

**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad
Iztapalapa**



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Obtención de betalainas en variantes de *Stenocereus stellatus* y su encapsulación en coacervados complejos”

T E S I S

QUE PRESENTA

CLARA CERVANTES ARISTA

Con matrícula: 2153804198

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

DIRECTORES

Dra. Angélica Román Guerrero

Dr. José Alberto Mendoza Espinoza

ASESOR

Dr. Fernando Díaz de León Sánchez

Ciudad de México a 26 de noviembre de 2021

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo.

Ciudad de México a 26 de noviembre de 2021

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis

**“Obtención de betalainas en variantes de *Stenocereus
stellatus* y su encapsulación en coacervados complejos”**

Que presentó:

Clara Cervantes Arista

Comité tutorial

Directora: Dra. Angélica Román Guerrero.
Universidad Autónoma Metropolitana

Co-director: Dr. José Alberto Mendoza Espinoza.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Asesor: Dr. Fernando Díaz de León Sánchez.
Universidad Autónoma Metropolitana

Comité de evaluación:

Presidente: Dr. Fernando Rivera Cabrera

Secretario: Dr. Fernando Díaz de León
Sánchez

Vocal: Dr. César Uriel López Palestina

Vocal: Dr. Daniel Trujillo Ramírez



The image shows four blue ink signatures on horizontal lines, corresponding to the members of the evaluation committee. The signatures are: 1. Dr. Fernando Rivera Cabrera (President), 2. Dr. Fernando Díaz de León Sánchez (Secretary), 3. Dr. César Uriel López Palestina (Vocal), and 4. Dr. Daniel Trujillo Ramírez (Vocal).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00256

Matrícula: 2153804198

Obtención de betalainas en variantes de *Stenocereus stellatus* y su encapsulación en coacervados complejos.



CLARA CERVANTES ARISTA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 9:00 horas del día 17 del mes de diciembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA
DR. CESAR URIEL LOPEZ PALESTINA
DR. DANIEL TRUJILLO RAMIREZ
DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: CLARA CERVANTES ARISTA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

VOCAL

DR. CESAR URIEL LOPEZ PALESTINA

VOCAL

DR. DANIEL TRUJILLO RAMIREZ

SECRETARIO

DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ

AGRADECIMIENTOS

Un documento de tesis además de ser un trabajo de laboratorio altamente demandante y extraordinariamente gratificante. Es también un conjunto de esfuerzo, paciencia, dedicación, asistencia y resiliencia que muestra cada una de las personas que forman parte de este nuestro proyecto.

Agradezco a mis padres simplemente por dejarme ser quien soy ahora.

A mis directores la Dra. Angélica Román al Dr. José Alberto Mendoza por su paciencia, confianza, tiempo y dedicación durante el desarrollo del proyecto. Así como por permitirme desarrollar este proyecto en sus respectivos espacios.

A mi asesor el Dr. Fernando Díaz de León por su colaboración durante todo el proyecto.

Al Mtro. Edgar Sierra Palacios por compartir su conocimiento conmigo, por dejarme aprender, por su gran paciencia. Y sobre todo por su confianza.

A la Mtra. Erika Álvarez Ramírez por formar parte de este proyecto y por su importante contribución.

A la Dra. Clara Pelayo Zaldívar por todo el apoyo brindado y sobre todo por iniciarme en esta gran experiencia.

A Bernita García Ocón por permitirme formar parte de ese bonito espacio donde desarrolle gran parte de este proyecto.

A Dagoberto Castillo y Trinidad por su colaboración y apoyo en la etapa inicial y fundamental del proyecto.

Así como a todas esas personitas que estuvieron ahí en UACM-CL y UAM-I, fomentando mi crecimiento como estudiante y como persona.

También se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo económico asignado para el proyecto de doctorado (592824), así como también por el proyecto Divisional de la UAM Iztapalapa “Obtención de metabolitos secundarios, a partir de tejidos vegetales y cultivos celulares, mediante técnicas convencionales y emergentes y su incorporación en sistemas de micro y nanoencapsulación” aprobado en la sesión 17.18 del Consejo Divisional.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
1. Introducción.....	7
2. Antecedentes.....	10
2.1 Descripción de <i>Stenocereus stellatus</i>	10
2.1.1 Clasificación molecular de variantes de <i>S. stellatus</i>	10
2.1.2 Clasificación de <i>S. stellatus</i> mediante el sistema ML	12
2.2 Betalaínas	13
2.3 Propiedades bioactivas	15
2.4 Aplicaciones de las betalaínas.....	17
2.5 Estabilidad de las betalaínas.....	17
2.6 Protección de betalaínas por encapsulación	19
2.6.1 Encapsulación por coacervación compleja.	20
2.6.2 Goma arábiga y proteína de suero de leche.....	22
3. Justificación	24
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos	27
5.1 Objetivo general.....	27
5.2 Objetivos específicos.....	27
6. Metodología.....	28
6.1 Materiales	29
6.2 Material vegetal	29
6.3 Clasificación de los frutos de <i>S. stellatus</i>	31
6.3.1 Análisis molecular.....	31
6.3.2 Construcción de árbol filogenético	33
6.3.3 Uso de algoritmos matemáticos	34
6.4 Caracterización física de los frutos	34
6.4.1 Porcentaje de pulpa, epicarpio y semilla.....	34
6.5 Caracterización fisicoquímica de los frutos.....	35
6.5.1 Contenido de sólidos solubles totales (SST)	35
6.5.2 Determinación de pH.....	35
6.5.3 Determinación de acidez titulable.....	35
6.5.4 Cuantificación de azúcares.....	35
6.5.5 Determinación de ácidos orgánicos	36
6.5.6 Contenido de fenoles totales (CFT)	36
6.5.7 Contenido de flavonoides totales.....	37
6.5.8 Contenido de betalaínas.....	37
6.5.9 Determinación de betalaínas por HPLC.....	38
6.6 Evaluación de capacidad antioxidante (CA) por ABTS ⁺	38
6.7 Actividad anti-hiperglucemiante.....	39
6.8 Optimización de extracción por Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)	40
6.9 Encapsulación de betalaínas por coacervación compleja (CC)	42
6.9.1 Condiciones de CC	42
6.9.2 Incorporación de extracto de <i>S. stellatus</i> en CC.....	42

6.10 Caracterización de CC.....	43
6.10.1 Rendimiento de coacervación	43
6.10.2 Potencial zeta de CC	44
6.10.3 Espectroscopia de FTIR.....	44
6.10.4 Eficiencia de encapsulación de betalaínas	44
6.10.5 Microscopia óptica de CC.....	45
6.11 Estabilidad térmica de los CC.....	45
6.12 Análisis estadístico.....	45
7. Resultados y discusión	46
7.1 Análisis molecular.....	46
7.2 Análisis matemático	51
7.3 Caracterización fisicoquímica de los frutos	54
7.3.1 Porcentaje de pulpa, cáscara y semilla.....	54
7.3.2 Caracterización química.....	55
7.3.3 Efecto anti-hiperglucemiante.....	57
7.4 Optimización de las condiciones de extracción de los compuestos bioactivos de <i>S. stellatus</i>	61
7.5 Encapsulación de betalaínas.....	66
7.5.1 Obtención de coacervados complejos (CC)	66
7.5.2 Estabilidad a la temperatura.....	73
8. Conclusiones	77
9. Referencias	79
A N E X O S.....	90
Anexo A.....	91
Publicación.....	91
Anexo B.....	92
Productos de trabajo presentados en eventos especializados.....	92
A n e x o 1.....	101
Secuencias del marcador <i>psbA-trnH</i>	101
Secuencias del marcador <i>matK</i>	106
A n e x o 2.....	111
Espectros de absorción de T1 a T4	111
A n e x o 3.....	115
ANOVA optimización condiciones de extracción	115

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Condiciones de PCR para los marcadores <i>psbA-trnH</i> y <i>matK</i> . Ciclos temperatura-tiempo (T _{mp})	31
Cuadro 2. Grupos experimentales utilizados para determinación de actividad antihiperglucemiante (n=5-6 ratas por grupo).....	39
Cuadro 3. Diseño de experimentos Box Behnken para la extracción de betalaínas.	41
Cuadro 4. Diseño de experimentos Box Behnken para la extracción de CFT y CA.	41
Cuadro 5. Porcentaje de pulpa, epicarpio y semilla en frutos de <i>S. stellatus</i>	54
Cuadro 6. Composición química de frutos de <i>S. stellatus</i>	55
Cuadro 7. Resultados del diseño de experimentos Box Behnken para la extracción de betalaínas.....	61
Cuadro 8. Resultados del diseño de experimentos Box Behnken para la extracción de CFT y CA.	62
Cuadro 9. Modelos de segundo orden obtenidos del análisis de la MSR.....	65
Cuadro 10. Comparación de los rendimientos de extracción teóricos y experimentales bajo condiciones óptimas de extracción.	65
Cuadro 11. Parámetros de degradación de BX y BC para los coacervados y pulpa liofilizada	75

Índice de Figuras

Figura 1. El DNA barcoding tiene como principio la obtención una región específica que se usa para la comparación entre especímenes (Creado en BioRender.com).	12
Figura 2. Estructuras químicas de las betalaínas y el ácido betalámico como precursor. Fuente propia	14
Figura 3. Estructuras químicas de indixantina y betanina, principales betalaínas en frutos de cactáceas (Khan y Giridhar, 2015). Fuente propia.....	15
Figura 4. Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas.....	19
Figura 5. Diagrama esquemático del proceso de coacervación compleja. (Creado en Biorender.com)	21
Figura 6. Estrategia experimental utilizada para la realización del proyecto.	28
Figura 7. Etapas del procesamiento de los frutos de <i>S. stellatus</i> previo a su almacenamiento.	30
Figura 8. Diagrama esquemático del proceso de transformación de <i>Escherichiae coli</i> (DH5 α).	33
Figura 9. Diagrama esquemático del proceso de encapsulación de betalaínas.	43
Figura 10. a) Productor realizando la cosecha de <i>S. stellatus</i> , b) Frutos recibidos en las instalaciones de UAM-I, c) T1, variante blanca, d) T2, variante roja, e) T3, variante púrpura, f) T4 variante naranja.	46
Figura 11. a) Perfil electroforético del marcador λ ps _{tl} para peso molecular de ADN (Jena Bioscience ®), b) Evaluación cualitativa de la extracción de ADN en T1-T4	

respecto a estándar λ psstI, b) Perfil de PCR para T1-T4 marcador <i>psbA-trnH</i> y c) Perfil de PCR para T1-T4 marcador <i>matK</i>	47
Figura 12. Cultivos de células de <i>E. coli</i> transformantes obtenidas con los productos de amplificación del marcador <i>psbA-trnH</i> (superior) y <i>matK</i> (inferior) para las muestras T1-T4.	49
Figura 13. Árbol filogenético obtenido para las muestras T1-T4 basado en los productos de amplificación del marcador a) <i>psbA-trnH</i> y b) <i>matK</i>	50
Figura 14. Espectros normalizados de las variantes de <i>S. stellatus</i> correspondientes al promedio de 76 escaneos para todas las muestras.	52
Figura 15. Resultados de la clasificación supervisada de las variantes de <i>S. stellatus</i> : a) Espacio CIELab, b) árbol de decisión, c) SMV, y d) K-neighbors....	53
Figura 16. Prueba de tolerancia a la glucosa bajo diferentes dosis de pulpa liofilizada para las cuatro variantes a) T1, b) T2, c) T3, y d) T4. Valores seguidos por un (*) indican similitud con metformina, valores seguidos por un (+) indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.	58
Figura 17. Área bajo la curva Prueba de tolerancia a la glucosa en los diferentes tratamientos de pulpa liofilizada ((a) T1, b) T2, c) T3, y d) T4), control y metformina. Valores seguidos por un (*) indican similitud con metformina, valores seguidos por un (+) indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.....	59
Figura 18. Gráficos de contorno y superficie de respuesta para a) BT, b) CFT, y c) CA.....	63
Figura 19. Comportamiento del potencial ζ de las soluciones de GA y PSL en función del pH.....	67
Figura 20. (a) solución de PSL:GA (3:1), (b) coacervado fresco, (c) coacervado seco (secado a estufa a 30°C por 12 h), (d) solución de PSL:GA (3:1) con el extracto de betalaínas, (e) coacervado fresco con el pigmento y (f) coacervado seco (secado a estufa a 30°C por 24 horas.	69
Figura 21. Espectros de IR de C; coacervado sin pigmento, CB; coacervado con pigmento y los biopolímeros GA y PSL.	70
Figura 22. Micrografías de coacervados formados con PSL (proteína de suero de leche) y GA (goma arábiga), obtenidas por microscopía óptica.....	72
Figura 23. (a) betalaínas en la pulpa liofilizada de los frutos de <i>Stenocereus stellatus</i> y (b) Betalaínas coacervadas.....	74
Figura 24. Espectros de absorción de la región visible a diferentes tiempos de exposición a 100°C. a) pulpa liofilizada b) coacervado. Soluciones en agua de pulpa liofilizada (c) y coacervados a 100°C (d).	74
Figura 25. Cinéticas de degradación de betaxantinas (BX) y betacianinas (BC) encapsuladas por coacervación y en la pulpa liofilizada durante su exposición a 100°C por 5 horas. (a) absorbancia y (b) Ln(absorbancia) de las betalaínas coacervadas, (c) y (d) betalaínas en la pulpa liofilizada	75

I. RESUMEN

El trabajo experimental fue dividido en dos etapas principales. La primera etapa consistió en la adquisición de los frutos de *S. stellatus* en huertas ubicadas en la región de San Juan Joluxtla, municipio de Cosoltepec, Oaxaca, México. Cabe mencionar que la clasificación de color de los frutos se basó en la experiencia de los cultivadores, debido a que no existe un precedente técnico que permita diferenciarlos entre sí. Los frutos fueron identificados de manera visual de acuerdo con la coloración de la pulpa como: T1-blanco, T2-rojo, T3-púrpura y T4-naranja. Posteriormente fueron caracterizados molecularmente mediante el uso de marcadores cloroplásticos como *psbA-trnH* y *matK*, con el fin de obtener una identificación molecular para cada color, logrando diferenciar las secuencias de los cuatro colores y con ello proporcionar información básica sobre la relación y/o diferencia entre las variantes, y con ello establecer si éstas pertenecen a la misma especie, así como la relación del color exhibido durante la maduración del fruto con modificaciones epigenéticas. Aunado al uso de dichas técnicas moleculares, las diferencias en el color de los frutos permitieron desarrollar un modelo matemático que permita de una forma más estandarizada realizar su clasificación, ya que como se mencionó anteriormente, ésta se basa sólo en la apreciación visual y experiencia del recolector. Este modelo se fundamenta en el perfil de betalainas, específicamente en los máximos de absorbancia característicos de los dos grupos de compuestos que conforman las betalainas: betaxantinas ($\lambda = 487 \text{ nm}$) y betacianinas ($\lambda = 536 \text{ nm}$), y mediante la implementación del algoritmo matemático es posible utilizarlo para lograr una clasificación estandarizada de los frutos.

Adicionalmente se realizó la caracterización fisicoquímica de los frutos mediante la evaluación del pH, el contenido de sólidos solubles totales (SST), acidez titulable, determinación de azúcares como sacarosa, glucosa y fructosa, contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante, contenido de flavonoides totales, betalainas y ácidos orgánicos (ác. cítrico y ác. málico). La caracterización de

color se ha realizado mediante la evaluación del contenido de betalainas en el fruto de *S. stellatus* y su comparación con extractos de betabel mediante HPLC. Como parte de la evaluación de la actividad funcional, se realizó un ensayo de determinación de actividad anti-hiperglucemiante de la pulpa liofilizada en modelos de rata Wistar. De forma general, a través de este análisis se determinó que el fruto rojo (T2) puede ser utilizado como fuente potencial de betalainas, dada su mayor concentración ($0.38 \text{ mg g}_{\text{peso fresco}}^{-1}$) respecto a las muestras T3 ($0.047 \text{ mg g}_{\text{peso fresco}}^{-1}$), T4 ($0.019 \text{ mg g}_{\text{peso fresco}}^{-1}$) y T1 (No detectado). Finalmente, la determinación de la actividad biológica determinada mediante la actividad antioxidante y el efecto anti-hiperglucemiante en un modelo de ratas Wistar, mostró que la variante T2 presentó la mayor disminución en los niveles de glucosa en sangre por efecto de la ingesta de pulpa de frutos rojos, obteniendo comportamientos similares a los obtenidos con metformina, medicamento usado para el control de los niveles de glucosa en sangre.

En la segunda etapa experimental se planteó la optimización de las condiciones de extracción de los compuestos bioactivos, betalainas y compuestos fenólicos totales, mediante un diseño de experimentos basado en el efecto del pH, temperatura, tiempo de extracción y solvente sobre el rendimiento de extracción de la concentración de betaxantinas (BX), betacianinas (BC), betalainas totales (BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA), a través de la metodología de superficie de respuesta (MSR). Para esta última etapa también se planteó la estabilización de las betalainas a través de su encapsulación por el método de coacervación. Todos los factores (pH, temperatura y tiempo de extracción y solvente) influyeron en el rendimiento de las BC, BX y BT, con excepción del tiempo de extracción sobre las BX. En el caso del CFT, tanto el pH como la temperatura favorecieron el rendimiento, siendo pH 4.0 y 60°C, la condición con mayor CFT y CA. La determinación de las condiciones óptimas de extracción buscó maximizar la concentración de BT, CFT y CA, cabe señalar que este proceso no fue posible al considerar un efecto simultáneo, sin embargo, para la extracción de BT, los valores

óptimos fueron: pH 4.2, 10°C, 60 min y etanol 55% (v/v), con un rendimiento de 0.51 $mg\ g_{peso\ fresco}^{-1}$. En el caso de CFT y CA las condiciones óptimas de extracción fueron; pH 4.0, 60°C y 10.6 min, con máximos rendimientos de 2.34 $mg_{EAG}\ g^{-1}$ y 18.60 $\mu mol_{Trolox}\ g^{-1}$, respectivamente.

A partir de estas condiciones de extracción óptimas, se procedió a reducir la degradación de las betalaínas mediante su incorporación en una matriz biopolimérica basada en la formación de complejos coacervados con goma arábica (GA) y aislado de proteína de suero de leche (PSL). A los coacervados obtenidos se les realizó una caracterización. Se determinó el rendimiento de coacervación, la eficiencia de carga, el potencial ζ , espectroscopia infrarroja, y finalmente un análisis de estabilidad térmica. Obteniendo valores de un 60% de rendimiento, una eficiencia del 10%, una condición de pH óptimo de 4, un perfil IR que permitió establecer la interacción entre los biopolímeros para la formación de los coacervados y finalmente observar que el proceso de coacervación es un método efectivo para proteger las betalaínas a la exposición térmica.

ABSTRACT

The experimental work was divided into two main stages. The first stage consisted of acquiring the fruits of *S. stellatus* in orchards located in the San Juan Joluxtla region, municipality of Cosoltepec, Oaxaca, Mexico. Color classification of the fruits was based on the experience of the cultivators, since there is no technical precedent that allows them to be differentiated from each other. The fruits were visually identified according to the color of the pulp as: T1-white, T2-red, T3-purple and T4-orange. Subsequently, they were characterized molecularly by using chloroplast markers such as *psbA-trnH* and *matK*, obtain a molecular identification for each color, managing to differentiate the sequences of the four colors and thus provide basic information on the relationship and / or difference. between the variants, and thereby establish whether they belong to the same species, as well as the relationship of the color exhibited during the ripening of the fruit with epigenetic modifications. In addition to the use of these molecular techniques, the differences in the color of the fruits allowed the development of a mathematical model that allows a more standardized classification to be carried out, since as mentioned above, it is based only on the visual appreciation and experience of the collector. This model is based on the betalain profile, specifically on the characteristic absorbance maxima of the two groups of compounds that make up betalains: betaxanthin ($\lambda = 487$ nm) and betacyanin ($\lambda = 536$ nm), and by implementing the algorithm mathematical it is possible to use it to achieve a standardized classification of the fruits.

Additionally, the physicochemical characterization of the fruits was carried out by evaluating the pH, the content of total soluble solids (TSS), titratable acidity, determination of sugars such as sucrose, glucose and fructose, content of total phenolic compounds, antioxidant capacity, flavonoid content. total, betalains and organic acids (ascorbic acid, citric acid and malic acid). Color characterization has been carried out by evaluating the betalain content in the fruit of *S. stellatus* and comparing it with extracts of beet by HPLC. As part of the evaluation of the functional

activity, a test to determine the anti-hyperglycemic activity of the lyophilized pulp was performed in Wistar rat models. Through this analysis it was determined that the red fruit (T2) can be used as a potential source of betalains, given its higher concentration ($0.38 \text{ mg } g_{\text{fresh weight}}^{-1}$) compared to the T3 samples ($0.047 \text{ mg } g_{\text{fresh weight}}^{-1}$), T4 ($0.019 \text{ mg } g_{\text{fresh weight}}^{-1}$) and T1 (Not detected). Finally, the determination of the biological activity determined by the antioxidant activity and the anti-hyperglycemic effect in a Wistar rat model, showed that the T2 variant presented the highest antioxidant capacity (CA), as well as the greatest decrease in glucose levels. in blood due to the ingestion of red fruit pulp, obtaining behaviors like those obtained with metformin, a drug used to control blood glucose levels.

In the second experimental stage, the optimization of the extraction conditions of bioactive compounds, betalains and total phenolic compounds was proposed, through a design of experiments based on the effect of pH, temperature, extraction time and solvent on the extraction performance of the concentration of betaxanthin (BX), betacyanin (BC), total betalains (BT), total phenolic compounds (CFT) and antioxidant capacity (CA), through the response surface methodology (MSR). For this stage, the stabilization of betalains through their encapsulation by the coacervation method was also proposed. All the factors (pH, temperature and extraction time and solvent) influenced the performance of the BC, BX and BT, with the exception of the extraction time on the BX. In the case of CFT, both pH and temperature favored performance, with pH 4.0 and 60°C being the condition with the highest CFT and CA. The determination of the optimal extraction conditions sought to maximize the concentration of BT, CFT and CA, it should be noted that this process was not possible when considering a simultaneous effect, however for the extraction of BT, the optimal values were pH 4.2, 10°C , 60 min and ethanol 55% (v / v), with a yield of $0.51 \text{ mg } g_{\text{fresh weight}}^{-1}$. In the case of CFT and CA the optimal extraction conditions were pH 4.0, 60°C and 10.6 min, with maximum yields of $2.34 \text{ mg}_{\text{EAG}} \text{ g}^{-1}$ and $18.60 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1}$, respectively.

From these optimal extraction conditions, the degradation of betalains was reduced by incorporating them into a biopolymeric matrix based on the formation of coacervated complexes with gum arabic (GA) and whey protein isolate (WPI). A characterization was carried out on the coacervates obtained. Coacervation performance, loading efficiency, ζ potential, infrared spectroscopy, and the thermal stability analysis were determined. Obtaining values of 60% yield, an efficiency of 10%, an optimum pH condition of 4, an IR profile that allowed to establish the interaction between the biopolymers for the formation of the coacervates and finally to observe that the coacervation process is an effective method to protect betalains from thermal exposure.

1. Introducción

La industria de los colorantes alimentarios representa un sector de alto impacto económico a nivel mundial, el cual en la actualidad se ha enfocado en la búsqueda de nuevas fuentes para la obtención de pigmentos de origen natural, que no sólo cumplan con la función de aportar coloración, sino que además contribuyan a mantener la salud humana (Martins *et al.*, 2017). De acuerdo con diversos estudios, el mercado de colorantes naturales ha presentado un crecimiento constante en los últimos años, con un valor de 2,154 millones de dólares y un crecimiento en la demanda del 4.3%. En este sentido, la industria alimentaria representa el 70% de la demanda de colorantes naturales, siendo los países europeos, Estados Unidos y Japón los países con mayor incorporación de colorantes naturales en productos de consumo humano. Dentro de la gran diversidad de colorantes naturales disponibles en el mercado, las betalaínas han comenzado a adquirir relevancia debido a sus características y propiedades funcionales (Khan y Giridhar, 2015; Belhadj *et al.*, 2017). Las betalaínas son metabolitos secundarios nitrogenados con actividad antioxidante, de carácter hidrofílico que proveen coloraciones rojas y amarillas (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013).

La industria de los colorantes sin duda está en cambio, los colorantes sintéticos están siendo desplazados por los obtenidos de fuentes naturales, principalmente por sus efectos negativos sobre la salud (Azeredo, 2009). Por lo que actualmente se está en una constante búsqueda de nuevas fuentes para la obtención de colorantes naturales (Albuquerque *et al.*, 2021). Existe una amplia investigación sobre pigmentos como: carotenoides, antocianinas y clorofilas, pero las investigaciones sobre betalaínas son recientes. Hasta ahora se han caracterizado un aproximado de 75 tipos, que incluyen betacianinas y betaxantinas (Polturak y Aharoni, 2018). Estos pigmentos, además de ser parte de los atractivos colores de flores y frutos, también presentan una alta capacidad antioxidante, por lo que se les ha atribuido el nombre de compuestos funcionales. Las betalaínas se encuentran en diferentes plantas y en

algunos hongos. En plantas, las betalainas son características del orden *Caryophyllales*, donde se encuentran ya algunas familias enfocadas para la obtención de estos compuestos, como *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae* y *Cactaceae* (Khan y Giridhar, 2015). La especie *Stenocereus stellatus* Riccob, perteneciente a esta última familia, posee un fruto denominado; xoconostle dulce, pitaya o tunillo, que básicamente se consume en fresco a nivel regional (Bravo-Hollins y Sánchez-Mejorada, 1991; Flores-Monter *et al.*, 2011). Esta especie presenta frutos de diferentes colores (blancos, rojos, púrpura y amarillos o naranjas), esta característica de color (característica física-fisiológica) es dependiente del colector, lo que implica una clasificación e identificación poco objetiva ya que solo depende de su percepción. Por lo que resulta relevante tener una clasificación más objetiva, ya sea a nivel genético o a través de alguna característica intrínseca. Que sea utilizada para la clasificación de frutas de cactáceas.

