En primer lugar, el sistema de emulsión debe ser estable (de almacenamiento) hasta la aplicación. En segundo lugar, en la aplicación, la emulsión debe comportarse de manera consistente para lograr la entrega deseada.

Generalmente la formación de emulsiones puede implicar varios pasos, a menudo es necesario dispersar los ingredientes funcionales en la fase en que son más solubles como, por ejemplo, vitaminas, colores, antioxidantes o surfactantes en el aceite y, proteínas hidrofílicas, polisacáridos, azúcares, sales, y tensioactivos en el agua. En el siguiente paso se realiza una pre-emulsión; emulsión gruesa que contiene gotas grandes, para ello se mezclan los líquidos inmiscibles con el fin de prevenir la aglomeración y facilitar la dispersión de los ingredientes en las siguientes etapas, comúnmente en este paso no se consigue la estabilidad y se realiza con ayuda de algún equipo de bajo cizallamiento.

El objetivo de la última etapa en la formación de emulsiones es dar estabilidad mediante la reducción del tamaño de las gotas, lo que implica el uso de equipos como molinos coloidales,

mezcladores de alto cizallamiento, recipientes equipados con deflectores, microfluidizadores, homogeneizadores de membrana o ultrasonidos de alta intensidad (Mc Clements, 2005). Este incremento en la estabilidad coloidal de la emulsión está plasmado en la Ley de Stokes, que establece que la velocidad crítica de cremado de una partícula esférica dispersa en un medio de distinta polaridad y densidad (por ejemplo, una gota de aceite en agua) está en función de variables intrínsecas del sistema (viscosidad de la fase continua, densidades de ambas fases), de la gravedad y del tamaño de partícula; al disminuir este último, la velocidad de cremado se ve sensiblemente reducida.

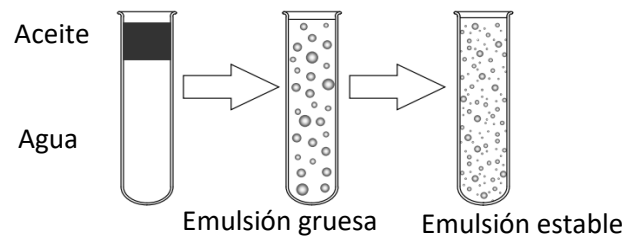


Figura 3. Formación de una emulsión.

1.7.3 Mecanismos de estabilidad

La estabilidad de una emulsión está ligada con la capacidad de esta para resistir los cambios en sus propiedades a través del tiempo, cuanto más estable es una emulsión, más lentamente cambian sus propiedades.

El tiempo que una emulsión debe permanecer estable depende de la naturaleza del producto alimenticio. Algunas emulsiones se forman como pasos intermedios o durante un proceso de fabricación y por lo tanto, solo necesitan permanecer estables durante unos pocos segundos, minutos u horas como por ejemplo la masa para pastel, una mezcla de helado o las premezclas de margarinas; mientras que otros deben permanecer estables durante días, meses o incluso años antes del consumo, como la mayonesa, los aderezos para ensaladas y licores de crema.

La mayoría de los tensoactivos utilizados para estabilizar emulsiones y espumas alimentarias se dividen en dos categorías: Especies de baja masa molar (como lípidos, fosfolípidos (lecitina, mono y diglicéridos), monoestearato de sorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitano) y de alta masa molar, como diversos tipos de proteínas, tanto de origen animal como de origen vegetal.

Una emulsión puede volverse inestable debido a varios procesos físicos o químicos. La inestabilidad física produce una alteración en la distribución espacial u organización estructural de las moléculas como la floculación, la coalescencia, inversión de fase, cremado o maduración de Ostwald, (ver Figura 4); por otra parte, la inestabilidad química da como resultado una alteración en el tipo de moléculas presentes, como la oxidación e hidrólisis. Sin embargo, el estudio del origen y la naturaleza

de los diversos mecanismos de desestabilización son una herramienta para controlar y mejorar la estabilidad de una emulsión.

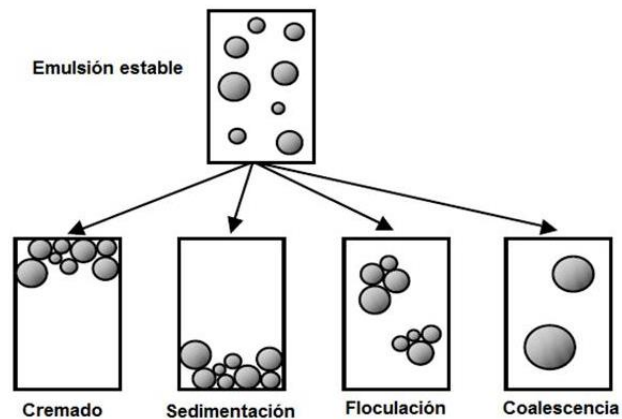


Figura 4. Mecanismos de inestabilidad en emulsiones.

Recientemente se han propuesto algunas de las nuevas tecnologías para formar emulsiones que sean cinéticamente estables durante periodos razonables, esto mediante la utilización de fuerzas mecánicas intensas. Los homogeneizadores de alta presión son los más empleados para producir emulsiones finas, con buenas propiedades de textura y mayor estabilidad. Así, Kuhn y Cunha (2012) evaluaron el efecto de la homogeneización de alta presión sobre la estabilidad de emulsiones de aceite de linaza con proteína aislada de suero de leche y sus resultados revelaron que las emulsiones homogeneizadas de 20 a 100 MPa eran más estables, sin signos de separación de fases.

Por su parte, Ru *et al* (2010) trabajaron con emulsiones aceite en agua estabilizadas por ι -carragenano y β -lactoglobulina con el objetivo de desarrollar portadores biocompatibles para el componente activo del té verde, epigallocatequina-3-galato, estas fueron preparadas con éxito por homogeneización de alta presión, obteniendo una respuesta de estabilidad favorable con tamaños de gotas < 500 nm, demostrando que los métodos de alta presión y la ultrasonificación son ideales para preparar nanoemulsiones.

1.8 Fundamentos del ultrasonido

1.8.1 Definición y clasificación

El ultrasonido (US) se define como la energía generada por ondas sónicas con frecuencias mayores a 20 kHz. La propagación de estas ondas ocurre a través de un medio, donde las partículas vibran y generan zonas de alta y baja presión, también conocidas como zonas de compresión y

rarefacción. La magnitud de estas variaciones de presión depende de la amplitud de la onda y por lo tanto de la cantidad de energía aplicada al sistema (Kentish & Ashokkumar, 2011).

Los dispositivos ultrasónicos son equipos que funcionan a partir de transductores ultrasónicos encargados de convertir la energía eléctrica en energía mecánica, los cuales vibran a determinada frecuencia cuando se le aplica un voltaje (Kentish & Feng, 2014). A su vez, los transductores se unen a una superficie o sonda metálica que transmite ondas sonoras al fluido, de acuerdo con esto existen diversos tipos de equipos como baños ultrasónicos, equipos de sonda, reactores que transmiten la vibración a partir de una copa y de una sonda acoplada, y celdas de flujo.

Los efectos y las aplicaciones del US dependerán de los parámetros de proceso ajustados para alcanzar el objetivo deseado. Los parámetros de diseño que pueden ser elegidos por el usuario dependerán de las características del equipo que se utilizará, pero comúnmente los que pueden ser modificados son: amplitud, frecuencia de la onda, tiempo de exposición, temperatura, presión y volumen de procesado (Salazar *et al.*, 2012). También existen otras variables que dependerán de las características del material por el cual se propagará la onda, estas son la longitud de onda y la velocidad de propagación, entre otras.

Los resultados del proceso para una configuración de parámetros dada dependen principalmente de la energía por unidad de volumen aplicada, conocida como coeficiente específico de energía y para el cual deberá conocerse la cantidad de energía transferida al proceso en el tiempo total de exposición. El coeficiente específico de energía se evalúa de la siguiente manera (Liu *et al.*, 2014):

$$Ev = Pt V \quad (\text{Ec. 1})$$

Siendo:

- Ev Coeficiente específico de energía en $W \cdot s/mL$
- P Potencia en W
- t Tiempo en s
- V Volumen tratado en mL

Las técnicas de ultrasonido se clasifican en dos grupos, de baja o de alta intensidad. Los primeros utilizan frecuencias más altas que 100kHz e intensidades por debajo de $1 \frac{W}{cm^2}$ y es excelente como técnica de análisis y monitoreo de varios alimentos durante el procesamiento y almacenamiento, esta técnica se considera una prueba no destructiva ya que las ondas ultrasónicas no causan daños físicos ni químicos permanentes en el alimento, la aplicación más común de este tipo de US en el sector alimentario es en pruebas analíticas dirigidas a obtener información sobre las propiedades fisicoquímicas y el estado de los alimentos. El US de alta intensidad, comprende potencias

mayores a $1 \frac{W}{cm^2}$ y frecuencias entre 20 y 100 kHz y cuando es aplicado a un medio líquido ocurre un fenómeno conocido como cavitación, el cual es el responsable de afectar las propiedades físicas y químicas de los alimentos, así como alterar las paredes celulares de los microorganismos y enzimas (Awad *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2011; Abbas *et al.*, 2013).

1.8.2 Cavitación

Las ondas del US crean en un medio líquido una presión acústica que depende del tiempo, frecuencia y presión máxima de amplitud de onda. Esta última es directamente proporcional a la potencia de entrada del transductor (Patist & Bates, 2008). A baja amplitud de onda la intensidad es menor y la propagación del US mueve oscilatoriamente los elementos del fluido mezclándolos; a esto se le conoce como corrientes acústicas. Utilizando intensidades altas el fenómeno que domina el proceso de US es la cavitación acústica; este proceso involucra la formación, crecimiento y colapso de microburbujas de gas en un campo ultrasónico.

Estas burbujas principalmente se componen de aire que se ha disuelto en el líquido facilitando la desgasificación de este. Las burbujas se forman primero en superficies sólidas, como las paredes de los recipientes y dentro de las partículas de impurezas, pero se extienden rápidamente para formar una población en todo el líquido de sonicación.

El rango de tamaños de burbuja inducidos por el campo acústico depende de la frecuencia de sonido. Burbujas más grandes se forman a frecuencias más bajas y es el colapso de estas burbujas lo que causa la mayor parte del efecto en aplicaciones alimenticias (Bermudez-Aguirre, 2017).

Durante la determinación de tamaño, número de burbujas y su tiempo de vida antes del colapso, las burbujas crecen por dos caminos: difusión rectificada y coalescencia de las burbujas. Las burbujas formadas por coalescencia pueden formar burbujas más grandes que excedan el tamaño de resonancia, por lo que se acumula en los nodos. La difusión rectificada consiste al transporte de masa a través de la pared de la burbuja durante los ciclos de rarefacción y compresión. Durante la fase de expansión los gases se difunden hacia dentro de la burbuja y durante la fase de compresión la materia se difunde desde dentro hacia afuera de la burbuja. Es conocido que el proceso de rarefacción es relativamente lento y el área superficial disponible para el transporte de masa es grande; por lo tanto, la cantidad de gas que se transfiere hacia la burbuja durante la fase de expansión es mayor que aquella transferida hacia afuera durante la compresión. Durante este proceso la burbuja comienza a crecer en un cierto número de ciclos hasta alcanzar un tamaño crítico, en el que la oscilación de la burbuja coincide con la frecuencia aplicada, y así implosiona en uno de los ciclos de compresión (Chandrapala *et al.*, 2012b). La implosión de estas burbujas genera nuevos núcleos iniciando de nuevo el ciclo. Las

burbujas generadas por la cavitación se pueden dividir en dos tipos (Bermúdez-Aguirre, 2017): cavitación *estable*, aquella donde el tamaño de las burbujas se mantiene en equilibrio durante muchos ciclos de presión acústica, permitiéndoles existir por un largo tiempo y suficiente para formar nubes de burbujas; y cavitación *transitoria*, son burbujas que existen por periodos de tiempo muy cortos, y se caracterizan por colapsar violentamente.

El colapso de las burbujas es un proceso casi adiabático pues ocurre en microsegundos, tiene como resultado la generación de altas temperaturas dentro de las burbujas debido a la compresión del gas y por lo cual las burbujas pueden alcanzar temperaturas alrededor de los 5000 K y presiones cercanas a las 500-1000 atm (Patist & Bates, 2008; Ashokkumar, 2011; Rae *et al.*, 2005). Sin embargo, el calor generado es transitorio y muy localizado, pues la energía se dispersa a los alrededores después del colapso, por lo que el aumento de temperatura global en el medio es bajo. La concentración del gas disuelto en el medio influye en la magnitud de la temperatura alcanzada durante el colapso de las burbujas. Las condiciones creadas durante y después de la cavitación producen reacciones de luminiscencia, producción de radicales, corrientes acústicas intensas, grandes esfuerzos de cortes cerca de las paredes de la burbuja capaces de romper enlaces inter e intramoleculares (Sutkar & Gogate, 2009), formación ondas de choque, micro-corrientes capaces de alcanzar velocidades de $100 \frac{m}{s}$ (Gao *et al.*, 2014) y turbulencia en la zona de cavitación. Estos últimos son los efectos que son aprovechados para generar cambios físicos y químicos en distintas aplicaciones. En el US de baja intensidad, dado que las frecuencias son mayores, los ciclos de compresión y rarefacción son más cortos, así que el ciclo de rarefacción produce una presión negativa insuficiente en su duración y/o intensidad para iniciar la cavitación y el ciclo de compresión ocurre más rápido que el tiempo requerido para que la microburbuja colapse; por lo cual los efectos producidos no son tan severos. A frecuencias bajas el número de burbujas de cavitación transitoria es menor, aunque tienen dimensiones considerables por lo que los efectos físicos ocasionados por las mismas son mayores que los químicos (Pingret *et al.*, 2013). Por ejemplo, una burbuja a 20kHz existe por sólo pocas oscilaciones sin embargo si es expuesta a 515 kHz tiene un límite de 5000 oscilaciones (Rae *et al.*, 2005). Las propiedades fisicoquímicas del medio que más influyen en la cavitación son la presión de vapor, la viscosidad y la tensión superficial. Así si se aumenta la temperatura del medio se pueden reducir los efectos de la cavitación, es decir, un incremento en la temperatura disminuye la viscosidad y tensión superficial del líquido e incrementa su presión de vapor lo que aumenta la formación de burbujas las cuales contienen más vapor y en consecuencia conduce a un colapso menos violento. Por el contrario, al incrementar la presión se incrementa la presión dentro de las burbujas lo que conlleva a un colapso más rápido y violento (Kentish & Feng, 2014). En general, los mayores efectos sonoquímicos producidos por el US son observadas a bajas temperaturas y altas presiones donde la mayoría del

contenido de las burbujas es gas (Salazar *et al.*, 2012). Al incrementar la potencia el fenómeno de cavitación puede aumentar y luego disminuir ya que al incrementar la intensidad el número de burbujas formadas alrededor del transductor se incrementa significativamente formando una nube que absorbe y disipa las ondas de sonido, esto disminuye la transferencia de energía hacia el medio (Gogate *et al.*, 2011). Por esta razón es necesario buscar un óptimo en el cual la mayor cantidad de energía sea transferida al proceso. La presencia de solutos también afecta la cavitación de diferentes maneras (Ashokkumar, 2011). La presencia de solventes en el vapor, solutos volátiles y otras moléculas de gas dentro de las burbujas genera una gran variedad de radicales y reactivos intermediarios los cuales pueden iniciar reacciones secundarias en el volumen de líquido. Además, la temperatura media de las burbujas que implosionan puede ser disminuida al agregar solventes como alcohol al medio (Rae *et al.*, 2005).

1.9 Aplicaciones del ultrasonido de alta intensidad

La aplicación del ultrasonido de baja frecuencia (alta intensidad) en la formación de emulsiones facilita el proceso de homogeneización y dispersión bajo la influencia de los fenómenos de cavitación (Abbas *et al.*, 2013). La frecuencia, el tiempo, la potencia, la fase oleosa y la fase acuosa son los principales parámetros que rigen el proceso de cavitación, que influyen en el tamaño y el índice de polidispersión de la gota en la emulsión. Además, la presión hidrostática, el contenido de gas y la temperatura también pueden tener profundos efectos en el proceso. Las emulsiones obtenidas por medio de oscilaciones mecánicas a frecuencias ultrasónicas son más estables incluso sin la adición de surfactante. El tamaño de gota de las suspensiones es más pequeño dentro de una distribución de tamaño estrecho en comparación con el obtenido con otros métodos. Debido a estas dos características, las emulsiones generadas por ultrasonido pueden encontrar aplicaciones potenciales en áreas donde el tamaño de partícula uniforme y pequeño es esencial, como en la encapsulación (Mongenot *et al.*, 2000). La encapsulación de los ingredientes alimentarios generalmente se logra ya sea con lípidos o polímeros hidrofílicos.

La aplicación de ultrasonido de alta intensidad para modificar biopolímeros se está estudiando cada vez más. Varios trabajos se centran en la capacidad del ultrasonido para despolimerizar polisacáridos tales como dextrano, xantano, carragenina, quitosano y almidón, lo que impacta directamente en sus propiedades funcionales (Arzeni *et al.*, 2012).

El tratamiento ultrasónico es uno de los métodos físicos de modificación del almidón y depende de factores como potencia y frecuencia de sonicación, temperatura y tiempo del tratamiento y propiedades de las dispersiones de almidón (por ejemplo, concentración y origen botánico del

almidón). En el caso de los gránulos de almidón nativos, la sonicación conduce a su degradación física. De acuerdo con Luo *et al* (2008), que sonicaron almidones de maíz de diferente contenido de amilosa, el tratamiento ultrasónico ataca principalmente a las regiones amorfas de los gránulos. Su forma y tamaño siguen siendo los mismos que antes del tratamiento, pero la superficie se vuelve porosa y cambian algunas propiedades fisicoquímicas como: poder de hinchamiento, solubilidad o propiedades de pegado (Arzeni *et al.*, 2012).

1.10 Ultrasonido de potencia como técnica de emulsificación y encapsulamiento de compuestos bioactivos

El USP se define como la energía generada por ondas sónicas de 20 kHz a alrededor de 1 MHz (Awad *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2011) por segundo que pueden interactuar con la materia y tiene la habilidad de provocar cambios físicos y químicos en ésta. Cuando una superficie plana vibra con cierta frecuencia y amplitud, longitudinal las ondas se generan y se propagan al medio líquido / gas circundante. Estas ondas inducen un movimiento en las partículas a través de una serie de compresiones y rarefacciones bajo presión fluctuante, lo que conduce a fenómenos de cavitación acústica. Este fenómeno se define como la formación repentina y el colapso de las burbujas en el líquido por medio de una fuerza mecánica. A medida que las burbujas se forman y se derrumban rápidamente, se producen ondas de choque presurizadas, eventos de calentamiento localizados y tremendas fuerzas de cizallamiento (Feng *et al.*, 2011). Al pasar por el medio, dependiendo de la viscosidad y la conductividad del medio, las ondas de sonido disipan parte de la energía acústica en energía térmica (Abbas *et al.*, 2013).

Las técnicas de ultrasonido pueden clasificarse en dos grupos, de baja o de alta intensidad. Los primeros son excelentes para medir propiedades del medio en el que se propagan ya que no producen ninguna modificación en el mismo. La aplicación más común de este tipo de US en el sector alimentario es en pruebas analíticas dirigidas a obtener información sobre las propiedades fisicoquímicas y el estado de los alimentos. En el US de alta intensidad, el fenómeno de cavitación puede afectar las propiedades físicas y químicas de los alimentos, así como alterar las paredes celulares de los microorganismos y enzimas (Awad *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2011; Abbas *et al.*, 2013).

En la formación de emulsiones, la aplicación del ultrasonido de baja frecuencia facilita el proceso de homogeneización y dispersión bajo la influencia de fenómenos de cavitación (Abbas *et al.*, 2013). La frecuencia, el tiempo, la potencia, la fase oleosa y la fase acuosa son los principales parámetros que rigen el proceso de cavitación, que influyen en el tamaño y el índice de polidispersión de la gota en la emulsión. Además, la presión hidrostática, el contenido de gas y la temperatura también pueden tener profundos efectos en el proceso. Las emulsiones obtenidas por medio de

oscilaciones mecánicas a frecuencias ultrasónicas son más estables incluso sin la adición de surfactante. El tamaño de gota de las suspensiones es más pequeño dentro de una distribución de tamaño estrecho en comparación con el obtenido con otros métodos. Debido a estas dos características, las emulsiones generadas por ultrasonido pueden encontrar aplicaciones potenciales en áreas donde el tamaño de partícula uniforme y pequeño es esencial, como en la encapsulación (Mongenot *et al.*, 2000). La encapsulación de los ingredientes alimentarios generalmente se logra ya sea con lípidos o polímeros hidrofílicos.

La aplicación de ultrasonido de alta intensidad para modificar biopolímeros se está estudiando cada vez más. Varios trabajos se centran en la capacidad del ultrasonido para despolimerizar polisacáridos tales como dextrano, xantano, carragenina, quitosano y almidón, lo que impacta directamente en sus propiedades funcionales (Arzeni *et al.*, 2012). El tratamiento ultrasónico es uno de los métodos físicos de modificación del almidón y depende de factores como potencia y frecuencia de sonicación, temperatura y tiempo del tratamiento y propiedades de las dispersiones de almidón (por ejemplo, concentración y origen botánico del almidón). En el caso de los gránulos de almidón nativos, la sonicación conduce a su degradación física. De acuerdo con Luo *et al.* (2008), que sonicaron almidones de maíz de diferente contenido de amilosa, el tratamiento ultrasónico ataca principalmente a las regiones amorfas de los gránulos. Su forma y tamaño siguen siendo los mismos que antes del tratamiento, pero la superficie se vuelve porosa y cambian algunas propiedades fisicoquímicas como: poder de hinchamiento, solubilidad o propiedades de pegado (Arzeni *et al.*, 2012).

Tomando en cuenta la información anteriormente expuesta, se plantean los siguientes objetivos relevantes para este proyecto.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología para el encapsulamiento en una emulsión alimenticia de extractos ricos en carotenoides obtenidos de pulpa y cáscara de mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn) empleando ultrasonido de potencia e hidrocoloides selectos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de tratamientos selectos de ultrasonido de potencia como técnica de emulsificación/encapsulamiento de bioactivos lipofílicos y su influencia en la modificación de los hidrocoloides como agentes estabilizantes de la emulsión.
- Seleccionar la proporción adecuada de hidrocoloides para encapsular en extracto lipofílico de pulpa y cáscara de mamey disuelto en aceite vegetal en una emulsión alimenticia producida mediante el ultrasonido de potencia.
- Evaluar propiedades reológicas y ópticas selectas de las emulsiones producidas por ultrasonido de potencia al tiempo cero y durante almacenamiento refrigerado en comparación con una emulsión producida por un método control.
- Evaluar al tiempo cero y durante almacenamiento refrigerado el efecto protector del encapsulado sobre carotenoides contenidos en la fase lipofílica de las emulsiones producidas por ultrasonido de potencia en comparación con una emulsión producida por un método control.

HIPÓTESIS

El tratamiento con USP en presencia de hidrocoloides selectos permitirá la formación de una emulsión estable que encapsule extractos ricos en carotenoides provenientes de pulpa y cáscara de mamey, mejorando su estabilidad durante el almacenamiento en comparación con una técnica emulsificante control.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1 Plan de trabajo

Etapa 1: En esta etapa se determinó el tiempo de sonicación con el que se trabajaría el resto del proyecto, para ello se prepararon 4 muestras centroide, las cuales se sometieron a diferentes tiempos de sonicación y, para evaluar el efecto del tratamiento del ultrasonido de potencia y su influencia en la modificación del hidrocoloide y la proteína, se midió la estabilidad de la emulsión por turbidimetría, tamaño de partícula y potencial Z. De acuerdo con los resultados y análisis experimental correspondiente se definió el tiempo de proceso óptimo.