Las cactáceas desde tiempos ancestrales se les ha atribuido propiedades farmacológicas, por lo que resulta interesante conocer qué tipo de compuestos son los posibles responsables de tales efectos, específicamente de la especie en estudio. Ya que se han reportado compuestos como alcaloides, pectinas, ácidos grasos, esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides y betalainas presentes en otras especies de cactáceas (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2020) a los cuales se les ha atribuido algún efecto farmacológico. Dentro de los principales efectos que se han reportado para estos últimos tres grupos de compuestos (compuestos fenólicos, flavonoides y betalainas) son: anti-inflamatorio, quimioprotector, anticancerígeno, antilipidémico y antimicrobiano (Choo, 2018; Coy-Barrera, 2020). Así como también se tiene conocimiento sobre su efecto en la disminución de los niveles de glucosa en sangre tanto de las betalainas (Dhananjayan *et al.*, 2017; Hadipour *et al.*, 2020; Madadi *et al.*, 2020; Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2021) como de los flavonoides (Madadi *et al.*, 2020; Al-Ishaq *et al.*, 2019). Además es indispensable la promoción de especies poco conocidas como el caso de *Stenocereus stellatus* para mejorar aspectos pre cosecha y post cosecha, además de posicionarla para realizar estudios en ella por su contenido de compuestos bioactivos y para aplicación de sus

pigmentos en diferentes sectores industriales. Sin embargo, las betalainas como otros pigmentos presentan alteraciones estructurales que repercuten en sus propiedades de color (Herbach *et al.*, 2006a; Herbach *et al.*, 2006b), así como posiblemente en sus propiedades funcionales. Dentro de los principales cambios reportados se encuentran; la isomerización (betanina-isobetanina), la hidrólisis del ácido betalámico que causa la pérdida de color, la deshidrogenación, responsable de la coloración amarilla, principalmente por la formación de compuestos de degradación como la neobetanina, y la descarboxilación causante de las tonalidades naranjas. Cambios ocasionados por efectos térmicos (Herbach *et al.*, 2006b). Por lo que se busca en esta investigación a través de la encapsulación por coacervación (método poco explorado para la protección de pigmentos) mejorar la estabilidad de estos compuestos. El método por coacervación resulta prometedor por ser un método relativamente sencillo, rápido, insumos de bajo costo, además de que el proceso puede llevarse a temperaturas ambiente. Algunos de los métodos de encapsulación de betalainas como: secado por aspersion (método más reportado), freeze drying, emulsificación microcanal, hidratación sonicación, gelificación iónica y emulsión (Castro-Enríquez *et al.*, 2020), presentan complejidad en su proceso, sus insumos suelen ser relativamente caros, o manejan condiciones que afectan a los compuestos encapsulados.

2. Antecedentes

2.1 Descripción de *Stenocereus stellatus*

El género de cactáceas columnares más rico y con mayor distribución en México es *Stenocereus*, siendo las especies *Stenocereus stellatus* y *Stenocereus pruinosus* las más reconocidas (Flores Monter *et al.*, 2011). La especie *S. stellatus* pertenece al orden *Caryophyllales*, Familia: *Cactaceae* y Género: *Stenocereus* (Guzmán *et al.*, 2007). Esta especie crece en zonas áridas y semiáridas con precipitaciones de 400 mm hasta 700 mm, con tiempos de sequía de 6 a 12 meses. Se estima que más de la mitad del territorio nacional corresponde a este tipo de zonas. La vegetación que crece bajo este tipo de climas es poco dependiente de los cuidados de la población, por lo que básicamente no requieren gran inversión económica para producirla. Entre este tipo de vegetación se encuentra el cacto columnar que incluye una de las especies de mayor relevancia por la producción de frutos; *Stenocereus stellatus* localizada principalmente en los estados de Guerrero, Puebla, Morelos y Oaxaca. Esta especie es nombrada comúnmente como “xoconostle dulce”, “pitaya de agosto” o tunillo (Casas *et al.*, 1997; Flores Monter *et al.*, 2011).

Existen diferentes variantes de *S. stellatus* las cuales han sido clasificadas por los diferentes grupos étnicos (Nahuas, Popolocas y Mixtecos) con base en las características morfológicas y agronómicas de los frutos como su tamaño, cantidad o forma de espinas, grosor de cáscara, peso y forma del fruto (esférica, ovoide), sabor (ácido o dulce), color en epicarpio y pulpa, cantidad de semillas e incluso según el tiempo de vida post-cosecha (Mandujano-Piña *et al.*, 2020). Siendo el color, la característica con mayor relevancia para su clasificación.

2.1.1 Clasificación molecular de variantes de *S. stellatus*

Existen técnicas moleculares que analizan el material genético con el fin de evaluar la autenticación de especies, ofreciendo una herramienta que, aunado a las técnicas

taxonómicas, faciliten y mejoren la clasificación de las especies vegetales. La identificación y clasificación es realizada por taxónomos expertos, lo cual representa un arduo trabajo. Sin embargo, la existencia de especies que presentan una alta relación entre ellas, dificulta la actividad de clasificarlas. Es por ello que el desarrollo e implementación de nuevas técnicas de clasificación utilizando herramientas moleculares, facilitaría esta tarea. El DNA barcoding es una de ellas, esta técnica emplea una secuencia de ADN denominada código de barras de ADN, que es utilizada para la diferenciación entre las especies analizadas. Los códigos de barras de ADN consisten en una secuencia corta estandarizada de ADN (400 a 800 pb) (Savolainen *et al.*, 2005). Para que una región genética pueda considerarse como código de barras debe cumplir con ciertos criterios (a) contenga una variabilidad y divergencia genética significativa a nivel de especie (b) poseer sitios flanqueantes conservados para desarrollar cebadores de PCR universales, y (c) tener una secuencia de longitud corta para facilitar las capacidades de extracción y amplificación de ADN (Kress y Erickson, 2008).

Entre los marcadores más reportados que podrían perfilarse como códigos de barras para la identificación y clasificación de plantas se encuentran, el espaciador intergénico *psbA-trnH* y el gen *matK* (Savolainen *et al.*, 2005; Kress y Erickson, 2008) además, se han reportado algunos otros marcadores en la identificación y autenticaciones de plantas como: ITS, ITS2, *rbcL*, nrITS, *accD*, YCF5, *ndhJ*, *rpoB* (Song *et al.*, 2009; Marcial-Quino *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2009).

En la Figura 1 se esquematiza las regiones características de un marcador usado para el análisis por ADN barcoding. Y el principio de la técnica para la obtención de secuencias.

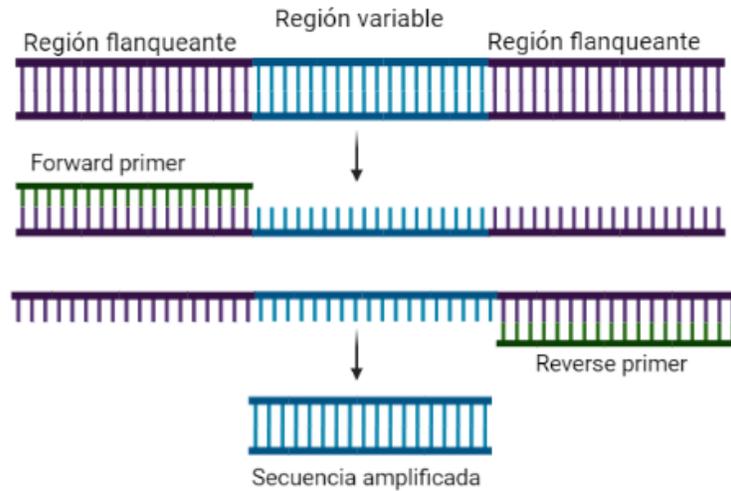


Figura 1. El DNA barcoding tiene como principio la obtención una región específica que se usa para la comparación entre especímenes (Creado en BioRender.com).

El proceso de análisis de las secuencias obtenidas por DNA barcoding empieza por la limpieza de las secuencias, eliminando los extremos anteriores a las secuencias flanqueantes, después se realiza la alineación, uno de los programas disponibles en línea para el alineamiento es Bioedit, el siguiente paso es el agrupamiento, este puede llevarse a cabo por un método de distancias o por un método probabilístico. Muscle es un programa de consulta gratuita, que puede generar fenogramas taxonómicos a través de un método de cluster UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) por sus siglas en inglés. Este es un método que utiliza las distancias genéticas (número de mutaciones o eventos evolutivos entre taxa desde su divergencia) para generar árboles genéticos entre taxa.

2.1.2 Clasificación de *S. stellatus* mediante el sistema ML

La clasificación de los frutos de *S. stellatus* se encuentra principalmente a cargo de los productores, quienes basan su clasificación en las características y atributos perceptibles de color en el epicarpio, sin embargo, esta clasificación puede resultar poco objetiva. Para solucionar este inconveniente y proveer una clasificación más robusta basada en características direccionadas, el uso de técnicas matemáticas y

estadísticas como el “*Machine Learning*” (ML), el cual pertenece a un área de la inteligencia artificial que permite que las máquinas aprendan una habilidad sin ser expresamente programadas para tal fin, esto quiere decir que es posible desarrollar herramientas que sean capaces de identificar patrones entre datos, desarrollar modelos predictivos, generar sistemas de entrenamiento de datos y evaluación de modelos, e incluso la posibilidad de realizar predicciones sobre ciertos eventos. Actualmente no hay ningún estudio que haga referencia al uso de esta herramienta para la clasificación de frutos de cactáceas. Por lo que este trabajo es el pionero en utilizar esta herramienta con el fin de clasificar a los frutos de *Stenocereus stellatus* utilizando los atributos de color como una característica propia del sistema a evaluar.

2.2 Betalaínas

Las betalaínas son metabolitos secundarios considerados como pigmentos en las plantas que pertenecen al orden Caryophyllales (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013; Gengatharan *et al.*, 2015). Estos compuestos se clasifican de acuerdo a su estructura química en betacianinas, las cuales exhiben coloraciones rojo-violeta, y betaxantinas con tonos amarillos, las variaciones en la coloración dependen de la resonancia en su estructura debido a la presencia de dobles enlaces (Figura 2). El primer grupo absorbe a un máximo de 540 nm y el segundo a 480 nm (Delgado-Vargas *et al.*, 2000), sin embargo, estas máximas longitudes de onda llegan a variar por nm.

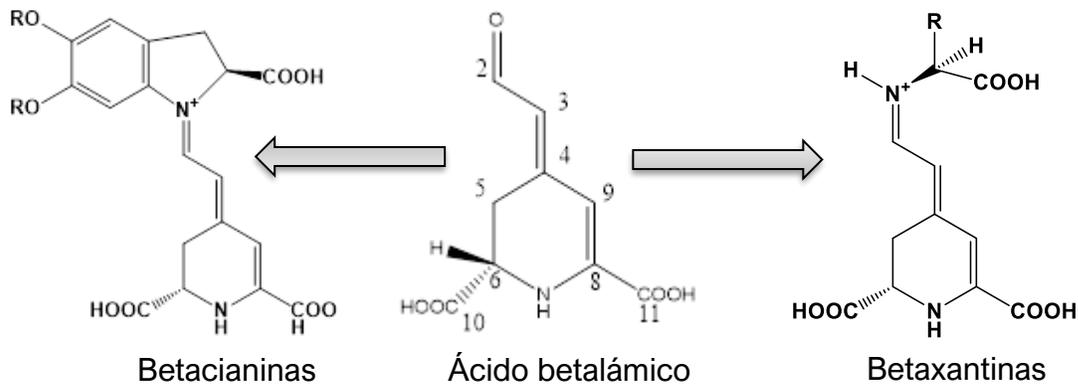
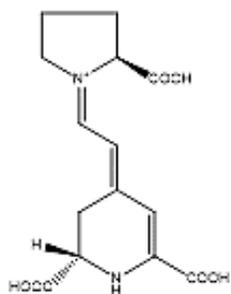


Figura 2. Estructuras químicas de las betalainas y el ácido betalámico como precursor. Fuente propia

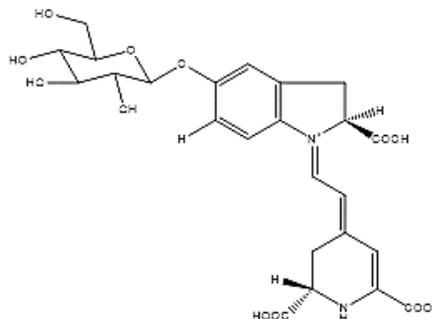
La estructura química de todas las betalainas está conformada por una estructura común; el ácido betalámico y una segunda estructura, para betacianinas el ciclo dopa y para betaxantinas aminas o aminoácidos (Khan y Giridhar, 2015). En la Figura 3 se muestran las dos betalainas principalmente reportadas en frutos de cactáceas (betanina e Indicaxantina).

Las betalainas están presentes en plantas y frutos, pero también se han encontrado en hongos, un ejemplo; *Amanita muscaria* (Strack *et al.*, 2003). De las fuentes vegetales la especie *Beta vulgaris* conocida comúnmente como remolacha, es la más explotada para la obtención de betalainas. *Amaranthus* es otra especie que se ha considerado rica de estos pigmentos. La especie *Opuntia sp.* y *Hylocereus polyrhizus* tienen un alto contenido de betacianinas entre ellas: betanina, hyloceranina y phyllocactina (Gengatharan *et al.*, 2015). También se reporta, la betanina, isobetanina e indicaxantina (Stintzing y Carle, 2007). Las cactáceas se están perfilando a ser fuentes potenciales en la industria de los alimentos, investigaciones recientes están informando de los posibles usos biotecnológicos y farmacológicos.



Indicaxantina

Aislada por primera vez de *Opuntia ficus-indica*



Betanina

Betacianina más recurrentes dentro de las Caryophyllales.

Figura 3. Estructuras químicas de indicaxantina y betanina, principales betalainas en frutos de cactáceas (Khan y Giridhar, 2015). Fuente propia

2.3 Propiedades bioactivas

Se han reconocido las propiedades bioactivas que presentan algunas especies de la familia de las cactáceas incluyendo el género *Stenocereus* como: *Equinocereus* sp. (“biznaga del dulce”), *Escotria chiotilla* (“jiotilla”), *Ferocactus* sp. (“borrachitas”), *Hylocereus* sp. (“pitahaya”), *Mammillaria* sp. (“chilitos”), *Myrtilocactus geomettizans* (“berry cactus”), *Opuntia* sp. (“tuna” o “xoconostle”), *Stenocereus* sp. (“pitaya”), debido a la presencia de compuestos químicos como alcaloides, ácidos orgánicos, betalainas, compuestos fenólicos totales, esteroides, entre otros (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2020). Beltrán-Orozco *et al.* (2009) reportaron la presencia de compuestos fenólicos y ácido ascórbico en *S. stellatus*, asociado a una destacada capacidad antioxidante, indicando que el consumo de este fruto puede reducir el riesgo de enfermedades crónicas concluyendo que este fruto es un alimento nutracéutico potencial. Esta conclusión es soportada por García-Cruz *et al.* (2017), quienes reportaron que las especies *S. stellatus* y *S. pruinosus* son fuentes importantes de compuestos antioxidantes.

En este sentido, la actividad antioxidante de las betalainas, así como sus propiedades anticarcinogénicas, antimicrobianas, y anti-lipidémicas han sido reportadas previamente, los estudios han mostrado que la ingesta diaria para alcanzar la concentración de betalainas óptima, depende de la estabilidad y biodisponibilidad de dichos compuestos, ya que a la fecha sólo se han evaluado algunos tipos de betalainas (Choo, 2018). De acuerdo con los reportes disponibles en la literatura, las betalainas han mostrado actividad antioxidante tres veces superior al de la vitamina C, e incluso dos veces superior al mostrado por antocianinas como la cianidin-3-O-glucósido (Cai *et al.*, 2003; Gliszczynska-Swiglo *et al.*, 2006). En el caso de betalainas extraídas de frutos de cactáceas, los resultados han mostrado comportamientos variables, en algunos casos el efecto antioxidante es mayor cuando se utilizan los compuestos purificados (Butera *et al.*, 2002), mientras que en otros existe un efecto sinérgico cuando se utilizan los extractos crudos (Wu *et al.*, 2006; Mahattanatawee *et al.*, 2006). Además, este tipo de compuestos han demostrado poseer actividad antimalaria y antimicrobiana, con efectos dependientes de la dosis y el tipo de betalainas presentes (Hilou *et al.*, 2006).

De acuerdo con Azeredo (2009), las betalainas de los frutos de cactáceas, así como del betabel se han asociado a actividades de inhibición de la peroxidación lipídica y la descomposición hemo, mostrando actividades de protección vascular en el endotelio celular (Gentile *et al.*, 2004) y contrarrestando las actividades de enzimas como las lipoperoxidasas, asociadas con daño celular gastrointestinal (Kanner *et al.*, 2001). Reddy *et al.* (2005), reportan que las betalainas han coadyuvado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, sugiriendo su uso como suplemento alimenticio (Govind *et al.*, 2011).

Actualmente, se ha demostrado que los frutos de cactáceas como *Opuntia ficus indica* disminuyen los niveles altos de glucosa en sangre (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2011). Butterweck *et al.* (2011), reporta que en ensayos con ratas

Wistar, la disminución de los niveles de glucosa se asocia a la administración de extractos de *O. ficus indica*, por lo que además se puede presumir que los extractos acuosos de *S. stellatus* también pueden presentar un efecto anti-hiperglucemiante.

2.4 Aplicaciones de las betalainas

Las betalainas tiene su principal foco de atención hacia aplicaciones como colorante, debido a que, por su origen, son consideradas como compuestos seguros para su consumo e incluso muestran actividad nutracéutica. A pesar de que este tipo de compuestos presentan mayor estabilidad durante el procesamiento de alimentos que las antocianinas, su uso aún se encuentra limitado. El principal colorante a base de betalainas corresponde al “rojo betabel”, el cual es extraído de este tubérculo y comercializado en la Unión Europea y Estados Unidos bajo el nombre comercial E-162, siendo la betanina la responsable de la coloración característica. Este colorante se ha aplicado exitosamente en productos lácteos como el yogur y el helado, aderezos para ensaladas, sopas, caramelos, postres, sustitutos cárnicos, bebidas, cosméticos y farmacéuticos (Fernández-Lopez *et al.*, 2013; Esatbeyoglu *et al.*, 2015).

En el caso de las betalainas presentes en frutos de cactáceas, como *O. ficus indica*, su uso se ha centrado en aprovechar el jugo de los frutos y procesados mediante secado por aspersión para la obtención de polvos, o bien por medio de su encapsulación como medio de estabilización. Sin embargo, recientemente la aplicación de estas fuentes vegetales de betalainas se han comenzado a diversificar en sus aplicaciones, aprovechando su potencial nutracéutico para producir “snacks” saludables, cereales extrudidos o masas para panadería enriquecidas con fibra (Zhu *et al.*, 2008; Moussa-Ayoub *et al.*, 2015; Msaddak *et al.*, 2017).

2.5 Estabilidad de las betalainas

La estabilidad de las betalainas resulta afectada debido al efecto de factores ambientales como la luz, altas temperaturas, la presencia de oxígeno, iones

metálicos, peróxido de hidrógeno, así como de enzimas como las peroxidases, polifenol oxidasas, glucosidasas, entre otras (Herbach *et al.*, 2006a; Yen-Ming & Lee-Fong, 2015), los cuales pueden inducir cambios en sus características estructurales y cromáticas. Sin embargo, factores como la concentración de betalainas así como la relación betaxantina:betacianina dentro de una matriz juegan un papel importante en su estabilidad, de acuerdo con Sáenz *et al.* (2012), la presencia de bajas concentraciones de betacianinas conduce a una mayor susceptibilidad de degradación.

Diversos autores han reportado que el pH tiene un efecto significativo sobre las propiedades cromáticas de las betalainas, es decir, cuando el pH se encuentra entre 4-7 el color rojo púrpureo es dominante, mientras que a $\text{pH} > 9$ o $\text{pH} < 3$ conducen a coloraciones naranjas o amarillo pálido (Tsai *et al.*, 2010).

Respecto a la temperatura, se ha observado que las betalainas tienden a cambiar sus propiedades cromóforas (cambios en el espectro de absorción y propiedades de color) debido al cambio estructural que sufren por el efecto térmico. De acuerdo con Herbach *et al.* (2004a), las altas temperaturas generan la descarboxilación en el C_7 de las betalainas puras como aquellas contenidas en jugo de betabel (*Beta vulgaris*), así como procesos de deshidrogenación que provocan la pérdida y degradación del color, y la generación de compuestos como la neobetainina, la cual confiere tonalidades amarillentas a la muestra (Herbach *et al.* 2004b). Cejudo-Bastante *et al.* (2015) reporta que las betacianinas exhiben mayor termoestabilidad que las betaxantinas. En la Figura 4 se muestra un diagrama esquemático con los principales factores que afectan la estabilidad de las betalainas.

Por otra parte, existen condiciones que pueden favorecer su estabilidad como una baja actividad de agua (A_w), un intervalo de pH óptimo entre 4 y 6, la presencia de agentes quelantes como los iones metálicos Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Al^{3+} , Hg^{2+} , y Cr^{3+} , antioxidantes como el ácido ascórbico (Herbach *et al.*, 2006b) y compuestos fenólicos, así como el uso de atmósferas modificadas (N_2) (Cai y Corke, 1999).

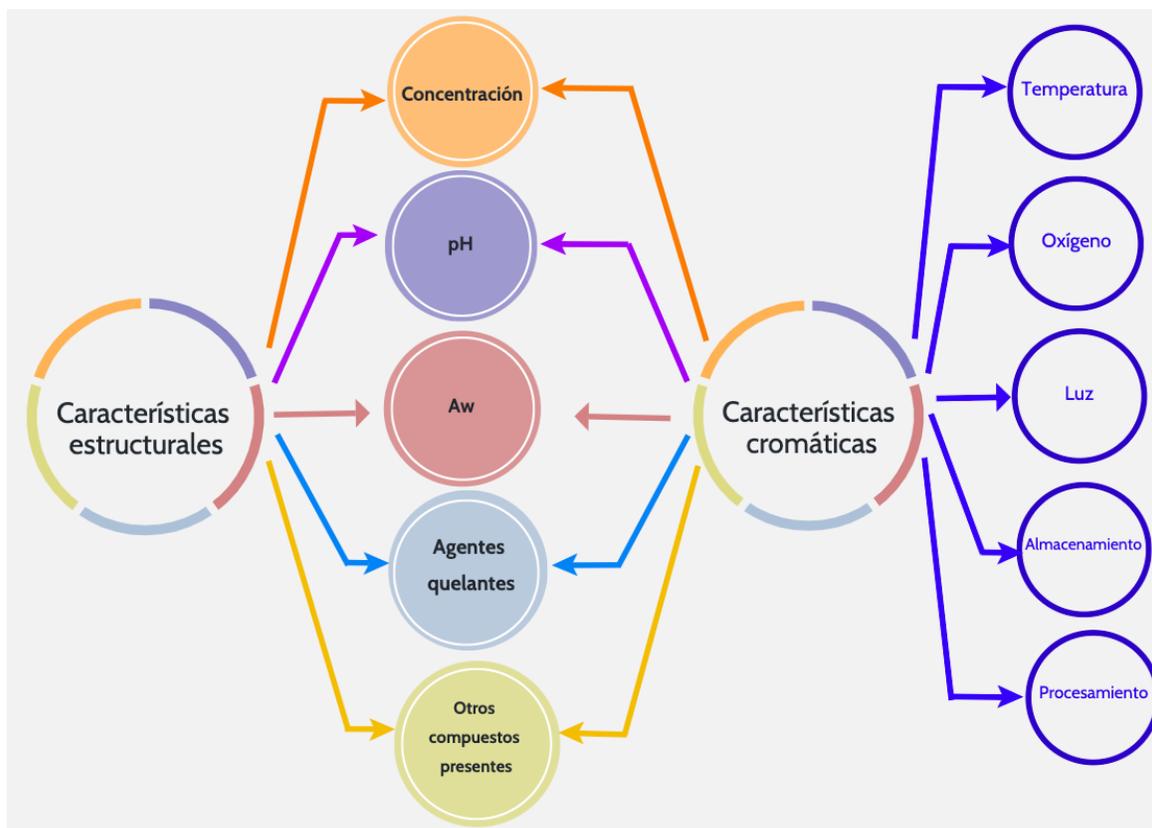


Figura 4. Factores que afectan la estabilidad de las betalainas

2.6 Protección de betalainas por encapsulación

Debido a la baja estabilidad de las betalainas ante factores y agentes degradativos y oxidantes, el uso de diversas estrategias de protección, han sido reportadas, siendo la encapsulación una de las técnicas que han demostrado prolongar la vida útil de dichos compuestos.

La encapsulación es un método utilizado para contener materiales en distintos estados de agregación (sólidos, líquidos, gases) en pequeñas cápsulas, cuyos tamaños pueden variar desde una escala nanométrica hasta la micrométrica. Esta técnica permite aislar los compuestos contenidos en el núcleo del ambiente que le rodea y además permite obtener vehículos de acarreo y liberación controlada, así

como sistemas susceptibles de liberación bajo estímulos específicos como el cambio de pH, temperatura, fuerza iónica, estrés mecánico, potencial químico y electrostático, entre otros (Janiszewska, 2014; Zuidam y Heinrich, 2009). Además, la finalidad de la encapsulación también involucra el enmascaramiento de sabores y olores desagradables, además de permitir utilizar dosificaciones muy bajas con altos contenidos de bioactivos y una mejor manipulación de los materiales (Narsaiah *et al.*, 2014).

En esta técnica, la sustancia que se encuentra encapsulada se denomina agente activo, fase interna o material central, mientras que el material de recubrimiento se denomina como revestimiento, membrana, material de pared o fase externa (Zuidam y Heinrich, 2009). Debido a que el material de pared generalmente se compone de biopolímeros como polisacáridos, proteínas, lípidos, polímeros sintéticos, o mezclas de ellos, la selección del tipo y composición del material de pared dependerá de la aplicación final y funcionalidad deseada (Chranioti *et al.*, 2015; Aldana *et al.*, 2011). En el caso de betalainas, los materiales biopoliméricos empleados para su encapsulación destaca la maltodextrina, goma guar, goma arábiga, goma xantana, pectina, y proteínas como la gelatina, aislados de proteína de soya (Janiszewska, 2014; Castro-Enriquez, *et al.*, 2020; Wandrey *et al.*, 2010).

2.6.1 Encapsulación por coacervación compleja.

Actualmente, el uso de mezclas de proteína-polisacárido y polisacárido-polisacárido han demostrado mejorar la estabilidad y funcionalidad de los compuestos bioactivos encapsulados, debido a que dichas mezclas forman recubrimientos de mayor espesor y con menor porosidad que la obtenida con materiales sencillos. En este sentido, el proceso de coacervación compleja ha sido utilizado como un proceso que permite mejorar la funcionalidad de los materiales de pared convencionales.

La coacervación compleja consiste en la combinación de dos macromoléculas con carga superficial opuesta en un solvente apropiado, los cuales al ser combinados en

las proporciones adecuadas son susceptibles de llevar a cabo interacciones asociativas, dependiendo de su naturaleza química (carga superficial, peso molecular, estructura química, composición), generalmente de tipo electrostáticas, las cuales conducen a un proceso de separación de fases en equilibrio debido a una reducción en la solubilidad del sistema coloidal. El proceso de coacervación puede generarse por diferentes vías, las cuales pueden estar determinadas por el efecto de cambios en la temperatura, pH, fuerza iónica, la adición de una segunda sustancia o de un no-solvente (Timilsena *et al.*, 2019), dando como resultado la presencia de una fase rica en biopolímeros denominada como fase coacervada, y otra con una cantidad reducida de biopolímeros llamada fase en equilibrio (Nairm, 1995; Agnihotri *et al.*, 2012), como se muestra en la Figura 5.