Etapa 2: Se realizaron todas las formulaciones descritas en el diseño de mezclas para emulsiones, estas se trataron con el tiempo de sonicación ya antes definido y se monitorearon los mismos parámetros de la etapa 1 para determinar la estabilidad. Se analizaron los datos obtenidos para encontrar las muestras más estables y seleccionar las formulaciones optimas.

Etapa 3: Se determinó la conservación de la actividad antioxidante de los extractos de bioactivos selectos del mamey incorporados en las emulsiones preparadas de acuerdo con las formulaciones optimas con y sin tratamiento ultrasónico para establecer si el tratamiento causaba algún daño o modificación a la estabilidad de los bioactivos.

2.2 Materiales

El extracto lipofílico purificado rico en carotenoides obtenido de la pulpa del mamey es proporcionado por la Dra. Ana Ortega Regules, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de las Américas Puebla. Como encapsulantes o formadores de la capa protectora del bioactivo antes mencionado se emplea; el almidón modificado Hi-Cap (Ingredion México S.A. de C.V.) el cual es un derivado del maíz ceroso (*waxy*) compuesto de 100% amilopectina, que muestra excelentes propiedades de estabilización de la emulsión y capacidad de formación de película; este producto a menudo se utiliza como ingrediente en galletas, bebidas y mezclas de especias, es de baja viscosidad y fue diseñado para la encapsulación de sabores, vitaminas y especias. Adicionalmente se empleó proteína concentrada de suero de leche Lacprodan 80 (WPC-80) (Arla Foods; Viby, Dinamarca); este producto se genera por ultrafiltración y diafiltración de suero dulce de quesería, cuyo retenido es posteriormente secado por aspersion; la composición del WPC se describe en la Tabla 9.

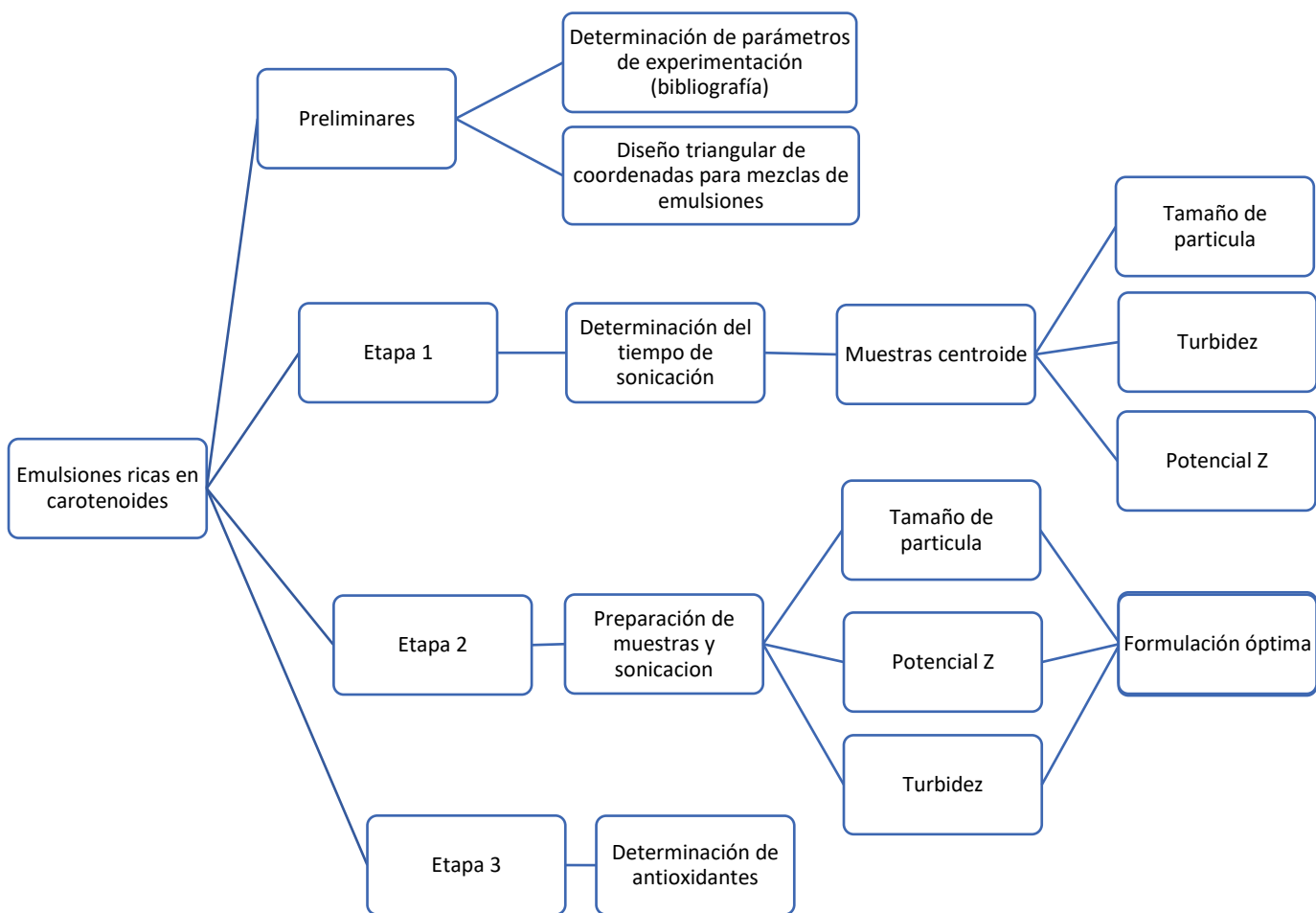


Figura 5. Diagrama del plan de trabajo.

El medio de dispersión fue aceite puro de maíz de marca Mazola (Unilever, México); este producto contiene 0.01% de TBHQ como antioxidante y fue adquirido en un supermercado local. Los valores nutricionales reportados son 100 g grasa (con 10.7 g de ácidos grasos saturados), 0 g azúcares y 0.0051 g sal por 100g de muestra.

Tabla 9. Composición química de WPC Lacprodan 80.

Composición	Proteína (Nx6.38) as is	Proteína (Nx6.38) d.m	Lactosa	Grasa	Ceniza	Humedad
%	76-80	80.84	Máx. 9	Máx. 10-5	Máx. 3.5	Máx. 6

2.3 Métodos

2.3.1 Preparación de emulsiones

Se preparó una emulsión aceite en agua estabilizada por mezclas selectas de los hidrocoloides antes descritos. La fase acuosa de la emulsión contenía el almidón modificado (HI-CAP) y WPC-80 en una relación 1:1. La proporción de adición de la mezcla de estabilizantes, el agua destilada y el aceite de maíz se determinó de acuerdo con el diseño de mezclas descrito en la sección 2.4. La concentración máxima de la fase oleosa tomó como valor de referencia el propuesto por Smith y Dairiki (1975), quienes prepararon emulsiones con contenido máximo de aceite vegetal de 25% del total del sistema. Hasta la segunda etapa (en la etapa donde se emplea la formulación óptima) se le adicionaron 2 mL de bioactivo proveniente del extracto de cascara y pulpa de mamey a la fase oleosa.

2.3.1.1 Preparación de pre-emulsiones

Los componentes de la fase acuosa se hidrataron con agua destilada un día antes de la formación de las emulsiones y se almacenaron a 4°C, esto para garantizar la saturación completa de las partículas y para mejorar las propiedades emulsionantes de las proteínas (McClements, 2005). Tras 24 h de almacenamiento refrigerado se prepararon las emulsiones gruesas con ayuda de una mezcladora de inmersión KitchenAid modelo KHBC212ER (Greenville, Ohio, Estados Unidos), homogeneizando por 1 min a 11000 rpm mientras se adicionaba lentamente la fase lipídica seguida de una homogenización por 2 min. a 18000 rpm; posterior a este proceso se dejó reposar por 5 h en refrigeración (4°C) para eliminar cualquier presencia de espuma.



Figura 6. Mezcladora de inmersión KitchenAid

2.3.1.2 Tratamiento ultrasónico

Para incrementar su estabilidad coloidal, las muestras se procesaron en un ultrasonificador de sonda HIELSHER UP400S (Teltow, Alemania) como el mostrado en la Figura 7; de cada tipo de emulsión se hizo un duplicado. El sonicador empleado tiene una potencia de salida de 400 W y opera a una frecuencia fija de 24 kHz y la amplitud (como una medida del grado de potencia) es ajustable de 20 a 100 %, transmitiendo las ondas ultrasónicas a través de una sonda de titanio de 22 mm de diámetro. Las principales aplicaciones de este tipo de equipo incluyen homogeneización, desaglomeración, lisis

y desintegración celular, extracción de proteínas y emulsificación de líquidos. Las condiciones experimentales se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros experimentales estudiados y niveles empleados.

Parámetros estudiados	Niveles
Fase continua de emulsión	Hi-Cap y WPC 1:1 + agua destilada
Tiempo de sonicación (s) para centroides	0, 60, 120, 180, 240
Tiempo óptimo (s)	180
USP	Ciclo = 1 Volumen = 170 mL Inmersión de sonda = 2.5 cm

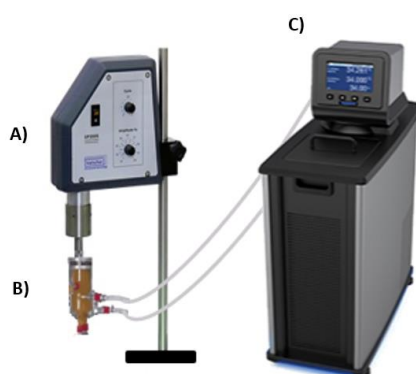


Figura 7. Distribución de equipos para el proceso de homogeneización por ultrasonido de potencia. A) Procesador ultrasónico, B) reactor enchaquetado y C) baño recirculador (Díaz González, 2018)

Para cada tratamiento se colocaron 170 mL de la respectiva preemulsión en un reactor enchaquetado de 500 mL, con un termopar a un costado del reactor para determinar el aumento de la temperatura durante la sonicación. La temperatura del sistema se ajustó a 10°C con ayuda de un baño de circulación con controlador digital de temperatura Polyscience AD07R-20 (Illinois, E.U.A.).

La potencia ultrasónica efectiva de los tratamientos fue calculada a partir de un método calorimétrico (Hussam *et al.*, 2012). El método calorimétrico involucra cualquier experimento tendente a evaluar la cantidad de calor transferido en un proceso. Para realizar la determinación, se registró la temperatura inicial y final de la emulsión correspondiente a la formulación centroide con la aplicación del ultrasonido durante 3 min. La potencia efectiva del tratamiento fue calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$P_n = mn c_p (dT/dt) \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

P_n = potencia efectiva determinada para el tratamiento n en W

m_n = masa utilizada en el tratamiento n en kg

cp = calor específico para la muestra n en J/(kg °C)

El calor específico de la muestra se calculó a partir de la composición del tratamiento centroide y la ecuación de Choi y Okos (Singh & Heldman, 2009):

$$cp = \sum cpiXi \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

C_{pi} = calor específico para el componente i

X_i = fracción peso del componente i

Los calores específicos para los componentes de la emulsión se determinaron con las Ecuaciones 3 a 6 (Singh & Heldman, 2009) utilizando la temperatura promedio (T) registrada en el tratamiento:

$$\text{Proteína} \quad cp = 2.0082 + 1.2089 \times 10^{-3}T - 1.3129 \times 10^{-6}T^2 \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\text{Grasa} \quad cp = 1.9842 + 1.4733 \times 10^{-3}T - 4.8008 \times 10^{-6}T^2 \quad (\text{Ec. 4})$$

$$\text{Agua} \quad cp = 4.1762 - 9.0864 \times 10^{-5}T + 5.4731 \times 10^{-6}T^2 \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\text{Carbohidratos} \quad cp = 1.5488 + 1.9625 \times 10^{-3}T - 5.9399 \times 10^{-6}T^2 \quad (\text{Ec. 6})$$

La densidad para los componentes de la emulsión se determinó mediante las Ecuaciones 7-9 (Singh & Heldman, 2009):

$$\text{Proteína} \quad \rho = 1.3299 \times 10^3 - 5.1840 \times 10^{-1}T \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\text{Grasa} \quad \rho = 9.2559 \times 10^2 - 4.1757 \times 10^{-1}T \quad (\text{Ec. 8})$$

$$\text{Agua} \quad \rho = 9.9718 \times 10^2 + 3.1439 \times 10^{-3}T - 3.7574 \times 10^{-3}T^2 \quad (\text{Ec. 9})$$

$$\text{Carbohidratos} \quad \rho = 1.5991 \times 10^3 - 3.1046 \times 10^{-1}T \quad (\text{Ec. 10})$$

2.3.2 Determinación del tiempo de sonicación

Para definir el tiempo de sonicación se elaboraron emulsiones con las proporciones de componentes indicadas en el centroide del diseño experimental de mezclas descrito en la sección 2.3.3 y que se muestran en la Tabla 11; éstas se sometieron a tratamiento ultrasónico por 1, 2, 3, o 4 min, comparando con una muestra control (0 min de proceso, equivalente a la pre-emulsión), con la finalidad de encontrar los valores donde se maximizaba la estabilidad de la emulsión, medida a través de valores de potencial z y turbidez.

Los tiempos de proceso ultrasónico se definieron en el rango de 0-4 min de acuerdo con resultados previos obtenidos por Armenta-Ortega (2015) debido a que tiempos superiores a 4 min generaban una gelificación espontánea del sistema por coagulación de las proteínas de suero.

Tabla 11. Mezcla de componentes para definir el tiempo de sonicación de la emulsión O/W (%).

Hi-Cap + WPC (1:1)	Agua	Aceite
17.42	69.69	12.87

2.3.3 Implementación del diseño experimental de mezclas

Para establecer la composición de las mezclas de las emulsiones se generó un diseño triangular de mezclas donde se consideró que cada uno de los tres componentes tiene una restricción (valores máximos y mínimos), definida por referencias previas, las cuales se describen al inicio de la sección de resultados y que conducen a delimitar una subárea en el área triangular original (ver Figura 8). En la Tabla 12 se establecen las composiciones de las emulsiones preparadas con base en tres fracciones: agua, aceite y estabilizante (mezcla 1:1 de WPC:AM). Como puede observarse, las fracciones de aceite, agua y mezclas de estabilizantes estuvieron en los rangos de 0.125 a 0.227, 0.625 a 0.773 y de 0.091 a 0.167, respectivamente. Cada punto corresponde a una posición del romboide explorado (Figura 8): el centroide, los vértices, la mitad de cada uno de los cuatro lados y la mitad de la distancia entre el centroide y los vértices (ver Tabla 12)

El modelo empleado fue un cúbico (Cornell, 2002), definido en la Ecuación 11:

$$y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (\text{Ec. 11})$$

El modelo consta de 7 términos; los primeros tres representan el modelo lineal, el cual sólo es válido en la ausencia de efectos de interacción de los componentes de la emulsión. Los tres siguientes términos representan efectos sinérgicos o antagónicos de las interacciones binarias para todos los

pares posibles de los componentes de la fórmula y el último término representa la interacción ternaria de los mismos. Estos términos posibilitan obtener información más clara acerca de los efectos presentes en las mezclas.

Tabla 12. Diseño para mezclas de emulsiones O/W

Tratamiento	MUESTRA	X _A	X _B	X _C
1	Vértice superior derecho (VSD)	0.125	0.708	0.167
2	Vértice superior izquierdo (VSI)	0.208	0.625	0.167
3	Vértice inferior derecho (VID)	0.136	0.773	0.091
4	Vértice inferior izquierdo (VII)	0.227	0.682	0.091
5	Centroide (C)	0.174	0.697	0.129
6	Medio lado superior (MLS)	0.167	0.667	0.167
7	Medio lado derecho (MLD)	0.131	0.741	0.129
8	Medio lado izquierdo (MLZ)	0.218	0.653	0.129
9	Medio lado inferior (MLI)	0.182	0.727	0.091
10	Vértice a centroide superior derecho	0.150	0.703	0.148
11	Vértice a centroide superior izquierdo	0.191	0.661	0.148
12	Vértice a centroide inferior derecho	0.155	0.735	0.110
13	Vértice a centroide inferior izquierdo	0.201	0.689	0.110

X_A: Fracción másica de aceite

X_B: Fracción másica de agua

X_C: Fracción másica de mezcla 1:1 de estabilizantes (WPC:AM)

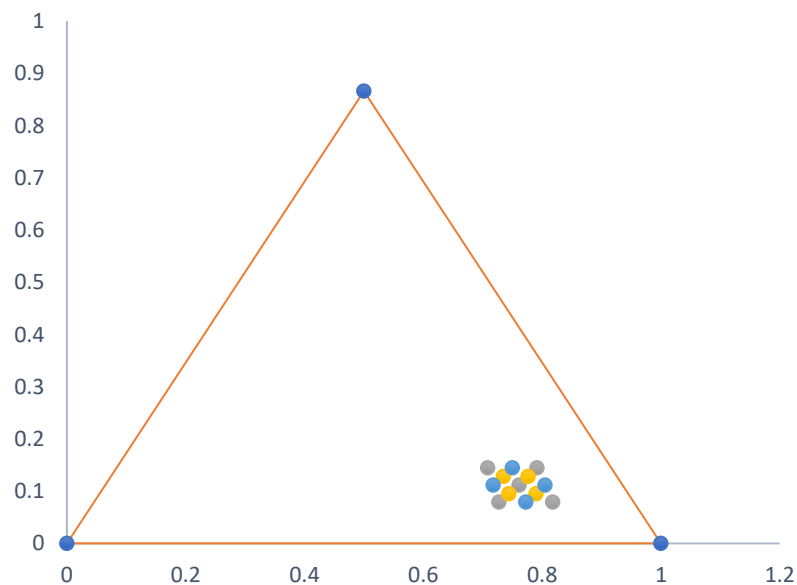


Figura 8. Representación gráfica del diseño de mezclas aceite: agua: estabilizantes implementado

2.3.4 Caracterización de estabilidad de emulsiones

2.3.4.1 Turbidez

La turbidez de las muestras se midió con un turbidímetro (HACH 2100N, Loveland, CO., EE. UU.), los resultados de las mediciones se expresaron en unidades nefelométricas (NTU). Una vez que se enciende el turbidímetro el tiempo de estabilización para que el instrumento esté listo para usarse es de 30 min, posteriormente se calibro el instrumento utilizando una serie de estándares de turbidez con valores NTU <0.1, 20, 200, 1000 y 4000; la calibración se llevó a cabo empezando con el estándar de valor NTU más bajo continuando en orden ascendente.

Según lo indica el manual del fabricante el método nefelométrico de medición de turbidez depende de la dispersión de la luz de las partículas en suspensión. Si la turbidez es muy elevada, gran cantidad de luz puede ser absorbida por las partículas, con lo que quedará poca para la dispersión. Esto ocasionaría una interferencia negativa que haría que la turbidez medida fuera inferior a la real, por esta razón se hicieron diluciones 1:200 de todas las muestras y se dejaron reposar por 30 min a fin de eliminar las burbujas de aire en la muestra (Linke & Drusch, 2016). La temperatura de las emulsiones antes de la medición se fijó a 25 °C (Polychniatou & Tzia, 2014). Se procedió a la medición de la muestra a analizar, colocando dentro de la cubeta de vidrio perfectamente limpia 30 ml de la emulsión, llenando hasta la línea marcada en la cubeta, procurando manejar la celda por la parte superior para evitar manchar la superficie.



Figura 9. Turbidímetro HACH 2100N.

2.3.4.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El tamaño de partícula se determinó por difracción de rayo láser, utilizando un equipo de dispersión dinámica de la luz (Nanotracs Wave II; Microtrac, Pennsylvania, EUA) mediante el software Microtrac Flex 11, instrumento de la Universidad de las Américas Puebla. Las muestras se diluyeron, adicionando una gota de la emulsión y el resto de la celda con agua destilada. Las lecturas se realizaron empleando el módulo de distribuciones de intensidad, y el índice de refracción utilizado fue 1.54; las mediciones se obtuvieron a partir de dos corridas de 30 s.

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés dynamic light scattering), proporciona una nueva forma de explorar los alimentos desde una perspectiva microscópica, las aplicaciones más usuales del DLS son las mediciones de tamaño y distribución de tamaños de las gotas de una emulsión y moléculas dispersas o disueltas en un líquido como proteínas, polímeros, micelas, carbohidratos, nanopartículas y dispersiones coloidales (Rao et al., 2019). Estas partículas tienen índices de refracción diferentes del medio en el que se dispersan y, por lo tanto, dispersan la luz. En los experimentos de dispersión de luz, se explora este efecto para investigar la estructura, el tamaño, la disposición y la dinámica de la materia.

El potencial Z es un parámetro analizado por el DLS, es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas, afecta la estabilidad, siendo este, cada vez mayor conforme aumenta el valor del potencial Z. Su medición aporta información detallada de las causas de la dispersión, agregación o floculación, y se puede aplicar para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones, sin embargo, este dato puede ser muy sensible incluso a pequeños cambios en la muestra como por la presencia de una pequeña proporción de agregados (Kosegarten & Jiménez, 2012). Se ha informado que el potencial Z de los encapsulados depende del pH, la concentración de electrolitos y tensioactivos. Esto prueba que el potencial zeta es un parámetro útil para la investigación de los cambios que ocurren en el material de encapsulación durante el envejecimiento.

El potencial electro-cinético representa el centro de gravedad de la distribución, es un tipo de tamaño de partícula promedio o tendencia central. En una suspensión con encapsulados puede caracterizarse por su potencial zeta. Es una medida de la magnitud de las fuerzas de repulsión o atracción entre los encapsulados, que tiene una unidad de MV. El valor puede estar relacionado con la estabilidad de almacenamiento de los encapsulados en suspensión. En general, un sistema de partículas con potencial zeta mayor o igual que 35 mV tiende a ser estable (Legrand *et al.*, 1999).

En cuanto a las medidas de diámetro de partículas, MI es el diámetro medio de la distribución de intensidad, MW es el peso molecular (un cálculo para proporcionar peso molecular expresado en g / mol), MN, diámetro medio en micras, se calcula utilizando el volumen de distribución y se pondera a las partículas más pequeñas en la distribución y MA, diámetro medio de la distribución de área se calcula a partir del volumen. Por su parte, el índice de polidispersidad es un parámetro obtenido de manera simultánea con el tamaño de partícula. Este índice provee información sobre la muestra: valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa así como valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños.

Los resultados de la dispersión dinámica de luz (DLS) a menudo se expresan en términos del tamaño promedio Z, este es el parámetro más estable producido por la técnica. El promedio Z surge

cuando los datos DLS se analizan mediante el uso de la técnica de acumulativos. Dado que el cálculo del promedio Z es matemáticamente estable, el resultado puede ser sensible a pequeños cambios en la muestra e incluso con la presencia de una pequeña proporción de agregados.

El tamaño promedio Z aumenta a medida que aumenta el tamaño de partícula. Por lo tanto, proporciona una medida confiable del tamaño promedio de una distribución de tamaño de partícula. Además, se mide fácilmente. Por estas razones, el tamaño promedio Z se ha convertido en la norma aceptada para presentar resultados de dimensionamiento de partículas por DLS. Además, los percentiles muestran las distribuciones de tamaño de partícula ponderada por volumen, el D50 representa un tipo de tamaño de partícula promedio. Finalmente, los valores de *sk* con el sesgo gráfico inclusivo, la medida de cuán asimétrica es una curva y cómo varía de una curva normal en forma de campana. *sk* incluye el 90% de la distribución e incluye las "colas" de la distribución. Una curva simétrica tiene un valor de *sk* de 0.00. Los valores de -0.30 a -1.00 muestran que las partículas gruesas influyen en la inclinación.



Figura 10. Nanotrac Wave II; Microtrac.

2.3.5. Determinación de actividad antioxidante.

Con una o dos formulaciones optimizadas que maximizaran la estabilidad de la emulsión se prepararon nuevos sistemas emulsivos conteniendo los agentes bioactivos descritos en la sección 2.2; la estabilidad de los bioactivos se analizó mediante pruebas de actividad antioxidante empleando el radical DPPH. El ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es una prueba eficaz y sencilla para evaluar la actividad antioxidante; ésta se basa en la disminución de color por acción de un compuesto antioxidante; para ello, se utiliza un espectrofotómetro UV-Visible midiendo a 517 nm; este ensayo se fundamenta en la captación de radicales libres, es decir, donantes de hidrógeno o electrones, de tal manera que la intensidad de absorción se reduce y la solución de color morado oscuro se decolora a amarillo. Todas las reacciones se iniciaron mediante la adición de 1 ml de muestra a 1 ml de la solución de DPPH, obteniendo un volumen final de 2 ml. Para los blancos se adicionó 1 ml de dicha muestra a 1 ml de etanol. Las reacciones se midieron en un espectrofotómetro UV visible (Spectronic 20 Genesys,

E.U.A) a 517 nm tras 30 min de reacción en oscuridad a 26 °C. Los resultados se expresaron como miligramos de Trolox por 100 mL de emulsión.

Los resultados se compararon con controles los cuales eran las pre-emulsiones y con los extractos puros.

2.3.6 Análisis de datos

Se estableció el modelo experimental cúbico especial planteado en la Ec. 11 para la evaluación de los datos obtenidos en las variables dependientes antes descritas; todos los experimentos se realizaron por duplicado y las mediciones de las pruebas por triplicado. Los parámetros de la ecuación 11, se evaluaron mediante regresión lineal ordinaria, basada en la minimización de la suma de cuadrados del error mediante el software Matlab R2012a. La significancia de los parámetros se evaluó con sus intervalos de confianza al 95%; la calidad de ajuste del modelo se evaluó con el coeficiente de determinación generalizado (R^2). A través de este análisis se obtuvo una formulación óptima.

Una vez obtenidos los modelos empleados para cada parámetro evaluado, se analizaron las posibles diferencias significativas entre las distintas formulaciones a través de análisis de varianza de una sola vía, para después hacer una comparación entre medias de Tukey, con un nivel de significancia de $p=0.05$ empleando un software estadístico apropiado (Minitab 14.0). Finalmente, se graficaron los datos experimentales contra los datos predichos por el modelo para visualizar la calidad del ajuste.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Redefinición del espacio experimental del diseño de mezclas

Se tuvo que hacer una redefinición del número de experimentos contemplados en el espacio experimental proporcionado en el diseño de mezclas de emulsiones O/W mostrado en la Tabla 12. El tiempo requerido para realizar los análisis de tamaño de partícula resultó ser excesivamente largo por las limitantes del equipo de DLS empleado; el modelo de Nanotrak utilizado (Wave II) no cuenta con una celda de medición removible, por lo que el proceso de limpieza entre muestras (que involucra lavados continuos con agua destilada e isopropanol y de requerirse, un tallado suave con cepillos especiales) tiene que hacerse en el mismo equipo y prolongarse hasta que el sensor óptico establezca que la lectura siguiente tenga el mínimo de interferencia; las mediciones entonces se prolongaban hasta más de 10 horas por día. Por ello, debido a la complejidad para la determinación de las distribuciones de tamaño por dispersión dinámica de luz se optó por intentar reducir el número de experimentos a realizar; con esto en mente, y tras realizar verificar que la fortaleza estadística del modelo no se vería afectada significativamente (datos no mostrados), se eliminaron los experimentos correspondientes a las muestras *de vértice a centroide* del diseño experimental (correspondientes a los tratamientos 10 a 13 en la Tabla 12). En la Tabla 13 se muestran las mezclas finales tratadas, las cuales provienen del diseño experimental de mezclas descrito anteriormente.

Tabla 13. Mezclas para emulsiones (%).

No. Prueba	Hi-Cap + WPC (1:1)	Agua	Aceite	Razón Aceite: emulsificante
1	16.66	70.83	12.5	0.75
2	16.66	62.5	20.83	1.25
3	9.09	77.27	13.63	1.5
4	9.09	68.18	22.72	2.5
5	12.87	69.69	17.42	1.35294118
6	16.66	66.66	16.66	1
7	12.87	74.05	13.06	1.01470588
8	12.87	65.34	21.78	1.69117647
9	9.09	72.72	18.18	2

3.2 Determinación del tiempo de sonicación

Para delimitar el tiempo de sonicación a emplearse y reducir el número de pruebas totales que debían realizarse, se elaboraron emulsiones con la formulación indicada en el centroide del diseño experimental antes descrito y se realizaron tratamientos ultrasónicos por 1,2,3 y 4 min, como se describe en la sección previa. Las variables de respuesta analizadas (potencial Z, turbidez, pH y diámetro promedio) se muestran en las Tablas 14-17 y se discute al respecto en los apartados siguientes. Los análisis estadísticos completos (ANOVAS) de las variables de respuesta mencionadas se presentan en el Anexo A.

3.2.1 Potencial Z de centroide

El potencial Z permite expresar mediante un parámetro numérico la repulsión o atracción electrostática entre las partículas de sistemas dispersos y es un parámetro esencial para establecer la estabilidad de sistemas coloidales y suspensiones; en particular para el sistema disperso con el que se trabajó en este proyecto, el potencial Z brinda información esencial para la correcta formulación de emulsiones (Legrand *et al.*, 1999). Los valores de potencial Z de las emulsiones elaboradas de acuerdo con la formulación del centroide del diseño experimental se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Potencial Z de la emulsión correspondiente al centroide a diferentes tiempos de sonicación

Tiempo de sonicación (min)	Potencial Z (mV)*
0	-5.55 ±0.78 ^A
1	-6.25 ±0.21 ^A
2	-6.3±0.42 ^A
3	-25.25 ±1.63 ^B
4	-20.10 ±6.22 ^B

* Valores promedio ± desviación estándar (n=2).

^{ab} Medias con letras diferentes en la misma columna presentan diferencia significativa (Tukey = 0.05)

El potencial Z es la carga general adquirida por partículas en un medio específico y refleja las diferencias en potencial entre la fase dispersa y el medio estacionario que rodea a estas partículas. Si todas las partículas (gotas) tienen un potencial Z grande, ya sea positivo o negativo, ellas se repelerán entre sí y el sistema se considera estable; mientras más grande el potencial Z, mayor es la estabilidad del sistema (Ramírez *et al.*, 2018).

En la Tabla 14 se observa que todas las emulsiones preparadas presentan un potencial Z de leve a moderadamente aniónico; se sabe que las emulsiones O/W con potenciales Z positivos o levemente negativos no son estables (Moreira de Morais *et al.*, 2006) El tratamiento ultrasónico no provocó cambios significativos con relación al valor del potencial Z del control (0 min) tras 1 y 2 min de proceso ultrasónico; sin embargo, este parámetro aumentó significativamente ($p < 0.05$) desde -5.55 ± 0.78 mV para la muestra control (sin sonicación) hasta -25.25 ± 1.63 mV para la muestra con 3 min de ultrasonificación; por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre este último tratamiento y el proceso ultrasónico a 4 min, en el cual se pudo observar una disminución no significativa en la magnitud del potencial Z que sugiere un posible efecto del tratamiento sobre la estructura e interacción de los componentes estabilizantes que, al prolongarse el tiempo de tratamiento pudieran ocasionar un incremento en la tendencia de floculación de las gotas de aceite. El comportamiento observado supone un cambio sustancial en el comportamiento de estabilidad de emulsiones estabilizadas por WPC:AM y sometidas a US, dado que un aumento en la magnitud de esta variable supone una tendencia reducida a flocular de las gotas de aceite. El potencial Z para la mayoría de las emulsiones O/W experimentales, incluyendo aquellas que emplean WPC como emulsificante/estabilizante, presenta un comportamiento marcadamente aniónico; así, Loi *et al.* (2019) reportan valores de potencial Z de -38.1 para emulsiones O/W estabilizadas con WPC; los concentrados y aislados séricos poseen propiedades anfifílicas que reducen la tensión en la interfaz aceite-agua, produciendo una película que recubre las gotas de aceite evitando su agregación. Por su parte, Silva *et al.* (2015), quienes trabajaron con emulsiones de aceite de semilla de achiote estabilizadas con biopolímeros y mediante tratamiento ultrasónico (19 KHz, 320 W, 2 min), reportaron un valor del potencial z para WPI de -20.2 ± 0.5 mV y de -8.0 ± 0.5 mV para Hi-Cap, ambos valores en el rango de magnitud de potencial Z reportado. En otra publicación del mismo grupo de investigación, Silva *et al.* (2014) reportan un valor del potencial zeta de -12.4 ± 0.5 mV para microencapsulados de aceite de café verde con una mezcla 1:1 de almidón OSA (Hi-Cap): maltodextrina estabilizada por otra tecnología emergente que genera cavitación (homogeneización a alta presión); nuevamente se observa que el AM exhibe una menor magnitud de Z en comparación con las emulsiones estabilizadas únicamente por proteínas séricas. De acuerdo con estos autores, la repulsión estérica es el mecanismo estabilizador dominante de los AM en sistemas emulsivos, haciéndolos más resistentes a los cambios de pH, fuerza iónica y temperatura; el tipo particular de modificación química que sufre el Hi-Cap (adición de un componente lipofílico como el anhídrido succínico) le permite adsorberse en la interfaz aceite-agua.

De acuerdo con Garti y Aserin (1999) está bien documentado que las interacciones tanto débiles como fuertes entre macromoléculas, incluyendo aquellas entre proteínas y polisacáridos,

pueden mejorar de manera sinérgica las capacidades emulsificantes de los polímeros individuales. Esto no fue observado en esta etapa del proyecto (los valores de la emulsión control son levemente negativos, con una posible baja estabilidad durante el almacenamiento); sin embargo, la aplicación de tratamientos selectos de US (en específico, el de 3 min) incrementó significativamente la capacidad estabilizante de la mezcla WPC:AM empleada; de manera similar, Albano *et al.* (2018) estudiaron el impacto del ultrasonido en la estabilización de emulsiones O/W formados con dispersiones WPC o WPI:pectina con aceite de soya y reportaron un incremento en la electronegatividad de las proteínas séricas al aplicar un tratamiento ultrasónico (20 KHz, 120W, 1 min, sonotrodo con 1 cm de inmersión); a pH 7, el WPC sin sonicar exhibió un potencial Z de -23.18mV y aumentó significativamente su magnitud a -33.34 mV tras aplicar el US.

Es importante mencionar que se realizaron mediciones de pH de las emulsiones, presentando un valor promedio de 5.75 ± 0.05 para todas las muestras; este valor se encuentra fuera del rango no apropiado de pH para proteínas séricas desnaturalizadas (pH=5); asimismo, este valor se encuentra dentro del rango de pH sugerido (5 a 7) por Zhou *et al* (2013) quienes reportan que favorece los efectos antioxidantes de compuestos bioactivos alimentarios como los polifenoles.

3.2.2 Diámetros promedio, área de partícula y medidas de dispersión de centroide

En la técnica de DLS para determinación de tamaño de partícula pueden emplearse distintos parámetros de diámetro promedio para describir el efecto de un proceso sobre las características de estabilidad de la emulsión. De acuerdo con Plantz (2016), el equipo DLS empleado en este proyecto genera una serie de mediciones directas y ponderadas que permiten caracterizar de una manera eficiente al sistema disperso, tomando en cuenta posibles contribuciones de partículas muy grandes, muy pequeñas o ponderaciones del diámetro. Cada valor de diámetro promedio proporciona información específica de la emulsión, pero no todas son apropiadas para describir al sistema disperso en todos los casos. Así, por ejemplo, Mz toma en cuenta partículas de tamaño pequeño y grande para realizar los cálculos de diámetro, Mv representa el centro de gravedad de la distribución y su valor se ve mucho más influenciado por la presencia de partículas grandes, mientras que MN se calcula ponderando el valor para tomar en cuenta partículas de menor tamaño. Por su parte, MA, que se calcula a partir de MV, representa una medida de diámetro menos afectada que esta última por la presencia de partículas pequeñas. En el presente trabajo se tomó en cuenta el tamaño medio ponderado de las gotas Mv, Mn, Ma y Mz, variables sensibles a la presencia de partículas pequeñas o grandes según sea el caso, para caracterizar la estabilidad de la emulsión centroide con respecto al tiempo de tratamiento ultrasónico. En la Tabla 15 se presentan las medias de diámetros promedio de la emulsión preparada de acuerdo con la formulación del centroide del diseño de mezclas propuesto.

Tabla 15. Valores de diámetro promedio (formulación centroide) a diferentes tiempos de sonicación

Muestra	Mz (nm)	M _v (nm)	M _N (nm)	M _A (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)
0	4071.33±503.11 ^A	3681.0±1002.5 ^A	549.8±149.4 ^{AB}	2222.8±765.3 ^A	2294±2301 ^{AB}	2911 ± 2438 ^{AB}
1	3771.33±151.84 ^A	3366.8±755.7 ^A	694.8±289.5 ^A	2037.3±572.6 ^{AB}	3782±1097 ^A	5113 ± 1001 ^A
2	1681±258.25 ^B	1940.8±508.2 ^B	483.4±250.4 ^{AB}	1134.3±499.7 ^{BC}	1587±937 ^{AB}	3743 ± 402 ^{AB}
3	734.76±59.96 ^B	811.8±112.6 ^B	210.8±32.5 ^B	495.3±48.1 ^C	552±84 ^B	1561 ± 448 ^B
4	794.43±55.32 ^B	937.0±181.7 ^B	237.4±51.7 ^B	481.5±50.2 ^C	597±153 ^B	2429 ± 1308 ^{AB}

* Valores promedio ± desviación estándar (n=4).

^{ab} Medias con letras diferentes en la misma columna presentan diferencia significativa (Tukey = 0.05)

Como puede observarse en la Tabla 15, todas las mediciones de diámetro presentan diferencias durante el tiempo de proceso ultrasónico, pero no todas se comportan de acuerdo con lo esperado. El tamaño de partícula y su distribución en una emulsión depende en gran parte del tipo de homogeneización aplicada y del tiempo de tratamiento; generalmente, al incrementarse la duración del proceso se obtiene una mayor disminución en el tamaño de partícula, lo cual se atribuye a la cavitación, a las microcorrientes y a la turbulencia generada por el ultrasonido (Yanjun *et al.*, 2014). Así, Qamar *et al.* (2019) exploraron la estabilidad y propiedades funcionales de emulsiones preparadas con concentrado de proteína de chícharo empleando dos métodos diferentes de homogeneización: microfluidización (500 Bar) y ultrasonido (20 kHz, 300 W y 100% amplitud) por 1, 3 y 5 min; los autores reportan una disminución en el tamaño de partícula a medida que se incrementó el tiempo de tratamiento ultrasónico de 1 a 5 min mientras que las muestras control (sin tratamiento ultrasónico) tenían un tamaño de partícula significativamente mayor en comparación con las emulsiones elaboradas con esta técnica. Las emulsiones preparadas usando 0.5 y 1.0% de proteína de chícharo y ultrasonificadas por 5 min mostraron un tamaño de partícula (D_{4,3}, media ponderada por volumen) de 0.96 y 1.53 μm respectivamente. Cabe destacar que la comparación con otras referencias en términos de la magnitud de reducción del tamaño de partícula puede ser complicada, dado que no todos los equipos de DLS expresan sus resultados en el mismo tipo de parámetros. De manera similar, Xiong *et al* (2019) investigaron los efectos del ultrasonido de sonda (20 kHz, 150-600 W) en las propiedades de emulsiones estabilizadas con proteína aislada de pescado y goma xantana, reportando que, en comparación con la emulsión no tratada, las emulsiones ultrasonificadas demostraban una mejor estabilidad, con un tamaño de partícula más pequeño expresado como D₄₃ y D₃₂ (media ponderada de superficie o diámetro medio de Sauter). Estos diámetros promedio fueron significativamente menores ($p < 0.05$) en comparación con la emulsión no tratada; así, D₄₃ disminuyó de 18.4 μm a 12.0 μm, y el valor D₃₂ disminuyó de 10.4 μm a 6.5 μm, lo que muestra la eficiencia de la sonicación como técnica de reducción de tamaño de la fase dispersa en una emulsión O/W.

En la tabla previa puede observarse que todos los diámetros promedio M_z , M_A , M_V y M_N tuvieron el mismo comportamiento, el cual correspondía con el esperado: una disminución progresiva (no significativa en todos los casos al comparar cada tiempo con su inmediato precedente) conforme se incrementaba el tiempo de sonicación de 1 a 3 min, hasta que se observó un pequeño incremento no significativo a los 4 min de proceso (con excepción de M_A , que presentó una disminución no significativa). Por otra parte, D_{50} y D_{90} tuvieron comportamientos muy diferentes y probaron no ser variables de seguimiento apropiadas; respectivamente estos diámetros corresponden a magnitudes de tamaño que indican, respectivamente, que el 50% y el 90% de la muestra se encuentran por debajo de este valor. Como puede observarse en la Tabla 15, tanto D_{50} como D_{90} aumentaron y disminuyeron alternativamente su valor a lo largo de todo el proceso ultrasónico. El incremento de tamaño al prolongar el tiempo de proceso ultrasónico en la elaboración de emulsiones fue también observado por Yanjun *et al.* (2014) quienes investigando el impacto del pretratamiento con ultrasonido de potencia sobre las propiedades físicas y funcionales del concentrado de proteína de leche reconstituida encontraron que el USP (12.50 ± 0.31 W, 50 % de amplitud; 0, 0.5, 1, 2 y 5 min de proceso) redujo el tamaño de partícula de la fase dispersa de $28.45 \mu\text{m}$ (tiempo 0) a $0.11 \mu\text{m}$ después de 2 min de sonicación, con un ligero aumento no significativo a los 5 min de tratamiento. Este fenómeno ha sido observado con otras tecnologías disruptivas como la homogeneización a alta presión y se asocia con una posible formación de aglomerados temporales de glóbulos de grasa o porque se puede alcanzar un límite crítico en la intensidad del proceso que genera el tamaño mínimo de partícula en la fase dispersa, a partir del cual el tamaño del glóbulo de grasa puede empezar a incrementarse (Thiebaud *et al.*, 2003). Tomando en cuenta lo anterior, y de acuerdo con los resultados de las medidas de diámetro de partícula que arrojaron resultados consistentes, se estableció que el tiempo de proceso más adecuado para lograr la mayor reducción en el tamaño de partícula y, con ello, una mayor estabilidad teórica de la emulsión (de acuerdo con la ley de Stokes) fue el USP de 3 min. Cabe mencionar que este tiempo de proceso también generó la mayor disminución en el potencial Z, como se mostró en la sección anterior.

3.2.3 Turbidez de emulsión preparada con mezcla de centroide

Esta propiedad es de suma importancia para determinar la apariencia final de una emulsión. La estructura y la composición son factores que afectan la apariencia general de la emulsión generando turbidez (McClements, 2016). Zhang & Reineccius (2016) enumeran los factores que controlan la turbidez de las emulsiones estabilizadas por biopolímeros alimentarios y tensioactivos naturales; estos factores incluyen el tipo de fase lipídica, la composición de la interfase, el tamaño de la partícula dispersa, la concentración de fase dispersa y el índice de refracción de la fase continua.

Por otra parte, la dispersión y absorción de la luz depende del tamaño, la concentración y la distribución espacial de la fase dispersa en una emulsión, por lo que una tecnología disruptiva como la sonicación debe tener un impacto considerable sobre esta propiedad. Los resultados de turbidez de la emulsión elaborada con las proporciones de aceite, agua y estabilizantes indicada en el centroide del diseño experimental se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de turbidez de la muestra centroide a diferentes tiempos de sonicación

Tiempo de sonicación (min)	Turbidez (NTU)
0	1485.3±57.2 ^C
1	2584.5±93.3 ^B
2	3580±203 ^A
3	3765±67.4 ^A
4	3577.8±173.5 ^A

* Valores promedio ± desviación estándar (n=4).

^{abc} Medias con letras diferentes en la misma columna presentan diferencia significativa (Tukey = 0.05)

La turbidez de las emulsiones se incrementó significativamente del tiempo 0 (1485.3 NTU) a los 2 min de sonicación (3580 NTU); a tiempos más largo de proceso ultrasónico, este parámetro no exhibió un cambio significativo, aunque el valor máximo absoluto se obtuvo a los 3 min de proceso, mismo tiempo al cual se obtuvo la mayor reducción en el tamaño promedio de partícula con diferentes parámetros, como pudo observarse en la sección previa. Este comportamiento difiere del esperado; de acuerdo con reportes previos, el comportamiento de la turbidez en función del tamaño de partícula y la concentración de la fase dispersa es variable y multifactorial, pero en términos generales, a menor tamaño de partícula se puede esperar un menor valor de turbidez. Así, Albano *et al.* (2018), al explorar el impacto del ultrasonido en la estabilización de emulsiones O/W de aceite de soja estabilizadas con dispersiones de proteínas de suero (WPC ó WPI) y pectina observaron una disminución en la turbidez proporcional a la sonicación, la cual redujo el tamaño de los complejos formados, generando una mejor homogeneización y, en consecuencia, una solución menos turbia. Por otra parte, Linke & Drusch (2016), observaron un cambio en la turbidez (expresada en NTU) de emulsiones O/W (preparadas en un homogeneizador convencional a 20 MPa) en función de la concentración y tipo de emulsificante, la cual variaba de 0.2 a 2%; estos autores reportan que la turbidez de emulsiones estabilizadas con un extracto de origen natural, WPC y almidón modificado OSA, respectivamente, se incrementaba de 340, 330 y 380 NTU a 3300, 3600 y 4150 NTU al aumentar la concentración de estabilizante de 0.2%, a 2%. Estos resultados los atribuyen a variaciones en la concentración y naturaleza química de los

componentes y a diferencias en sus índices de refracción; mientras que el extracto natural poseía un peso molecular de 1800-2000 Da, tanto WPC como el almidón OSA poseían pesos moleculares mucho más altos (1.6×10^4 - 2.5×10^5 Da y 1.2×10^5 a 2.6×10^5 Da, respectivamente) y esto influía sobre el tamaño de las micelas formadas; para el caso del extracto natural, las micelas medían aproximadamente 15 nm, tamaño que se considera demasiado pequeño para dispersar la luz de manera efectiva, ocasionando valores reducidos de turbidez en la emulsión. Como se mencionó anteriormente, la medición de turbidez es un fenómeno complejo; de acuerdo con Mirhosseini *et al* (2008) la turbidez de una emulsión que contiene partículas muy finas y polidispersas está en función no sólo del tamaño de la partícula y de su concentración, sino también de la distribución de tamaño de la misma; cambios en otras propiedades de partícula no reportadas en esta etapa, tales como la presencia de distribuciones multimodales, puede influir en las mediciones de turbidez observadas.