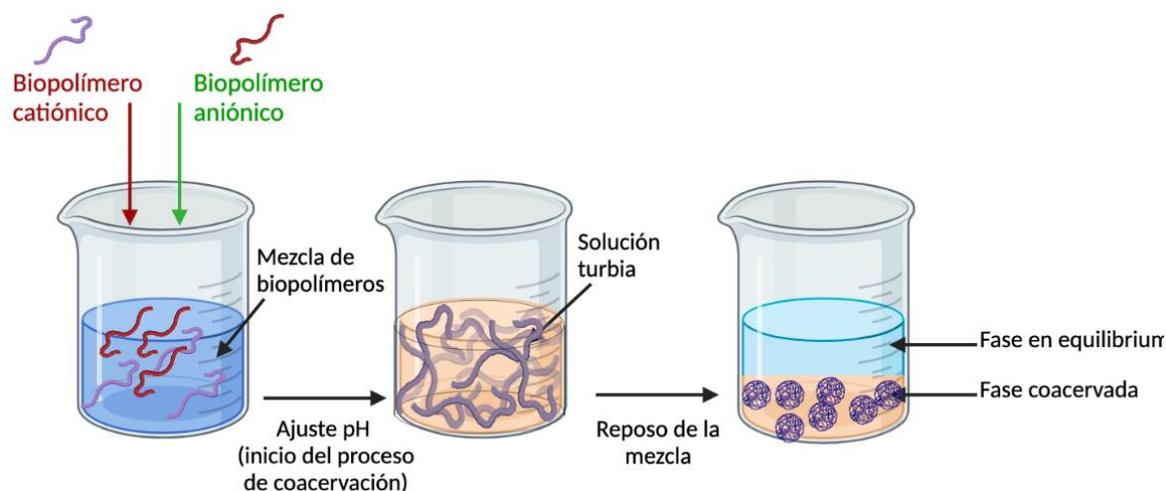


Figura 5. Diagrama esquemático del proceso de coacervación compleja. (Creado en Biorender.com)

Durante el proceso de microencapsulación por coacervación compleja, la mezcla de biopolímeros de carga opuesta (proteínas o polisacáridos) interactúan para formar el material de pared y es depositada alrededor del ingrediente activo o núcleo de la microcápsula, con la finalidad de rodearlo y así brindar protección física y química (Timilsena *et al.*, 2019). Esta tecnología de microencapsulación ha sido descrita como un método sencillo, de bajo costo, fácil escalabilidad hacia procesos de gran

escala, y con eficiencias de encapsulación superiores al 99% (Drusch *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2014; Butstraen y Salaün, 2014; Timilsena *et al.*, 2019).

Los pigmentos reportados que han sido encapsulados a través de esta técnica de microencapsulación son licopeno, antocianinas y β -caroteno (Jain *et al.*, 2015, 2016; Shaddel *et al.*, 2018; Kanha *et al.*, 2020; Gheonea *et al.*, 2021) donde se han empleado biopolímeros como la goma Arábica y el aislado de proteína de suero de leche, en estas investigaciones se reportaron altas eficiencias de encapsulación y efectos protectores de dichos compuestos. Por lo que, en este trabajo se presenta un avance sobre la microencapsulación de betalaínas por medio de la coacervación compleja.

2.6.2 Goma arábica y proteína de suero de leche

La goma arábica (GA) es un polisacárido con naturaleza aniónica, está conformada por una cadena de galactano y cadenas laterales de galactosa y arabinosa. También contiene D-galactosa (40%), L-arabinosa (24%), L-ramnosa (13%) y dos ácidos urónicos, a los cuales se les atribuye el carácter polianiónico de la goma, ácido D-glucurónico (21%) y ácido 4-O-metil-D-glucurónico (2%) (Weinbreck *et al.*, 2003). Es ampliamente usada en la industria alimentaria debido a su excelente solubilidad, alta actividad superficial (debida principalmente al contenido de proteína) y baja viscosidad incluso en concentraciones altas. Se estima que el 20% de sus unidades de azúcar contienen grupos carboxilo, lo que implica que la goma arábica sea un polielectrolito débil con una carga negativa por encima de pH 2 (Wang *et al.*, 2018).

Las proteínas de suero de leche son proteínas globulares derivadas del subproducto (suero) de la industria quesera. Es una mezcla de cuatro tipos de proteínas globulares; alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina, albumina de suero bovina y inmunoglobulinas (Devi *et al.*, 2017). Sin embargo, el aislado de proteína de suero de leche (PSL) contiene principalmente dos tipos de proteínas la beta-lactoglobulina (75%) (la cual es la principal responsable en la formación de los complejos) y la alfa-

lactoalbúmina (15%) con un punto isoeléctrico de 5.2 y 4.1 respectivamente (Weinbreck *et al.*, 2003).

3. Justificación

De acuerdo con el Global "Natural Color Market" research report 2021, el mercado de colorantes naturales presenta un incremento continuo, con expectativas de crecimiento entre 2020 y 2026 de 104% por un valor de 874 millones de dólares, sólo en Estados Unidos (US Natural Dyes Market Report 2021-2026), debido a la tendencia creciente por parte de los consumidores para adquirir productos y aditivos de origen natural en áreas de la industria de alimentos, cosmética, y farmacéutica, que además provean un aporte nutracéutico a su salud. En este sentido, los colorantes naturales obtenidos a partir de extractos de plantas, frutos y flores, son comúnmente utilizados para la preparación de bebidas y zumos aromatizados, productos de panadería y repostería, entre otros. Dentro de la gran cantidad de compuestos presentes en la naturaleza considerados como colorantes naturales se encuentran las betalaínas, un grupo de aproximadamente 70 moléculas de pigmentos hidrosolubles, con estructuras glucosiladas y propiedades cromóforas amarillas y rojas, debido a las betacianinas y betaxantinas, respectivamente. Si bien su uso no es tan extensivo como el de las antocianinas, las betalaínas aportan atributos de color a productos alimenticios como productos lácteos, jaleas y mermeladas, bebidas en polvo, productos cárnicos y algunas golosinas.

La distribución de las betalaínas se asocia a ciertos géneros vegetales, dentro de los que destacan las cactáceas, como *S. stellatus*. Los frutos de esta planta y sus propiedades funcionales son poco conocidos, por lo que su comercialización y consumo en el mercado mexicano se limita a un consumo local como producto fresco. Por otra parte, de acuerdo con productores de los Estados de Oaxaca y Puebla, la clasificación de las variantes de esta especie se basa principalmente en atributos fenotípicos, por lo que en este trabajo se pretende en una primera etapa establecer una caracterización y clasificación basado en el uso de marcadores moleculares y en algoritmos matemáticos, aportando criterios más precisos para su diferenciación y clasificación. Como se ha mencionado previamente, en los últimos años los pigmentos de origen natural como las betalaínas, han estado desplazando

a los colorantes artificiales, por lo que además se realizará una caracterización fisicoquímica y funcional de los frutos y extractos de betalainas de *S. stellatus* en cuatro variantes: rojo, púrpura, naranja y blanco. Finalmente, debido a que una de las principales desventajas y limitante en su aplicación de las betalainas es su alta susceptibilidad de degradación frente a factores ambientales como temperatura, pH, oxígeno, luz, etc., la incorporación de los extractos de *S. stellatus* en matrices biopoliméricas aportará información sobre la factibilidad de emplear técnicas de microencapsulación para proteger, contener y liberar de forma controlada, compuestos bioactivos como las betalainas.

4. Hipótesis

El uso de técnicas moleculares y algoritmos matemáticos permitirán diferenciar de forma asertiva las variantes roja, púrpura, naranja y blanca de *S. stellatus* y utilizarse como criterios de clasificación y diferenciación; a su vez los compuestos bioactivos presentes en los frutos de *S. stellatus* presentarán actividad nutracéutica, por lo que su incorporación en sistemas de microencapsulación basados en complejos coacervados promoverá su estabilidad y funcionalidad.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Obtener betalaínas y compuestos funcionales a partir de frutos de cuatro variantes de *Stenocereus stellatus* y su encapsulación en coacervados complejos.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la clasificación de los frutos de cuatro variantes de *S. stellatus* (rojo, púrpura, naranja, blanco) mediante el uso de marcadores *psbA-trnH* y *matK* como herramientas moleculares, así como la aplicación de un algoritmo matemático basado en los atributos de color de los frutos.
2. Caracterizar fisicoquímicamente los frutos y extractos de cuatro variantes de *S. stellatus* (rojo, púrpura, naranja, blanco) y determinación de actividad antioxidante y anti-hiperglucemiante.
3. Optimizar las condiciones de extracción de los compuestos bioactivos en los frutos rojos de *S. stellatus* a través de una metodología de superficie de respuesta.
4. Establecer las condiciones de encapsulación de los compuestos bioactivos de los frutos rojos de *S. stellatus* mediante la técnica de coacervación compleja y evaluación de su estabilidad térmica.

6. Metodología

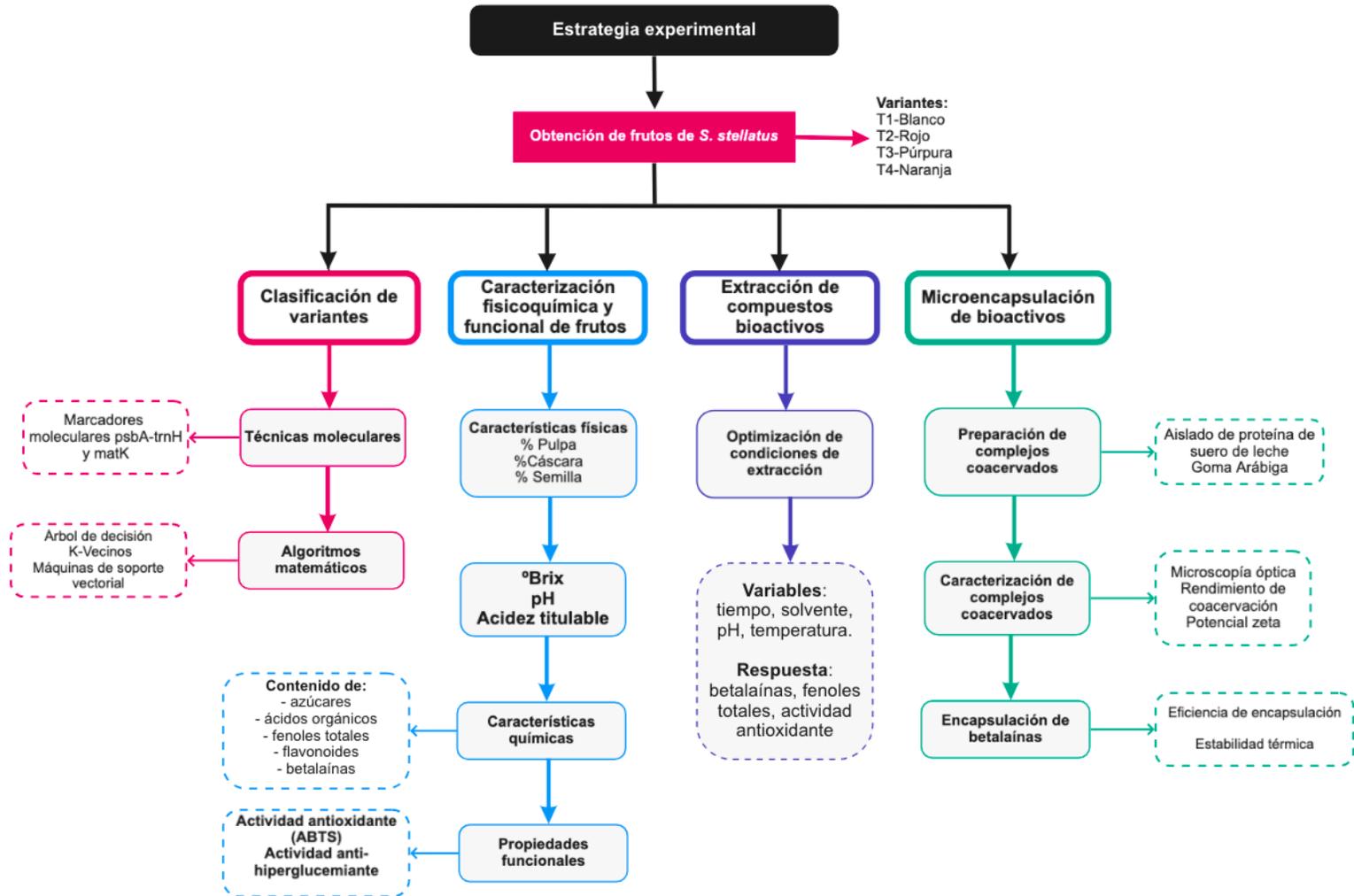


Figura 6. Estrategia experimental utilizada para la realización del proyecto.

6.1 Materiales

Para el desarrollo del trabajo experimental se utilizaron los siguientes reactivos:

Caracterización molecular: Kit de extracción de ADN (Multi-Source Genomic DNA Kit, BioSelect, CDMx, Mex), kit de purificación (QIAEX II, Qiagen, Germany), vector pJET (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), cultivo celular de *Escherichia coli* DH5 α (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), kit de recuperación de plásmido (ZR Plasmid Miniprep, Classic, Zymo Research, CA, USA), agarosa, bacto triptona, extracto de levadura, agar bacteriológico de Sigma Aldrich (Toluca, Estado de México, México).

Reactivos: Cloruro de calcio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de sodio dibásico, fosfato mono potásico, sulfato de magnesio, cloruro de aluminio, acetato de potasio, persulfato de potasio marca J.T. Baker (Ciudad de México), estándares de glucosa, fructosa, sacarosa, ácido cítrico, ácido málico (D, L), ácido ascórbico, quercetina, ácido gálico, persulfato de potasio, 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) (ABTS), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), reactivo de Folin-Ciocalteu y goma Arábica (GA) de Sigma Aldrich (Toluca, Estado de México, México); hidróxido de sodio de Tecsiquim S.A. de C.V. (Estado de México, México), proteína aislada de suero de leche (WPI, 98% proteína, Hilmar Ingredients, CA, USA).

Solventes: Propanol, etanol, ácido acético y ácido clorhídrico de J.T. Baker. En todos los casos se utilizó agua desionizada.

6.2 Material vegetal

De acuerdo con la estrategia experimental (Figura 6), la primera etapa de trabajo con el material vegetal contempló el desarrollo de las actividades en color rosa y azul, mientras que aquellas señaladas en color morado y verde fueron desarrolladas en la última etapa.

Para la primera etapa, los frutos de *Stenocereus stellatus* fueron comprados a productores de la región de San Juan Joluxtla (17° 40'30" LN; 97° 57' 45" LW), en el municipio de Cosoltepec, Oaxaca, México, los cuales fueron cosechados en el

mes de septiembre de 2017. Para la segunda etapa, los frutos de *S. stellatus* fueron comprados a productores del municipio de Tepeyahualco de Cuauhtémoc (18°48'58"N 97°52'40"O), Puebla, México, cosechados en el mes de septiembre de 2019. En ambos casos, los frutos fueron transportados a las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y procesados mínimamente de acuerdo con la Figura 7, posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

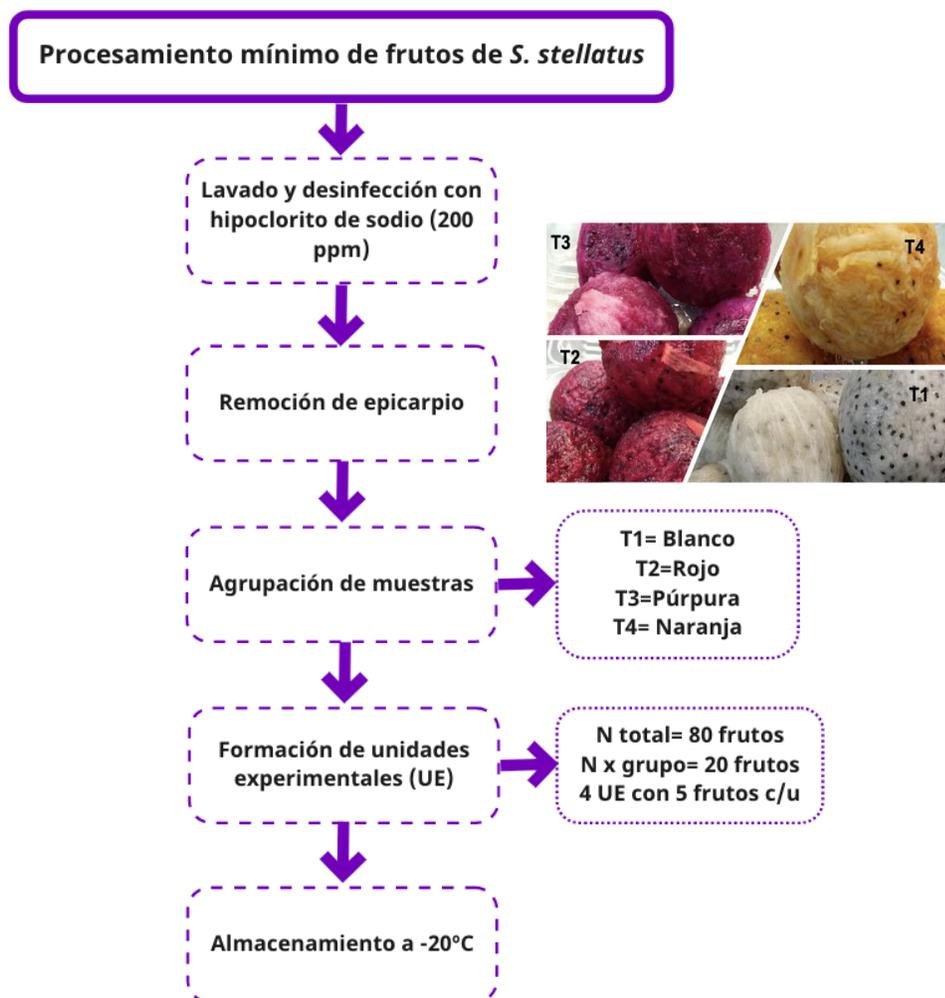


Figura 7. Etapas del procesamiento de los frutos de *S. stellatus* previo a su almacenamiento.

6.3 Clasificación de los frutos de *S. stellatus*

6.3.1 Análisis molecular

a) Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)

Cien miligramos del epicarpio de cada fruto (T1-T4) fueron utilizados para llevar a cabo la extracción del ADN por medio del Kit de extracción de ADN, cuya integridad fue verificada mediante el uso de un gel de agarosa (1%). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis.

b) Análisis de PCR

El análisis de PCR tiene como principio obtener copias de segmentos específicos de ADN en una muestra, por lo que fue utilizada para obtener las amplificaciones de los marcadores *psbA-trnH* utilizando los *primers* *psbAF* (5'-CGCGCATGGTG GATTCACAATCC-3') y *t-rnH2* (5'-GTTATGCATGAACGTAATG CTC-3') y *matK* con *matK390F* (5'-CGATCTATTCATTCAATATTTTCAT-3') and *matK1326R* (5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3'), de acuerdo con lo reportado por Cervantes-Arista *et al.* (2020). Se realizó una mezcla de reacción de 25 µL de la siguiente manera, 2.5 µL de Buffer Dream Taq (10X), 0.5 µL de dNTPs 10 mM, 0.5 µL de primer Forward y Reverse, 1 µL de ADN dilución (1/50), 0.2 µL Dream Taq DNA Polimerasa (5 U/µL), bajo las condiciones descritas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Condiciones de PCR para los marcadores *psbA-trnH* y *matK*. Ciclos temperatura-tiempo (Tmp)

Marcador de cloroplasto		1 Tmp	3 Tmp	Alineamiento primer	2 Tmp	Terminación	Almacenamiento
<i>psbA-trnH</i>	T (°C)	95	95	61	72	72	20
	t (s)	30	10	30	30	300	
<i>matK</i>	T (°C)	95	95	48	72	72	20
	T (s)	30	10	30	60	300	

1 Tmp= Desnaturalización inicial de ADN, 2 Tmp=Hibridación del *primer*, 3 Tmp= Desnaturalización del ADN para todos los ciclos.

c) Purificación de los fragmentos amplificados

Se utilizó el Kit QIAE X II Gel para la purificación de los amplificados por PCR y recuperados de los geles de agarosa. se colocaron 10 µL de cada producto de amplificación (*psbA-trnH*, *matK*) para cada muestra (T1-T4). En el caso del marcador *psbA-trnH* se utilizó un gel de agarosa (2%), mientras que para el marcador *matK* se utilizó un gel de agarosa al 1%, y de Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 1 mM (TAE 1X).

d) Secuenciación

Las muestras amplificadas fueron ligadas al vector pJET, los clones obtenidos se incorporaron a células competentes de *Escherichia coli* DH5α (proceso denominado transformación). El ADN plasmídico se obtuvo a partir de insertos positivos y la secuenciación se realizó en ambas direcciones (DNA Synthesis y Laboratorio de Secuenciación, IBT-UNAM, Cuernavaca, México).

i) Obtención de células competentes

El proceso de volver competentes a las células de *E. coli* consistió en realizar un lavado con solución de cloruro de calcio (100 mM) a las muestras anteriores y centrifugación para la recuperación de éstas, con la finalidad de reducir la repulsión entre los grupos fosfato del plásmido y los fosfolípidos de la membrana de las células de *E. coli*. Posteriormente se utilizó el Kit Z. R. Plasmid Miniprep- classic para llevar a cabo la clonación y la inserción del plásmido pJET que presenta el gen de resistencia a ampicilina. Los productos de amplificación de los marcadores *psbA-trnH* y *matK* fueron insertados dentro de los plásmidos.

ii) Proceso de transformación

Se utilizaron 50 µL de células competentes a las cuales se les adicionaron 6 µL de los productos de amplificación, las muestras se dejaron reposar en baño con hielo por 30 min, posteriormente fueron calentadas a 42 °C en un baño de agua y mantenidas a esa temperatura por 90 s, inmediatamente después se colocaron nuevamente en baño con hielo por 3 min. 800 µL de medio LB (bactotriptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%) se agregaron y se llevó a incubación con agitación por 1 h a 37°C. Finalmente, las suspensiones celulares (50 µL) fueron

inoculadas en medio LA (medio LB + 2% agar) con ampicilina e incubadas a 37°C por 12 h (Figura 8). La extracción del ADN plasmídico de estas muestras se realizó mediante el kit QIAE X II Gel de extracción. La recuperación de los plásmidos se realizó con el kit Z. R. Plasmid Minipred- classic.

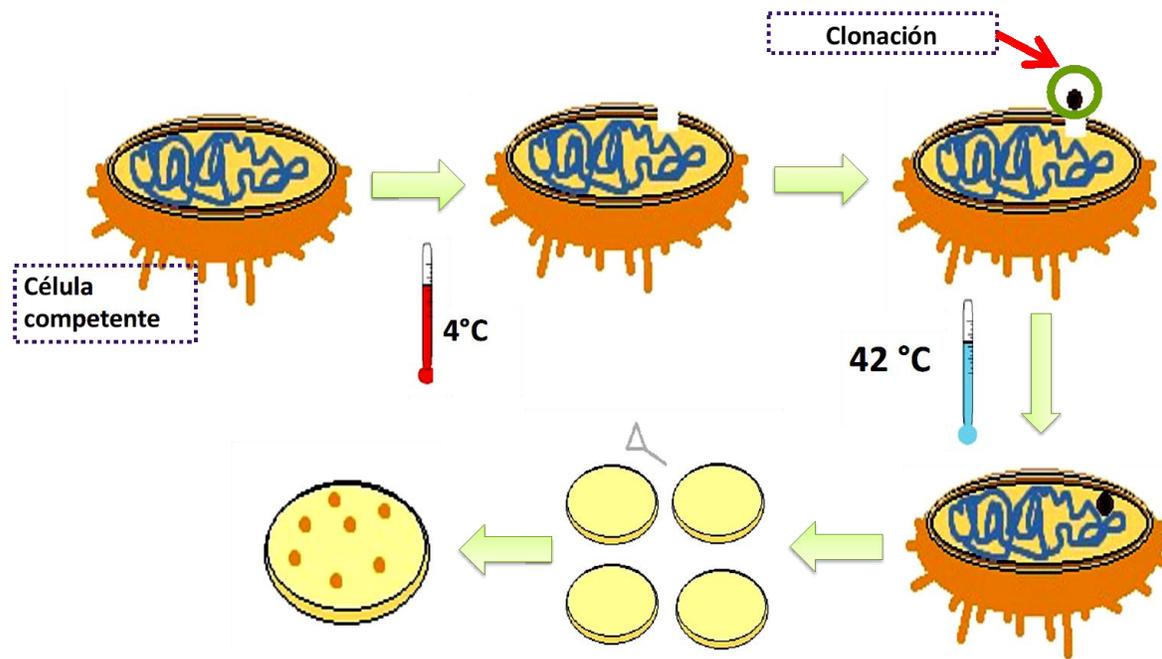


Figura 8. Diagrama esquemático del proceso de transformación de *Escherichiae coli* (DH5α).

6.3.2 Construcción de árbol filogenético

A partir de los datos de secuenciación, se realizó un análisis de las secuencias de las muestras (T1-T4) utilizando el software MEGA-X v10.0.5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Temple University and Arizona State University, USA) junto con tres secuencias tomadas del Gen Bank del mismo género (*S. pruinosus*, *S. griseus* y *S. montanus*) y una cuarta perteneciente a *Opuntia ficus indica*. Los árboles filogenéticos de las muestras T1-T4 fueron elucidados de acuerdo con el método UPGMA según Kumar *et al.* (2018).

6.3.3 Uso de algoritmos matemáticos

La clasificación de las muestras (T1-T4) de *S. stellatus* por medio del uso de algoritmos matemáticos fue utilizando el sistema de máquinas de vector soporte (*SVM-learning* por sus siglas en inglés) en Python (*module-sklearn, function SVC*). Los datos de análisis consistieron en realizar un barrido de absorbancia UV-Vis a 487 y 536 nm en las muestras de pulpa de los frutos de *S. stellatus*, respectivamente, se eligió el número 10^6 para el parámetro de penalización C del modelo con la finalidad de evitar constricciones suaves. Para el resto de los parámetros se utilizaron valores predeterminados. Los conjuntos de entrenamiento y prueba constituyeron el 75% y el 25% de los datos, respectivamente. Debido a que la muestra T2 contenía datos de los espectros de las muestras T3 y T4, se utilizó una regresión lineal (Módulo de Python: *sklearn.linear_model*, función de regresión lineal; intersección con el eje $y = 0$) para aproximar el espectro normalizado promedio de la variante roja (T2) basado en el promedio de los espectros normalizados de los fenotipos púrpura (T3) y naranja (T4). posteriormente se generó una representación gráfica de cada variante en el espacio de color CIE $L^* C^* h$, utilizando imágenes fotográficas de la pulpa de los frutos. Las imágenes fueron convertidas de formato RGB a CIE $L^* a^*b^*$ (Módulo de Python: *skimage*, función *color.rgb2lab*) seguido de un cilindro transformación de " $a^* b^*$ " en ángulo de tono (h) y radio de saturación (C). Previo a la conversión, el 75% de los píxeles de mayor intensidad fueron promediados para eliminar interferencias asociadas a la presencia de las semillas. Posteriormente los frutos se agruparon según su ubicación en el gráfico resultante (módulo de Python: *sklearn.tree*, función *DecisionTreeClassifier*).