3.3 Determinación de formulaciones óptimas de emulsiones O/W preparadas por USP

3.3.1 Caracterización por DLS de emulsiones O/W preparadas por ultrasonido de potencia

Se elaboraron todas las formulaciones indicadas en el diseño de mezclas por duplicado, las cuales se sonicaron por 3 min (tiempo establecido con las muestras centroide) con el fin de hallar la fórmula óptima con base en su estabilidad coloidal medida por parámetros ópticos y determinada por el tamaño de partícula y potencial Z. Los datos de los parámetros ópticos evaluados en las emulsiones se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Medidas de diámetros promedio de formulaciones de emulsiones O/W ultrasonificadas preparadas de acuerdo con un diseño de mezclas

Formulación	Diámetro promedio Vol (nm)	Diámetro promedio Número (nm)	Diámetro promedio Área (nm)	Mz (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)
1 (VSD)	1551.1±306.7 ^A	244.1±13.6 ^A	673.3±42.4 ^A	1433.8±485.0 ^{AB}	944.4±33.9 ^A	3291±1359 ^{BC}
2 (VSI)	1313.3±91.9 ^A	245.1±24.6 ^A	572.4±77.3 ^A	1313.6±138.1 ^{AB}	883.6±295.7 ^A	2826±875 ^C
3 (VID)	2134.0±365.2 ^A	193.7±7.6 ^A	513.1±38.4 ^A	2076.8±265.8 ^{AB}	1065.5±465.6 ^A	5335±453 ^{AB}
4 (VII)	2297.0±458.6 ^A	234.7±14.8 ^A	660.4±26.3 ^A	2639.9±538.0 ^A	1256.5±585.8 ^A	5874±391 ^A
5 (C)	2563.4±611.8 ^A	262.0±30.9 ^A	653.5±83.4 ^A	2362.0±238.0 ^{AB}	2132.5±2155.6 ^A	5965±70.7 ^A
6 (MLS)	2058.6±653.5 ^A	265.7±11.3 ^A	649.6±56.0 ^A	1152.9±455.0 ^B	1428.9±808.9 ^A	5884±366 ^A
7 (MLD)	2645.9±241.6 ^A	236.7±23.3 ^A	682.0±180.7 ^A	2141.3±205.0 ^{AB}	1446.6±1150.3 ^A	6075±113 ^A
8 (MLZ)	2356.8±221.3 ^A	223.7±52.2 ^A	631.8±82.0 ^A	2056.3±210.6 ^{AB}	1373.0±1010.1 ^A	5883±125 ^A
9 (MLI)	2584.9±808.40 ^A	230.2±16.2 ^A	655.4±181.6 ^A	2144.0±279.0 ^{AB}	1683.9±1458.6 ^A	6007±137 ^A

* Valores promedio ± desviación estándar (n=4).

^{abc} Medias con letras diferentes en la misma columna presentan diferencia significativa (Tukey = 0.05)

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía para cada una de las diferentes expresiones de diámetro de partícula obtenidos por DLS. Como puede observarse en la tabla anterior,

los valores de diámetro que se reportan no mostraron variación significativa ($p < 0.05$) en su magnitud (ver análisis completo en Anexo B 21-26) entre las diferentes formulaciones con proporciones variables de agua: aceite: mezcla de estabilizantes, a excepción de los parámetros Mz y D90 (diámetro a partir del cual se encuentran el 90% de los tamaños de partícula de la distribución). Los resultados obtenidos llevan a pensar que el efecto del tiempo de tratamiento ultrasónico implementado es de mucho mayor relevancia que aquel proveniente del tipo de formulación. En estas variables significativas pudo observarse que el tamaño más pequeño de partícula se obtuvo para las formulaciones 6 (1152.9 nm) y 2 (2862 nm), para Mz y D90, respectivamente. Un valor de D90 más pequeño nos habla de una menor distribución de tamaño en la muestra, mientras que Mz, que es una medida de tendencia central que toma en cuenta partículas dentro de todo el rango de tamaño de la distribución y, aún en unidades específicas para equipos Microtrac, se le define como media gráfica y nos permite identificar la magnitud de un diámetro promedio tradicional. Para el caso de Mz, la formulación que resultó en un menor tamaño de partícula (6) corresponde a la única de todo el diseño con una razón 1:1 entre aceite y emulsificante.

La selección del tipo de medida de tendencia central más apropiado en el equipo de dispersión de luz dinámica empleado es compleja; de acuerdo con el manual de operación del equipo empleado, el valor de Mz es la medida central más frecuentemente empleada; sin embargo, no todos los reportes la consideran así; por ejemplo, Li y Chiang (2012) quienes realizaron mediciones de tamaño de partícula en emulsiones de D-limoneno estabilizadas por una mezcla de surfactantes y USP emplearon el diámetro promedio de la distribución volumétrica como medida del tamaño promedio de la fase dispersa, reportando valores sensiblemente menores (100-600 nm) en el tamaño de partícula, fenómeno probablemente atribuible al tipo de estabilizantes y a la potencia ultrasónica empleada. El parámetro Mz usualmente presenta una medida de tamaño menos afectada por partículas grandes de lo que se puede obtener con Mv (Plantz, 2013).

En la Tabla 18 se presentan los valores del índice de polidispersión, potencial Z, sesgo (ski) y superficie calculada de las emulsiones sonicadas y preparadas de acuerdo con el diseño de mezclas antes mencionado; es posible observar que las únicas variables evaluadas que exhibieron diferencias significativas entre las distintas formulaciones fueron el índice de polidispersión (PDI) y el sesgo, ambos adimensionales. El PDI es un valor adimensional que oscila entre 0 y 1, donde 1 indica una muestra con una distribución de tamaño muy amplia; estos valores altos denotan emulsiones polidispersas con baja estabilidad y una amplia distribución de tamaños, mientras que los valores bajos de PDI son una indicación de emulsiones monodispersas con alta estabilidad cinética (Raviadaran *et al.*, 2018). los valores más bajos de PDI se observaron con las formulaciones 1 y 2; por otra parte, el centroide (formulación 5) exhibió el valor significativamente ($p < 0.05$) más alto de

polidispersión; adicionalmente, las formulaciones 4, 6 y 9 no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con las formulaciones 1 y 2. Por su parte, todos los valores de sesgo (ski) tienen valores positivos en el rango de 0.33 a 0.85; de acuerdo con Plantz (2013) valores de sesgo cercanos a 0 indican una curva simétrica de distribución, mientras que valores en el rango de +0.3 a +0.1 indican influencia de partículas finas en el sesgo (el cual se orientaría más hacia la izquierda del centro de la distribución si fuese normal), lo cual es el caso con todas las formulaciones mostradas; la formulación con el valor de sesgo significativamente ($p < 0.05$) más pequeño (0.33) fue la 1, la cual no presentó diferencias significativas con aquellos de las formulaciones 2 (0.54) y 6 (0.658); estas tres formulaciones corresponden a aquellas con los valores de razón aceite: emulsificante más bajas; la mayor cantidad de emulsificante por unidad de grasa muy probablemente influyó en estos resultados.

Para el caso del potencial Z, de acuerdo con la discusión del apartado 3.2.1, si todas las partículas tienen un potencial Z grande, ellas se repelerán entre sí y el sistema se considera estable; sin embargo, en este análisis el potencial zeta no muestra diferencias ($P = 0.053$) al nivel de significancia empleado (0.05), probablemente debido a la alta variabilidad en formulaciones selectas; sin embargo, es posible destacar que las medias más bajas de potencial Z se obtuvieron con las formulaciones 1 y 9 (que respectivamente corresponden a aquellas con las razones más baja y más alta de aceite: emulsificante (ver Tabla 13); por su parte, las medias más altas de potencial Z, se presentaron con las formulaciones 7, 5 y 6, destacándose que esta última presentó la menor variabilidad de todas las muestras analizadas ($29.05 \text{ mV} \pm 0.212$).

Tabla 18. Índice de polidispersión, potencial Z, sesgo (ski) y superficie en emulsiones sonicadas

Formulación	Potencial Z (mV)	PDI	Ski	Superficie calculada
1 (VSD)	18.75±2.47 ^A	0.525±0.205 ^C	0.331±0.12 ^B	9.43±0.90 ^A
2 (VSI)	27.025±1.23 ^A	0.505±0.233 ^C	0.544±0.23 ^{AB}	10.72±1.35 ^A
3 (VID)	27.13±7.67 ^A	1.4±0.084 ^{ABC}	0.772±0.06 ^A	12.22±0.40 ^A
4 (VII)	25.225±0.177 ^A	0.765±0.035 ^{BC}	0.817±0.04 ^A	9.22±0.21 ^A
5 (C)	30.78±4.14 ^A	2.105±0.672 ^A	0.769±0.15 ^A	9.77±1.73 ^A
6 (MLS)	29.05±0.212 ^A	1.005±0.106 ^{ABC}	0.658±0.02 ^{AB}	9.84±0.89 ^A
7 (MLD)	31.30±10.25 ^A	1.415±0.361 ^{ABC}	0.851±0.04 ^A	9.23±1.25 ^A
8 (MLZ)	21.10±2.55 ^A	1.73±0.00 ^{AB}	0.792±0.04 ^A	10.03±0.78 ^A
9 (MLI)	13.9±0.636 ^A	1.13±0.07 ^{ABC}	0.820±0.04 ^A	10.16±1.95 ^A

* Valores promedio \pm desviación estándar (n=4).

^{abc} Medias con letras diferentes en la misma columna presentan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$)

En la Figura 11 se muestran distribuciones de tamaño típicas para las formulaciones elaboradas; puede observarse que, en todos los casos, se observan distribuciones multimodales, con

presencia de posibles agregados de emulsificante de tamaño de partícula mayor a ≈ 3000 nm, que no formaban parte del sistema emulsivo e incrementaban considerablemente el tamaño de partícula: esto fue especialmente cierto en las medidas de diámetro más sensibles a la presencia de partículas grandes, como el diámetro M_v . Esto ayuda a reafirmar que la medida más apropiada de tendencia central es M_z .

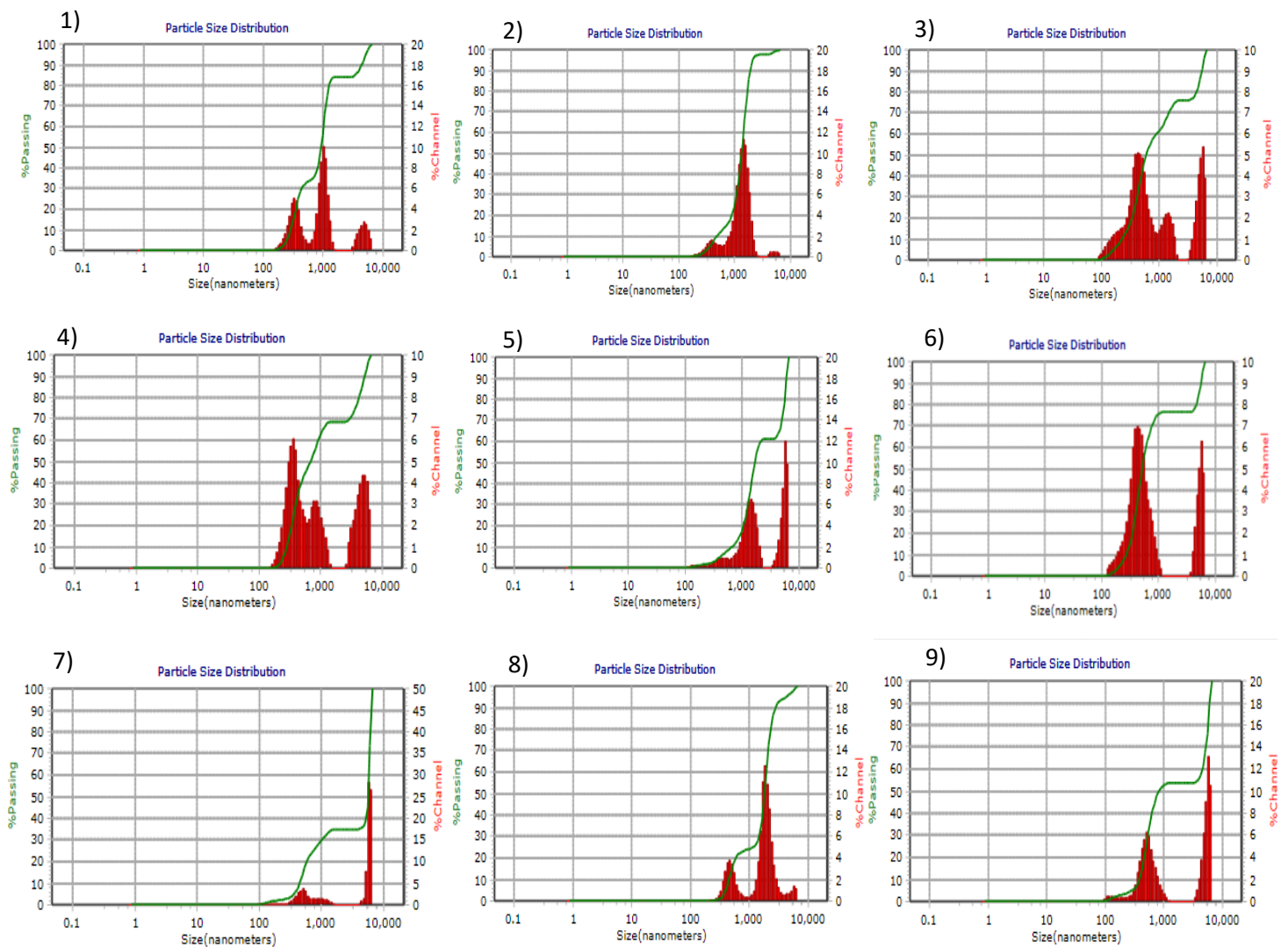


Figura 11. Distribuciones de tamaño de emulsiones O/W estabilizadas por emulsificantes y USP con formulaciones establecidas de acuerdo con el diseño de mezclas.

El número en la esquina superior izquierda identifica a cada formulación

3.3.2 Optimización mediante análisis de regresión lineal.

Se utilizó la metodología de Superficie de Respuesta para modelar y analizar todas las variables y reducir de esta manera el número de ensayos experimentales, creando modelos empíricos eficientes para predecir los cambios de las variables de respuesta los cuales verifican el grado de ajuste con la respuesta experimental a través del coeficiente de correlación (R^2). En la Figura 12 se presentan las gráficas de valores predichos por el modelo empírico (Ec. 11) vs observados experimentalmente para todas las variables de estabilidad coloidal determinadas por DLS.

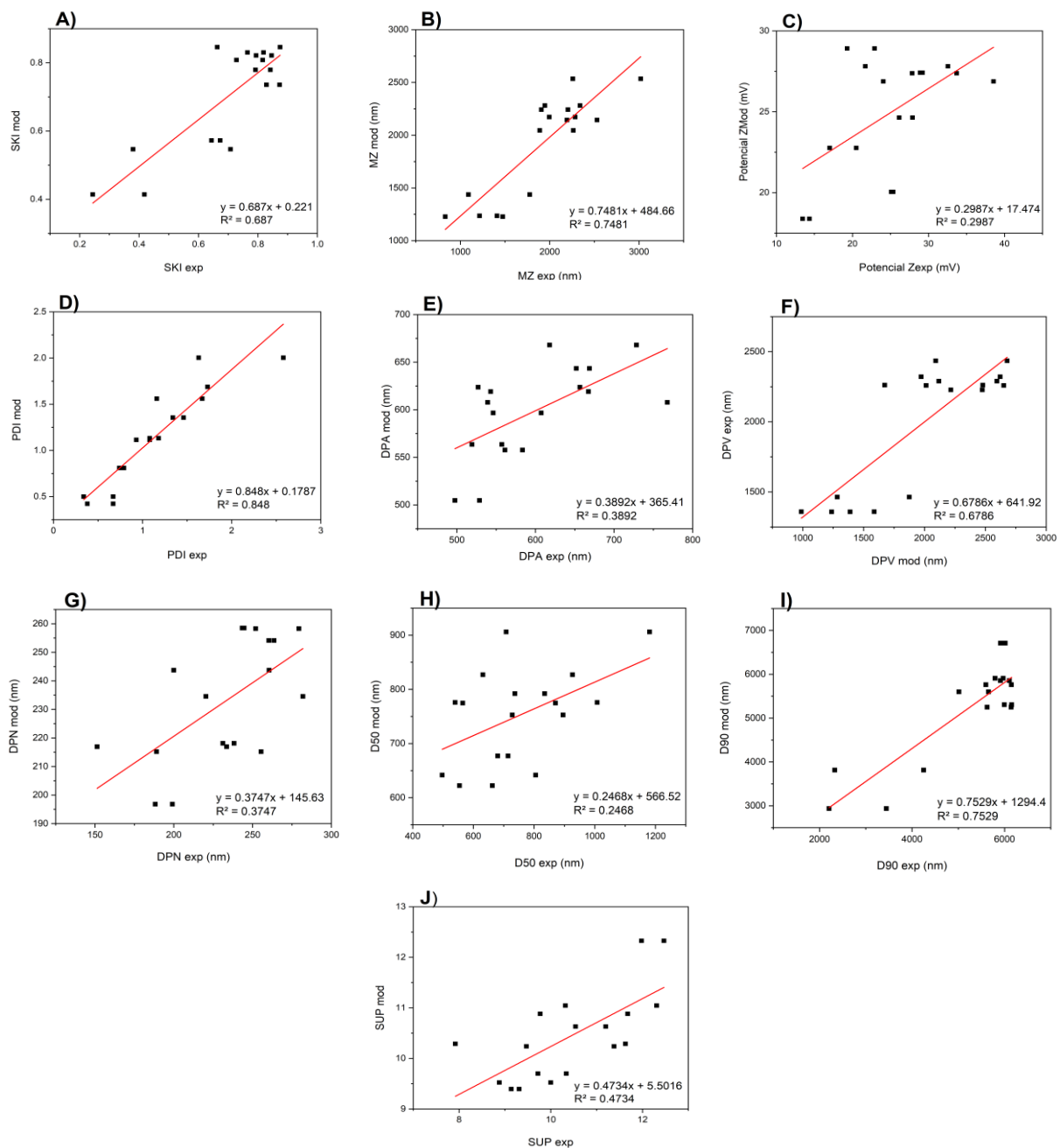


Figura 12: Gráficas de valores predichos vs observados de los parámetros de estabilidad de emulsiones sonicadas

Como puede observarse en la Figura 12, los valores de R^2 de las gráficas de valores predichos vs experimentales presentaron variaciones importantes de magnitud desde valores muy bajos (0.247 para D_{50} y 0.299 para potencial Z) hasta valores relativamente cercanos a la unidad. Entre estos últimos, los mejores ajustes de datos experimentales con los modelos propuestos se obtuvieron con Mz (0.748), D_{90} (0.753) y PDI (0.848). Es importante hacer notar que, de acuerdo con el análisis de regresión, todos los parámetros del modelo fueron significativos ($p < 0.05$), aunque es evidente que el grado de ajuste no fue satisfactorio en todos los casos. Por esta razón, se consideró necesario calcular la desviación relativa media (MRD) como medida de ajuste alterna para determinar la dispersión de los datos mediante la relación matemática mostrada en la Ecuación 12.

$$MRD = 100 \sum_{j=1}^n \left| \frac{y_{\text{mod},j} - y_{\text{exp},j}}{y_{\text{exp},j}} \right| / n \quad (\text{Ec. 12})$$

El índice MRD calcula el porcentaje de error relativo entre la respuesta generada por el modelo y la experimental y sirve como un valor complementario a R^2 para medir el grado de ajuste con el modelo predictivo propuesto. Los valores de MRD y R^2 se muestran en las Tablas 19 y 20.

Tabla 19. Coeficientes originales del modelo predictivo (componentes originales con respecto a x)

Parámetro	Potencial Z (mV)	PDI	Ski (nm)	Diámetro promedio Vol (nm)	Diámetro promedio Número (nm)	Diámetro promedio Área (nm)	Mz (nm)	D_{50} (nm)	D_{90} (nm)	Superficie calculada
B1	4723.539	199.936	15.344	112278.767	-13614.818	4575.416	-25188.048	96905.989	618389.960	-7.408
B2	437.670	17.639	2.221	9834.181	-1090.940	-843.536	-7317.636	6704.366	55238.415	42.520
B3	4480.558	26.656	-25.612	-54157.961	-8497.911	-19574.649	-297542.625	106647.674	774507.965	514.431
B12	-8465.248	-398.091	-34.137	-198863.162	23816.583	62.089	66037.049	-156345.003	-1110143.313	-99.047
B13	-40254.073	-2423.303	-219.290	-791750.396	51779.508	23906.174	705992.863	-816472.193	-8107884.999	-1206.031
B23	-8259.977	-206.187	9.016	4438.277	16759.502	36305.257	425233.470	-164556.837	-1426321.522	-864.735
B123	63619.925	4646.424	523.049	1556079.604	-68890.890	-56484.689	-772314.134	1121431.995	13139455.606	2071.833
R^2	0.299	0.848	0.687	0.679	0.375	0.389	0.748	0.247	0.753	0.473
MRD	20.0	14.6	14.4	14.2	10	7.3	13.7	17.4	12.4	7.1

Como se observa, la desviación relativa media entre los valores experimentales y aquellos obtenidos mediante el modelo de regresión presentó valores en el rango de 7.1 – 20.0%; valores bajos de MRD son deseables, pues implica que la desviación promedio que existe entre el modelo y el experimental es reducida e indica la magnitud de la dispersión de los datos alrededor de la media. Esto lleva a

considerar que a pesar de que algunos valores de R^2 eran muy bajos para algunas variables, el modelo predictivo es apropiado y se consideró apto para realizar el proceso de optimización para encontrar la formulación de emulsión más estable para realizar las pruebas con antioxidantes.

De acuerdo con lo expuesto por Cornell (2002) cuando se trabaja con diseños de mezcla, en ocasiones es conveniente transformar los coeficientes de los componentes regulares (denominados componentes en x) en nuevos coeficientes con respecto a L-pseudocomponentes (denominados componentes en z); esta transformación es necesaria para evitar estimaciones de coeficientes inestables debido a la colinealidad que surge en regiones altamente restringidas como la empleada en el diseño de mezclas mostrado en la Figura 8. En las Tablas 19 y 20 se muestran los coeficientes del modelo de regresión para los modelos de mezclas basados en x y z, respectivamente. La transformación de los coeficientes originales en aquellos basados en L-pseudocomponentes se realizó de acuerdo con el procedimiento indicado en el Anexo C. Adicionalmente, en la Tabla 21 se muestran los valores experimentales comparados con los valores del modelo para las variables de respuesta que se consideraron significativas y en la Tabla 22 se resumen las composiciones transformadas en z, mismas que se emplearon para la optimización descrita en la sección siguiente.

Tabla 20. Coeficientes del modelo con respecto a las z (L-pseudocomponentes)

Parámetro	Potencial Z (mV)	PDI	Ski (nm)	Diámetro promedio Vol (nm)	Diámetro promedio Número (nm)	Diámetro promedio Área (nm)	Mz (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Superficie calculada
B1	30.470	1.071	0.752	2304.531	162.161	648.806	2375.556	815.382	4193.024	8.975
B2	27.381	2.003	0.846	2261.366	254.101	607.709	2143.797	752.723	6710.899	10.289
B3	20.607	-1.195	0.098	62.303	241.523	503.707	-338.204	769.018	1547.878	12.381
B12	-1.408	1.038	0.172	7.982	77.406	-37.358	-173.143	-61.732	3014.856	0.869
B13	-2.546	2.490	0.557	936.475	45.180	-59.031	1156.595	-598.648	540.105	0.460
B23	14.634	3.125	0.519	1427.370	24.633	137.070	1505.532	159.762	4470.696	-2.609
B123	23.716	1.732	0.195	580.071	-25.681	-21.056	-287.901	418.044	4898.086	0.772
R ²	0.299	0.848	0.687	0.679	0.375	0.389	0.748	0.247	0.753	0.473
MRD	20.0	14.6	14.4	14.2	10	7.3	13.7	17.4	12.4	7.1

El análisis estadístico de los parámetros del modelo (ver Anexo D) reveló que todos los componentes de la mezcla contribuyeron a la respuesta observada. Se observó además un sinergismo binario significativo entre los componentes agua-estabilizantes para las respuestas de PDI, sesgo (SKI),

MZ y D90, pudiendo atribuirse a diversos factores, incluyendo el proceso de hidratación de hidrocoloides empleado, a las modificaciones del almidón empleado en este estudio (las cuales favorecen las interacciones con compuestos hidrófobos) y a la contribución de las proteínas del suero de leche por su alta solubilidad. Por otro lado, se observó un efecto negativo o antagónico de componentes para aceite-agua, esto debido a la polaridad de ambos componentes. En el caso del Mz, la combinación del agua y los estabilizantes aumenta la respuesta respecto al promedio aditivo.

Tabla 21. Valores experimentales y predichos para las variables de respuesta significativa.

Tratamiento	PDI	<i>PDI mod</i>	Ski (nm)	<i>Ski (nm) mod</i>	Diámetro promedio Vol (nm)	<i>Diámetro promedio Vol (nm) mod</i>	Mz (nm)	<i>Mz (nm) mod</i>	D ₉₀ (nm)	<i>D₉₀ (nm) mod</i>
1	0.52	0.42	0.33	0.41	1551.1	1358.86	1433.8	1437.12	3291	3815.44
2	0.50	0.49	0.54	0.54	1313.3	1357.88	1313.6	1235.61	2826	2935.49
3	1.4	1.35	0.77	0.80	2134.0	2434.63	2076.8	2045.40	5335	5601.24
4	0.76	0.80	0.81	0.77	2297.0	2321.35	2290.9	2534.20	5874	5760.07
5	2.10	2.00	0.76	0.84	2563.4	2261.37	2304.4	2143.80	5965	6710.90
6	1.00	1.11	0.65	0.57	2058.6	1463.38	1452.9	1227.54	5884	5250.06
7	1.41	1.55	0.85	0.73	2645.9	2227.48	2503.3	2171.75	6075	5305.62
8	1.73	1.68	0.79	0.83	2356.8	2289.40	2343.3	2242.70	5883	5907.23
9	1.13	1.13	0.82	0.82	2584.9	2259.39	2566.9	2281.18	6007	5854.94

* Valores promedio \pm desviación estándar (n=2).

Tabla 22. Composiciones transformadas Z

TRATAMIENTO	MUESTRA	Z1	Z2	Z3
1	Vértice superior derecho	-0.684	1.158	0.526
2	Vértice superior izquierdo	0.474	0.000	0.526
3	Vértice inferior derecho	-0.526	2.053	-0.526
4	Vértice inferior izquierdo	0.737	0.789	-0.526
5	Centroide	0.000	1.000	0.000
6	Medio lado superior	-0.105	0.579	0.526
7	Medio lado derecho	-0.605	1.605	0.000
8	Medio lado izquierdo	0.605	0.395	0.000
9	Medio lado inferior	0.105	1.421	-0.526

En diseños de mezclas, los gráficos de Cox se utilizan para examinar el efecto de cada componente sobre la mezcla, dado que con frecuencia otros análisis estadísticos no dan resultados confiables, puesto que existe una gran correlación entre todos los componentes. En este diseño, cuando se cambia la proporción de un componente de la mezcla, es necesario hacer modificaciones

en la concentración de los otros dos debido a que la suma de las proporciones siempre será igual a 1; los cambios en las respuestas a causa de las variaciones de concentración de este componente, junto con los cambios relacionados en los otros componentes puede considerarse como una línea en una dirección determinada a través de la región experimental (Minitab, 2018); en este caso en concreto, estos gráficos ayudan entonces a examinar el efecto de un componente i ($i = 1,2,3$) mientras se mantienen constantes las proporciones *relativas* de los componentes restantes, que se observa como una línea o rayo proyectado desde una mezcla de referencia, en este caso de la mezcla centroide (mezcla 5), al vértice $x_i = 1$ ($i = 1,2,3$; Cornell, 2002). Si las coordenadas de la mezcla de referencia se indican por r_1 , r_2 y r_3 , y la proporción del componente i se cambia en Δ_i , las formulaciones siguiendo las instrucciones de Cox se obtienen mediante las ecuaciones 13 y 14 (Hernández *et al.*, 2019).

$$X_i = r_i + \Delta_i \quad (\text{Ec. 13})$$

$$X_j = r_j - \frac{\Delta_i r_j}{1-r_i}, \quad j \neq i \quad (\text{Ec. 14})$$

En la Figura 13 se presentan los gráficos de Cox de las respuestas estimadas a lo largo de los rayos de los x_i componentes ($i = 1,2,3$), donde se refleja el efecto que tiene cada uno de los componentes (aceite: agua: estabilizantes) sobre una mezcla de referencia (centroide, mezcla 5); esto se hace de esta manera porque el diseño es restringido (sólo se emplea un área delimitada de todo el espacio triangular del diseño de mezclas de tres componentes). Los rayos que se observan se conectan desde un punto arbitrario del diseño a cada uno de los vértices (en este caso al centroide); dichos rayos evalúan la formulación ya que muestran el efecto al cambiar un determinado componente en la mezcla de referencia mientras que los demás no son modificados. En las gráficas de Cox se puede observar cuando el modelo predictivo se ajusta a uno de primer orden (cuando las líneas resultantes son rectas) o a uno de segundo orden las líneas son curvas; en este último caso, si la curva es casi rectilínea, entonces los cambios a lo largo de línea de Cox y de los otros componentes mantiene la misma proporción y la respuesta no cambia en gran medida (Soriano-Almanzar, 2017).

La interpretación de los gráficos de Cox es relativamente simple; cada componente de la mezcla tiene una curva; si la línea de un componente cambia sensiblemente (esto es, que exhibe un comportamiento curvado pronunciado) esto implica que tiene un efecto significativo sobre la variable dependiente graficada; mientras menos pronunciada sea la curva en cuestión (cuando la línea se acerca al comportamiento de una línea recta o cuando la curva sea más aplanada) esto significa que cuando el componente cambia a lo largo de la dirección de Cox y los otros componentes mantienen la misma razón, la variable dependiente no cambia demasiado (Reliasoft, 2020). Como puede observarse en la Figura 13, el efecto del aceite es particularmente significativo sobre el PDI, el

diámetro promedio número y el D_{90} ; mientras tanto, el efecto del componente agua fue significativo particularmente sobre el sesgo, el M_z , el potencial Z, el PDI, el diámetro promedio área, el diámetro promedio número, el D_{50} , el D_{90} y la superficie calculada; finalmente, al mantener constante la razón entre los otros dos componentes, cambios en la concentración de la mezcla de estabilizantes afectaron sensiblemente a las siguientes variables de respuesta: PDI, potencial Z, sesgo y diámetro promedio volumen.

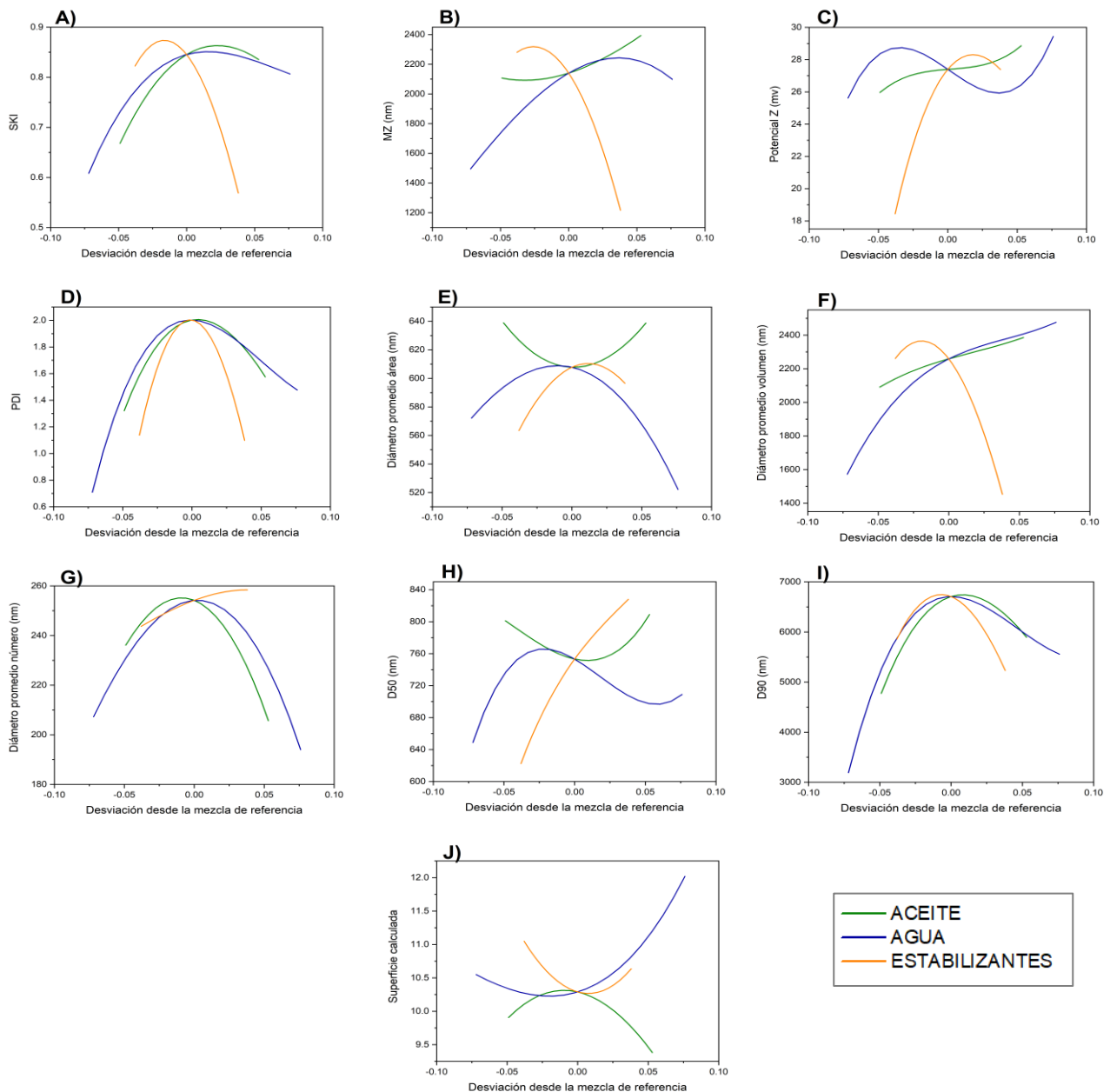


Figura 13: Gráficas de Cox de respuestas estimadas a lo largo de los rayos x_i ($i = 1,2,3$).

- A.** Sesgo; **B.** M_z ; **C.** Potencial Z; **D.** PDI; **E.** Diámetro promedio área; **F.** Diámetro promedio volumen; **G.** Diámetro promedio número; **H.** D_{50} ; **I.** D_{90} ; **J.** Superficie calculada

3.4 Optimización de formulación de emulsiones

El objetivo de la Etapa 2 fue evaluar las características y el comportamiento de los 9 tratamientos para determinar la fórmula o formulaciones más estables, a las cuales se les podía emplear como vehículo de acarreo de compuestos bioactivos. Los diseños de mezclas se emplean cuando la respuesta buscada (en este caso, la mayor estabilidad de la emulsión) depende de la proporción de los componentes en la mezcla, más que de la concentración de cada componente. Se consideraron específicamente los coeficientes del índice de polidispersión de las partículas (PDI) y el tamaño de partículas expresado como Mz con respecto a las composiciones transformadas en Z para encontrar las formulaciones óptimas, donde se buscaba minimizar los valores Mz y PDI con restricciones en los rangos mínimos y máximos de las composiciones de las mezclas. El análisis de optimización con respecto a estas variables se muestra en el Anexo E, donde se observa que se definieron 2 fórmulas que exhibían los mejores valores de desempeño en los términos de estabilidad coloidal arriba indicados; estas formulaciones óptimas se describen en la Tabla 23.

Tabla 23. Composición de fórmulas óptimas

Componente	Fórmula 1*	Formula 2
X _A	0.186	0.208
X _B	0.647	0.625
X _C	0.167	0.167

XA: Fracción másica de aceite; XB: Fracción másica de agua; XC: Fracción másica de mezcla 1:1 de estabilizantes (WPC:AM)

La formulación 1 no corresponde a ninguna de las desarrolladas en el diseño experimental, aunque, como puede observarse al comparar esta formulación con aquellas desarrolladas en el diseño experimental, su composición se asemeja a aquella de la fórmula 6 (medio lado superior, MLS) del diseño de mezclas (XA: 0.167, XB: 0.667 y XC: 0.167). En la sección 3.3.1 se observa que esta formulación exhibía el tamaño de partícula más pequeño (1152.9 nm) con respecto al parámetro Mz; mientras tanto, la formulación óptima 2 corresponde exactamente al tratamiento 2 de los 9 estudiados; esta formulación en particular mostró que minimiza Mz y representa uno de los valores más bajos en el análisis de varianza (ANOVA) para PDI. Tomando en cuenta lo anterior, ambas formulaciones se consideraron apropiadas en términos de estabilidad coloidal para emplearse como vehículos para incluir los compuestos bioactivos seleccionados, extraídos del fruto del mamey.

3.4.1 Adición de compuestos bioactivos en formulaciones óptimas

En la Etapa 3 del presente trabajo se prepararon las emulsiones con las formulaciones óptimas seleccionadas en la fase anterior y se adicionó el compuesto bioactivo de la cáscara y pulpa de mamey.

Como bien se sabe, la efectividad de las emulsiones como vehículo de transporte de compuestos antioxidantes depende de su capacidad para preservar la bioactividad y la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos incorporados; en este proyecto se evaluó el mantenimiento de la bioactividad a través de pruebas de retención de la actividad antioxidante de las emulsiones finales la cual fue evaluada mediante el método de decoloración del radical DPPH. Las formulaciones óptimas preparadas con la adición de los compuestos antioxidantes de cáscara y pulpa de mamey se compararon con los resultados arrojados de las emulsiones con extractos, pero sin el tratamiento ultrasónico (en este caso denominadas muestras control). En la Tabla 24 se muestran los niveles de DPPH de las emulsiones preparadas; los resultados completos se muestran en el Anexo F.

Tabla 24. Actividad antioxidante por prueba de DPPH de emulsiones sonicadas preparadas con las formulaciones optimizadas adicionadas con extractos de bioactivos de cáscara y pulpa de mamey

Muestra	DPPH (mg Trolox/100mL de emulsión)	
	Fórmula 1	Fórmula 2
Control Cáscara	147.82±0.33 ^{aA}	170.35±2.19 ^{bA}
Cáscara US	121.16±1.73^{aB}	156.53±0.79^{bB}
Control Pulpa	174.78±1.73 ^{aA}	197.72±1.66 ^{bA}
Pulpa US	140.50±0.83^{aB}	136.08±1.88^{aB}

* Valores promedio ± desviación estándar (n=3).

^{ab} Medias con letras minúsculas diferentes en la misma fila presentan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$)

En la Tabla 24 se observa la actividad antioxidante de las emulsiones expresada en mg Trolox/100 mL de emulsión; es importante hacer notar que un incremento en el porcentaje de inhibición indica una mayor actividad antioxidante de la emulsión. La actividad antioxidante original en extractos de cáscara y de pulpa de mamey fue de 345.31 ± 0.83 y de 271.61±4.17 mg Trolox/100mL de extracto, respectivamente. Estas cifras difieren notoriamente de otros reportes previos; así, Moo-Huchin *et al* (2014) obtuvieron un valor de 113.06 ± 26.45 mg Trolox/100 g para la pulpa de mamey empleando el mismo método; por otra parte, Deza (2019) determinó la actividad antioxidante del *Pouteria sapota* reportando un valor de 759.88 µg/mL. Las discrepancias entre los resultados reportados por los autores y los obtenidos en el presente proyecto puede atribuirse a las diferencias en las materias primas utilizadas; una de ellas puede ser el estado de maduración, ya que según Tejacal *et al.* (2005), hay una reducción de fenoles cuando los frutos pasan de inmaduros a maduros, dado que la pulpa muestra oscurecimiento con la maduración; por otro lado, Alia *et al.*, (2002) describen que la coloración naranja de la pulpa del mamey se debe a los carotenoides, los cuales aumentan durante la maduración.

Como era de esperarse, los tratamientos de homogeneización para producir la emulsión generan un deterioro importante en la actividad antioxidante de los extractos; reportes previos indican que los tratamientos de alta energía como el ultrasonido pueden degradar parcialmente a los compuestos bioactivos, fenómeno ocasionado por los incrementos localizados de temperatura y presión relacionados con la cavitación (Nowacka *et al.*, 2018); así, en términos generales, se observa que, en todos los casos, el tratamiento ultrasónico ocasionó un deterioro significativo ($p < 0.05$) adicional en la actividad antioxidante de los extractos de cáscara y pulpa, independientemente del tipo de formulación; así, el tratamiento ultrasónico para fabricar la emulsión de extractos de cáscara redujo la actividad antioxidante con respecto al control en 18% y 8% con las formulaciones 1 y 2, respectivamente; mientras tanto, con la pulpa el tratamiento ultrasónico provocó una reducción de actividad antioxidante de 20% y 32% con respecto al control para las formulaciones 1 y 2, respectivamente; aun así, tomando en cuenta el incremento en la estabilidad coloidal de la emulsión que conlleva incluir un tratamiento ultrasónico en el procedimiento de elaboración de emulsiones, se estima que la degradación incrementada de bioactivos no representa un problema tan grave. Asimismo, se debe hacer notar que la fórmula 2 aparenta ser un mejor vehículo de transporte de bioactivos, exhibiendo valores significativamente ($p < 0.05$) más altos de inhibición del radical DPPH en las emulsiones con bioactivos de cáscara (con y sin proceso ultrasónico) y de pulpa sin tratamiento ultrasónico; la única excepción se presentó con la emulsión con bioactivos de pulpa tratada por ultrasonido, donde no se observó una diferencia significativa en la eficiencia de ambas formulaciones para mantener la actividad antioxidante de los extractos de pulpa de mamey. Esto podría explicarse parcialmente a su composición ya que la formulación 2 contiene más aceite (20.8%) que la formulación 1 (18.6%). Considerando lo anterior, se presume que la formulación 2 es el vehículo más apropiado para contener los bioactivos de cáscara tras el tratamiento ultrasónico (156.53 ± 0.79 mg Trolox/100mL de emulsión) y, aunque no presenta diferencia significativa con el de la formulación 2, los bioactivos de pulpa exhiben la mayor actividad antioxidante cuando se incluyen dentro de la formulación 1 (140.50 ± 0.83 mg Trolox/100mL).

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

A partir de los resultados obtenidos se concluye que:

- El tratamiento ultrasónico a tiempos cortos puede mejorar la estabilidad de las emulsiones preservando la actividad de los bioactivos incorporados; sin embargo, se requiere de más investigación para hacer de esta tecnología una aplicación rentable para la producción a gran escala de emulsiones ricas en bioactivos.
- El uso de almidones modificados en combinación con proteínas concentradas de suero de leche como emulsificantes mostraron una gran capacidad para estabilizar emulsiones con niveles de hasta el 20 % de aceite.
- El diseño de mezclas permitió realizar combinaciones de ingredientes para optimizar el uso de éstos, buscando a la vez las mejores características funcionales para las mezclas, ahorrando de esta manera tiempo en el trabajo experimental.
- Las emulsiones de aceite en agua se consideran una manera eficiente, de bajo costo y conveniente de aumentar la dispersibilidad y la estabilidad de los bioactivos, principales inconvenientes que dificultan su suplementación.
- Los almidones modificados con anhídrido octenil succínico (OSA) tienen buenas propiedades emulsionantes, barrera contra el oxígeno y formación de paredes que proporcionan estabilidad contra las tensiones ambientales como temperatura, pH y fuerza iónica.

En cuanto a propuestas de trabajo futuro, se recomienda:

- Efectuar estudios de seguimiento de las pruebas con un menor contenido de hidrocoloides; de esta manera se estarían explorando emulsiones menos turbias consideradas interesantes en la industria alimentaria especialmente para aplicaciones en bebidas.
- Evaluar el efecto de cambios en el pH de los sistemas evaluados sobre el mantenimiento de la estabilidad coloidal.
- Realizar un seguimiento de la estabilidad coloidal y del mantenimiento de la actividad antioxidante de las formulaciones optimizadas de emulsión durante un periodo específico de tiempo durante su almacenamiento refrigerado.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., & Zhang, X. (2013). An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions. *Food Engineering Reviews*, 5(3), 139-157.

Albano, K. M., & Nicoletti, V. R. (2018). Ultrasound impact on whey protein concentrate-pectin complexes and in the O/W emulsions with low oil soybean content stabilization. *Ultrasonics sonochemistry*, 41, 562-571.

Alia-Tejagal, I., Soto-Hernández, R. M., Colinas-León, M. T., & Martínez-Damián, M. T. (2005). Análisis preeliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore & Stearn). *Revista Chapingo serie horticultura*, 11(2), 225-231.

Tejagal, I. A., León, M. T. C., Damián, M. T. M., & Hernández, R. M. S. (2005). Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore and Stearn). II. Cambios en fenoles totales y actividad enzimática. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(1), 25-32.

Álvarez, A. M. P., Bustos, C. R. B., Hernández, L., & Muñoz, L. (2018). Emulsiones tipo pickering a base de almidones modificados como agentes emulsificantes. Artículo de revisión. *Revista de Investigación*, 11(1), 127-139.

Alvídrez-Morales, A., González-Martínez, B. E., & Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista salud pública y Nutrición*, 3(3).

Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pílosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472.

Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410-427.

Barba Evia, J. R. (2018). México y el reto de las enfermedades crónicas no transmisibles. El laboratorio también juega un papel importante. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 65(1), 4-17.

Bermudez-Aguirre, D. (Ed.). (2017). *Ultrasound: advances in food processing and preservation*. Academic Press.

Chemat, F., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813-835.

Chen, J., Li, F., Li, Z., McClements, D. J., & Xiao, H. (2017). Encapsulation of carotenoids in emulsion-based delivery systems: Enhancement of β -carotene water-dispersibility and chemical stability. *Food Hydrocolloids*, 69, 49-55.

Cheuk, S. Y., Shih, F. F., Champagne, E. T., Daigle, K. W., Patindol, J. A., Mattison, C. P., & Boue, S. M. (2015). Nano-encapsulation of coenzyme Q10 using octenyl succinic anhydride modified starch. *Food chemistry*, *174*, 585-590.

Cornell, J. 2002. Experiments with mixtures. Designs, models and the analysis of mixture data. 3rd. Ed. John Wiley & Sons. New York, NY.

Damasceno, E. T. S., Almeida, R. R., de Carvalho, S. Y. B., de Carvalho, G. S. G., Mano, V., Pereira, A. C., & de Lima Guimarães, L. G. (2018). Lippia organoides Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and p-coumaric acid: encapsulation efficiency and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, *125*, 85-94.

Diaz-Perez, J. C., Bautista, S., & Villanueva, R. (2000). Quality changes in sapote mamey fruit during ripening and storage. *Postharvest Biology and Technology*, *18*(1), 67-73.