6.4 Caracterización física de los frutos

6.4.1 Porcentaje de pulpa, epicarpio y semilla

Los frutos frescos y acondicionados en las instalaciones del laboratorio fueron pesados de manera individual. Posteriormente, el epicarpio fue removido y se

registró la masa de la pulpa, semillas y epicarpio. El porcentaje de pulpa, epicarpio o cáscara y semillas fue calculado mediante la relación de la masa de cada uno de los tejidos anteriores (*tejido i*), respecto al valor registrado para el fruto fresco previo a su fragmentación (Ecuación 1). Esta determinación se realizó a 20 frutos de cada color.

$$\% \text{ tejido}_i \text{ en fruto} = \frac{m_{\text{tejido } i}}{m_{\text{fruto fresco}}} \times 100 \quad (1)$$

6.5 Caracterización fisicoquímica de los frutos

6.5.1 Contenido de sólidos solubles totales (SST)

La determinación de los sólidos solubles totales (SST) se basó en la norma NMX-FF-015-1982. Brevemente, se obtuvo jugo de los frutos de *S. stellatus* (T1-T4) y se colocó en un refractómetro portátil (Erma Inc, Japón, A-contrast 11-520-0) previamente calibrado con agua destilada, registrando la lectura de SST en °Brix.

6.5.2 Determinación de pH

El pH en los frutos fue determinado mediante un potenciómetro (903, Nahita, 0.01 pH; 1 mV) previamente calibrado, las mediciones de pH en los jugos de las muestras T1-T4 se realizaron de acuerdo con la norma NMX-F-317-S-1978.

6.5.3 Determinación de acidez titulable

La acidez titulable en el jugo de los frutos para las muestras T1-T4, se realizó por el método potenciométrico de acuerdo con el procedimiento descrito en la norma NMX-FF-010-1982. Los resultados se expresaron como % de ácido málico.

6.5.4 Cuantificación de azúcares

Se preparó una solución de pulpa liofilizada a una concentración de 1 000 ppm para cada una de las muestras (T1-T4), la cual fue filtrada a través de una membrana de nylon de 0.45 µm (Millex, Millipore, Bedford, USA). Posteriormente, 20 µL de la

muestra filtrada fueron inyectados en un equipo HPLC (Agilent 1260, Agilent Technologies, CA, USA) utilizando una columna Agilent Hi-Plex Ca (8% crosslinked, 7.7 x 300 mm, 8 μ m) con una fase móvil de agua desionizada en modo isocrático, con un flujo de elución de 0.6 mL/min a una temperatura de 70 °C, utilizando un detector de índice de refracción. La concentración de los azúcares presentes en las muestras fue calculada mediante la interpolación de las áreas de las señales, respecto a una curva estándar para glucosa y para fructosa, respectivamente.

6.5.5 Determinación de ácidos orgánicos

Se preparó una solución de pulpa liofilizada a una concentración de 1 000 ppm para cada una de las muestras (T1-T4), la cual fue filtrada a través de una membrana de nylon de 0.45 μ m (Millex, Millipore, Bedford, USA). Posteriormente, 20 μ L de la muestra filtrada fueron inyectados en un equipo HPLC (Agilent 1260, Agilent Technologies, CA, USA) utilizando una columna X Terra MS C18, 5 μ m (4.6 x 250 mm). con una fase móvil de buffer de fosfatos (50 Mm, pH 2.8) en modo isocrático, con un flujo de elución de 0.7 mL/min a una temperatura de 10 °C, utilizando un detector de arreglo de diodos. La concentración de los ácidos orgánicos presentes en las muestras fue calculada mediante la interpolación de las áreas de las señales, respecto a una curva estándar para ácido málico y ácido cítrico, respectivamente.

6.5.6 Contenido de fenoles totales (CFT)

600 mg de pulpa liofilizada de la muestra T1 y 300 mg de pulpa liofilizada de las muestras T2-T4 fueron agregadas a 4.5 mL de agua de forma independiente, mezcladas en un vórtex durante 2 min y centrifugadas a 14,000 rpm por 5 min. Los sobrenadantes fueron utilizados para la determinación del CFT mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) con algunas modificaciones. Se tomaron 400 μ L de muestra y se adicionaron 2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución en agua 1:10 (v/v)), seguido de 0.8 mL de carbonato de sodio 20 % (p/v). Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. La absorbancia fue medida a 765 nm en un espectrofotómetro marca JENWAY

modelo 6705. Los resultados fueron reportados como el contenido equivalente de ácido gálico por gramo ($\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}$).

6.5.7 Contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales fue determinado de acuerdo con la metodología reportada por Chang *et al.* (2002). Se tomaron 0.150 mL de la muestra descrita en la sección anterior y se mezclaron con 0.45 mL de etanol al 95% (v/v), 30 μL de cloruro de aluminio al 10%, 30 μL de acetato de potasio (1M) y 0.84 mL de agua para ser mezclada en un vórtex. La mezcla se incubó durante 30 min y se midió la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro marca JENWAY modelo 6705. Los resultados fueron expresados como los miligramos equivalentes de quercetina por gramo ($\text{mg}_{\text{EQ}}/\text{g}$).

6.5.8 Contenido de betalaínas

La determinación de las betalaínas en las muestras T1-T4 de *S. stellatus* se realizó tomando 2 mL de la muestra descrita en la sección 6.5.6 y colocados en una celda de vidrio. Se registró la absorbancia de las muestras a dos longitudes de onda, $\lambda=483$ nm para determinar betaxantinas y $\lambda=538$ nm para betacianinas, utilizando un espectrofotómetro JENWAY mod. 6705. El contenido de betalaínas (BC) fue calculado de acuerdo con la Ecuación 2 (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008; García-Cruz *et al.*, 2016).

$$BC(\text{mg}/\text{kg}) = \frac{(A \cdot FD \cdot W_c \cdot V_m)}{(\epsilon \cdot m_s \cdot L)} \quad (2)$$

donde A es la absorbancia registrada, FD es el factor de dilución, W_c es el peso molecular de la betanina, como betacianina mayoritaria en este tipo de frutos (550 g/mol) y para indixantina como betaxantina mayoritaria (308 g/mol), V_m es el volumen de la solución utilizada (m^3), ϵ es el coeficiente de extinción molar para betacianina (6,000 $\text{m}^3/(\text{mol} \cdot \text{m})$) y para indixantina (48,000 $\text{m}^3/(\text{mol} \cdot \text{m})$), m_s es la masa de la muestra en la solución en base seca (kg) y L es la longitud de la celda (1 cm).

6.5.9 Determinación de betalaínas por HPLC

300 mg de muestra liofilizada (T1-T4) se diluyó en 4.5 mL de agua desionizada, las soluciones resultantes fueron llevadas a dilución utilizando FD=100 para T2 y de 10 para T3-T4. Se utilizó un extracto de betabel estandarizado a una concentración inicial de 20 g/L con un FD =100, el cual se utilizó para realizar una curva estándar de acuerdo con el procedimiento reportado por Cervantes-Arista *et al.* (2020) para la recuperación de la fracción colorida del betabel. La determinación se realizó al inyectar 100 μ L de cada muestra en un HPLC marca Agilent modelo 1260, usando como fase móvil una mezcla de isopropanol:etanol:agua:ácido acético (23:35:40:2) en condiciones isocráticas, la fase estacionaria consistió de dos columnas conectadas en paralelo: la primera fue de fase normal sílica Zorbax (5 μ m, 4.5 x 150 mm) y la segunda columna fase reversa C-18 Bondapack (3.9 x 300 mm). La concentración de las betalaínas fue determinada mediante el cálculo del área de las señales a λ =483 y 538 nm. Los valores de las áreas se sumaron para obtener un contenido total de betalaínas y convertidos a concentración mediante la curva estandar de betabel descrita anteriormente. Los valores se expresaron como mg/g_{muestra}.

6.6 Evaluación de capacidad antioxidante (CA) por ABTS⁺

Se preparó una solución stock de ABTS⁺ a una concentración final de 7 mM con agua desionizada y persulfato de potasio a una concentración de 2.45 mM. La solución se llevó a obscuridad por un período de 16 h y previo a su uso se ajustó la lectura de la absorbancia (λ =734nm) a un valor de 0.7 ± 0.02 con solución de búffer de fosfatos (pH 7.4, 10X (1X, contiene 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ y 2 mM de KH₂PO₄). Se tomaron 100 μ L de las muestras de *S. stellatus* (T1-T4) y se mezclaron con 2 mL de la solución del radical ABTS⁺ mezclando en un vórtex por 5 s y dejando reposar durante 7 min en oscuridad. La absorbancia de las muestras fue medida a λ =734nm en un espectrofotómetro y los resultados fueron reportados como los miligramos equivalentes de ácido ascórbico por gramo de

muestra. Cabe mencionar que se utilizó el ácido ascórbico como estándar (1-20 mg/mL) debido a que es uno de los antioxidantes mayoritarios presentes en este tipo de frutos.

6.7 Actividad anti-hiperglucemiante

La evaluación de la actividad anti-hiperglucemiante se determinó en modelos *in vivo*, para ello, ratas macho Wistar de 150-200 g de peso fueron mantenidos bajo condiciones de ciclos de luz/oscuridad (12/12 h) a 22 ± 1 °C y $50 \pm 10\%$ HR, y fueron alimentadas con una dieta estándar de laboratorio y agua. Todos los procedimientos experimentales se desarrollaron de acuerdo con las Regulaciones Federales que siguen las Guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

La prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) se realizó considerando un ayuno de 14 h previas a la evaluación. Posterior al ayuno, se determinó la glucosa basal ($t=0$) mediante la medición de glucosa capilar en un glucómetro (Accu-Chek® Roche) obteniendo una gota de sangre por una pequeña punción en la vena caudal, y se registró el peso de las ratas. Las ratas recibieron una dosis de glucosa (dextrosa anhidra) por vía oral (2 g/kg) utilizando una cánula de metal o bien distintas concentraciones de las muestras T2-T4. Los grupos experimentales se definieron de acuerdo con el Cuadro 2:

Cuadro 2. Grupos experimentales utilizados para determinación de actividad anti-hiperglucemiante (n=5-6 ratas por grupo).

Grupo	Descripción	Dosis
1	Control (Glucosa)	2.0 g/kg
2	Metformina	300 mg/kg
3	T1	
4	T2	25 mg/kg
5	T3	100 mg/kg
6	T4	200 mg/kg

El Grupo 2 correspondiente a la dosis de metformina la cual fue administrada 30 min antes de la dosis de glucosa, mientras que los Grupos 3-6 fueron administrados 15 min previos a la dosis de glucosa. El contenido de glucosa en sangre se midió a los 30, 60, 90 y 120 min y se reportó como el valor de la media \pm error estándar de la media (SEM) en mg/dL.

6.8 Optimización de extracción por Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

Para realizar la optimización del proceso de extracción de los compuestos bioactivos en los frutos de *S. stellatus*, se utilizó un diseño experimental Box-Behnken empleando como variables el pH (2.5-7.0), la temperatura (10-45°C), el tiempo de extracción (10-60 min) y la concentración de etanol en el solvente (EtOH 20-80%) que constó de 29 corridas para establecer las condiciones óptimas de extracción de betalaínas (Cuadro 3). Por otra parte, en el Cuadro 4 se muestran las condiciones de extracción para definir las condiciones óptimas de extracción del CFA y CA, respectivamente.

Para ello, 250 mg de pulpa liofilizada de las muestras T1-T4 se colocaron en 50 mL de solvente aditando durante 5 min en un vórtex. Posteriormente el pH de la solución se ajustó y la muestra se colocó en un baño con sonicación durante el tiempo requerido. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 20°C en una centrífuga Hermle Z326 (Hermle Labortechnik, Alemania), el sobrenadante de cada muestra fue almacenado en frascos ámbar para su posterior caracterización.

Cuadro 3. Diseño de experimentos Box Behnken para la extracción de betalainas.

Corrida	pH	T (°C)	t (min)	EtOH (%)
1	2.5	10	35	50
2	7.0	10	35	50
3	2.5	45	35	50
4	7.0	45	35	50
5	4.75	27.5	10	80
6	4.75	27.5	60	80
7	4.75	27.5	10	20
8	4.75	27.5	60	20
9	2.5	27.5	35	80
10	7.0	27.5	35	80
11	2.5	27.5	35	20
12	7.0	27.5	35	20
13	4.75	10	10	50
14	4.75	45	10	50
15	4.75	10	60	50

Corrida	pH	T (°C)	t (min)	EtOH (%)
Cont...				
16	4.75	45	60	50
17	2.5	27.5	10	50
18	7.0	27.5	10	50
19	2.5	27.5	60	50
20	7.0	27.5	60	50
21	4.75	10	35	80
22	4.75	45	35	80
23	4.75	10	35	20
24	4.75	45	35	20
25	4.75	27.5	35	50
26	4.75	27.5	35	50
27	4.75	27.5	35	50
28	4.75	27.5	35	50
29	4.75	27.5	35	50

Cuadro 4. Diseño de experimentos Box Behnken para la extracción de CFT y CA.

Corrida	pH	T (°C)	t (min)	EtOH (%)
1	4	20	20	60
2	6	20	20	60
3	4	60	20	60
4	6	60	20	60
5	4	40	10	60
6	6	40	10	60
7	4	40	30	60
8	6	40	30	60
9	5	20	10	60

Corrida	pH	T (°C)	t (min)	EtOH (%)
Cont...				
10	5	60	10	60
11	5	20	30	60
12	5	60	30	60
13	5	40	20	60
14	5	40	20	60
15	5	40	20	60
16	5	40	20	60
17	5	40	20	60

Los extractos fueron caracterizados de acuerdo con su contenido de betalainas, CFT y CA de acuerdo con el procedimiento descrito en secciones previas y analizados mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) utilizando el software Minitab Statistical Software (v.17.1.0, JMP Division, SAS Institute Inc.).

6.9 Encapsulación de betalaínas por coacervación compleja (CC)

6.9.1 Condiciones de CC

De acuerdo con el trabajo reportado por Estrada-Fernández *et al.* (2018), las condiciones de formación de los complejos coacervados utilizadas para la encapsulación de las betalaínas fueron:

Biopolímero catiónico: Aislado de proteína de suero de leche (PSL), (WPI por sus siglas en inglés, Whey Protein Isolate) al 1% (p/v).

Biopolímero aniónico: Goma Arábica (GA) al 1% (p/v).

pH coacervación: 4.0 ± 0.1

Relación másica WPI:GA: 3:1.

6.9.2 Incorporación de extracto de *S. stellatus* en CC

500 mg de pulpa liofilizada de T2 fueron agregados en 5 mL de EtOH 55% (v/v), agitando en un vórtex por 5 min, el pH del extracto fue ajustado a pH 4.2, sonificado en un baño de ultrasonido por 1 h a 10 °C. Los extractos fueron centrifugados por 10 min a 10,000 rpm, el sobrenadante fue recuperado y utilizado para la encapsulación en el coacervado complejo. Para ello, se prepararon dispersiones de cada biopolímero con una concentración de 1% (p/v) y se almacenaron durante 24 h a 4 °C previas a su uso, con la finalidad de permitir su completa hidratación. El proceso de encapsulación se muestra en la Figura 9. El extracto de betalaínas fue agregado en la dispersión de WPI y bajo agitación constante se agregó lentamente la dispersión de GA por goteo, posteriormente el pH se ajustó a 4, la mezcla se mantuvo durante 1 h bajo agitación y posteriormente se dejó reposar durante 24 h para permitir la interacción electrostática de los biopolímeros y la formación de los coacervados complejos. Finalmente, los coacervados cargados con la betalaína fueron centrifugados a 6,000 rpm por 20 min. La fase precipitada fue retirada y secada en una estufa a 30°C hasta alcanzar peso constante. Las muestras resultantes fueron almacenadas en oscuridad hasta su posterior caracterización.

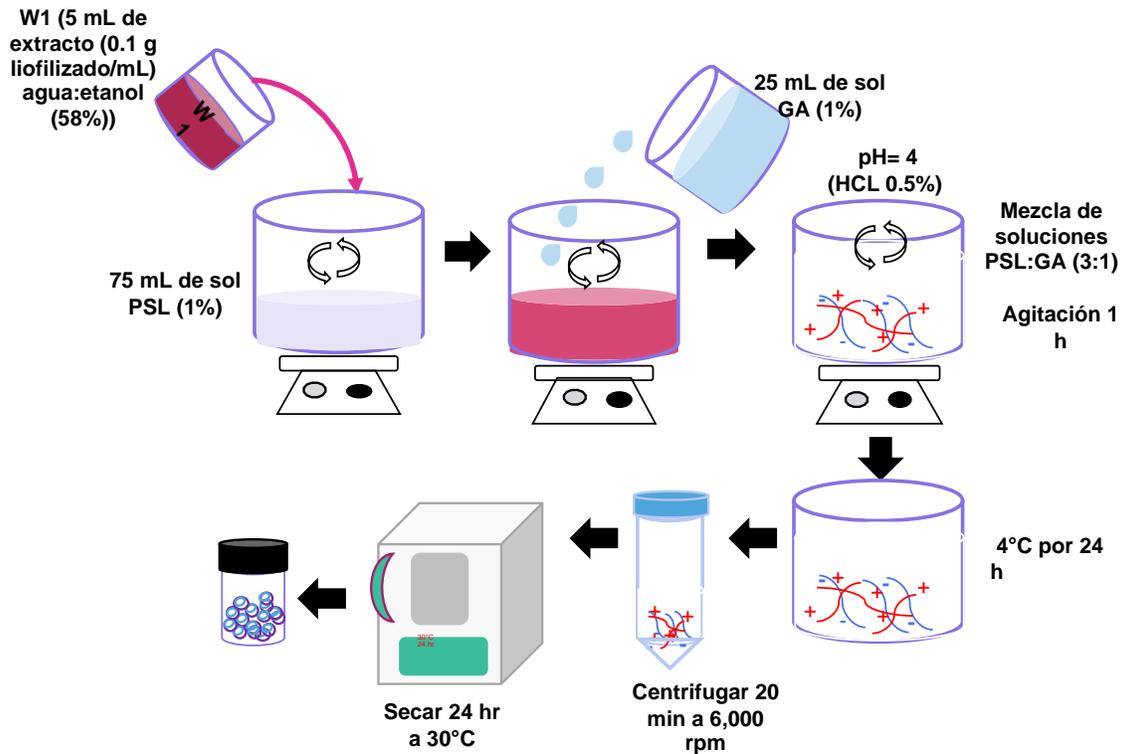


Figura 9. Diagrama esquemático del proceso de encapsulación de betalainas.

6.10 Caracterización de CC

6.10.1 Rendimiento de coacervación

De acuerdo con Estrada-Fernández et al. (2018), el rendimiento de coacervación fue calculado con la Ecuación (3).

$$\% CC = \frac{m_{CC}}{m_{WPI} + m_{GA}} \times 100 \quad (3)$$

donde m_{CC} es la masa del complejo coacervado seco, m_{WPI} y m_{GA} son las masas de WPI y GA utilizadas para formar el coacervado en base seca.

6.10.2 Potencial zeta de CC

El potencial zeta de los biopolímeros individuales (1% p/v) pH 2-7) fue determinado en un Zetasizer NS (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, R.U.) mediante la determinación de la movilidad electroforética.

6.10.3 Espectroscopia de FTIR

El análisis de FTIR se realizó con un espectrofotómetro infrarrojo Frontier (Perkin Elmer, Waltham, MA, E.U.). Las muestras secas se pusieron en contacto con el cristal de diamante aplicando una presión de carga y se escanearon en el intervalo de 650-1800 cm^{-1} . Se utilizó un espectro de celda vacía como blanco. Para cada muestra, el espectro representaba un promedio de cuatro escaneos con una resolución de 1 cm^{-1} . Además, los espectros fueron corregidos en la línea base.

6.10.4 Eficiencia de encapsulación de betalaínas

La eficiencia de encapsulación de las betalaínas en los coacervados de PSL:GA fue calculada de acuerdo con la Ecuación 4:

$$EE (\%) = \frac{BC_{CC}}{BC_{extracto}} \times 100 \quad (3)$$

donde BC_{CC} representa el contenido de betalaínas contenidas en el coacervado, $BC_{extracto}$ es el contenido de betalaínas iniciales en el extracto etanólico. Para BC_{CC} , las betalaínas fueron extraídas al colocar 100 mg de coacervado en 1.5 mL de agua y aplicando ultrasonido en un equipo Vibra-Cell VCX130 PB (Newtown, CT, USA) a 20 kHz de frecuencia y 30% de amplitud, durante 2 min en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra, el extracto se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y al sobrenadante se le determinó el contenido equivalente de betalaínas de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

6.10.5 Microscopia óptica de CC

Se obtuvieron micrografías de los CC conteniendo las betalaínas en un microscopio óptico Olympus BX45 con contraste de fase acoplado a una cámara digital Camedia C- 3030 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) y un analizador de imágenes Image-Pro Plus version 7.0. Las muestras fueron observadas a magnificaciones de 4X, 10X y 40X, respectivamente.

6.11 Estabilidad térmica de los CC

Los CC conteniendo las betalaínas fueron colocados en una estufa a 100°C durante 1, 2, 3, 4, 5, y 22 h. Al concluir cada tiempo, 20 mg de CC fueron tomados, triturados en un mortero y agregados en 1.5 mL de agua, las muestras fueron sonicadas en un Vibra-Cell VCX130 PB (Newtown, CT, USA) por 2 min a una frecuencia del 30%, y se centrifugaron. El sobrenadante de cada muestra fue utilizado para determinar la concentración de betalaínas en los CC. El mismo procedimiento fue aplicado para la pulpa de T2 con la finalidad de evaluar el efecto de los CC.

6.12 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0.05$ y pruebas de comparación de medias mediante la prueba de Tukey-Kramer, utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.I versión (6.0.1.7589; Statgraphics Technologies, Inc., USA). La MSR fue realizada utilizando el software de MINITAB versión (17.1.0; Minitab Inc., USA), los gráficos presentados fueron elaborados en el software SigmaPlot (v. 12.0; Systat software, CA, USA).

7. Resultados y discusión

En la Figura 10 se muestran las imágenes representativas de las variantes de *S. stellatus* utilizadas en este estudio.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 10. a) Productor realizando la cosecha de *S. stellatus*, b) Frutos recibidos en las instalaciones de UAM-I, c) T1, variante blanca, d) T2, variante roja, e) T3, variante púrpura, f) T4 variante naranja.

7.1 Análisis molecular

La caracterización de las variantes o muestras T1-T4 por medio del análisis molecular se observa en la Figura 11. De acuerdo con la Figura 11a y 11b, la extracción de ADN se realizó de manera adecuada, ya que se puede apreciar que éste se encuentra en estado íntegro, de acuerdo con su comparación con el marcador de peso molecular λ psf1. La Figura 11c y 11d se muestran la amplificación de los marcadores *psbA-trnH* y *matK* para cada una de las muestras. En este caso,

el marcador *psbA-trnH* presentó un desplazamiento de bandas distintas en las variantes T1-T4, lo que podría indicar la posible existencia de una diferencia genética (Cervantes *et al.*, 2020). Por lo que se realizó un segundo análisis con el marcador *matK*, el cual, al igual que *psbA-trnH* se ha reportado como un marcador confiable para la identificación y clasificación de especies vegetales (Song *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009). En la Figura 11d se observan los resultados derivados de la amplificación con el marcador *matK*, donde también se observaron diferencias entre el tamaño de las bandas de las distintas muestras de *S. stellatus*.

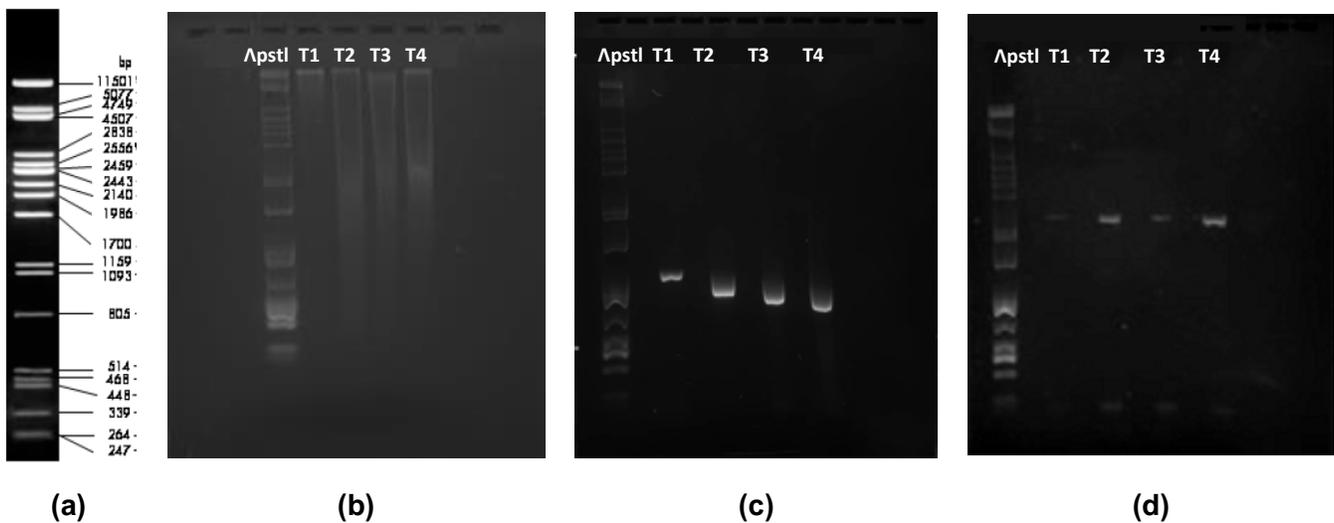


Figura 11. a) Perfil electroforético del marcador λ pstI para peso molecular de ADN (Jena Bioscience ®), b) Evaluación cualitativa de la extracción de ADN en T1-T4 respecto a estándar λ pstI, b) Perfil de PCR para T1-T4 marcador *psbA-trnH* y c) Perfil de PCR para T1-T4 marcador *matK*

Partiendo de los resultados anteriores, se realizó la secuenciación de los productos de amplificación para conocer en forma más específica la semejanza entre las variantes utilizadas para *S. stellatus* analizadas. Para ello, se obtuvieron las células de *E. coli* “transformadas” que contienen los productos de amplificación de los marcadores (*psbA-trnH* y *matK*). Las células transformadas de *E. coli* fueron inoculadas en medio LB para la recuperación de plásmidos, los cuales fueron purificados y colocados en un gel de agarosa al 1% para la verificación del inserto o producto de amplificación en las células. A partir de la secuenciación de los

plásmidos (Anexo 1) insertados se encontró que existía diferencia en el número y tipo de nucleótidos entre las cuatro variantes.

En la Figura 12 se muestran los cultivos de las células transformadas obtenidas para cada marcador en las muestras analizadas. Cabe mencionar que de no haberse logrado la incorporación de los plásmidos provenientes de las muestras T1-T4, los cultivos celulares no hubiesen sido viables.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el software BioEdit Sequence Alignment Editor (v. 7.0.5, Informer Technologies, Inc., USA) y analizadas en MEGA-X v10.0.5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Temple University and Arizona State University, USA)), donde se confirmaron las diferencias en el número y ordenamiento de los nucleótidos para cada muestra, permitiendo identificar y agrupar las variantes (fenotipos) de *S. stellatus* utilizadas en este trabajo. A partir de estos resultados, se construyeron los árboles filogenéticos mostrados en la Figura 13 para cada uno de los marcadores utilizados.

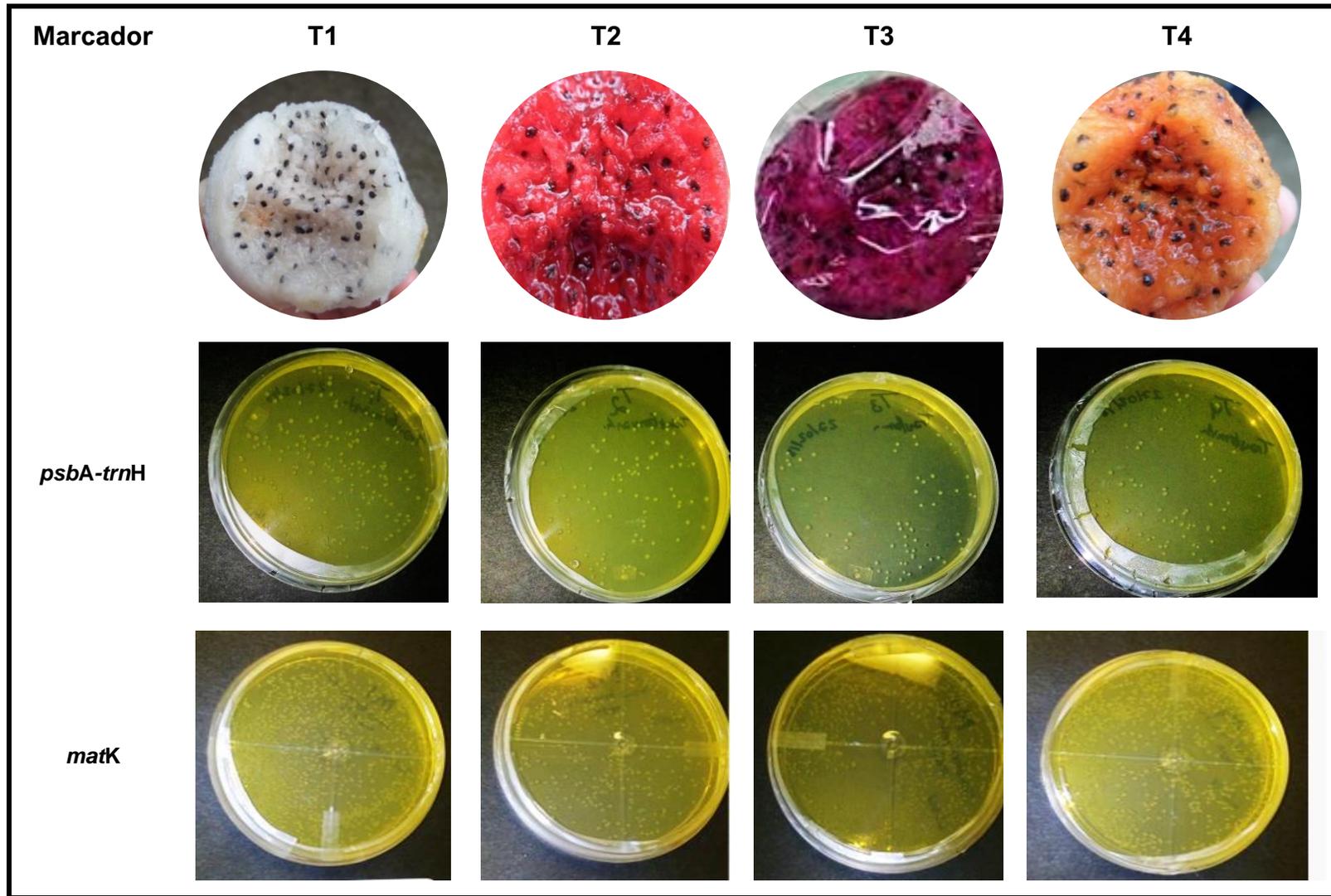


Figura 12. Cultivos de células de *E. coli* transformantes obtenidas con los productos de amplificación del marcador *psbA-trnH* (superior) y *matK* (inferior) para las muestras T1-T4.

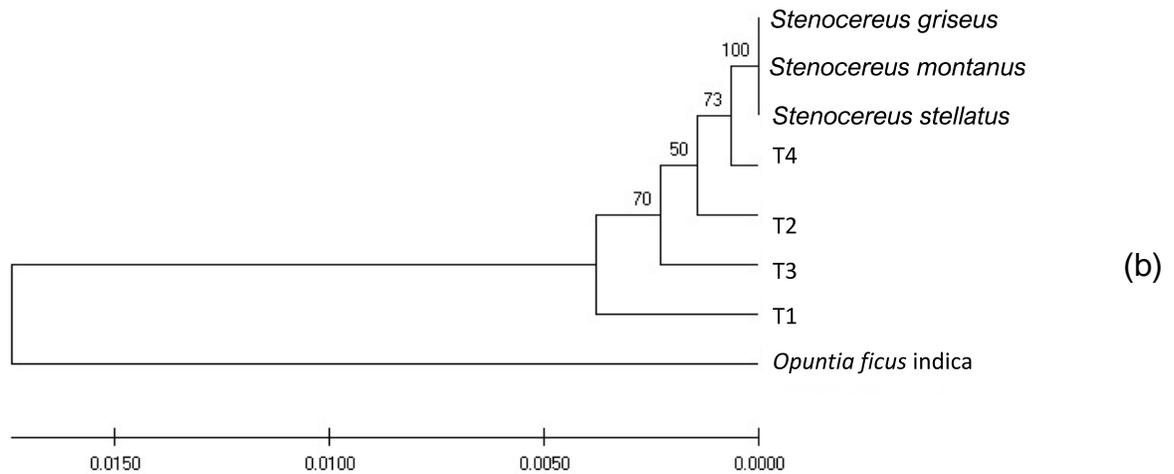
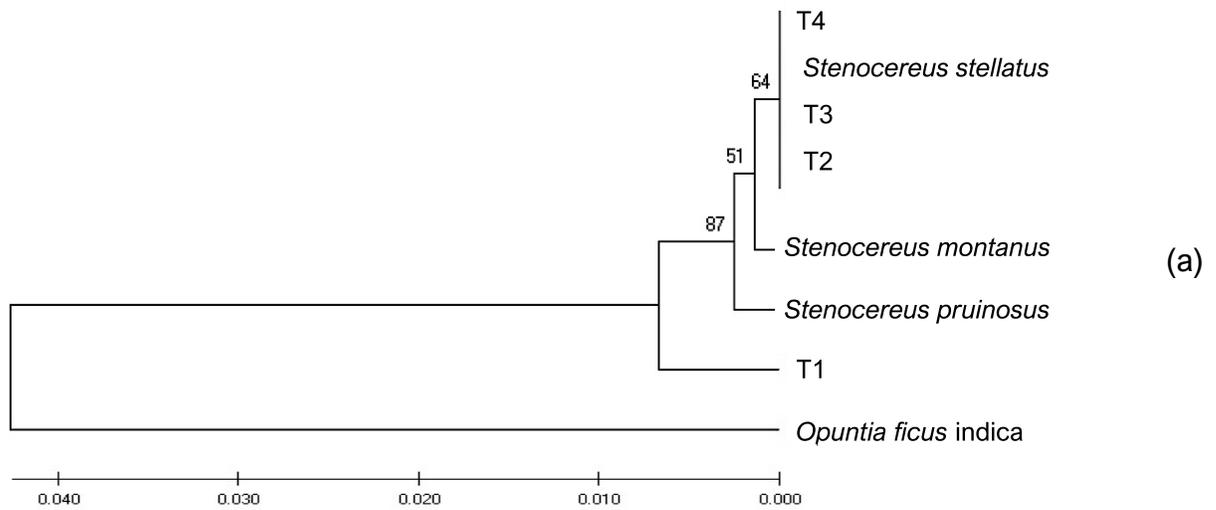


Figura 13. Árbol filogenético obtenido para las muestras T1-T4 basado en los productos de amplificación del marcador a) *psbA-trnH* y b) *matK*.

El árbol filogenético obtenido con el marcador *psbA-trnH* permitió observar el agrupamiento de las especies del género *Stenocereus* y *Opuntia*, y de las muestras T1-T4. A partir de la comparación de sus secuencias fue posible establecer que la variante blanca (T1) se encontró más lejana del nodo interno, o punto donde se concentran el resto de variantes (T2-T4), lo cual de acuerdo con Casas *et al.* (2007), puede deberse al efecto del proceso de domesticación o mecanismo de selección artificial que ha sufrido esta variante, ya que el fruto blanco presenta las características de acidez, dulzor y tamaño preferidas en la región. Para el caso del marcador *matK*

se encontraron resultados similares, la muestra correspondiente al fruto blanco se ubicó más alejada del nodo interno que contenía las muestras T2-T4. Cabe destacar, que existe poca información reportada acerca del estudio molecular de la especie *S. stellatus*, por lo que este estudio aporta información relevante acerca de las variantes asociadas a esta especie. De acuerdo con Casa *et al.* (2006), el manejo humano de este tipo de especies vegetales puede promover el incremento en la diversidad morfológica y genética, indicando que aquellas especies que sufren procesos de domesticación generalmente presentan mayor diversidad molecular respecto a aquellos especímenes silvestres.

7.2 Análisis matemático

Debido que las cuatro variantes de *S. stellatus* son reconocidas por los productores de una forma cualitativa por color de la pulpa de los frutos, el uso de representaciones gráficas basadas en parámetros de color (CIELab) puede representar una alternativa factible para proveer criterios más rigurosos en la clasificación de estas variantes. Para llevar a cabo este proceso, se realizaron un total de 76 espectros de absorción de la pulpa de frutos (T1-T4) distribuidos de la siguiente manera: 16 para T1, 25 para T2, 22 para T3, y 13 para T4 (Ver Anexo 2). Los espectros obtenidos en un intervalo de $\lambda=350-800$ nm fueron promediados y normalizados, como se muestra en la Figura 14.

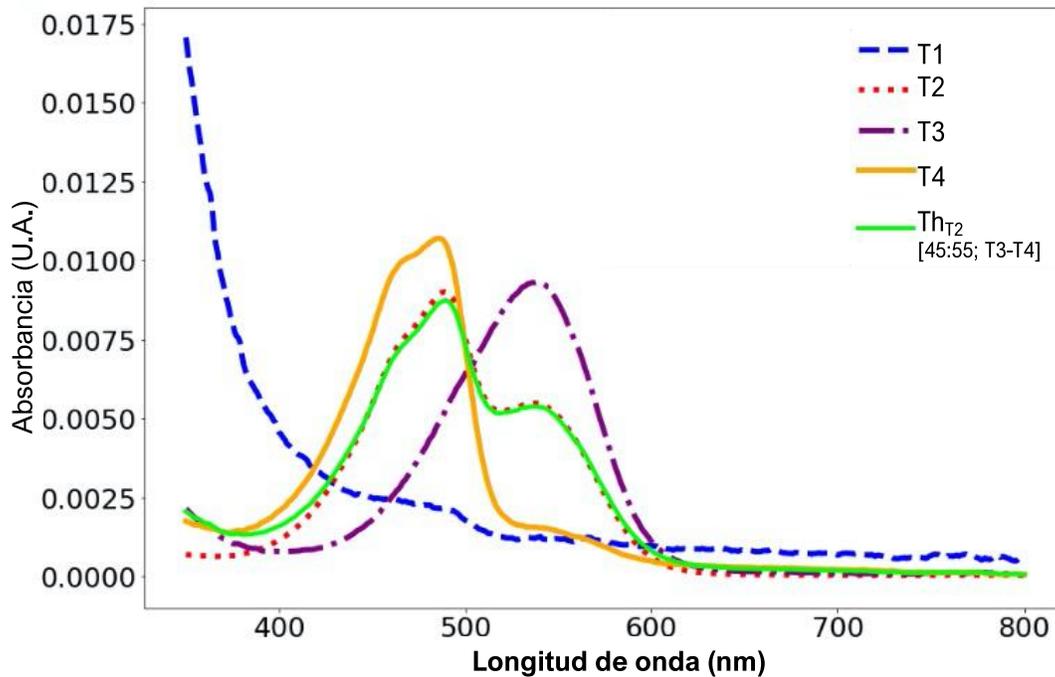


Figura 14. Espectros normalizados de las variantes de *S. stellatus* correspondientes al promedio de 76 escaneos para todas las muestras.

A partir de los espectros promedio de las variantes de *S. stellatus*, se consideraron los valores de máxima absorbancia ubicados en $\lambda_{max}=540$ nm correspondiente a las betalainas y $\lambda_{max}=486$ nm para betaxantinas. La selección del método de clasificación se basó en obtener el método con mayor capacidad de diferenciación de los atributos de cada muestra (T1-T4) de acuerdo con las magnitudes de absorbancia a ambas longitudes de onda. Se utilizaron los modelos Árbol de decisión, k-Neighbors, SVM y el espacio CIELab, respectivamente. Para cada método, los datos fueron divididos en dos grupos: i) datos para entrenamiento del modelo y ii) datos de prueba. Con los datos de entrenamiento se buscó que el modelo reconociera las variables con las cuales se realizará la clasificación, mientras que con los datos de prueba se busca saber qué tan eficiente es el modelo para ejecutar la clasificación de acuerdo a esas características definidas. El método denominado árbol de decisión es utilizado para ubicar los objetos en los diferentes grupos que va formando para cada categoría. El método evaluado de vecinos más cercanos o K-Neighbors, es un método de distancias que no busca asumir ninguna distribución de la variable categórica (variable respuesta), sino que va generando en cada paso del proceso, una comparación entre

los puntos cercanos para generar una clasificación de acuerdo a la mínima distancia entre los puntos. Finalmente, el método de Support Vector Machine (SVM) o Máquinas de Soporte Vectorial, es el método cuya separación puede llevarse a cabo a través de rectas, planos o hiperplanos y marca sus límites a través de puntos soporte (puntos que se encuentran más cercanos entre los diferentes grupos) y permite generar el margen que separa de igual forma a estos puntos soporte. En la Figura 15 se muestran las representaciones de clasificación de las variantes de *S. stellatus* de acuerdo con los métodos de clasificación descritos anteriormente.

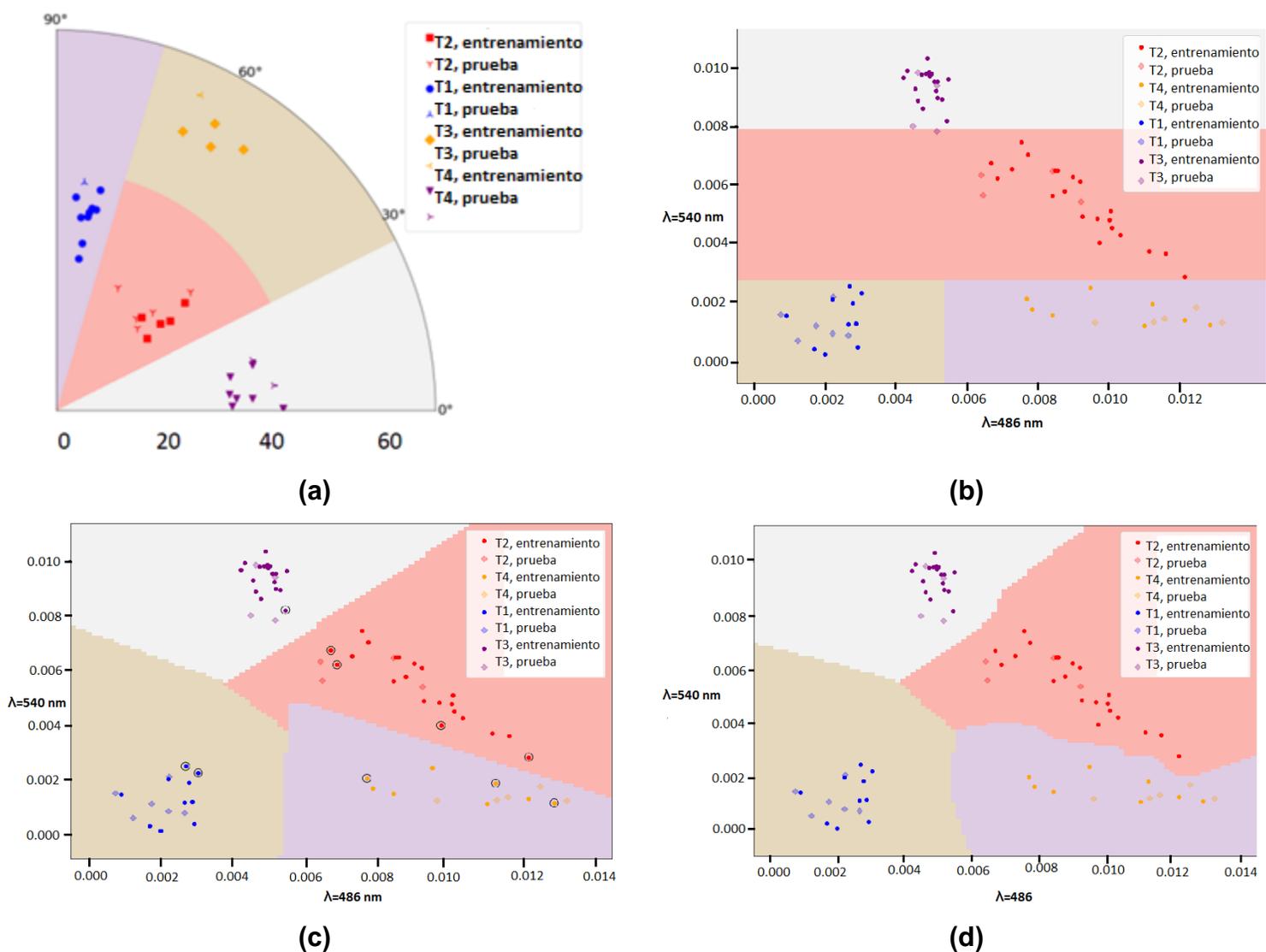


Figura 15. Resultados de la clasificación supervisada de las variantes de *S. stellatus*: a) Espacio CIELab, b) árbol de decisión, c) SMV, y d) K-neighbors.

A partir de estos resultados se encontró que el método SMV (Figura 15c) mostró una mejor capacidad para diferenciar y clasificar las variantes de *S. stellatus* de forma objetiva, por lo que es posible utilizar esta herramienta en futuros estudios para uniformizar la selección y diferenciación entre los frutos de variantes de una especie, y así mantener criterios de estandarización para las matrices de estudio.

No hay registro del uso de este tipo de algoritmos para establecer la clasificación de frutos basados únicamente en sus espectros de absorción, por ello este primer acercamiento permite ampliar el uso de las herramientas matemático-informáticas con fines biotecnológicos. Cabe mencionar que el agrupamiento de las variantes de acuerdo con sus atributos de color (Figura 15a) presenta buena diferenciación, aunque pudiera no ser suficientemente robusta cuando las tonalidades entre los frutos son muy semejantes.

7.3 Caracterización fisicoquímica de los frutos

7.3.1 Porcentaje de pulpa, cáscara y semilla

Los frutos acondicionados fueron caracterizados de acuerdo con su composición en términos del porcentaje que representaba cada tejido principal en el fruto, los resultados se muestran en la Cuadro 5.

Cuadro 5. Porcentaje de pulpa, epicarpio y semilla en frutos de *S. stellatus*.

Muestra	% Pulpa	% Epicarpio	% Semilla
T1	68.67 a ± 5.07	23.75 a ± 4.60	7.58 a ± 1.00
T2	48.85 b ± 9.47	39.03 b ± 9.44	12.12 b ± 3.63
T3	69.00 a ± 3.01	22.96 a ± 2.92	8.04 a ± 1.15
T4	64.52 a ± 4.28	27.19 a ± 4.07	8.29 a ± 1.72

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa a $p < 0.05$, Tukey Kramer.

Se puede observar que las muestras T1, T3 y T4 no presentaron diferencia significativa en el porcentaje de pulpa, T2 mostró menor contenido de tejido. Respecto al porcentaje de epicarpio y semilla, T2 mostró un porcentaje significativamente mayor

que el del resto de muestras, estos resultados concuerdan con lo reportado por Casas *et al.* (1997), ya que este tipo de frutos provienen de plantas con menor domesticación.

7.3.2 Caracterización química

En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos para los atributos de calidad, la composición química y la actividad antioxidante de los frutos de las variantes de *S. stellatus* en las muestras T1-blanca, T2-roja, T3-púrpura, T4-naranja.

Cuadro 6. Composición química de frutos de *S. stellatus*

	T1	T2	T3	T4
Atributos de calidad				
SST (°Brix)	10.15±0.45 b	8.99 ± 0.38 a	9.61 ± 0.68 ab	10.25 ± 0.32 b
pH	4.23 ± 0.11 a	4.31 ± 0.12 a	4.17 ± 0.05 a	4.36 ± 0.21 a
AT (%Ác. málico)	0.88 ± 0.05 a	0.47 ± 0.06 b	0.57 ± 0.15 b	0.42 ± 0.19 b
Azúcares (mg/g_{FF})				
Glucosa	16.01 ± 3.49 a	14.63 ± 3.65 a	12.72 ± 1.30 ab	11.36 ± 0.79 b
Fructosa	34.14 ± 0.51 ab	36.26 ± 0.44 b	32.31 ± 0.33 ab	30.84 ± 0.30 a
Ácidos orgánicos (mg/g_{FF})				
A. málico total	1.9 ± 0.48 a	3.7 ± 0.67 b	2.90 ± 0.29 ab	2.20 ± 0.63 a
A. L-málico	1.40 ± 0.40 ac	3.00 ± 0.73 b	2.40 ± 0.30 ab	1.30 ± 0.45 c
A. D-málico	0.40 ± 0.10 a	0.70 ± 0.07 ab	0.50 ± 0.08 a	0.90 ± 0.23 b
A. cítrico	1.2 ± 0.28 a	3.00 ± 0.25 a	2.20 ± 1.98 a	2.60 ± 0.67 a
Contenido de betalaínas (mg/g_{FF})				
Betalaínas totales	(6.0±2.0) x 10 ⁻⁴ a	0.38 ± 0.05 c	0.06 ± 0.01 b	0.02 ± 0.00 ab
Betacianinas	(2.9±0.9) x 10 ⁻⁴ a	0.21 v 0.03 b	0.04 ± 0.01 c	0.004±0.00 a
Betaxantinas	(3.0±1.0) x 10 ⁻⁴ a	0.17 ± 0.02 b	0.02 ± 0.01 a	0.02 ± 0.00 a
Compuestos funcionales				
CFT (mg _{EAG} /g _{FF})	0.16 ± 0.04 ab	0.26 ± 0.04 b	0.13 ± 0.04 ab	0.08 ± 0.10 a
Flavonoides (mg _{EQ} /g _{FF})	0.01 ± 0.00 a	0.10 ± 0.02 b	0.01 ± 0.01 a	0.02 ± 0.01 a
ABTS (mg _{EAA} /g _{FF})	0.23 ± 0.09 a	0.34 ± 0.08 a	0.24 ± 0.06 a	0.29 ± 0.05 a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa a p<0.05, Tukey Kramer.

Los resultados de los atributos de calidad de los frutos, mostraron que las muestras T2 presentaron el menor contenido de SST comparado con las otras muestras, con excepción de T3, respecto al pH no se observó diferencia significativa entre las variantes T1 a T4, aunque sí se presentó diferencia significativa en la acidez titulable para la muestra T1. Los resultados mostrados en el Cuadro 6 son semejantes a los reportados por García-Cruz *et al.* (2016) para frutos de la misma especie colectados en Tepexi de Rodríguez en el Estado de Puebla, México.

Respecto a la composición química, se encontró que todas las muestras presentaron mayor contenido de fructosa respecto a la glucosa. El contenido de ácidos orgánicos mostró que las T2 y T3 presentaron el mayor contenido de ácido málico, mientras que el contenido de ácido cítrico no mostró diferencias significativas entre las muestras. El contenido de betalaínas fue diferente significativamente entre las muestras, siendo T2 la que presentó un contenido mayor: 19 veces el contenido en T4, 6 veces el contenido en T3, y 600 veces el contenido en T1. El contenido de betacianinas fue mayor en T2, seguida de T3, mientras que T4 y T1 no presentaron diferencia significativa entre ellas, asimismo, el contenido de betaxantinas fue mayor para T2, mientras que en el resto de las muestras no se observó diferencia significativa.

Debido a que el betabel es la principal fuente comercial para la obtención de estos pigmentos, se desarrolló una estimación del contenido de betalaínas por HPLC en las tres variantes coloridas (T2, T3 y T4), en relación a la fracción colorida de betabel. Esto permitió corroborar que la muestra T2 presenta la mayor concentración de betalaínas, con una concentración similar a la encontrada para betabel (0.34 mg/g). Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Pérez-Loredo *et al.* (2016) y García-Cruz *et al.* (2016), en ambos casos, las mayores concentraciones de betalaínas se encontraron en los frutos rojos de esta especie. Esto lleva a poner en perspectiva el hecho que si la finalidad es la extracción de los pigmentos la mejor fuente para su extracción deben ser los frutos de color rojo, sin embargo, cabe resaltar que de forma indirecta los frutos púrpura y naranja mantienen de forma natural una discriminación de ambos grupos de betalaínas (betacianinas y betaxantinas).

Finalmente, respecto a la cuantificación de CFT, flavonoides y CA se encontró diferencia significativa entre las muestras T2 y T4 para CFT, para flavonoides, T2 presentó la mayor concentración. La CA no mostró diferencias significativas entre las muestras, a pesar de que ésta puede asociarse al contenido de betalainas y CFT. Estudios previos sobre frutos de esta especie han reportado diferencias significativas en la CA en frutos de los cuatro colores evaluados en este trabajo, Beltrán-Orozco *et al.* (2009) reportaron que las variante blanca y amarilla presentaron la mayor capacidad antioxidante, mientras que Pérez-Loredo *et al.* (2016) observaron esta propiedad para la variante blanca de frutos de *S. stellatus*. Estas diferencias pueden atribuirse a las condiciones de cultivo y crecimiento de las plantas, así como a las regiones y temporalidades de cosecha.