Donhowe, E. G., Flores, F. P., Kerr, W. L., Wicker, L., & Kong, F. (2014). Characterization and in vitro bioavailability of β -carotene: Effects of microencapsulation method and food matrix. *LWT-Food Science and Technology*, *57*(1), 42-48.

Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., & Grolier, P. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *83*(5), 369-382.

Feng, H., Barbosa-Cánovas, G. V., & Weiss, J. (2011). *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (Vol. 1, p. 599). New York: Springer.

Garti, N., Slavin, Y., & Aserin, A. (1999). *Portulaca oleracea* gum and casein interactions and emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, *13*(2), 127-138.

Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, *13*(1), 114-122.

Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C.N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International journal of food sciences and nutrition*, *50*(3), 213-224.

Gonnet, M., Lethuaut, L., & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, *146*(3), 276-290.

Hernández-Carranza, P., Jattar-Santiago, K. Y., Avila-Sosa, R., Pérez-Xochipa, I., Guerrero-Beltrán, J. A., Ochoa-Velasco, C. E., & Ruiz-López, I. I. (2019). Antioxidant fortification of yogurt with red cactus pear peel and its mucilage. *CyTA-Journal of Food*, *17*(1), 824-833.

Jain, A., Thakur, D., Ghoshal, G., Katare, O. P., & Shivhare, U. S. (2016). Characterization of microcapsulated β -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. *International journal of biological macromolecules*, *87*, 101-113.

- Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). The physical and chemical effects of ultrasound. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 1-12). Springer, New York, NY.
- Khoozani, A. A., Birch, J., & Bekhit, A. E. D. A. (2019). Resistant starch preparation methods. *En Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 390-394). Academic Press Oxford.
- Kosegarten-Conde, C. E., & Jiménez-Munguía, M. T. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*, 6(2), 1-18.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., & Lee, D. U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 15(5), 261-266.
- Linke, C., & Drusch, S. (2016). Turbidity in oil-in-water-emulsions—Key factors and visual perception. *Food Research International*, 89, 202-210.
- Loi, C. C., Eyres, G. T., & Birch, E. J. (2019). Effect of milk protein composition on physicochemical properties, creaming stability and volatile profile of a protein-stabilised oil-in-water emulsion. *Food Research International*, 120, 83-91.
- López Córdoba, A. F. (2012). *Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- López-Barreto, R. E., Becerra-Jiménez, M. L., & Borrás-Sandoval, L. M. (2018). Caracterización físico-química y microbiológica del lactosuero del queso Paipa. *Ciencia y Agricultura*, 15(2), 99-106.
- Martínez-Navarrete, N., Vidal, M. D. M. C., & Lahuerta, J. J. M. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad dietética*, 12(2), 64-68.
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- Meléndez Martínez, A. J., Vicario Romero, I., & Heredia Mira, F. J. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos.
- Mínguez Mosquera, M. I., Pérez Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2005). Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples “colorantes” naturales.
- Minitab, Inc. (2019). Minitab 18 Support [Internet]. Verificado 11/11/2020.
- Miranda Miranda, O., Fonseca, P. L., Ponce, I., Cedeño, C., Rivero, L. S., & Vázquez, L. M. (2014). Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de leche que incorpora *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Cubana de alimentación y nutrición*, 24(1), 7-16.
- Mirhosseini, H., Tan, C. P., Hamid, N. S., & Yusof, S. (2008). Optimization of the contents of Arabic gum, xanthan gum and orange oil affecting turbidity, average particle size, polydispersity index and density in orange beverage emulsion. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1212-1223.

Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., y Vargas, M. D. L. V., ... & Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food chemistry*, 152, 508-515.

Mongenot, N., Charrier, S., & Chaliér, P. (2000). Effect of ultrasound emulsification on cheese aroma encapsulation by carbohydrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 861-867.

Moreira de Morais, J., David Henrique dos Santos, O., Delicato, T., Azzini Gonçalves, R., & Alves da Rocha-Filho, P. (2006). Physicochemical characterization of canola oil/water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 27(1), 109-115.

Muñoz, J., Alfaro, M., & Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y aceites*, 58(1), 64-73.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.

Nowacka, M., Fijalkowska, A., Dadan, M., Rybak, K., Wiktor, A., & Witrowa-Rajchert, D. (2018). Effect of ultrasound treatment during osmotic dehydration on bioactive compounds of cranberries. *Ultrasonics Sonochemistry*, 83, 18–25.

Pasin, J. Z. (1972). *U.S. Patent No. 3,664,963*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Paulín, K. V., Alvarado Sánchez, B., & Munguía, A. R. (2015). Historia del mamey Pouteria sapota. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 1-9.

Paz, E., Martín, Á., Bartolomé, A., Largo, M., & Cocero, M. J. (2014). Development of water-soluble β -carotene formulations by high-temperature, high-pressure emulsification and antisolvent precipitation. *Food Hydrocolloids*, 37, 14-24.

Plantz, P.E. 2013. Explanation of data reported by Microtrac Instruments. Microtrac Inc. Pennsylvania, USA.

Qamar, S., Bhandari, B., & Prakash, S. (2019). Effect of different homogenisation methods and UHT processing on the stability of pea protein emulsion. *Food research international*, 116, 1374-1385.

Ramírez-Nieto, N., Baena, Y., & Osorio, C. (2019). Caracterización Físicoquímica de Emulsiones Aceite/Agua a partir de Uchuva (*Physalis peruviana*) como Ingrediente para la Industria Alimenticia. *Información tecnológica*, 30(3), 147-156.

Ramos-Ramírez, F. X., Alia-Tejacal, I., López-Martínez, V., Colinas-León, M. T., Acosta-Durán, C. M., Tapia-Delgado, A., & Villegas-Torres, O. (2009). Almacenamiento de frutos de zapote mamey

[*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore & Stearn] en atmósfera modificada. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(1), 17-23.

Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.

Rao, P., Yu, Z., Han, H., Xu, Y., & Ke, L. (2019). Dynamic light scattering for food quality evaluation. In *Evaluation Technologies for Food Quality* (pp. 535-557). Woodhead Publishing.

Reliasoft. 2015. Reliability Engineering eTextbook Library. Reliasoft Corporation. Tucson, AR.

Santillán-Urquiza, E., Ruiz-Espinosa, H., Angulo-Molina, A., Ruiz, J. F. V., & Méndez-Rojas, M. A. (2017). Applications of nanomaterials in functional fortified dairy products: benefits and implications for human health. In *Nutrient Delivery* (pp. 293-328). Academic Press.

Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2013). Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 401-407.

Silva, E. K., Gomes, M. T. M., Hubinger, M. D., Cunha, R. L., & Meireles, M. A. A. (2015). Ultrasound-assisted formation of annatto seed oil emulsions stabilized by biopolymers. *Food Hydrocolloids*, 47, 1-13.

Silva, H. D., Cerqueira, M. Â., & Vicente, A. A. (2012). Nanoemulsions for food applications: development and characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 854-867.

Silva, V. M., Vieira, G. S., & Hubinger, M. D. (2014). Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. *Food Research International*, 61, 132-143.

Soriano-Almanzar, 2017. An optimizing method for screening in a mixture design experiment. Thesis. The Rocher Institute of Technology.

Tamjidi, F., Nasirpour, A., & Shahedi, M. (2012). Physicochemical and sensory properties of yogurt enriched with microencapsulated fish oil. *Food science and technology international*, 18(4), 381-390.

Thakur, D., Jain, A., Ghoshal, G., Shivhare, U. S., & Katare, O. P. (2017). Microencapsulation of β -carotene based on casein/guar gum blend using zeta potential-yield stress phenomenon: An approach to enhance photo-stability and retention of functionality. *AAPS PharmSciTech*, 18(5), 1447-1459.

Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J.P. and Cheftel, J.C. 2003. Highpressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *Int. Dairy J.* 13:427-439

Torkamani, AE, Juliano, P., Ajlouni, S., y Singh, TK (2014). *Impacto del tratamiento con ultrasonido en la oxidación de lípidos del suero de queso Cheddar*. Ultrasonics sonochemistry, Australia.

Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., & Morales, G. (2014). Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista chilena de nutrición*, 41(2), 198-204.

Villegas-Monter, A., & Granados-Friely, J. C. (2012). Conservación y aprovechamiento de los recursos fitogenéticos en las sapotáceas. *Zapote mamey y otras sapotáceas*, 39-68.

Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International dairy journal*, 20(4), 292-302.

Xiao, Z., Liu, W., Zhu, G., Zhou, R., & Niu, Y. (2014). A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1482-1494.

Xiong, Y., Li, Q., Miao, S., Zhang, Y., Zheng, B., & Zhang, L. (2019). Effect of ultrasound on physicochemical properties of emulsion stabilized by fish myofibrillar protein and xanthan gum. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 54, 225-234.

Yahia, E. M., Gutiérrez-Orozco, F., & Arvizu-de Leon, C. (2011). Phytochemical and antioxidant characterization of mamey (*Pouteria sapota* Jacq. HE Moore & Stearn) fruit. *Food Research International*, 44(7), 2175-2181.

Yanjun, S., Jianhang, C., Shuwen, Z., Hongjuan, L., Jing, L., Lu, L., ... & Jiaping, L. (2014). Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 124, 11-18.

Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.

Zhang, J., Zhang, X., Wang, X., Huang, Y., Yang, B., Pan, X., & Wu, C. (2017). The influence of maltodextrin on the physicochemical properties and stabilization of beta-carotene emulsions. *AAPS PharmSciTech*, 18(3), 821-828.

Zhang, J., & Reineccius, G. A. (2016). Factors controlling the turbidity of submicron emulsions stabilized by food biopolymers and natural surfactant. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 162-168.

Zou, L., Zheng, B., Zhang, R., Zhang, Z., Liu, W., Liu, C., ... & McClements, D. J. (2016). Enhancing the bioaccessibility of hydrophobic bioactive agents using mixed colloidal dispersions: Curcumin-loaded zein nanoparticles plus digestible lipid nanoparticles. *Food Research International*, *81*, 74-82.

Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 3-29). Springer, New York, NY.x

ANEXO A

ANOVAS PARA LOS DATOS CENTROIDE Y LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE SONICACIÓN

A 1. Anova unidireccional: Diámetro promedio Vol (nm) vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	28521907	7130477	18.96	0.000
Error	15	5640058	376004		
Total	19	34161965			

S = 613.2 R² = 83.49% R²ajustado = 79.09%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	IC Inferior	IC Superior
0	4	3681.0	1002.5	1678.5	5683.5
1	4	3366.8	755.7	1855.3	4878.3
2	4	1940.8	508.2	824.4	3057.2
3	4	811.8	112.6	586.6	1037.0
4	4	937.0	181.7	573.6	1300.4

Desv.Est. agrupada = 613.2

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0	4	3681.0	A
1	4	3366.8	A
2	4	1940.8	B
4	4	937.0	B
3	4	811.8	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A 2. ANOVA unidireccional: Diámetro promedio Número (nm) vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	689106	172276	4.99	0.009
Error	15	517681	34512		
Total	19	1206787			

S = 185.8 R² = 57.10% R²ajustado = 45.66%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+
0	4	549.8	149.4	(-----*-----)
1	4	694.8	289.5	(-----*-----)
2	4	483.4	250.4	(-----*-----)
3	4	210.8	32.5	(-----*-----)
4	4	237.4	51.7	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+
				250 500 750 1000

Desv.Est. agrupada = 185.8

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	4	694.8	A
0	4	549.8	A B
2	4	483.4	A B
4	4	237.4	B
3	4	210.8	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A 3. ANOVA unidireccional: Diámetro promedio Área (nm) vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	10946859	2736715	11.71	0.000
Error	15	3504480	233632		
Total	19	14451339			

S = 483.4 R² = 75.75% R²ajustado = 69.28%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	+-----+-----+-----+-----
0	4	2222.8	765.3	(-----*-----)
1	4	2037.3	572.6	(-----*-----)
2	4	1134.3	499.7	(-----*-----)
3	4	495.3	48.1	(-----*-----)
4	4	481.5	50.2	(-----*-----)
				+-----+-----+-----+-----
				0 700 1400 2100

Desv.Est. agrupada = 483.4

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0	4	2222.8	A
1	4	2037.3	A B
2	4	1134.3	B C
3	4	495.3	C
4	4	481.5	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A 4. ANOVA unidireccional: Superficie calculada vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	353.49	88.37	38.90	0.000
Error	15	34.08	2.27		
Total	19	387.56			

S = 1.507 R² = 91.21% R²ajustado = 88.86%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+---
0	4	3.063	1.434	(---*---)
1	4	3.175	1.107	(---*---)
2	4	5.990	2.172	(---*---)
3	4	12.195	1.130	(---*---)
4	4	12.570	1.443	(---*---)
				-----+-----+-----+-----+---
				3.5 7.0 10.5 14.0

Desv.Est. agrupada = 1.507

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
4	4	12.570	A
3	4	12.195	A
2	4	5.990	B
1	4	3.175	B
0	4	3.063	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A 5. ANOVA unidireccional: PDI vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	0.2327	0.0582	1.42	0.276
Error	15	0.6150	0.0410		
Total	19	0.8477			

S = 0.2025 R² = 27.45% R²ajustado = 8.10%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+-----+-----
0	4	0.3135	0.0983	(-----*-----)
1	4	0.2985	0.1749	(-----*-----)
2	4	0.5831	0.2785	(-----*-----)
3	4	0.4818	0.1914	(-----*-----)
4	4	0.4649	0.2249	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+-----+-----
				0.20 0.40 0.60 0.80

Desv.Est. agrupada = 0.2025

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
2	4	0.5831	A
3	4	0.4818	A
4	4	0.4649	A
0	4	0.3135	A
1	4	0.2985	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A 6. ANOVA unidireccional: Mz (nm) vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	28985801	7246450	17.06	0.000
Error	15	6369924	424662		
Total	19	35355725			

S = 651.7 $R^2 = 81.98\%$ $R^2(\text{ajustado}) = 77.18\%$

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+
0	4	3587.3	1051.7	(-----*-----)
1	4	3333.0	885.4	(-----*-----)
2	4	1886.5	461.9	(-----*-----)
3	4	792.8	126.0	(-----*-----)
4	4	772.1	63.5	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+
				1200 2400 3600 4800

Desv.Est. agrupada = 651.7

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0	4	3587.3	A
1	4	3333.0	A
2	4	1886.5	B
3	4	792.8	B
4	4	772.1	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A 7. ANOVA unidireccional: ski vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	0.1690	0.0422	0.51	0.729
Error	15	1.2407	0.0827		
Total	19	1.4097			

S = 0.2876 R² = 11.99% R²ajustado = 0.00%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	-+-----+-----+-----+-----
0	4	0.4219	0.2757	(-----*-----)
1	4	0.2859	0.2160	(-----*-----)
2	4	0.4191	0.4302	(-----*-----)
3	4	0.3897	0.2367	(-----*-----)
4	4	0.5729	0.2232	(-----*-----)
				-+-----+-----+-----+-----
				0.00 0.25 0.50 0.75

Desv.Est. agrupada = 0.2876

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
4	4	0.5729	A
0	4	0.4219	A
2	4	0.4191	A
3	4	0.3897	A
1	4	0.2859	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A 8. ANOVA unidireccional: D50 (nm) vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	28870140	7217535	4.87	0.010
Error	15	22221066	1481404		
Total	19	51091206			

S = 1217 R² = 56.51% R² ajustado= 44.91%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95%
0	4	2294	2301	(-----*-----)
1	4	3782	1097	(-----*-----)
2	4	1587	937	(-----*-----)
3	4	552	84	(-----*-----)
4	4	597	153	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
0 1500 3000 4500

Desv.Est. agrupada = 1217

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	4	3782	A
0	4	2294	A B
2	4	1587	A B
4	4	597	B
3	4	552	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A9. ANOVA unidireccional: D90 (nm) vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	29212248	7303062	4.05	0.020
Error	15	27066376	1804425		
Total	19	56278625			

S = 1343 R2 = 51.91% R2ajustado = 39.08%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+
0	4	2911	2438	(-----*-----)
1	4	5113	1001	(-----*-----)
2	4	3743	402	(-----*-----)
3	4	1561	448	(-----*-----)
4	4	2429	1308	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+
				2000 4000 6000 8000

Desv.Est. agrupada = 1343

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	4	5113	A
2	4	3743	A B
0	4	2911	A B
4	4	2429	A B
3	4	1561	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A 10. ANOVA unidireccional: Potencial Z (mV) vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	691.89	172.97	20.50	0.003
Error	5	42.19	8.44		
Total	9	734.09			

S = 2.905 R2 = 94.25% R2ajustado= 89.65%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	+-----+-----+-----+-----
0	2	5.550	0.778	(-----*-----)
1	2	6.250	0.212	(-----*-----)
2	2	6.300	0.424	(-----*-----)
3	2	25.250	1.626	(-----*-----)
4	2	20.100	6.223	(-----*-----)
				+-----+-----+-----+-----
				0.0 8.0 16.0 24.0

Desv.Est. agrupada = 2.905

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3	2	25.250	A
4	2	20.100	A
2	2	6.300	B
1	2	6.250	B
0	2	5.550	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A 11. ANOVA unidireccional: Turbidez (NTU) vs. Tratamiento

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	4	14890067	3722517	211.64	0.000
Error	15	263834	17589		
Total	19	15153901			

Resumen del modelo

S	R2	R2 ajustado	R2(pred)
132.623	98.26%	97.79%	96.90%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	4	1485.3	57.2	(1343.9, 1626.6)
1	4	2584.5	93.3	(2443.2, 2725.8)
2	4	3580	203	(3439, 3721)
3	4	3765.0	67.4	(3623.7, 3906.3)
4	4	3577.8	173.5	(3436.4, 3719.1)

Desv.Est. agrupada = 132.623

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3	4	3765.0	A
2	4	3580	A
4	4	3577.8	A
1	4	2584.5	B
0	4	1485.3	C

ANEXO B

ANOVAS DE LAS 9 FORMULACIONES

B 1. ANOVA Unidireccional: SKI vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	8	0.4624	0.05780	5.16	0.012
Error	9	0.1007	0.01119		
Total	17	0.5631			

Resumen del modelo

S	R ²	R ² (ajustado)	R ² (pred)
0.105789	82.11%	66.21%	28.45%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	0.3310	0.1230	(0.1618, 0.5002)
2	2	0.544	0.232	(0.375, 0.713)
3	2	0.7720	0.0622	(0.6028, 0.9412)
4	2	0.8170	0.0354	(0.6478, 0.9862)
5	2	0.769	0.150	(0.600, 0.938)
6	2	0.6585	0.0205	(0.4893, 0.8277)
7	2	0.8510	0.0311	(0.6818, 1.0202)
8	2	0.7920	0.0382	(0.6228, 0.9612)
9	2	0.8200	0.0368	(0.6508, 0.9892)

Desv.Est. agrupada = 0.105789

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
7	2	0.8510	A
9	2	0.8200	A
4	2	0.8170	A
8	2	0.7920	A
3	2	0.7720	A
5	2	0.769	A
6	2	0.6585	A B
2	2	0.544	A B
1	2	0.3310	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

B2. ANOVA Unidireccional: Diámetro promedio Vol (nm) vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	8	3512160	439020	2.78	0.075
Error	9	1423275	158142		
Total	17	4935434			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
397.670	71.16%	45.53%	0.00%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	1288	423	(652, 1924)
2	2	1313.3	107.5	(677.1, 1949.4)
3	2	2386	415	(1750, 3022)
4	2	2297	459	(1661, 2933)
5	2	2076	570	(1440, 2712)
6	2	1579	418	(943, 2215)
7	2	2346	183	(1709, 2982)
8	2	2357	337	(1721, 2993)
9	2	2332	451	(1696, 2968)

Desv.Est. agrupada = 397.670

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3	2	2386	A
8	2	2357	A
7	2	2346	A
9	2	2332	A
4	2	2297	A
5	2	2076	A
6	2	1579	A
2	2	1313.3	A
1	2	1288	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

B 3. ANOVA Unidireccional: diámetro promedio número (mn) vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	8	11357	1420	1.31	0.347
Error	9	9777	1086		
Total	17	21134			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
32.9593	53.74%	12.62%	0.00%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	244.063	0.831	(191.341, 296.784)
2	2	222.2	46.9	(169.5, 275.0)
3	2	193.68	7.64	(140.95, 246.40)
4	2	234.70	4.99	(181.98, 287.42)
5	2	262.00	2.33	(209.28, 314.72)
6	2	265.7	19.4	(213.0, 318.4)
7	2	251.2	43.5	(198.4, 303.9)
8	2	192.4	58.1	(139.7, 245.2)
9	2	230.2	42.8	(177.5, 283.0)

Desv.Est. agrupada = 32.9593

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
6	2	265.7	A
5	2	262.00	A
7	2	251.2	A
1	2	244.063	A
4	2	234.70	A
9	2	230.2	A
2	2	222.2	A
3	2	193.68	A
8	2	192.4	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

B 4. ANOVA Unidireccional: diámetro promedio área (mn) vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	8	49213	6152	1.07	0.457
Error	9	51805	5756		
Total	17	101018			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
75.8691	48.72%	3.13%	0.00%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	673.3	78.1	(551.9, 794.6)
2	2	572.4	15.7	(451.0, 693.7)
3	2	513.1	22.1	(391.8, 634.5)
4	2	660.38	11.84	(539.02, 781.73)
5	2	654	162	(532, 775)
6	2	576.8	43.1	(455.4, 698.1)
7	2	605.3	88.0	(483.9, 726.6)
8	2	591.8	91.6	(470.4, 713.1)
9	2	538.3	26.9	(416.9, 659.6)

Desv.Est. agrupada = 75.8691

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	2	673.3	A
4	2	660.38	A
5	2	654	A
7	2	605.3	A
8	2	591.8	A
6	2	576.8	A
2	2	572.4	A
9	2	538.3	A
3	2	513.1	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

B 5. ANOVA Unidireccional: Potencial Z (mV) vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	8	551.1	68.88	3.17	0.053
Error	9	195.7	21.75		
Total	17	746.8			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4.66327	73.79%	50.50%	0.00%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	18.75	2.47	(11.29, 26.21)
2	2	27.025	1.237	(19.566, 34.484)
3	2	27.13	7.67	(19.67, 34.58)
4	2	25.225	0.177	(17.766, 32.684)
5	2	30.78	4.14	(23.32, 38.23)
6	2	29.050	0.212	(21.591, 36.509)
7	2	31.30	10.25	(23.84, 38.76)
8	2	21.10	2.55	(13.64, 28.56)
9	2	13.900	0.636	(6.441, 21.359)

Desv.Est. agrupada = 4.66327

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
7	2	31.30	A
5	2	30.78	A
6	2	29.050	A
3	2	27.13	A
2	2	27.025	A
4	2	25.225	A
8	2	21.10	A
1	2	18.75	A
9	2	13.900	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

B 6. ANOVA Unidireccional: Superficie Calculada. vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	8	14.61	1.826	1.20	0.392
Error	9	13.68	1.520		
Total	17	28.29			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.23297	51.64%	8.65%	0.00%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	9.440	0.792	(7.468, 11.412)
2	2	10.725	1.351	(8.753, 12.697)
3	2	12.225	0.346	(10.253, 14.197)
4	2	9.2250	0.1202	(7.2528, 11.1972)
5	2	9.78	2.62	(7.80, 11.75)
6	2	10.870	0.467	(8.898, 12.842)
7	2	10.425	1.351	(8.453, 12.397)
8	2	10.030	0.438	(8.058, 12.002)
9	2	11.315	1.407	(9.343, 13.287)