Para tratar de tener un mayor entendimiento de este comportamiento se realizó un análisis de correlación de la composición química sobre la CA, donde el CFT, el ácido D-málico y el contenido de glucosa fueron correlacionados como principales factores que afectan la CA. El modelo matemático de dicha correlación corresponde a $CA = 0.542 CFT + 0.558 D - málico + 0.282 Glucosa$, donde se observa que los compuestos fenólicos y el ácido D-málico contribuyen en mayor proporción al comportamiento de la CA. En este sentido, los compuestos fenólicos totales debido al gran número de grupos hidroxilo presentes en su estructura, son considerados excelentes donadores de electrones que actúan efectivamente en la estabilización de radicales libres como el ABTS (Minatel *et al.*, 2017), además se ha demostrado que algunos ácidos orgánicos como el ácido cítrico y ascórbico, también actúan como agentes antioxidantes (Belhadj *et al.*, 2017). Por otra parte la glucosa presenta grupos hidroxilo que posiblemente puedan interactuar con los radicales libres del reactivo de ABTS, como ocurre con los compuestos presentes en el reactivo de Folin-Ciocalteu, tal como se reporta en el trabajo de Muñoz-Bernal *et al.* (2017).

7.3.3 Efecto anti-hiperglucemiante

Solo las muestras T2 y T4 exhibieron actividad anti-hiperglucemiante reduciendo el nivel de azúcar en sangre (Figura 16), T4 en una dosis de 100 y 200 mg/kg mostró una reducción significativa al cabo de 30 min respecto a la muestra control. En el caso de

la muestra T2 a una dosis de 100 mg/kg, se observó la reducción del nivel de azúcar con mayor efecto respecto al control, y semejante al observado en el tratamiento con metformina.

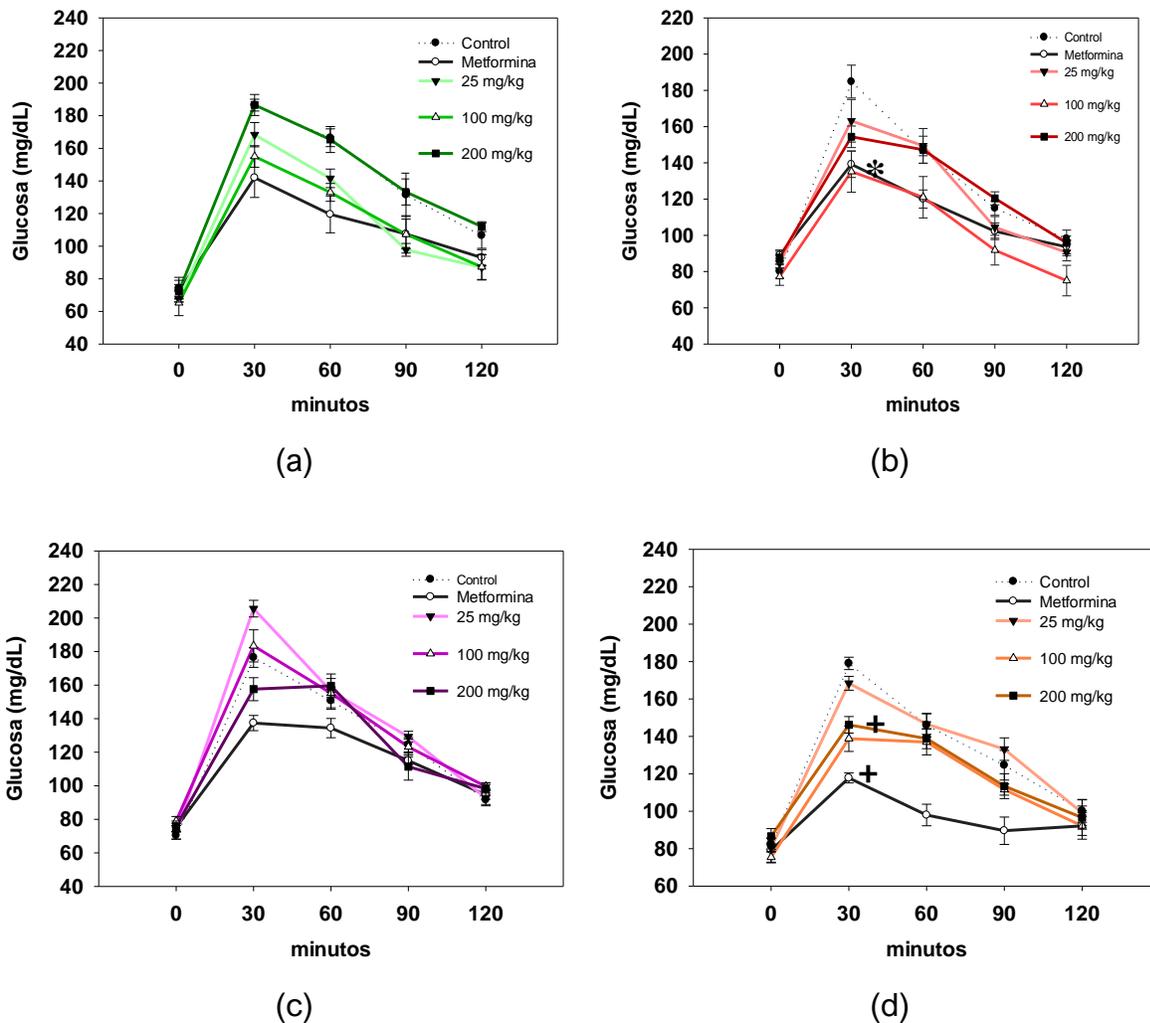
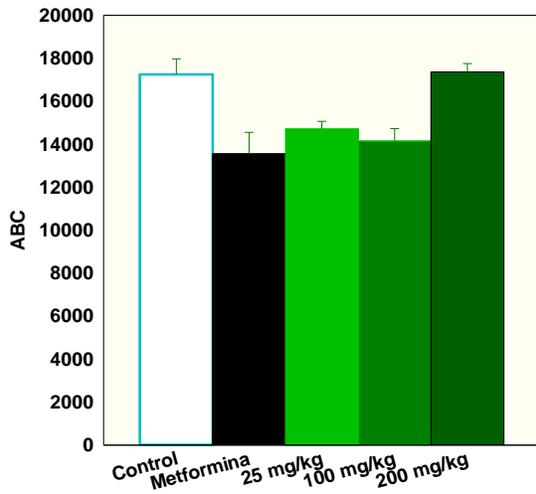
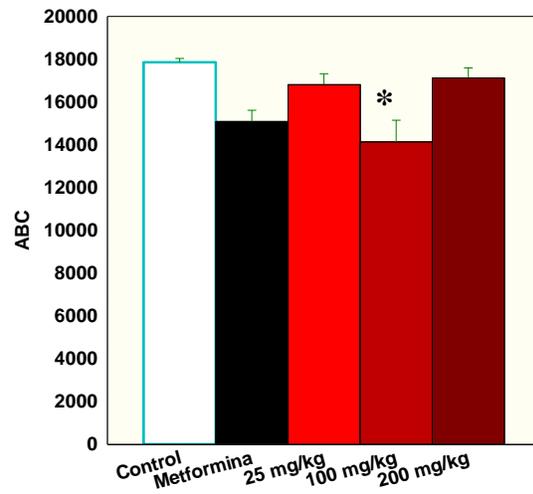


Figura 16. Prueba de tolerancia a la glucosa bajo diferentes dosis de pulpa liofilizada para las cuatro variantes a) T1, b) T2, c) T3, y d) T4. Valores seguidos por un (*) indican similitud con metformina, valores seguidos por un (+) indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

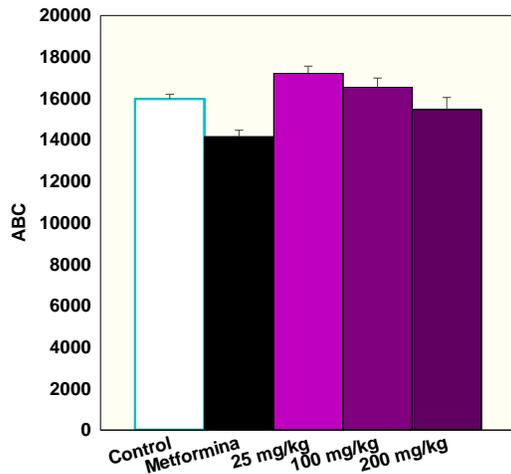
Resultados similares fueron obtenidos al realizar el análisis del área bajo la curva (ABC, Figura 17) para cada uno de los perfiles mostrados anteriormente.



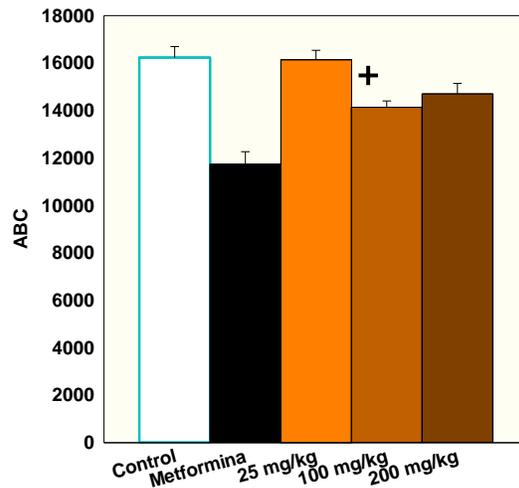
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 17. Área bajo la curva Prueba de tolerancia a la glucosa en los diferentes tratamientos de pulpa liofilizada ((a) T1, b) T2, c) T3, y d) T4), control y metformina. Valores seguidos por un (*) indican similitud con metformina, valores seguidos por un (+) indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

Actualmente existen diferentes fuentes vegetales que se están estudiando con el fin de emplearse en el tratamiento del aumento de la glucemia. Como es bien sabido existen diferentes compuestos químicos que se han reportado como responsables de dicho efecto, entre ellos se encuentran alcaloides, carbohidratos, flavonoides, terpenos, péptidos, aminoácidos, compuestos fenólicos totales y glucopéptidos entre otros (Patel *et al.*, 2012) pero también se han reportado compuestos de naturaleza N-

heterocíclicos como las betalaínas que se encuentran en especies del orden de las Caryophyllales (Lugo-Radillo *et al.*, 2012).

En general la mayoría de las publicaciones que han evaluado el efecto de los compuestos bioactivos provenientes de cactáceas sobre los altos niveles de glucosa en sangre, están basados en el estudio de tallos o clados (Habtemariam, 2019). Andrade-Cetto y Wiedenfeld (2011) reportan que extractos de clados de la especie *Opuntia streptacantha* redujeron los niveles de glucosa en ratas diabetizadas, concluyendo que dicho efecto no está directamente relacionado con la fibra o el mucilago como se reporta en el trabajo de Nuñez-López *et al.* (2013). Butterweck *et al.* (2011) además de observar una disminución sobre los niveles de glucosa reportaron una estimulación en la secreción de insulina por acción directa sobre las células β pancreáticas especialmente al analizar sus extractos obtenidos de clados y piel de fruta de la especie *Opuntia ficus-indica*. En el trabajo de Becerra-Jiménez y Andrade-Cetto (2012) se concluye que el efecto anti-hiperglucemiante que presenta la especie *Opuntia streptacantha* sobre ratas diabetizadas no está asociado con la inhibición de la enzima alfa-glicosidasa o debido a la hidrólisis intestinal de los disacáridos. La regulación de los niveles de glucosa en sangre tiene diferentes mecanismos, algunos asociados a las células β , a los receptores de insulinas y a la inhibición de enzimas encargadas de la degradación de polisacáridos, entre algunos otros. Aunque aún no hay reportes suficientes que sustenten de forma concreta el mecanismo por el cual se esté llevando la regulación de la glucosa en sangre por efecto de la administración de extractos de cactáceas. Cabe destacar que actualmente no hay reportes que hayan evaluado el efecto de los frutos de la especie *S. stellatus* para el tratamiento o regulación de los niveles de glucosa en sangre, por lo que estos resultados son novedosos y abren líneas de investigación que permitan conocer con mayor precisión los compuestos responsables en la regulación de glicemia, así como sus posibles mecanismos de acción.

7.4 Optimización de las condiciones de extracción de los compuestos bioactivos de *S. stellatus*.

De acuerdo con la MSR, el proceso de optimización de las condiciones de extracción se centró en maximizar el rendimiento de extracción del CFT, betalaínas totales (BT), betacianinas (BC) y betaxantinas (BX), así como la CA. Los resultados obtenidos para los diseños experimentales descritos en la sección 6.8 se muestran a continuación en la Cuadro 7 y 8.

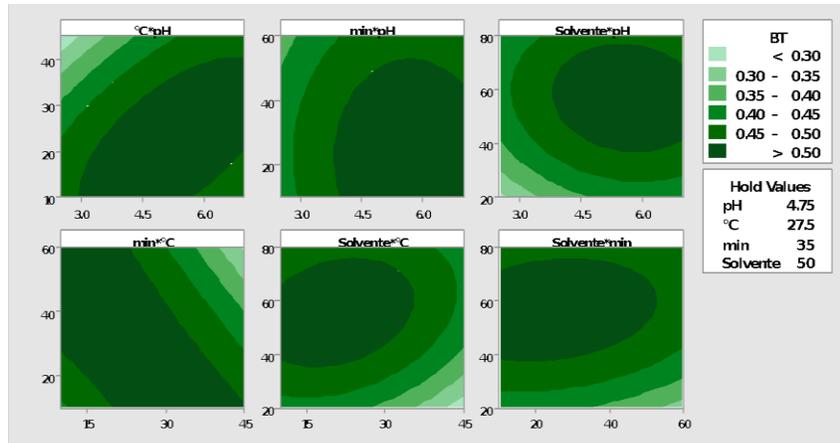
Cuadro 7. Resultados del diseño de experimentos Box Behnken para la extracción de betalaínas.

Corrida	pH	T (°C)	T (min)	EtOH (%)	BX (mg/g)	BC (mg/g)	BT (mg/g)
1	2.5	10	35	50	0.23	0.21	0.44
2	7.0	10	35	50	0.24	0.21	0.45
3	2.5	45	35	50	0.15	0.11	0.26
4	7.0	45	35	50	0.28	0.25	0.53
5	4.75	27.5	10	80	0.23	0.20	0.43
6	4.75	27.5	60	80	0.20	0.15	0.35
7	4.75	27.5	10	20	0.24	0.22	0.46
8	4.75	27.5	60	20	0.23	0.21	0.45
9	2.5	27.5	35	80	0.18	0.13	0.32
10	7.0	27.5	35	80	0.21	0.19	0.40
11	2.5	27.5	35	20	0.22	0.20	0.41
12	7.0	27.5	35	20	0.23	0.22	0.44
13	4.75	10	10	50	0.23	0.20	0.43
14	4.75	45	10	50	0.26	0.24	0.50
15	4.75	10	60	50	0.29	0.27	0.56
16	4.75	45	60	50	0.19	0.12	0.31
17	2.5	27.5	10	50	0.23	0.21	0.44
18	7.0	27.5	10	50	0.27	0.25	0.52
19	2.5	27.5	60	50	0.20	0.16	0.36
20	7.0	27.5	60	50	0.24	0.20	0.43
21	4.75	10	35	80	0.22	0.20	0.43
22	4.75	45	35	80	0.13	0.10	0.22
23	4.75	10	35	20	0.24	0.24	0.48
24	4.75	45	35	20	0.22	0.19	0.41
25	4.75	27.5	35	50	0.27	0.25	0.52
26	4.75	27.5	35	50	0.28	0.26	0.54
27	4.75	27.5	35	50	0.26	0.24	0.50
28	4.75	27.5	35	50	0.27	0.25	0.52
29	4.75	27.5	35	50	0.28	0.26	0.54

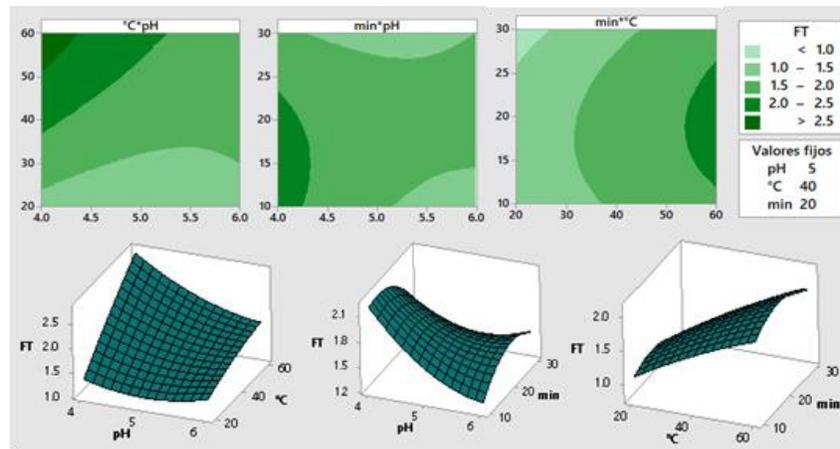
Cuadro 8. Resultados del diseño de experimentos Box Behnken para la extracción de CFT y CA.

Corrida	pH	T (°C)	t (min)	CFT (mg _{EAG} /g)	CA (μmol _{Trolox} /g)
1	4	20	20	1.62	17.52
2	6	20	20	1.33	16.89
3	4	60	20	2.81	18.98
4	6	60	20	1.53	16.43
5	4	40	10	2.16	18.97
6	6	40	10	1.57	16.94
7	4	40	30	1.33	19.00
8	6	40	30	1.53	15.72
9	5	20	10	0.84	14.28
10	5	60	10	1.93	18.12
11	5	20	30	0.79	15.01
12	5	60	30	2.10	18.85
13	5	40	20	1.70	12.48
14	5	40	20	1.70	12.07
15	5	40	20	1.70	12.31
16	5	40	20	1.68	12.09
17	5	40	20	1.69	12.07

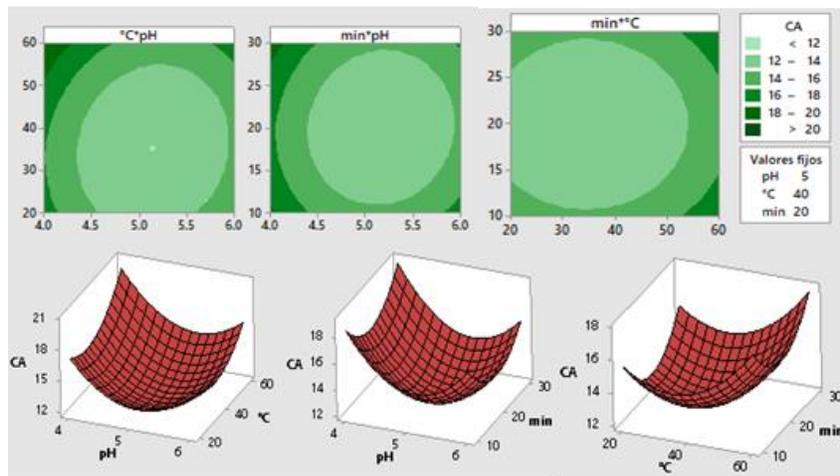
A partir de estos datos, se construyeron los gráficos de superficie de respuesta (Figura 18), y se ajustaron a un modelo de segundo orden, donde los coeficientes de los modelos presentaron valores de $R^2 > 0.82$, ya que de acuerdo con Gutiérrez Pulido y Vara Salazar (2004), este valor en el coeficiente de correlación indica que el modelo explica en gran medida el comportamiento de los datos experimentales.



(a)



(b)



(c)

Figura 18. Gráficos de contorno y superficie de respuesta para a) BT, b) CFT, y c) CA.

En las gráficas de contorno de temperatura vs pH para BT (Figura 18), se observa como la máxima concentración (región verde oscuro) se encuentra en un pH a partir de 3 y conforme aumenta la temperatura de 10 a 40°C, esta se va desplazando a pH's más cercanos a 6, infiriendo un efecto protector del pH. Al evaluar la interacción entre tiempo y temperatura de extracción el rango de máxima concentración se observa entre 20 y 45 °C y un tiempo entre 20 y 60 min. Y al evaluar el solvente vs temperatura de extracción es claro que la máxima concentración se observa en relaciones de solvente cercanas a 40 y 70% (agua: etanol) cuando la temperatura de extracción se encuentra cercanas a 15 y 30 °C.

Para los CFT, los gráficos muestran que, a temperaturas cercanas de 60°C, pH 4 y tiempos de extracción entre 15 y 25 min, se tiene la mayor concentración (Figura 18b). Es interesante observar que la capacidad antioxidante también aumenta cuando se realizan las extracciones a temperaturas altas cercanas a 60°C y pH cercano a 4 con tiempos similares a los mencionados para fenoles totales (Figura 18c), lo que podría indicar que como lo expresan diferentes investigadores la CA está correlacionada con los compuestos fenólicos totales.

A través del análisis de varianza (Anexo 3), se identificó que todos los factores presentaron un efecto sobre la extracción de betalaínas, con excepción del tiempo de extracción para BX. Al evaluar las interacciones entre los factores, es posible identificar si los valores de las variables respuesta se ven modificados por el nivel de cada factor. Para la variable BC, se presentó interacción entre el pH y la temperatura de extracción, así como temperatura y tiempo de extracción, para BX se presentó el mismo efecto significativo para esas interacciones además de la interacción entre la temperatura y la relación solvente. Asimismo, al evaluar la significancia de los factores sobre la concentración de CFT y CA, se observó que no todos los factores fueron significativos. Para ambos casos sólo el pH y la temperatura de extracción presentaron un efecto significativo. Los modelos obtenidos para BX, BC, BT, CFT y CA se muestra a continuación en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Modelos de segundo orden obtenidos del análisis de la MSR.

Variable Respuesta	Modelo
BX (mg/g)	$\text{BX} = 0.0279 + 0.0351\text{pH} + 0.00032\text{T} + 0.00210\text{t} + 0.00418 (\text{EtOH}) - 0.00474\text{pH}*\text{pH} - 0.000080\text{T}*\text{T} - 0.000013 \text{t}*\text{t} - 0.000046 (\text{EtOH})*(\text{EtOH}) + 0.000796 \text{pH}*\text{T} + 0.000011 \text{pH}*\text{t} - 0.000065\text{pH}*(\text{EtOH}) - 0.000073\text{t}*\text{T} + 0.000036\text{T}*(\text{EtOH}) + 0.000009\text{t}*(\text{EtOH})$
BC (mg/g)	$\text{BC} = -0.0826 + 0.0485\text{pH} + 0.00178\text{T} + 0.00368\text{t} + 0.004605 (\text{EtOH}) - 0.00556\text{pH}*\text{pH} - 0.000089\text{T}*\text{T} - 0.000026\text{t}*\text{t} - 0.000043(\text{EtOH})*(\text{EtOH}) + 0.000855\text{pH}*\text{T} - 0.000048\text{pH}*\text{t} - 0.000128\text{pH}*(\text{EtOH}) - 0.000110 \text{T}*\text{t} + 0.000025 \text{T}*(\text{EtOH}) + 0.000014\text{t}*(\text{EtOH})$
BT (mg/g)	$\text{BT} = -0.055 + 0.0836\text{pH} + 0.00210\text{T} + 0.00578\text{t} + 0.00879(\text{EtOH}) - 0.01030 \text{pH}*\text{pH} - 0.000169\text{T}*\text{T} - 0.000039\text{t}*\text{t} - 0.000089(\text{EtOH})*(\text{EtOH}) + 0.001652 \text{pH}*\text{T} - 0.000037\text{pH}*\text{t} - 0.000193\text{pH}*(\text{EtOH}) - 0.000183\text{T}*\text{t} + 0.000061 \text{T}*(\text{EtOH}) + 0.000023\text{t}*(\text{EtOH})$
CFT (mg_{EAG}/g)	$\text{CFT} = 5.22 - 1.93\text{pH} + 0.0913\text{T} - 0.0282\text{t} + 0.179\text{pH}*\text{pH} - 0.000132\text{T}*\text{T} - 0.00227\text{t}*\text{t} - 0.01246\text{pH}*\text{T} + 0.0198\text{pH}*\text{t} + 0.000270 \text{T}*\text{t}$
CA (μmol_{Trolox}/g)	$\text{CA} = 104.0 - 31.16\text{pH} - 0.241\text{T} - 0.754\text{t} + 3.168\text{pH}*\text{pH} + 0.00519\text{T}*\text{T} + 0.02281\text{t}*\text{t} - 0.0241\text{pH}*\text{T} - 0.0312\text{pH}*\text{t} + 0.00001\text{T}*\text{t}$

De acuerdo con estos modelos, las condiciones óptimas en las cuales se logró maximizar el contenido de BT fue a pH=4.2, T=10°C, t=60 min y EtOH=45% para CFT y CA las condiciones fueron a pH=4.0, T= 60°C. Los resultados predichos por el modelo y los obtenidos experimentalmente se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Comparación de los rendimientos de extracción teóricos y experimentales bajo condiciones óptimas de extracción.

Rendimiento	Valores Predichos	Valores experimentales
BT (mg/g)	0.65	0.51 ± 0.04
CFT (mg_{EAG}/g)	2.82	2.34 ± 0.14
CA (μmol_{Trolox}/g)	21.76	18.60 ± 0.05

Como puede observarse, los valores estimados para las variables, presentan una variación respecto a los valores experimentales, la cual está relacionado con la estimación del modelo y el ajuste a los datos experimentales.

Al estandarizar una metodología, es necesario considerar tanto los factores a controlar como el tipo de matriz, ya que la conformación biológica-química de ésta influirá en la extracción y los rendimientos de los compuestos de interés. Esta investigación es la primera en implementar MSR para la optimización del proceso de extracción de betalaínas, CFT y CA a partir de frutos de *Stenocereus*, sin embargo, se han desarrollado algunos estudios en frutos de especies de cactáceas a través de MSR, como el reportado por Sanchez-Gonzalez *et al.* (2013), quienes reportaron condiciones óptimas de extracción de 15 °C por 10 min en metanol/agua (20:80) para betalaínas de frutos de *Opuntia joconostle*, obteniendo concentraciones similares a las obtenidas en esta investigación. Por otro lado, la mayoría de las investigaciones se han realizado sobre el betabel, principal matriz de obtención de betalaínas, reportando condiciones como las de Kushwaha *et al.* (2018) de 50.04 °C por 10 min y pH; 2.50 en un sistema acuoso, y el de Maran y Priya (2016), quienes reportaron condiciones óptimas de 53°C por 35 min, aplicando ultrasonido 89 W con una relación de sólidos:solvente de 1:19 g/mL. En dichas investigaciones se han contemplado diferentes factores de extracción, pero es evidente que tanto la temperatura, el pH y el tiempo de extracción son factores comunes. Por lo que al igual que en esta investigación, se corrobora la importancia del control de estos factores para la extracción de estos compuestos bioactivos.

7.5 Encapsulación de betalaínas

7.5.1 Obtención de coacervados complejos (CC)

a) Potencial Z

En la Figura 19 se observa el comportamiento del potencial ζ de las soluciones de GA y la PSL. La GA presentó valores de potencial negativos en todo el rango de pH de 2 a 7, debido a los grupos carboxilo ($-\text{CO}_2\text{H} \rightleftharpoons -\text{CO}_2^-$). La PSL presentó valores

positivos de potencial ζ entre pH de 2 y cerca de 5, y valores negativos por arriba de 5 hasta 7. El punto isoeléctrico (punto de inflexión) de la solución de PSL se encontró entre valores de pH entre 4 y 5, él cual se encuentra dentro de los valores reportados para los dos principales constituyentes de la PSL. La cual está constituida por un 75% de β -lactoglobulina (β -lg, $pI=5.2$) y un 15% de α -lactoalbumina (α -lac, $pI=4.1$) (Weinbreck *et al.*, 2003). También se observó que a entre un pH de 3 y 4 se presentó la mayor diferencia de carga, lo que en teoría indica que dentro de ese rango de pH existe mayor disposición de cargas para que interactúen ambos biopolímeros y se forme la mayor cantidad de coacervado. Otros autores también han reportado valores de pH de 4.2 y 4.0 como el ideal para la formación de los coacervados utilizando como biopolímeros la PSL y GA (Jain *et al.*, 2015; Estrada-Fernández *et al.*, 2018).