Desv.Est. agrupada = 1.23297

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3	2	12.225	A
9	2	11.315	A
6	2	10.870	A
2	2	10.725	A
7	2	10.425	A
8	2	10.030	A
5	2	9.78	A
1	2	9.440	A
4	2	9.2250	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

B 7. ANOVA Unidireccional: PDI vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	8	4.7031	0.58789	7.53	0.003
Error	9	0.7025	0.07806		
Total	17	5.4056			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.279384	87.00%	75.45%	48.02%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	0.525	0.205	(0.078, 0.972)
2	2	0.505	0.233	(0.058, 0.952)
3	2	1.4000	0.0849	(0.9531, 1.8469)
4	2	0.7650	0.0354	(0.3181, 1.2119)
5	2	2.105	0.672	(1.658, 2.552)
6	2	1.0050	0.1061	(0.5581, 1.4519)
7	2	1.415	0.361	(0.968, 1.862)
8	2	1.730	0.000	(1.283, 2.177)
9	2	1.1300	0.0707	(0.6831, 1.5769)

Desv.Est. agrupada = 0.279384

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
5	2	2.105	A
8	2	1.730	A B
7	2	1.415	A B C
3	2	1.4000	A B C
9	2	1.1300	A B C
6	2	1.0050	A B C
4	2	0.7650	B C
1	2	0.525	C
2	2	0.505	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

B 8. ANOVA Unidireccional: D50 (mn) vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	8	155756	19469	0.46	0.859
Error	9	384010	42668		
Total	17	539765			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
206.562	28.86%	0.00%	0.00%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	944	334	(614, 1275)
2	2	651	218	(321, 982)
3	2	697.3	24.0	(366.9, 1027.7)
4	2	785.9	69.4	(455.5, 1116.3)
5	2	811.8	118.4	(481.3, 1142.2)
6	2	779	209	(448, 1109)
7	2	718	216	(387, 1048)
8	2	774	331	(444, 1104)
9	2	608.4	76.5	(278.0, 938.8)

Desv.Est. agrupada = 206.562

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	2	944	A
5	2	811.8	A
4	2	785.9	A
6	2	779	A
8	2	774	A
7	2	718	A
3	2	697.3	A
2	2	651	A
9	2	608.4	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

B 9. ANOVA Unidireccional: D90 vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento 9	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento 8	8	25352994	3169124	9.03	0.002
Error	9	3157432	350826		
Total	17	28510426			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
592.305	88.93%	79.08%	55.70%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	3291	1359	(2344, 4239)
2	2	2826	875	(1878, 3773)
3	2	5335	453	(4388, 6282)
4	2	5874	391	(4926, 6821)
5	2	5965.0	70.7	(5017.6, 6912.4)
6	2	5884	366	(4936, 6831)
7	2	6075.0	113.1	(5127.6, 7022.4)
8	2	5883.8	125.5	(4936.3, 6831.2)
9	2	6007.5	137.9	(5060.1, 6954.9)

Desv.Est. agrupada = 592.305

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
7	2	6075.0	A
9	2	6007.5	A
5	2	5965.0	A
8	2	5883.8	A
6	2	5884	A
4	2	5874	A
3	2	5335	A B
1	2	3291	B C
2	2	2826	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

B 10. ANOVA Unidireccional: MZ vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	8	4095814	511977	4.42	0.020
Error	9	1041952	115772		
Total	17	5137766			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
340.254	79.72%	61.69%	18.88%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	1434	485	(890, 1978)
2	2	1313.6	138.1	(769.3, 1857.9)
3	2	2077	266	(1533, 2621)
4	2	2640	538	(2096, 3184)
5	2	2362	238	(1817, 2906)
6	2	1153	455	(609, 1697)
7	2	2141	205	(1596, 2685)
8	2	2056	210	(1512, 2600)
9	2	2144	279	(1600, 2688)

Desv.Est. agrupada = 340.254

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
4	2	2640	A
5	2	2362	A B
9	2	2144	A B
7	2	2141	A B
3	2	2077	A B
8	2	2056	A B
1	2	1434	A B
2	2	1313.6	A B
6	2	1153	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO C

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LAS 9 FORMULACIONES CON RESPECTO A Z

C 1. ANÁLISIS DE REGRESIÓN POTENCIAL Z

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.97778954
Coefficiente de determinación R ²	0.95607239
R ² ajustado	0.84120279
Error típico	6.89993769
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	7	11398.1995	1628.31421	34.2017143	3.3E-06
Residuos	11	523.700541	47.6091401		
Total	18	11921.9			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	0	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
Variable X 1	30.470	8.407	3.624	0.004	11.966	48.973	11.966	48.973
Variable X 2	27.381	3.643	7.517	0.000	19.364	35.399	19.364	35.399
Variable X 3	20.607	11.798	1.747	0.109	-5.360	46.575	-5.360	46.575
Variable X 4	-1.408	9.456	-0.149	0.884	-22.221	19.405	-22.221	19.405
Variable X 5	-2.546	23.585	-0.108	0.916	-54.457	49.365	-54.457	49.365
Variable X 6	14.634	12.584	1.163	0.269	-13.062	42.330	-13.062	42.330
Variable X 7	23.716	19.500	1.216	0.249	-19.203	66.635	-19.203	66.635

Análisis de los residuales

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>
1	22.7645373	-5.76453732
2	22.7645373	-2.26453732
3	24.6441744	1.50582559
4	24.6441744	3.25582559
5	27.8113858	-6.11138583
6	27.8113858	4.73861417
7	20.0489698	5.05103017
8	20.0489698	5.30103017
9	27.3812029	6.31879709
10	27.3812029	0.46879709
11	27.4162883	1.78371173
12	27.4162883	1.48371173
13	26.8795949	-2.82959489
14	26.8795949	11.6704051
15	28.9142022	-6.0142022
16	28.9142022	-9.6142022
17	18.3896443	-4.03964434
18	18.3896443	-4.93964434

C 2. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DIÁMETRO VOLUMÉTRICO

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.98960796
Coefficiente de determinación R ²	0.97932391
R ² ajustado	0.87713696
Error típico	379.758868
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	75139202.7	10734171.8	74.4308014	8.0118E-08
Residuos	11	1586384.77	144216.798		
Total	18	76725587.5			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
Variable X 1	2304.53113	462.696453	4.98065441	0.00041501	1286.14	3322.919	1286.1431	3322.91915
Variable X 2	2261.3661	200.481644	11.2796666	2.1922E-07	1820.108	2702.623	1820.10897	2702.62322
Variable X 3	62.3025649	649.355641	0.09594521	0.92528973	-1366.919	1491.524	-1366.91956	1491.52469
Variable X 4	7.98197224	520.451028	0.01533664	0.98803824	-1137.523	1153.486	-1137.52302	1153.48696
Variable X 5	936.475091	1298.08889	0.72142601	0.48569914	-1920.599	3793.549	-1920.59929	3793.54948
Variable X 6	1427.37005	692.577686	2.06095298	0.06376051	-96.98316	2951.723	-96.9831629	2951.72325
Variable X 7	580.070571	1073.2352	0.54048784	0.59963341	-1782.104	2942.245	-1782.10418	2942.24532

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	1358.86494	228.135055
2	1358.86494	-370.364945
3	1357.88108	31.3689245
4	1357.88108	-120.631075
5	2434.6294	-341.879404
6	2434.6294	244.620596
7	2321.35252	-348.602524
8	2321.35252	299.897476
9	2261.3661	217.633904
10	2261.3661	-588.366096
11	1463.37898	411.37102
12	1463.37898	-179.87898
13	2227.48456	247.515445
14	2227.48456	-11.4845553
15	2289.39935	305.600651
16	2289.39935	-170.899349
17	2259.39307	-246.143072
18	2259.39307	392.106928

C 3. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DIÁMETRO NUMÉRICO

Estadísticas de la regresión

Coeficiente de correlación múltiple	0.99335451
Coeficiente de determinación R ²	0.98675318
R ² ajustado	0.88861855
Error típico	34.6601582
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	984352.52	140621.789	117.055422	8.7435E-09
Residuos	11	13214.5923	1201.32657		
Total	18	997567.113			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	162.160625	42.2297769	3.8399593	0.00274672	69.2135125	255.107737	69.2135125	255.107737
Variable X 2	254.1006	18.2977307	13.8870007	2.5586E-08	213.827566	294.373633	213.827566	294.373633
Variable X 3	241.522927	59.2659479	4.07523941	0.001835	111.079455	371.966398	111.079455	371.966398
Variable X 4	77.4059053	47.500971	1.62956469	0.1314684	-27.143027	181.954838	-27.143027	181.954838
Variable X 5	45.1804326	118.475091	0.38134963	0.71020697	-215.581484	305.942349	-215.581484	305.942349
Variable X 6	24.6332495	63.2107746	0.38970017	0.70419767	-114.492727	163.759226	-114.492727	163.759226
Variable X 7	-25.680934	97.9529513	-0.26217621	0.79803043	-241.273926	189.912058	-241.273926	189.912058

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	258.512904	-13.8629044
2	258.512904	-15.0379044
3	215.194077	-26.1440771
4	215.194077	40.2309229
5	196.786961	-8.51196097
6	196.786961	2.28803903
7	218.109286	20.1157141
8	218.109286	13.0657141
9	254.1006	9.54940033
10	254.1006	6.24940033
11	258.268019	-6.29301852
12	258.268019	21.1069815
13	234.540387	-14.165387
14	234.540387	47.384613
15	216.946513	-65.6215133
16	216.946513	16.6034867
17	243.716253	16.8087469
18	243.716253	-43.7662531

C 4. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DIÁMETRO ÁREA

Estadísticas de la regresión

Coeficiente de correlación múltiple	0.99527493
Coeficiente de determinación R ²	0.9905722
R ² ajustado	0.89452067
Error típico	74.8921371
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	6482473.16	926067.594	165.108807	1.6055E-09
Residuos	11	61697.1541	5608.83219		
Total	18	6544170.31			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	648.80649	91.2482344	7.11034569	1.9667E-05	447.97048	849.6425	447.97048	849.6425
Variable X 2	607.709451	39.5369273	15.3706799	8.8117E-09	520.689261	694.729642	520.689261	694.729642
Variable X 3	503.707014	128.059239	3.93339065	0.00233842	221.850529	785.563499	221.850529	785.563499
Variable X 4	-37.3578984	102.637997	-0.36397727	0.72277434	-263.262608	188.546811	-263.262608	188.546811
Variable X 5	-59.0310653	255.995737	-0.23059394	0.82186282	-622.473883	504.411752	-622.473883	504.411752
Variable X 6	137.069924	136.583046	1.0035647	0.33715405	-163.547333	437.687182	-163.547333	437.687182
Variable X 7	-21.0561886	211.652405	-0.09948476	0.9225433	-486.899992	444.787614	-486.899992	444.787614

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	668.019312	60.480688
2	668.019312	-50.019312
3	557.721459	25.7785411
4	557.721459	3.52854111
5	504.770862	23.9791379
6	504.770862	-7.27086209
7	643.383247	25.3667533
8	643.383247	8.61675329
9	607.709451	160.040549
10	607.709451	-68.4594514
11	596.634229	10.6157709
12	596.634229	-50.3842291
13	619.13211	-76.1321104
14	619.13211	48.3678896
15	623.658438	32.8415618
16	623.658438	-96.6584382
17	563.595891	-6.3458912
18	563.595891	-44.3458912

C 5. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE SUPERFICIE

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.99625582
Coefficiente de determinación R ²	0.99252567
R ² ajustado	0.89753967
Error típico	1.16373579
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	1978.20231	282.60033	208.671859	5.0425E-10
Residuos	11	14.8970908	1.35428098		
Total	18	1993.0994			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	8.97516311	1.41789031	6.32994175	5.5989E-05	5.85440757	12.0959186	5.85440757	12.0959186
Variable X 2	10.2889112	0.61435738	16.7474364	3.5545E-09	8.9367197	11.6411027	8.9367197	11.6411027
Variable X 3	12.3809809	1.98989006	6.22194214	6.5118E-05	8.00126235	16.7606994	8.00126235	16.7606994
Variable X 4	0.86903898	1.59487385	0.54489512	0.59669978	-2.64125469	4.37933264	-2.64125469	4.37933264
Variable X 5	0.4602845	3.97787287	0.11571121	0.90996677	-8.29495465	9.21552365	-8.29495465	9.21552365
Variable X 6	-2.60915974	2.12234001	-1.22937877	0.24457813	-7.2803986	2.06207912	-7.2803986	2.06207912
Variable X 7	0.77233159	3.28882961	0.23483478	0.8186511	-6.46633359	8.01099677	-6.46633359	8.01099677

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	9.52252755	-0.64252755
2	9.52252755	0.47747245
3	10.8824511	-1.11245113
4	10.8824511	0.79754887
5	12.3258244	-0.34582438
6	12.3258244	0.14417562
7	9.39450433	-0.25450433
8	9.39450433	-0.08450433
9	10.2889112	-2.36891118
10	10.2889112	1.34108882
11	10.6300213	-0.09002132
12	10.6300213	0.56997868
13	10.2397104	1.14028956
14	10.2397104	-0.76971044
15	9.70137838	0.01862162
16	9.70137838	0.63862162
17	11.0446713	1.2653287
18	11.0446713	-0.7246713

C.6 ANÁLISIS DE REGRESIÓN PDI

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.98633893
Coefficiente de determinación R ²	0.97286449
R ² ajustado	0.86715421
Error típico	0.27330869
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F			
Regresión	7	29.4587259	4.20838942	56.3389863	3.0898E-07			
Residuos	11	0.82167406	0.07469764					
Total	18	30.2804						

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	1.07147829	0.33299805	3.21767134	0.00819294	0.33855452	1.80440206	0.33855452	1.80440206
Variable X 2	2.0033988	0.14428465	13.8850444	2.5624E-08	1.68583043	2.32096718	1.68583043	2.32096718
Variable X 3	-1.19476997	0.46733482	-2.55656099	0.02668153	-2.22336697	0.16617297	2.22336697	0.16617297
Variable X 4	1.03754596	0.37456345	2.77001391	0.01822654	0.21313737	1.86195454	0.21313737	1.86195454
Variable X 5	2.48991454	0.93422171	2.66522872	0.02198051	0.43370642	4.54612265	0.43370642	4.54612265
Variable X 6	3.12548361	0.4984413	6.27051498	6.0829E-05	2.02842172	4.22254551	2.02842172	4.22254551
Variable X 7	1.73207954	0.77239674	2.24247392	0.04649927	0.03204578	3.43211329	0.03204578	3.43211329

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	0.42164842	0.24835158
2	0.42164842	-0.04164842
3	0.49947036	0.17052964
4	0.49947036	-0.15947036
5	1.35425477	0.10574523
6	1.35425477	-0.01425477
7	0.80892488	-0.01892488
8	0.80892488	-0.06892488
9	2.0033988	-0.3733988
10	2.0033988	0.5766012
11	1.11388122	-0.18388122
12	1.11388122	-0.03388122
13	1.55936941	-0.39936941
14	1.55936941	0.11063059
15	1.68723178	0.04276822
16	1.68723178	0.04276822
17	1.13182035	-0.05182035
18	1.13182035	0.04817965

C.7 ANÁLISIS DE REGRESIÓN D50

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.98086173
Coefficiente de determinación R ²	0.96208974
R ² ajustado	0.85050232
Error típico	192.244261
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	10317114.1	1473873.45	39.8798417	1.6182E-06
Residuos	11	406536.416	36957.856		
Total	18	10723650.6			

	Coefficiente s	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	815.382174	234.229521	3.48112471	0.00513826	299.846473	1330.91787	299.846473	1330.91787
Variable X 2	752.723323	101.489257	7.41677831	1.3315E-05	529.346974	976.099673	529.346974	976.099673
Variable X 3	769.017815	328.721476	2.33942067	0.03921234	45.5067238	1492.52891	45.5067238	1492.52891
Variable X 4	61.7317231	263.466457	-0.23430582	0.81905151	-641.617485	518.154039	-641.617485	518.154039
Variable X 5	598.647954	657.127881	-0.91100678	0.38182192	-2044.97667	847.68076	-2044.97667	847.68076
Variable X 6	159.761727	350.60165	0.45567876	0.65748478	-611.907302	931.430755	-611.907302	931.430755
Variable X 7	418.043971	543.300831	0.76945211	0.45782961	-777.753095	1613.84104	-777.753095	1613.84104

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	905.963448	274.536552
2	905.963448	-197.663448
3	641.732467	-144.432467
4	641.732467	163.567533
5	677.131617	3.16838275
6	677.131617	37.1683827
7	792.194884	42.8051155
8	792.194884	-55.3948845
9	752.723323	142.776677
10	752.723323	-24.7233234
11	826.904085	99.5959154
12	826.904085	-195.604085
13	774.777182	-209.977182
14	774.777182	95.7228176
15	775.899494	232.100506
16	775.899494	-235.899494
17	622.273498	-67.9734983
18	622.273498	40.2265017

C.8 ANÁLISIS DE REGRESIÓN D90

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.9932328
Coefficiente de determinación R ²	0.9865114
R ² ajustado	0.88824489
Error típico	800.327107
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	515303308	73614758.3	114.929055	9.5677E-09
Residuos	11	7045758.27	640523.479		
Total	18	522349067			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	4193.0242	975.114856	4.3000311	0.0012559	2046.81087	6339.23753	2046.81087	6339.23753
Variable X 2	6710.8986	422.5073	15.8835092	6.2304E-09	5780.9663	7640.83089	5780.9663	7640.83089
Variable X 3	1547.87772	1368.49187	1.13108288	0.28207755	-1464.15257	4559.90801	-1464.15257	4559.90801
Variable X 4	3014.85607	1096.83039	2.74869853	0.01893467	600.748665	5428.96347	600.748665	5428.96347
Variable X 5	540.105406	2735.67207	0.19743061	0.84709145	-5481.06822	6561.27903	-5481.06822	6561.27903
Variable X 6	4470.69554	1459.58065	3.063	0.01079398	1258.18019	7683.2109	1258.18019	7683.2109
Variable X 7	4898.08586	2261.80162	2.16556829	0.05318611	-80.1059444	9876.27767	-80.1059444	9876.27767

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	3815.44339	437.056609
2	3815.44339	-1485.19339
3	2935.49416	509.255838
4	2935.49416	-728.494162
5	5601.23678	-586.236784
6	5601.23678	53.763216
7	5760.07499	-162.574991
8	5760.07499	389.925009
9	6710.8986	-795.898596
10	6710.8986	-695.898596
11	5250.06245	374.937552
12	5250.06245	892.437552
13	5305.621	849.378996
14	5305.621	689.378996
15	5907.2304	-112.230399
16	5907.2304	65.2696008
17	5854.93823	55.0617748
18	5854.93823	250.061775

C.9 ANÁLISIS DE REGRESIÓN ZAV

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.99094753
Coefficiente de determinación R ²	0.98197701
R ² ajustado	0.88123719
Error típico	342.976715
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	70501170.1	10071595.7	85.6187757	4.0478E-08
Residuos	11	1293963.29	117633.027		
Total	18	71795133.4			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	2375.55561	417.881247	5.68476242	0.00014134	1455.80519	3295.30603	1455.80519	3295.30603
Variable X 2	2143.79677	181.063673	11.8400159	1.3352E-07	1745.27831	2542.31523	1745.27831	2542.31523
Variable X 3	-338.203717	586.461261	-0.57668552	0.57576278	-1628.99625	952.588815	-1628.99625	952.588815
Variable X 4	-173.143102	470.04191	-0.36835673	0.71959795	-1207.69837	861.412167	-1207.69837	861.412167
Variable X 5	1156.59503	1172.36041	0.98655244	0.3450655	-1423.75284	3736.9429	-1423.75284	3736.9429
Variable X 6	1505.53193	625.496965	2.40693723	0.03480264	128.822392	2882.24147	128.822392	2882.24147
Variable X 7	-287.900888	969.285287	-0.29702389	0.77198196	-2421.28342	1845.48164	-2421.28342	1845.48164

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	1437.1229	339.877105
2	1437.1229	-346.522895
3	1235.60902	175.640982
4	1235.60902	-19.6340183
5	2045.39878	-156.598781
6	2045.39878	219.351219
7	2534.1996	486.050397
8	2534.1996	-274.199603
9	2143.79677	385.953232
10	2143.79677	49.7032322
11	1227.54309	247.056913
12	1227.54309	-396.418087
13	2171.74867	-176.248669
14	2171.74867	114.001331
15	2242.70456	-37.9545635
16	2242.70456	-335.454564
17	2281.17662	-334.426616
18	2281.17662	59.8233838

C.10 ANÁLISIS DE REGRESIÓN Ski

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.99071657
Coefficiente de determinación R ²	0.98151933
R ² ajustado	0.88052988
Error típico	0.12657671
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	9.36012071	1.3371601	83.4595078	4.5855E-08
Residuos	11	0.17623829	0.01602166		
Total	18	9.536359			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	0.75224675	0.15422048	4.87773586	0.00048864	0.41280977	1.09168373	0.41280977	1.09168373
Variable X 2	0.84603033	0.06682216	12.6609254	6.6917E-08	0.69895576	0.99310491	0.69895576	0.99310491
Variable X 3	0.09781657	0.2164355	0.45194329	0.66009149	-0.37855474	0.57418789	-0.37855474	0.57418789
Variable X 4	0.17209396	0.17347054	0.99206444	0.3424875	-0.20971213	0.55390005	-0.20971213	0.55390005
Variable X 5	0.55741183	0.43266355	1.2883263	0.22407163	-0.39487422	1.50969787	-0.39487422	1.50969787
Variable X 6	0.51875816	0.23084175	2.2472458	0.04611201	0.01067889	1.02683744	0.01067889	1.02683744
Variable X 7	0.1949806	0.35771799	0.54506791	0.59658492	-0.59235139	0.98231258	-0.59235139	0.98231258

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	0.41417052	-0.17017052
2	0.41417052	0.00382948
3	0.54677675	0.16122325
4	0.54677675	-0.16677675
5	0.80810979	-0.08010979
6	0.80810979	0.00789021
7	0.7794155	0.0125845
8	0.7794155	0.0625845
9	0.84603033	-0.18303033
10	0.84603033	0.02896967
11	0.57255273	0.07144727
12	0.57255273	0.10044727
13	0.73558645	0.09341355
14	0.73558645	0.13741355
15	0.83038322	-0.01138322
16	0.83038322	-0.06538322
17	0.82147471	-0.02747471
18	0.82147471	0.02452529

ANEXO C

Modelo del L pseudo componente modificado

Modelo de L-pseudo componentes

1. Calcular el rango de cada composición R_i ($i = 1,2,3$)

$$U_i = \max(x_i)$$

$$L_i = \min(x_i)$$

$$R_i = U_i - L_i$$

El componente con el rango más amplio se define como k .