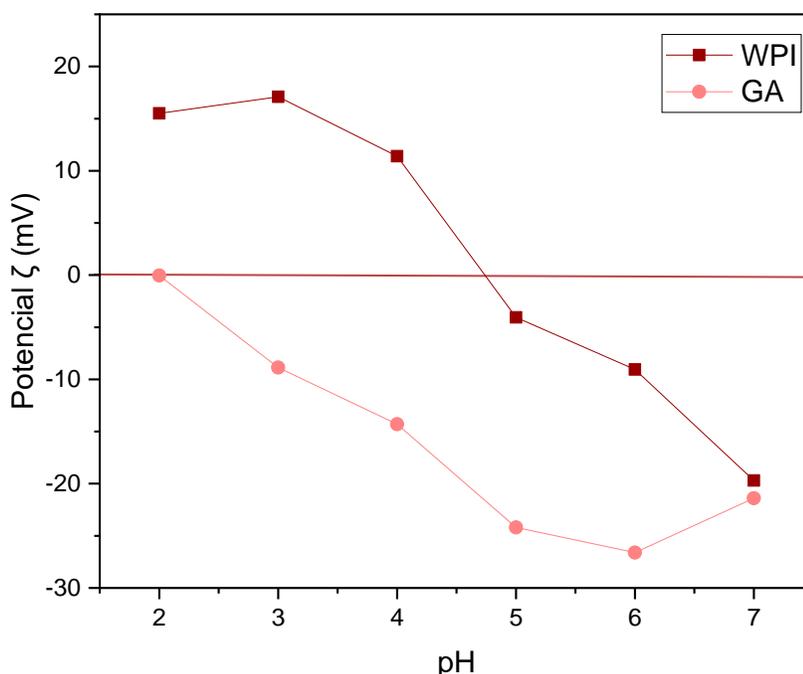


Figura 19. Comportamiento del potencial ζ de las soluciones de GA y PSL en función del pH.

b) Análisis de FTIR

El análisis de los espectros de infrarrojo permitió observar los picos característicos tanto de los biopolímeros (GA, PSL) como de los coacervados (Figura 20). La técnica de FTIR permite un análisis detallado de la estructura como de la estabilidad de las proteínas ya que permite obtener información específica de la estructura secundaria

de estas biomoléculas (Mallamace *et al.*, 2015). En la Figura 21 se observan picos entre 3400 cm^{-1} y 3200 cm^{-1} señal de las aminas. Shaddel *et al.* (2018) reporta que señales en 3300 se deben al estiramiento de los enlaces N-H de las aminas secundarias y entre 3100 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} se asocian al estiramiento de C-H, lo cual es también reportado por Jain *et al.* (2016). Picos en la región de 1225 cm^{-1} a 950 cm^{-1} representan señales complementarias de los estiramientos de C-C, C-N y C-O, y los picos pronunciados en 1630 cm^{-1} y 1520 cm^{-1} característicos también de las aminas primarias y secundarias respectivamente, debido al estiramiento de los enlaces N-H de las aminas primarias, y además de la señal característica del estiramiento del grupo carbonilo (C=O) (Jain *et al.*, 2016).

Por otra parte, al analizar los espectros de la GA se observaron señales que según lo reporta Jain *et al.* (2015) se asocian a la presencia de grupos hidroxilo y al estiramiento de enlaces C-H correspondientes a los grupos alifáticos unidos a las diferentes posiciones de la cadena proteica. Además de señales cercanas a 2925 cm^{-1} características de grupos carboxilo libres (Shaddel *et al.*, 2018).

Finalmente, las nuevas señales en los espectros de IR obtenidos de los coacervados, así como los desplazamientos en algunas señales características de los biopolímeros (GA y PSL) pueden ser resultado de la asociación entre ambos biopolímeros. Los cambios más marcados, se observan en los rangos de 3400 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} y 1519 cm^{-1} a 1633 cm^{-1} , regiones características de las aminas (Mallamace *et al.*, 2015). Además de una disminución de la señal a 1021 cm^{-1} localizada en la GA, pero ausente en la PSL.

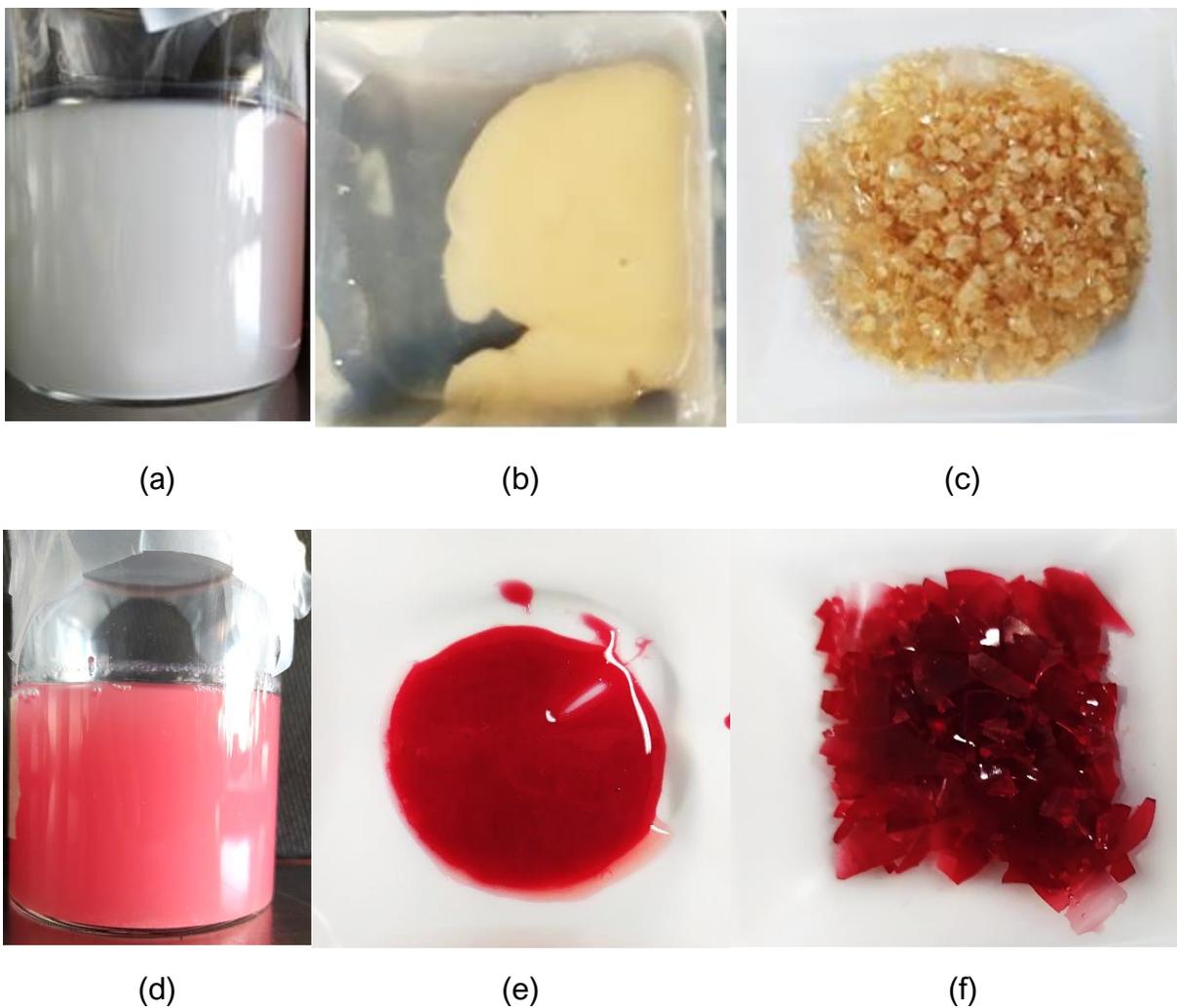


Figura 20. (a) solución de PSL:GA (3:1), (b) coacervado fresco, (c) coacervado seco (secado a estufa a 30°C por 12 h), (d) solución de PSL:GA (3:1) con el extracto de betalainas, (e) coacervado fresco con el pigmento y (f) coacervado seco (secado a estufa a 30°C por 24 horas).

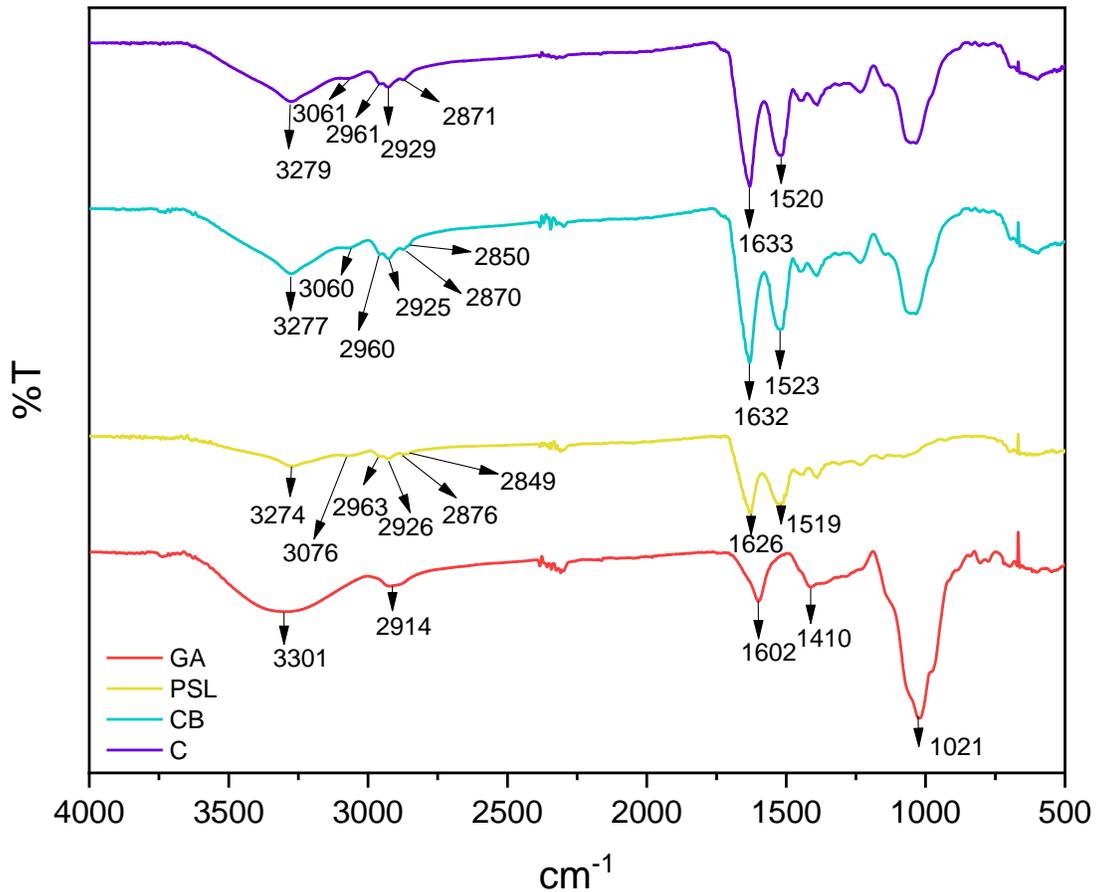


Figura 21. Espectros de IR de C; coacervado sin pigmento, CB; coacervado con pigmento y los biopolímeros GA y PSL.

c) Rendimiento de coacervación

El rendimiento promedio de coacervación fue del 60% con una relación de PSL:GA de 3:1. Este parámetro parece ser dependiente de la relación entre los biopolímeros. En el trabajo de Jain *et al.* (2015) quienes evaluaron diferentes relaciones de GA:PSL (1:1, 1:2, 2:1) encontraron un mayor rendimiento de coacervación (80%) a la relación de 1:2. Además también parece ser que el tipo de material a encapsular afecta el rendimiento, ya que en el trabajo de Kanha *et al.* (2020) en el cual evaluaron diferentes biopolímeros (GE-AG, CS-CMC) para la encapsulación de antocianinas, se ve una reducción del rendimiento en ambas combinaciones de biopolímeros cuando al extracto de antocianinas se le adiciona un extracto hojas de té verde (como proveedor

de compuestos fenólicos totales) alrededor de un 10%. El rendimiento obtenido en este trabajo fue similar a lo reportado por Silva *et al.* (2012) en la encapsulación de licopeno con gelatina y pectina.

d) Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación fue de un 10%. En algunas otras investigaciones en las cuales se han encapsulado péptidos antimicrobianos (nisina), y algunos de los pigmentos más comerciales como las antocianinas y el licopeno, se han reportado eficiencias entre 30 y 80% (Calderón-Oliver *et al.*, 2017; Gheonea *et al.*, 2021). Es importante mencionar que, en estas investigaciones, el proceso de encapsulación se llevó a cabo una emulsión, lo que podría hacer la gran diferencia entre la eficiencia obtenida en este estudio, tal como se reporta en el trabajo de de Souza *et al.* (2018) en el cual se menciona que por la naturaleza de los compuestos hidrofílicos tienden a migrar a la fase acuosa durante el proceso de coacervación por lo que se obtienen bajas eficiencias de encapsulación. Si embargo, en su investigación reportan eficiencias de encapsulación de compuestos fenólicos de 65 a 86 %, atribuyendo estos valores altos, a la capacidad de los compuestos fenólicos a unirse a proteínas, por lo que esto pudo contribuir a aumentar la eficiencia de encapsulación. En el trabajo de García-Saldaña *et al.* (2016) al igual que en esta investigación, en el proceso de coacervación no se realizó emulsión, las eficiencias de encapsulación que reporta se encuentra entre 12 y 17 % para sulforafano (compuestos con propiedades quimiopreventivas). Además, la eficiencia de carga es dependiente de diferentes factores, incluyendo el tipo de compuesto a encapsular, el material o los materiales de recubrimiento, así como también la naturaleza del extracto.

e) Morfología

A través de la microscopia óptica se obtuvieron las micrografías en objetivos 4X, 10X y 40X (Figura 22) en todas ellas se observan una morfología esférica de las partículas (partículas azules). Esta misma morfología se ha reportado en otras investigaciones como la de Shaddel *et al.* (2018) en la cual se encapsulo antocianinas de frambuesa

negra usando como biopolímeros gelatina y goma arábica. En el trabajo de Jain *et al.* (2015) se reporta la encapsulación por coacervación de β -caroteno, en su proceso utilizaron goma arábica y WPI como agentes encapsulantes, ellos también reportan una morfología esférica de sus coacervados, sin embargo, mencionan que las proporciones másicas podrían influir en la forma final de los coacervados. Gheonea *et al.*, 2021 al utilizar la metodología de coacervación compleja para encapsular licopeno de cáscara de tomate, reportan formas esféricas para los coacervados formados con WPI y goma arábica. Las antocianinas han sido de los pigmentos más utilizados para ser encapsulados por coacervación compleja, en la investigación de Kanha *et al.* (2020) utilizaron dos combinaciones distintas de agentes encapsulantes, gelatina-goma arábica y quitosano-carboximetil celulosa para la encapsulación de antocianinas de arroz negro, en ambas combinaciones reportan formas esféricas de los coacervados resultantes. Se debe mencionar que en todas las investigaciones que se describen, se llevó a cabo durante el proceso de coacervación una emulsión. Pero en esta investigación el proceso no incluyó una emulsión, sin embargo, se obtuvieron al igual que en las demás investigaciones coacervados con forma esférica.

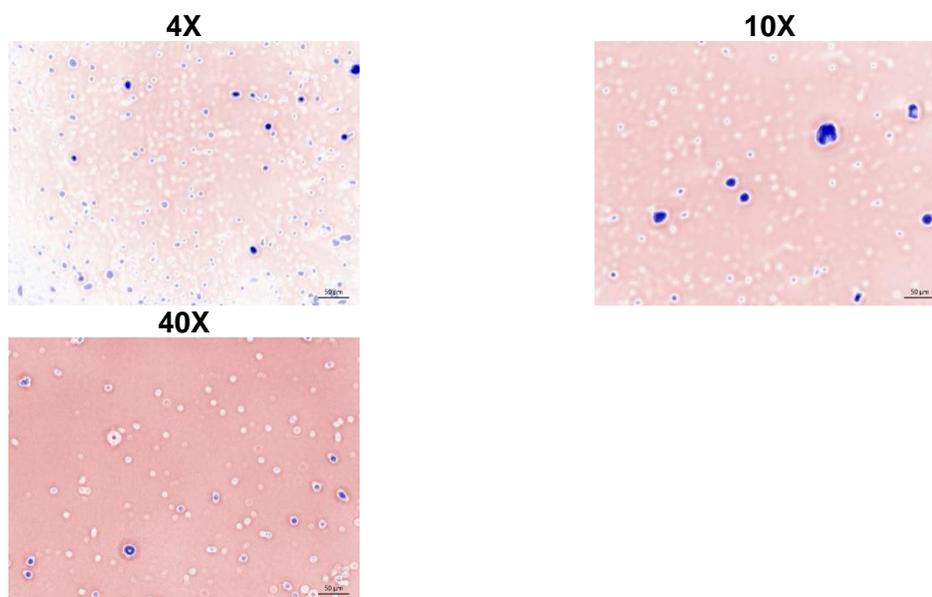


Figura 22. Micrografías de coacervados formados con PSL (proteína de suero de leche) y GA (goma arábica), obtenidas por microscopía óptica

7.5.2 Estabilidad a la temperatura

El análisis de estabilidad se realizó con la finalidad de observar si el método de coacervación protegería a las betalaínas ante la exposición de temperaturas elevadas. Se maneja un control (pulpa liofilizada de frutos rojos de *Stenocereus stellatus*) Figura 23a, para comparar con la estabilidad de las betalaínas encapsuladas (Figura 23b) ambas sometidas por diferentes intervalos de tiempo a una temperatura de 100°C. En la Figura 24 se observan los espectros de absorción en la región visible de pulpa liofilizada (Figura 24a) y de las betalaínas en los coacervados (Figura 24b). Se observa la degradación de las betalaínas en la pulpa liofilizada, ya que presentan una disminución en las absorbancias donde se presentan los máximos tanto de las BX como de las BC. fenómeno que no fue observado cuando estas se encontraban protegidas dentro del coacervado. Sin embargo, si se observa un ligero desplazamiento en la longitud de onda. Este comportamiento se puede asociar al cambio de color que se observa al comparar las Figuras 24c y 24d. En el primer caso se observa como el color rojo va virando al anaranjado hasta llegar al amarillo, lo que explica la degradación del pigmento, principalmente por reacciones de deshidrogenación, descarboxilación y desglicosilación (Herbach *et al.*, 2004a; 2004b; 2006a). Por otra parte, se puede observar que en la Figura 24d, el cambio en la tonalidad a lo largo del tiempo es casi despreciable al comparar con la Figura 24c, donde a las betalaínas presentes en la pulpa liofilizada no se les aplicó ninguna protección. Lo que implica que el proceso de coacervación permite proteger a las betalaínas cuando estas son expuestas a altas temperaturas. Hasta el momento no se tienen reportes de encapsulación de betalaínas por el método de coacervación, por lo que limita comparar los resultados obtenidos con algunas otras investigaciones.

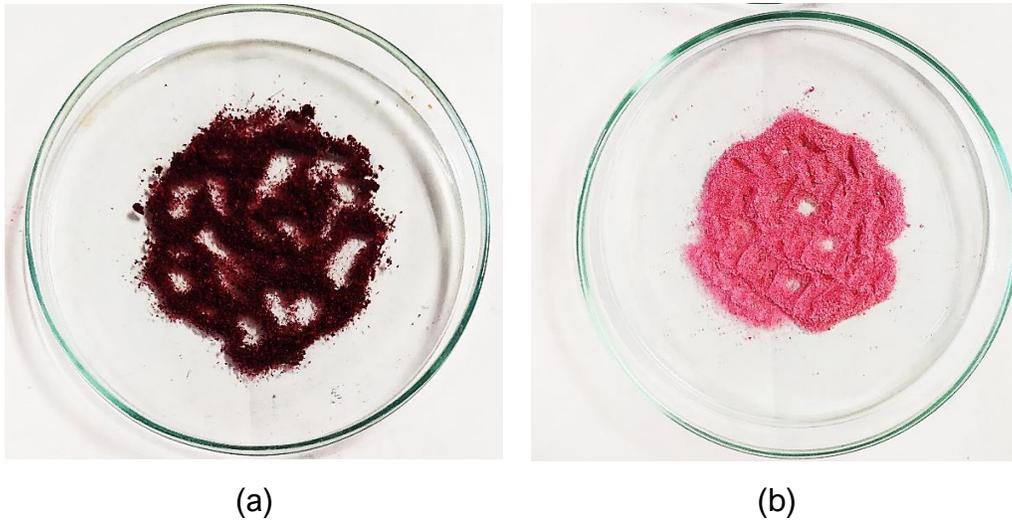


Figura 23. (a) betalainas en la pulpa liofilizada de los frutos de *Stenocereus stellatus* y (b) Betalainas coacervadas.

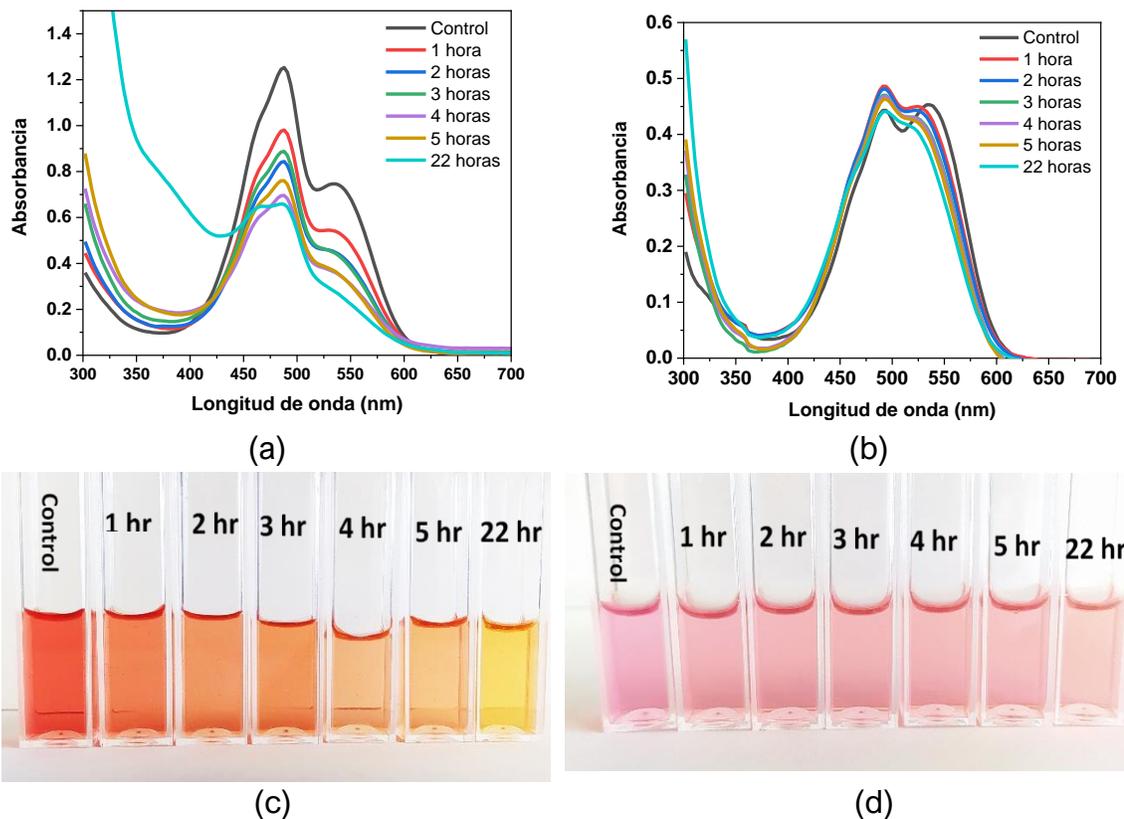


Figura 24. Espectros de absorción de la región visible a diferentes tiempos de exposición a 100°C. a) pulpa liofilizada b) coacervado. Soluciones en agua de pulpa liofilizada (c) y coacervados a 100°C (d).

En la Figura 25 se muestran las cinéticas de degradación de las betalainas en los coacervados (Figura 25a y 25b) y en la pulpa liofilizada (Figura 25c y 25d), se observó una cinética de primer orden como ya se ha reportado (Attoe y Von Elbe, 1982).