2. Calcular el promedio de cada composición $\langle x_i \rangle$ ($i = 1,2,3$)

$$\langle x_i \rangle = \frac{\sum_{j=1}^N x_{ij}}{N}$$

3. Calcular el pseudocomponente z_k (el del rango más amplio)

$$z_{kj} = \frac{x_{kj} - \langle x_k \rangle}{\langle x_k \rangle - L_k}$$

4. Calcular el pseudocomponente z_i ($i \neq k$)

$$z_{ij} = \frac{x_{ij} - \langle x_i \rangle}{\langle x_k \rangle - L_k}$$

ANEXO D

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LAS 9 FORMULACIONES CON RESPECTO A X

D 1. ANÁLISIS DE REGRESIÓN POTENCIAL Z

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.97778954
Coefficiente de determinación R ²	0.95607239
R ² ajustado	0.84120279
Error típico	6.89993769
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	11398.1995	1628.31421	34.2017143	3.3495E-06
Residuos	11	523.700541	47.6091401		
Total	18	11921.9			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	4723.53892	3926.8989	1.20286746	0.25427896	-3919.50728	13366.5851	-3919.50728	13366.5851
Variable X 2	437.670471	342.113667	1.27931303	0.22711358	-315.316632	1190.65757	-315.316632	1190.65757
Variable X 3	4480.55797	5762.51214	0.77753554	0.45324112	-8202.64573	17163.7617	-8202.64573	17163.7617
Variable X 4	-8465.24774	6755.77531	-1.25303867	0.2361729	-23334.6089	6404.11347	-23334.6089	6404.11347
Variable X 5	-40254.0725	36305.7934	-1.10875066	0.29119057	-120162.585	39654.44	-120162.585	39654.44
Variable X 6	-8259.97651	9269.47708	-0.89109412	0.3919529	-28661.958	12142.005	-28661.958	12142.005
Variable X 7	63619.9248	52309.8086	1.21621406	0.24935768	-51513.1877	178753.037	-51513.1877	178753.037

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	22.7645373	-5.76453732
2	22.7645373	-2.26453732
3	24.6441744	1.50582559
4	24.6441744	3.25582559
5	27.8113858	-6.11138583
6	27.8113858	4.73861417
7	20.0489698	5.05103017
8	20.0489698	5.30103017
9	27.3812029	6.31879709
10	27.3812029	0.46879709
11	27.4162883	1.78371173
12	27.4162883	1.48371173
13	26.8795949	-2.82959489
14	26.8795949	11.6704051
15	28.9142022	-6.0142022
16	28.9142022	-9.6142022
17	18.3896443	-4.03964434
18	18.3896443	-4.93964434

D 2. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DIÁMETRO VOLUMÉTRICO

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.98960796
Coefficiente de determinación R ²	0.97932391
R ² ajustado	0.87713696
Error típico	379.758868
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	75139202.7	10734171.8	74.4308014	8.0118E-08
Residuos	11	1586384.77	144216.798		
Total	18	76725587.5			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	112278.767	216128.717	0.51949953	0.61370523	-363417.331	587974.866	-363417.331	587974.866
Variable X 2	9834.18079	18829.2568	0.52228194	0.61183019	-31608.734	51277.0956	-31608.734	51277.0956
Variable X 3	-54157.9606	317157.224	-0.17076061	0.86751244	-752216.304	643900.383	-752216.304	643900.383
Variable X 4	-198863.162	371824.457	-0.53483077	0.60340982	-1017243.27	619516.949	-1017243.27	619516.949
Variable X 5	-791750.396	1998198.77	-0.39623205	0.69951176	-5189756.23	3606255.44	-5189756.23	3606255.44
Variable X 6	4438.27662	510173.61	0.00869954	0.99321463	-1118446.27	1127322.82	-1118446.27	1127322.82
Variable X 7	1556079.6	2879027.98	0.54048784	0.59963341	-4780618.26	7892777.47	-4780618.26	7892777.47

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	1358.86494	228.135055
2	1358.86494	-370.364945
3	1357.88108	31.3689245
4	1357.88108	-120.631075
5	2434.6294	-341.879404
6	2434.6294	244.620596
7	2321.35252	-348.602524
8	2321.35252	299.897476
9	2261.3661	217.633904
10	2261.3661	-588.366096
11	1463.37898	411.37102
12	1463.37898	-179.87898
13	2227.48456	247.515445
14	2227.48456	-11.4845553
15	2289.39935	305.600651
16	2289.39935	-170.899349
17	2259.39307	-246.143072
18	2259.39307	392.106928

D 3. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DIÁMETRO NUMÉRICO

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.99335451
Coefficiente de determinación R ²	0.98675318
R ² ajustado	0.88861855
Error típico	34.6601582
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	984352.52	140621.789	117.055422	8.7435E-09
Residuos	11	13214.5923	1201.32657		
Total	18	997567.113			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	-13614.8179	19725.8212	-0.69020285	0.50436877	-57031.0577	29801.4218	-57031.0577	29801.4218
Variable X 2	-1090.94036	1718.52477	-0.63481213	0.53853052	-4873.38788	2691.50715	-4873.38788	2691.50715
Variable X 3	-8497.91062	28946.5777	-0.2935722	0.77454963	-72208.8986	55213.0774	-72208.8986	55213.0774
Variable X 4	23816.5829	33935.9936	0.70180892	0.49737891	-50876.0354	98509.2012	-50876.0354	98509.2012
Variable X 5	51779.508	182373.32	0.28392041	0.78174435	-349621.463	453180.479	-349621.463	453180.479
Variable X 6	16759.5022	46562.9628	0.35993204	0.72571318	-85724.8881	119243.892	-85724.8881	119243.892
Variable X 7	-68890.8895	262765.597	-0.26217621	0.79803043	-647234.069	509452.289	-647234.069	509452.289

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	258.512904	-13.8629044
2	258.512904	-15.0379044
3	215.194077	-26.1440771
4	215.194077	40.2309229
5	196.786961	-8.51196097
6	196.786961	2.28803903
7	218.109286	20.1157141
8	218.109286	13.0657141
9	254.1006	9.54940033
10	254.1006	6.24940033
11	258.268019	-6.29301852
12	258.268019	21.1069815
13	234.540387	-14.165387
14	234.540387	47.384613
15	216.946513	-65.6215133
16	216.946513	16.6034867
17	243.716253	16.8087469
18	243.716253	-43.7662531

D 4. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DIÁMETRO ÁREA

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.99527493
Coefficiente de determinación R ²	0.9905722
R ² ajustado	0.89452067
Error típico	74.8921371
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	6482473.16	926067.594	165.108807	1.6055E-09
Residuos	11	61697.1541	5608.83219		
Total	18	6544170.31			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	4575.41636	42622.6821	0.10734698	0.91644659	-89236.4744	98387.3071	-89236.4744	98387.3071
Variable X 2	-843.536371	3713.31232	-0.22716548	0.82446179	-9016.48168	7329.40894	-9016.48168	7329.40894
Variable X 3	-19574.6488	62546.4849	-0.31296161	0.76016347	-157238.534	118089.236	-157238.534	118089.236
Variable X 4	62.0887153	73327.3941	0.00084673	0.99933957	-161330.418	161454.595	-161330.418	161454.595
Variable X 5	23906.1739	394064.205	0.06066568	0.95271365	-843423.292	891235.64	-843423.292	891235.64
Variable X 6	36305.2575	100611.191	0.36084711	0.72504798	-185138.481	257748.996	-185138.481	257748.996
Variable X 7	-56484.6887	567772.281	-0.09948476	0.9225433	-1306143.05	1193173.68	-1306143.05	1193173.68

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	668.019312	60.480688
2	668.019312	-50.019312
3	557.721459	25.7785411
4	557.721459	3.52854111
5	504.770862	23.9791379
6	504.770862	-7.27086209
7	643.383247	25.3667533
8	643.383247	8.61675329
9	607.709451	160.040549
10	607.709451	-68.4594514
11	596.634229	10.6157709
12	596.634229	-50.3842291
13	619.13211	-76.1321104
14	619.13211	48.3678896
15	623.658438	32.8415618
16	623.658438	-96.6584382
17	563.595891	-6.3458912
18	563.595891	-44.3458912

D 5. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE SUPERFICIE

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.99625582
Coefficiente de determinación R ²	0.99252567
R ² ajustado	0.89753967
Error típico	1.16373579
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	1978.20231	282.60033	208.671859	5.0425E-10
Residuos	11	14.8970908	1.35428098		
Total	18	1993.0994			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	-7.40753288	662.306384	-0.01118445	0.99127656	-1465.13405	1450.31899	-1465.13405	1450.31899
Variable X 2	42.5198954	57.700509	0.73690676	0.47660266	-84.4780687	169.51786	-84.4780687	169.51786
Variable X 3	514.431243	971.898863	0.52930532	0.60711012	-1624.70373	2653.56622	-1624.70373	2653.56622
Variable X 4	-99.0471054	1139.42152	-0.08692754	0.93229132	-2606.89696	2408.80275	-2606.89696	2408.80275
Variable X 5	-1206.03148	6123.29458	-0.19695794	0.8474524	-14683.312	12271.249	-14683.312	12271.249
Variable X 6	-864.735293	1563.37965	-0.55311919	0.5912456	-4305.71071	2576.24013	-4305.71071	2576.24013
Variable X 7	2071.83314	8822.51392	0.23483478	0.8186511	-17346.3891	21490.0554	-17346.3891	21490.0554

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	9.52252755	-0.64252755
2	9.52252755	0.47747245
3	10.8824511	-1.11245113
4	10.8824511	0.79754887
5	12.3258244	-0.34582438
6	12.3258244	0.14417562
7	9.39450433	-0.25450433
8	9.39450433	-0.08450433
9	10.2889112	-2.36891118
10	10.2889112	1.34108882
11	10.6300213	-0.09002132
12	10.6300213	0.56997868
13	10.2397104	1.14028956
14	10.2397104	-0.76971044
15	9.70137838	0.01862162
16	9.70137838	0.63862162
17	11.0446713	1.2653287
18	11.0446713	-0.7246713

D.6 ANÁLISIS DE REGRESIÓN PDI

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.98633893
Coefficiente de determinación R ²	0.97286449
R ² ajustado	0.86715421
Error típico	0.27330869
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	29.4587259	4.20838942	56.3389863	3.0898E-07
Residuos	11	0.82167406	0.07469764		
Total	18	30.2804			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	199.935788	155.545696	1.28538297	0.22506133	-142.41798	542.289555	-142.41798	542.289555
Variable X 2	17.6392762	13.5512295	1.30167349	0.21962811	-12.1867789	47.4653312	-12.1867789	47.4653312
Variable X 3	26.6563642	228.254911	0.11678331	0.9091367	-475.729308	529.042036	-475.729308	529.042036
Variable X 4	-398.090577	267.598376	-1.48764197	0.16494029	-987.070632	190.889478	-987.070632	190.889478
Variable X 5	-2423.30266	1438.08385	-1.68509135	0.12009656	-5588.50388	741.898553	-5588.50388	741.898553
Variable X 6	-206.186659	367.166891	-0.56156114	0.58567424	-1014.31554	601.942219	-1014.31554	601.942219
Variable X 7	4646.42369	2072.00791	2.24247392	0.04649927	85.9650323	9206.88234	85.9650323	9206.88234

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	0.42164842	0.24835158
2	0.42164842	-0.04164842
3	0.49947036	0.17052964
4	0.49947036	-0.15947036
5	1.35425477	0.10574523
6	1.35425477	-0.01425477
7	0.80892488	-0.01892488
8	0.80892488	-0.06892488
9	2.0033988	-0.3733988
10	2.0033988	0.5766012
11	1.11388122	-0.18388122
12	1.11388122	-0.03388122
13	1.55936941	-0.39936941
14	1.55936941	0.11063059
15	1.68723178	0.04276822
16	1.68723178	0.04276822
17	1.13182035	-0.05182035
18	1.13182035	0.04817965

D.7 ANÁLISIS DE REGRESIÓN D50

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.98086173
Coefficiente de determinación R ²	0.96208974
R ² ajustado	0.85050232
Error típico	192.244261
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	10317114.1	1473873.45	39.8798417	1.6182E-06
Residuos	11	406536.416	36957.856		
Total	18	10723650.6			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	96905.9893	109410.231	0.88571232	0.3947227	-143904.306	337716.285	-143904.306	337716.285
Variable X 2	6704.36641	9531.88161	0.70336232	0.49644784	-14275.1636	27683.8964	-14275.1636	27683.8964
Variable X 3	106647.674	160553.608	0.66424963	0.52021141	-246728.434	460023.782	-246728.434	460023.782
Variable X 4	-156345.003	188227.647	-0.83061658	0.42385205	-570631.261	257941.254	-570631.261	257941.254
Variable X 5	-816472.193	1011542.53	-0.80715557	0.43668216	-3042862.29	1409917.91	-3042862.29	1409917.91
Variable X 6	-164556.837	258263.749	-0.63716584	0.5370523	-732991.516	403877.841	-732991.516	403877.841
Variable X 7	1121431.99	1457442.22	0.76945211	0.45782961	-2086376.71	4329240.7	-2086376.71	4329240.7

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	905.963448	274.536552
2	905.963448	-197.663448
3	641.732467	-144.432467
4	641.732467	163.567533
5	677.131617	3.16838275
6	677.131617	37.1683827
7	792.194884	42.8051155
8	792.194884	-55.3948845
9	752.723323	142.776677
10	752.723323	-24.7233234
11	826.904085	99.5959154
12	826.904085	-195.604085
13	774.777182	-209.977182
14	774.777182	95.7228176
15	775.899494	232.100506
16	775.899494	-235.899494
17	622.273498	-67.9734983
18	622.273498	40.2265017

D.8 ANÁLISIS DE REGRESIÓN D90

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.9932328
Coefficiente de determinación R ²	0.9865114
R ² ajustado	0.88824489
Error típico	800.327107
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	515303308	73614758.3	114.929055	9.5677E-09
Residuos	11	7045758.27	640523.479		
Total	18	522349067			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	618389.96	455482.901	1.3576579	0.20177076	-384121.146	1620901.07	-384121.146	1620901.07
Variable X 2	55238.4153	39681.9296	1.39202947	0.19141689	-32100.9228	142577.753	-32100.9228	142577.753
Variable X 3	774507.965	668396.568	1.15875515	0.27109345	-696622.962	2245638.89	-696622.962	2245638.89
Variable X 4	-1110143.31	783605.643	-1.41671174	0.1842597	-2834847.7	614561.08	-2834847.7	614561.08
Variable X 5	-8107885	4211126.53	-1.92534823	0.08041938	-17376512	1160741.99	-17376512	1160741.99
Variable X 6	-1426321.52	1075171.13	-1.32659954	0.21152307	-3792757.22	940114.172	-3792757.22	940114.172
Variable X 7	13139455.6	6067439.99	2.16556829	0.05318611	-214889.761	26493801	-214889.761	26493801

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	3815.44339	437.056609
2	3815.44339	-1485.19339
3	2935.49416	509.255838
4	2935.49416	-728.494162
5	5601.23678	-586.236784
6	5601.23678	53.763216
7	5760.07499	-162.574991
8	5760.07499	389.925009
9	6710.8986	-795.898596
10	6710.8986	-695.898596
11	5250.06245	374.937552
12	5250.06245	892.437552
13	5305.621	849.378996
14	5305.621	689.378996
15	5907.2304	-112.230399
16	5907.2304	65.2696008
17	5854.93823	55.0617748
18	5854.93823	250.061775

D.9 ANÁLISIS DE REGRESIÓN ZAv

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99094753
Coefficiente de determinación R ²	0.98197701
R ² ajustado	0.88123719
Error típico	342.976715
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	70501170.1	10071595.7	85.6187757	4.0478E-08
Residuos	11	1293963.29	117633.027		
Total	18	71795133.4			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	-25188.0481	195195.224	-0.12904029	0.89965497	-454809.839	404433.743	-454809.839	404433.743
Variable X 2	-7317.63587	17005.519	-0.43030947	0.67528003	-44746.5308	30111.2591	-44746.5308	30111.2591
Variable X 3	-297542.625	286438.453	-1.03876634	0.32120824	-927989.41	332904.16	-927989.41	332904.16
Variable X 4	66037.0491	335810.804	0.19664957	0.84768791	-673077.546	805151.644	-673077.546	805151.644
Variable X 5	705992.863	1804660.03	0.39120546	0.70311664	-3266037.08	4678022.81	-3266037.08	4678022.81
Variable X 6	425233.47	460759.928	0.92289595	0.37586112	-588892.294	1439359.23	-588892.294	1439359.23
Variable X 7	-772314.134	2600175.12	-0.29702389	0.77198196	-6495260.99	4950632.72	-6495260.99	4950632.72

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	1437.1229	339.877105
2	1437.1229	-346.522895
3	1235.60902	175.640982
4	1235.60902	-19.6340183
5	2045.39878	-156.598781
6	2045.39878	219.351219
7	2534.1996	486.050397
8	2534.1996	-274.199603
9	2143.79677	385.953232
10	2143.79677	49.7032322
11	1227.54309	247.056913
12	1227.54309	-396.418087
13	2171.74867	-176.248669
14	2171.74867	114.001331
15	2242.70456	-37.9545635
16	2242.70456	-335.454564
17	2281.17662	-334.426616
18	2281.17662	59.8233838

D.10 ANÁLISIS DE REGRESIÓN Ski

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.99071657
Coefficiente de determinación R ²	0.98151933
R ² ajustado	0.88052988
Error típico	0.12657671
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	7	9.36012071	1.3371601	83.4595078	4.5855E-08
Residuos	11	0.17623829	0.01602166		
Total	18	9.536359			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Variable X 1	15.3439789	72.0374525	0.21300002	0.83522301	-143.209385	173.897343	-143.209385	173.897343
Variable X 2	2.22053823	6.27594386	0.35381742	0.73016416	-11.5927211	16.0337975	-11.5927211	16.0337975
Variable X 3	-25.6116198	105.711073	-0.24227944	0.81302146	-258.280122	207.056882	-258.280122	207.056882
Variable X 4	-34.1372717	123.932104	-0.2754514	0.78807502	-306.909994	238.63545	-306.909994	238.63545
Variable X 5	-219.289624	666.01584	-0.32925587	0.74814632	-1685.18061	1246.60136	-1685.18061	1246.60136
Variable X 6	9.01605217	170.044998	0.05302157	0.95866539	-365.250465	383.282569	-365.250465	383.282569
Variable X 7	523.048993	959.603355	0.54506791	0.59658492	-1589.02375	2635.12174	-1589.02375	2635.12174

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	0.41417052	-0.17017052
2	0.41417052	0.00382948
3	0.54677675	0.16122325
4	0.54677675	-0.16677675
5	0.80810979	-0.08010979
6	0.80810979	0.00789021
7	0.7794155	0.0125845
8	0.7794155	0.0625845
9	0.84603033	-0.18303033
10	0.84603033	0.02896967
11	0.57255273	0.07144727
12	0.57255273	0.10044727
13	0.73558645	0.09341355
14	0.73558645	0.13741355
15	0.83038322	-0.01138322
16	0.83038322	-0.06538322
17	0.82147471	-0.02747471
18	0.82147471	0.02452529

ANEXO E

OPTIMIZACIÓN DE FORMULACIONES DE EMULSIÓN

E 1. OPTIMIZACIÓN DE FORMULACIÓN 1

Mz	PDI	x1	x2	x3	z1	yz	ypdi
2375.55561	1.07147829	0.186	0.647	0.167	0.16425486	390.196549	0.17599551
2143.79677	2.0033988	0.125	0.625	0.09090909	0.30942935	663.353646	0.6199104
						-	
-338.203717	-1.19476997	0.22727273	0.77272727	0.16666667	0.52631579	178.001956	-0.6288263
						-	
-173.143102	1.03754596				0.05082527	8.80004565	0.05273356
1156.59503	2.48991454	0.1860638	0.64726954	0.83333333	0.08644993	99.9875538	0.21525293
1505.53193	3.12548361			0.22327656	0.16285755	245.187248	0.50900862
						-	
-287.900888	1.73207954				0.02675014	7.70139034	0.04633338
						1204.2216	0.99040809

E 2. OPTIMIZACIÓN DE FORMULACIÓN 2

Mz	PDI	x1	x2	x3	z1	yz	ypdi
2375.55561	1.07147829	0.208	0.625	0.167	0.47368421	1125.26318	0.50754235
2143.79677	2.0033988	0.125	0.625	0.09090909	0	0	0
						-	
-338.203717	1.19476997	0.22727273	0.77272727	0.16666667	0.52631579	178.001956	-0.6288263
						-	
-173.143102	1.03754596				0	0	0
1156.59503	2.48991454				0.24930748	288.347791	0.62075432
1505.53193	3.12548361				0	0	0
-287.900888	1.73207954				0	0	0
						1235.60902	0.49947036

ANEXO F

RESULTADOS COMPLETOS DE PRUEBA DE DPPH DE FORMULACIONES OPTIMIZADAS DE EMULSIONES

Muestra	Fórmula	Réplica	Absorbancia	DPPH	% inhibición	ppm (µg/mL)	mgTrolox/100mL		
Cáscara	1	1	0.4240	0.603	29.685	1479.66	147.9655	MEDIA	149.62
			0.4230	0.603	29.851	1487.95	148.7947	DE	2.19
			0.4190	0.603	30.514	1521.11	152.1115	CV	1.47
	1	2	0.4270	0.603	29.187	1454.78	145.4780	MEDIA	146.03
			0.4240	0.603	29.685	1479.66	147.9655	DE	1.73
			0.4280	0.603	29.022	1446.49	144.6488	CV	1.18
	2	1	0.4250	0.603	29.519	1471.36	147.1364	MEDIA	148.24
			0.4230	0.603	29.851	1487.95	148.7947	DE	0.96
			0.4230	0.603	29.851	1487.95	148.7947	CV	0.65
	2	2	0.4060	0.603	32.670	1628.91	162.8909	MEDIA	164.83
			0.4010	0.603	33.499	1670.37	167.0368	DE	2.09
			0.4040	0.603	33.002	1645.49	164.5493	CV	1.27
cáscara control	1		0.4580	0.603	24.046	1197.73	119.7732	MEDIA	121.16
			0.4570	0.603	24.212	1206.02	120.6024	DE	1.73
			0.4540	0.603	24.710	1230.90	123.0899	CV	1.42
	2		0.3960	0.603	34.328	1711.83	171.1828	MEDIA	170.35
			0.4000	0.603	33.665	1678.66	167.8660	DE	2.19
			0.3950	0.603	34.494	1720.12	172.0120	CV	1.29
Pulpa	1	1	0.4320	0.603	28.358	1413.32	141.3320	MEDIA	140.50
			0.4330	0.603	28.192	1405.03	140.5029	DE	0.83
			0.4340	0.603	28.027	1396.74	139.6737	CV	0.59
	1	2	0.4320	0.603	28.358	1413.32	141.3320	MEDIA	140.50
			0.4330	0.603	28.192	1405.03	140.5029	DE	0.83
			0.4340	0.603	28.027	1396.74	139.6737	CV	0.59
	2	1	0.4360	0.603	27.695	1380.15	138.0153	MEDIA	140.23
			0.4330	0.603	28.192	1405.03	140.5029	DE	2.09
			0.4310	0.603	28.524	1421.61	142.1612	CV	1.49
	2	2	0.4430	0.603	26.534	1322.11	132.2110	MEDIA	131.93
			0.4410	0.603	26.866	1338.69	133.8694	DE	2.09
			0.4460	0.603	26.036	1297.23	129.7234	CV	1.58
pulpa control	1		0.3940	0.603	34.660	1728.41	172.8412	MEDIA	174.78
			0.3910	0.603	35.158	1753.29	175.3287	DE	1.73
			0.3900	0.603	35.323	1761.58	176.1579	CV	0.99
	2		0.3640	0.603	39.635	1977.17	197.7168	MEDIA	197.72
			0.3620	0.603	39.967	1993.75	199.3752	DE	1.66
			0.3660	0.603	39.303	1960.58	196.0584	CV	0.84
Cáscara	1		0.1850	0.603	69.320	3461.41	346.1413	MEDIA	345.31
			0.1860	0.603	69.154	3453.12	345.3121	DE	0.83
			0.1870	0.603	68.988	3444.83	344.4830	CV	0.24
pulpa	1		0.4360	0.603	27.695	2760.31	276.0306	MEDIA	271.61
			0.4410	0.603	26.866	2677.39	267.7387	DE	4.17
			0.4390	0.603	27.197	2710.55	271.0555	CV	1.54