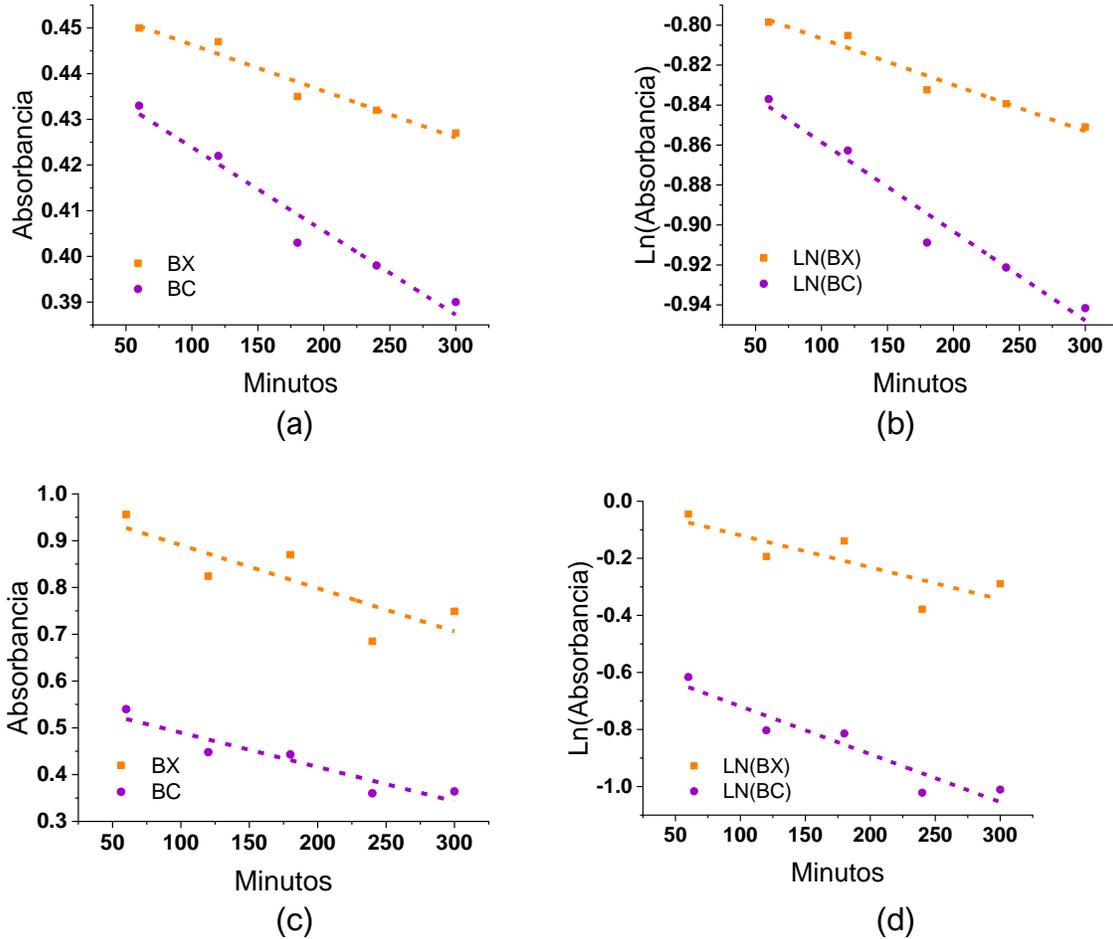


Figura 25. Cinéticas de degradación de betaxantinas (BX) y betacianinas (BC) encapsuladas por coacervación y en la pulpa liofilizada durante su exposición a 100°C por 5 horas. (a) absorbancia y (b) Ln(absorbancia) de las betalainas coacervadas, (c) y (d) betalainas en la pulpa liofilizada

Se calcularon las constantes de degradación (k_{dt}) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para las BX y BC en los coacervados y en la pulpa sin encapsular, los valores obtenidos para dichas constantes se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Parámetros de degradación de BX y BC para los coacervados y pulpa liofilizada

	Coacervado		Pulpa sin encapsular	
	BX	BC	BX	BC
k_{dt} (min)	2.32×10^{-4}	4.46×10^{-4}	1.11×10^{-3}	1.68×10^{-3}
$t_{1/2}$ (min)	2 990.71	1 553.36	618.88	412.59

A través del análisis de las constantes de degradación podemos observar que la velocidad de degradación es mayor para las betalaínas encontradas en la pulpa liofilizada, comparada con la velocidad de degradación de las betalaínas encapsuladas por coacervación compleja. Al comparar las constantes de degradación (k_{dt}) de las BX de la pulpa y su respectiva constante de los coacervados se estimó que las betalaínas de la pulpa se degradan 5 veces más rápido que las encontradas en los coacervados. Y para las BC en la pupa la velocidad de degradación fue 3 veces más mayor. También se calculó la vida media de las betalaínas para ambos casos, encapsuladas y en la pulpa liofilizada. En el trabajo de Herbach *et al.*, 2004b calcularon la vida media de las betacianinas procedentes de jugo de pitaya púrpura (*Hylocereus polyrhizus*) en términos de concentración de la betacianina inicial y la betacianina a los diferentes tiempos de calentamiento a 85°C. Ellos reportan una vida media para las betacianinas de 2.5 h (150 mins). A demás mencionan que en trabajos previos tanto soluciones de betanina como de jugo de betabel sus vidas medias son mucho menores a lo que el reporta. Lo cual puede estar fundamentado al tipo de matriz, en la cual se encuentran las betalaínas, así como las condiciones de pH.

8. Conclusiones

A través de esta investigación se ha logrado conocer diferentes aspectos de los frutos de *Stenocereus stellatus*. Permitiendo así tener un panorama general y base para estudios posteriores.

Los resultados del aspecto genético permitieron conocer diferencias en las secuencias de los cuatro colores para ambos marcadores (*psbA-trnH* y *matK*), el análisis de estas diferencias por UPGMA da indicio de que la variante blanca ha presentado cambios en su material genético posiblemente como describen algunos autores, debido a la interacción hombre-planta.

La agrupación de frutas basada completamente en señales visuales (por ejemplo, el color) es intrínsecamente subjetiva, lo que presenta muchos problemas tanto para los investigadores como para los productores. Esto último se superó en el presente estudio al combinar el uso de variables cuantificables (por ejemplo, datos UV-Vis, métricas de espacio de color CIE * C * h) con la aplicación de clasificadores SVM (una forma de aprendizaje automático) para la agrupación supervisada de frutos de *Stenocereus stellatus* Riccobono. Por lo tanto, se estableció una importante prueba de concepto que, con suerte, alentará el uso de técnicas similares para la identificación y clasificación de frutas (o de sus variantes) en entornos comerciales considerablemente más grandes.

Los tunillos rojos (es decir, la variante A2-rojo) parecen ser el fenotipo del que se derivan las variantes púrpura y naranja, ya que fue posible reconstituir el espectro promedio normalizado del primero combinando las matrices líquidas de A3-púrpura y A4 -naranja. El espectro normalizado promedio de la variante A2-rojo se reconstituyó combinando las matrices líquidas de A3-púrpura y A4-naranja. Este resultado fue validado por la separación de pigmentos de A2-rojo usando cromatografía de columna abierta.

La cuantificación de pigmentos y el análisis HPLC / UV-Vis también establecieron al A2-rojo como el candidato más adecuado para la extracción a gran escala de betalaínas en general, mientras que el A3-púrpura probablemente sería el más

adecuado para la extracción de matrices coloreadas como las de la remolacha (*Beta vulgaris*).

Se optimizaron las condiciones de extracción para los compuestos bioactivos (CFT, BX, BC) y capacidad antioxidante. Condiciones que se usaron para obtener los extractos que fueron encapsulados por el método de coacervación con GA y PSL, con el fin de brindarles estabilidad. Se evaluó la capacidad de protección del proceso de coacervación a través del ensayo de termosensibilidad. Los resultados demostraron que el proceso de coacervación brinda protección a las betalainas al aplicarles temperaturas de 100°C expuestas hasta 22 h.

La especie *Stenocereus stellatus* es una de las tantas especies de cactáceas que se han mantenido en los límites del consumo local y regional. Por lo que con esta investigación se espera generar las bases para fomentar estudios que amplíen el conocimiento pertinente que permita aumentar su consumo, comercialización y uso como fuente de compuestos bioactivos.

9. Referencias

- Agnihotri N, Mishra R, Goda C, Arora M. (2012) Microencapsulation – a novel approach in drug delivery: A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 1-20.
- Albuquerque, B. R., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Could fruits be a reliable source of food colorants? Pros and cons of these natural additives. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(5), 805-835. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1746904>
- Aldana, A. S., Sandoval, E. R., y Aponte, A. A. (2011). Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. *Ingeniería y Competitividad*, 5(2), 73-83. <https://doi.org/10.25100/iyc.v5i2.2298>
- Andrade-Cetto, A., y Wiedenfeld, H. (2011). Anti-hyperglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lem. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 940-943. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.022>
- Attoe, E. L., y Von Elbe, J. H. (1982). Degradation kinetics of betanin in solutions as influenced by oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(4), 708-712.
- Azeredo, HMC. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science Technology* 44, 2365–2376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x>
- Becerra-Jiménez, J., y Andrade-Cetto, A. (2012). Effect of *Opuntia streptacantha* Lem. on alpha-glucosidase activity. *Journal of ethnopharmacology*, 139(2), 493-496. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.039>
- Belhadj, I., Najar, T., y Abderrabba, M. (2017). Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(4), 675-689. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04208>
- Beltrán-Orozco, M. C., Oliva-Coba, T. G., Gallardo-Velázquez, T., y Osorio-Revilla, G. (2009). Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *Agrociencia*, 43(2), 153-162.
- Bravo-Hollis H, Sánchez-Mejorada H (1991) Las cactáceas de México, Vol. 2 Universidad Nacional Autónoma de México.
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., Kohen, R., y Livrea, MA. (2002). Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin

- and indicaxanthin. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50:6895–6901. <https://doi.org/10.1021/jf025696p>
- Butstraen, C., y Salaün, F. (2014). Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 99, 608-616. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.006>
- Butterweck, V., Semlin, L., Feistel, B., Pischel, I., Bauer, K., y Verspohl, E. J. (2011). Comparative evaluation of two different *Opuntia ficus-indica* extracts for blood sugar lowering effects in rats. *Phytotherapy Research*, 25(3), 370-375. <https://doi.org/10.1002/ptr.3271>
- Cai, Y., y Corke, H. (1999). Amaranthus betacyanin pigments applied in model food systems. *Journal of Food Science*, 64(5), 869-873. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15930.x>
- Cai, Y. Z., Sun, M., y Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 51(8):2288–2294. <https://doi.org/10.1021/jf030045u>
- Calderón-Oliver, M., Pedroza-Islas, R., Escalona-Buendía, H. B., Pedraza-Chaverri, J., y Ponce-Alquicira, E. (2017). Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract. *Food Hydrocolloids*, 62, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.028>
- Casas, A., Pickersgill, B., Caballero, J., y Valiente-Banuet, A. (1997). Ethnobotany and domestication in xoconochtlí, *Stenocereus stellatus* (Cactaceae), in the Tehuacán Valley and la Mixteca Baja, México. *Economic Botany*, 51(3), 279-292.
- Casas, A., Otero-Arnaiz, A., Perez-Negron, E., y Valiente-Banuet, A. (2007). *In situ* management and domestication of plants in Mesoamerica. *Annals of botany*, 100(5), 1101-1115.
- Castellanos-Santiago, E., y Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758-5764. <https://doi.org/10.1021/jf800362t>
- Castro-Enríquez, D. D., Montaña-Leyva B., Del Toro-Sánchez C. L., Juaréz-Onofre J. E., Carvajal-Millan E., Burruel-Ibarra S. E., Tapia-Hernández J. A., Barreras-Urbina C. G., y Rodríguez-Félix F. (2020). Stabilization of betalains by encapsulation—a review. *Journal Food Science Technology*, 57(5), 1587–1600. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04120-x>

- Cejudo-Bastante, M. J., Hurtado N., y Heredia F. J. (2015). Potential use of new Colombian sources of betalains. Colorimetric study of red prickly pear (*Opuntia dillenii*) extracts under different technological conditions. *Food Research International*, 71, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.011>
- Cervantes-Arista C., Roman-Guerrero A., Oidor-Chan V. H., Díaz de León-Sánchez F., Álvarez-Ramírez E. L., Pelayo-Zaldívar C., Sierra-Palacios E. del C., y Mendoza-Espinoza J. A. (2020). Chemical characterization, antioxidant capacity, and anti-hyperglycemic effect of *Stenocereus stellatus* fruits from the arid Mixteca Baja region of Mexico. *Food Chemistry*, 328, 127076. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127076>
- Chranioti, C., Nikoloudaki, A., y Tzia, C. (2015). Saffron and beetroot extracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modified starch and chitosan: incorporation in a chewing gum system. *Carbohydr Polym*, 127, 252–263
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., y Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Choo WS (2018) Betalains: application in functional foods. In: Merillon JMK, Ramawat G, (eds) Bioactive molecules in food. Springer, Cham, pp 1–28. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54528-8_38-2
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., y Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(3), 173–289.
- Drusch S, Regier M, Bruhn M. (2012). Recent advances in the microencapsulation of oils high in polyunsaturated fatty acids. In: Mcelhatton A, Sobral PJDA, (eds.) Novel technologies in food science, New York, Springer, pp. 159–8. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7880-6_7
- Esatbeyoglu, T, Wagner, A. E., Schini-Kerth, V. B., y Rimbach, G. (2015). Betanin—a food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition Food Research*, 59(1), 36–47. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400484>
- Estrada-Fernández, A. G., Román-Guerrero, A., Jiménez-Alvarado, R., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., y Vernon-Carter, E. J. (2018). Stabilization of oil-in-water-in-oil (O1/W/O2) Pickering double emulsions by soluble and insoluble whey protein concentrate-gum Arabic complexes used as inner and outer interfaces. *Journal of Food Engineering*, 221, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.006>

- Fernández-Lopez, J. A., Angosto, J. M., Gimenez, P. J., y Leon, G. (2013). Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods Human Nutrition*, 68(1), 11–17. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0337-1>
- Flores Monter, Y. N., Reyna Trujillo T. J., Cervantes Ramírez, M. C., y Luna Morales, C. C. (2011). Distribución geográfica y potencial de *Stenocereus pruinosus* y *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) en la Mixteca Poblana, México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 56(1), 4-20.
- Gandía-Herrero, F., y García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in plant science*, 18(6), 334-343. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.003>
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., y del Carmen Luna-Morales, C. (2016). Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.004>
- García-Cruz, L., Dueñas, M., Santos-Buelgas, C., Valle-Guadarrama, S., y Salinas-Moreno, Y. (2017). Betalains and phenolic compounds profiling and antioxidant capacity of pitaya (*Stenocereus spp.*) fruit from two species (*S. Pruinosus* and *S. stellatus*). *Food Chemistry*, 234, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.174>
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., y Choo, W. S. (2015). Betalains: natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 645-649. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052>
- Gheonea, I., Aprodu, I., Cîrciumaru, A., Râpeanu, G., Bahrim, G. E., y Stănciuc, N. (2021). Microencapsulation of lycopene from tomatoes peels by complex coacervation and freeze-drying: Evidences on phytochemical profile, stability and food applications. *Journal of Food Engineering*, 288, 110166. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110166>
- Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M. A., y D'Alessio, P. (2004). Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Annals New York Academy Sciences*, 1028(1), 481–486. <https://doi.org/10.1196/annals.1322.057>
- Gliszczynska-Swiglo, A., Szymusiak, H., y Malinowska, P. (2006). Betanin, the main pigment of red beet: Molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. *Food Additives and Contaminants*, 23(11), 1079–1087. <https://doi.org/10.1080/02652030600986032>

- Govind, J. K., Magnus, A. A., Rao, G.S., Takanari, A., Akira, I., Harukuni, T. (2011). Cytotoxic effect of the red beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract compared to doxorubicin (adriamycin) in the human prostate (PC-3) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *Anti-Cancer Agents Medicinal Chemistry*, 11(3), 280–284. <https://doi.org/10.2174/187152011795347504>
- Gutiérrez-Pulido, H., & De la Vara-Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México: McGraw-Hill.
- Guzmán, U., Arias, S. y Dávila, P. (2007). Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyectos Q045 y AS021. México.
- Habtemariam, S. (2019). Chapter 26 - Antidiabetic herbal medicines rebranded as dietary supplements. In S. Habtemariam (Ed.), *Medicinal foods as potential therapies for type-2 diabetes and associated diseases* (pp.1049-1134). Academic Press. ISBN 9780081029220, <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102922-0.00026-2>
- Hao, D. C., Chen, S. L., y Xiao, P. G. (2009). Authentication of medicinal plants based on molecular biology and genomics. *Pharmaceutical Biotechnology*, 16(5), 490-494.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., y Carle, R. (2004a). Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science*, 69(6), C491-C498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10994.x>
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., y Carle, R. (2004b). Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton y Rose] monitored by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric analyses. *European Food Research and Technology*, 219(4), 377-385. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0948-8>
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., y Carle, R. (2006a). Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71(4), R41-R50. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x>
- Herbach, K. M., Rohe, M., Stintzing, F. C., y Carle, R. (2006b). Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton y Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Research International*, 39(6), 667-677. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.004>

- Hilou, A., Nacoulmam, O. G., Guiguemdem, T. R. (2006). In vivo antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2), 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.006>
- Jain, A., Thakur, D., Ghoshal, G., Katare, O. P., y Shivhare, U. S. (2015). Microencapsulation by complex coacervation using whey protein isolates and gum acacia: an approach to preserve the functionality and controlled release of β -carotene. *Food and Bioprocess Technology*, 8(8), 1635-1644. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1521-0>
- Jain, A., Thakur, D., Ghoshal, G., Katare, O. P., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.117>
- Janiszewska, E. (2014). Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain. *Powder Technology*, 264, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.032>
- Khan, M. I., y Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, 117, 267-295. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.008>
- Kanha, N., Surawang, S., Pitchakarn, P., y Laokuldilok, T. (2020). Microencapsulation of copigmented anthocyanins using double emulsion followed by complex coacervation: Preparation, characterization and stability. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 133(2), 110154. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110154>
- Kanner, J., Harel, S., y Granit, R. (2001). Betalains – a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49, 5178–5185. <https://doi.org/10.1021/jf010456f>
- Kress, W.J., Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 105(8), 2761–2762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800476105>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kushwaha, R., Kumar, V., Vyas, G., y Kaur, J. (2018). Optimization of different variable for eco-friendly extraction of betalains and phytochemicals from beetroot pomace. *Waste and Biomass Valorization*, 9(9), 1485-1494.

- Lugo-Radillo, A., Delgado-Enciso, I., y Peña-Beltrán, E. (2012). Betanidin significantly reduces blood glucose levels in BALB/c mice fed with an atherogenic diet. *Natural products and bioprospecting*, 2(4), 154-155.
- Mahattanatawee, K., Manthey, J. A., Luzio, G., Talcott, S. T., Goodner, K., y Baldwin, E. A. (2006). Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7355–7363. <https://doi.org/10.1021/jf060566s>
- Mallamace, F., Corsaro, C., Mallamace, D., Vasi, S., Vasi, C., y Dugo, G. (2015). The role of water in protein's behavior: The two dynamical crossovers studied by NMR and FTIR techniques. *Computational and structural biotechnology journal*, 13, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.11.007>
- Mandujano-Piña M., González-Calderón B., Trujillo-Hernández A., Arriaga-Frías A., De la Cruz-Guzmán G.H., y Colinas-León M.T. (2020). Cambios postcosecha en las variables físicas de frutos de *Stenocereus pruinosus*, fenotipos rojo y amarilla de la localidad de Venta Salada, Municipio de Coxcatlán, Puebla. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 6, 667-673.
- Marcial-Quino, J., Mendoza-Espinoza, J. A., y Sierra-Palacios, E. (2015). DNA Barcoding: An Alternative for the Identification of the Medicinal Plants Employed in Mexico. *Journal of Plant Sciences*, 10(4), 116. <https://doi.org/10.3923/jps.2015.116.127>
- Maran, J. P., y Priya, B. (2016). Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. *Journal of food science and technology*, 53(1), 792-799. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1988-8>
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2017). Coloring attributes of betalains: a key emphasis on stability and future applications. *Food & function*, 8(4), 1357-1372.
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C.-Y. O., & Lima, G. P. P. (2017). Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. In M. Soto-Hernández, M. P. Tenango, & R. García-Mateos (Eds.), *Phenolic compounds - Biological activity* (pp. 1– 24). London, UK: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66368>
- Msaddak, L., Abdelhedi, O., Kridene, A., Rateb, M., Belbahri, L. (2017). *Opuntia ficus-indica* cladodes as a functional ingredient: bioactive compounds profile and their effect on antioxidant quality of bread. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0397-y>

- Moussa-Ayoub, T. E., Youssef, K., El-Samahy, S. K., Kroh, L. W., y Rohn, S. (2015). Flavonol profile of cactus fruits (*Opuntia ficus-indica*) enriched cereal-based extrudates: authenticity and impact of extrusion. *Food Research International* 78, 442–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.019>
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., Laura, A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *Tip, Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 20(2), 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>.
- Nairm JG. (1995) 3 Coacervation-phase separation technology. In: Ganderton D, Jones T, McGinity J. (eds). *Advances in pharmaceutical sciences*. vol 7. New York: Academic Press, pp. 1995:93–219 J.
- Narsaiah, K., Jha, S. N., Wilson, R. A., Mandge, H. M., & Manikantan, M. R. (2014). Optimizing microencapsulation of nisin with sodium alginate and guar gum. *Journal of food science and technology*, 51(12), 4054-4059. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0886-6>
- Núñez-López, M. A., Paredes-López, O., y Reynoso-Camacho, R. (2013). Functional and hypoglycemic properties of nopal cladodes (*O. ficus-indica*) at different maturity stages using *in vitro* and *in vivo* tests. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 10981-10986. <https://doi.org/10.1021/jf403834x>
- Patel, D. K., Kumar, R., Laloo, D., y Hemalatha, S. (2012). Diabetes mellitus: an overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(5), 411-420. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60067-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60067-7)
- Pérez-Loredo, M. G., García-Ochoa, F., y Barragán-Huerta, B. E. (2016). Comparative analysis of betalain content in *Stenocereus stellatus* fruits and other cactus fruits using principal component analysis. *International Journal of Food Properties*, 19(2), 326-338. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1022259>
- Polturak, G., y Aharoni, A. (2018). “La Vie en Rose”: Biosynthesis, sources, and applications of betalain pigments. *Molecular plant*, 11(1), 7-22. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.008>
- Ramírez-Rodríguez, Y., Martínez-Huélamo, M., Pedraza-Chaverri, J., Ramírez, V., Martínez-Tagüeña, N., y Trujillo, J. (2020). Ethnobotanical, nutritional and medicinal properties of Mexican drylands Cactaceae Fruits: Recent findings and research opportunities. *Food Chemistry*, 312, 126073. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126073>

- Reddy, M. K., Alexander-Lindo, R. L., Nair, M. G. (2005). Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53(23), 9268–9273. <https://doi.org/10.1021/jf051399j>
- Sáenz, C., Cancino, B., y Robert, P. (2012). Red betalains from *Opuntia spp.*: Natural colorants with potential applications in food. *Israel Journal of Plant Science*, 60(3), 291–299. <https://doi.org/10.1560/IJPS.60.2.291>
- Sanchez-Gonzalez, N., Jaime-Fonseca, M. R., San Martin-Martinez, E., & Zepeda, L. G. (2013). Extraction, stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* cv. using response surface methodology. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 61(49), 11995-12004. <https://doi.org/10.1021/jf401705h>
- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., y Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1462), 1850–1811. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1730>
- Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi-Achachlouei, B., y Huang, Q. (2018). Double emulsion followed by complex coacervation as a promising method for protection of black raspberry anthocyanins. *Food Hydrocolloids*, 77, 803-816. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.024>
- Silva, D. F., Favaro-Trindade, C. S., Rocha, G. A., y Thomazini, M. (2012). Microencapsulation of lycopene by gelatin–pectin complex coacervation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(2), 185-190. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00575.x>
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Stintzing, F. C., y Carle, R. (2007). Betalains—emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science y Technology*, 18(10), 514-525. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.04.012>
- Strack, D., Vogt, T., y Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3), 247-269. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00564-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00564-2)
- Song, J., Yao, H., Li, Y., Li, X., Lin, Y., Liu, C., Han, J., Xie, C., y Chen, S. (2009). Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3), 434-439. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.042>

- Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., y Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1276–1286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144>
- Tsai, P. J., Sheu, C. H., Wu, P. H., y Sun, Y. F. (2010). Thermal and pH stability of betacyanin pigment of Djulis (*Chenopodium formosanum*) in Taiwan and their relation to antioxidant activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 58(2), 1020-1025. <https://doi.org/10.1021/jf9032766>
- U.S. Natural Dyes Market Report 2021-2026: Rise In Innovative Dyeing Technology / Increasing Online Presence of Vendors / Increasing Demand from End-User Industries. Research and Markets Jun 30, 2021, <https://www.prnewswire.com/news-releases/us-natural-dyes-market-report-2021-2026-rise-in-innovative-dyeing-technology--increasing-online-presence-of-vendors--increasing-demand-from-end-user-industries-301323500.html> (Consultado el 7 Oct. 2021)
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., y Harding, S. E. (2010). Materials for encapsulation. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Springer, New York. pp. 31-100
- Weinbreck, F., De Vries, R., Schrooyen, P., y De Kruif, C. G. (2003). Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, 4(2), 293-303. <https://doi.org/10.1021/bm025667n>
- Wu, L.-c., Hsu, H.-W., Chen, Y.-C., Chiu, C.-C., Lin, Y.-I., Ho, J. a-A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*, 95(2), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.002>
- Xiao, Z., Liu, W., Zhu, G., Zhou, R., y 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. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6491>
- Yao, H., Song, J. Y., Ma, X. Y., Liu, C., Li, Y., Xu, H. X., Han, J. P., Duan, L. S., y Chen, S. L. (2009). Identification of dendrobium species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region. *Planta Medica*, 75, 667– 669. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185385>
- Yen-Ming, W., y Lee-Fong, S. (2015). Effects of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice and concentrate as models. *Journal of food science and technology*, 52(5), 3086-3092. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1362-2>

- Zhu, F., Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H. (2008). Influence of Amaranthus betacyanin pigments on the physical properties and color of wheat flours. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56:8212–8217. <https://doi.org/10.1021/jf801579c>
- Zuidam, N. J. & Heinrich, J. (2009) Encapsulation of aroma. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A., (Eds.). *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp. 127-160.

A N E X O S

Anexo A. Publicación.

Anexo B. Productos de trabajo presentados en eventos especializados.

Anexo 1. Datos obtenidos de la secuenciación molecular de las variantes de *S. stellatus*.

Anexo 2. Espectros de absorbancia obtenidos para el modelamiento matemático.

Anexo 3. Resultados obtenidos de la optimización de las condiciones de extracción por MSR.

Anexo A

Publicación

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127076>

Food Chemistry 328 (2020) 127076



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Chemical characterization, antioxidant capacity, and anti-hyperglycemic effect of *Stenocereus stellatus* fruits from the arid *Mixteca Baja* region of Mexico



Cervantes-Arista Clara^a, Roman-Guerrero Angélica^b, Oidor-Chan Víctor Hugo^c,
Díaz de León-Sánchez Fernando^c, Álvarez-Ramírez Erika Lorena^d, Pelayo-Zaldívar Clara^e,
Sierra-Palacios Edgar del Carmen^f, Mendoza-Espinoza José Alberto^{f,*}

^a Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), CDMX, Mexico

^b Group of Biochemistry of Macromolecules, Mexico

^c Laboratory of Post-harvest of Plant Genetic Resources and Natural Products, Department of Health Sciences, UAM-I, CDMX, Mexico

^d College of Sciences and Technology, Mexico

^e Laboratory of Physiology and Postharvest Technology of Horticultural Products, Department of Biotechnology, UAM-I, CDMX, Mexico

^f College of Sciences and Humanities, Campus Casa Libertad, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), CDMX, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Antioxidants
Molecular markers
Pigments
Stenocereus stellatus
Anti-hyperglycemic effect

ABSTRACT

The tunillo (*Stenocereus stellatus* [Pfeiffer] Riccobono) is a relatively little known cactus fruit with a significant pharmacological potential. However, all currently known variants are identified visually mostly on the basis of pulp color. Differences in chemical composition and pharmacological properties also remain largely unknown. Support vector machine classifiers were applied to UV-Visible spectra of liquid samples to obtain the following, color-based categories of tunillo fruits: A1-white, A2-red, A3-purple, and A4-orange. The spectrum of A2-red could be duplicated by combining those from A3-purple and A4-orange, while UPGMA-based hierarchical clustering of psbA-trnH and matK suggested that certain differences in color might actually have a genetic basis. The pigment quantification established A2-red and A3-purple as the most suitable candidates for the extraction of betalains and complex colored matrices, respectively. A2-red also had the highest content of phenols and flavonoids and displayed a noticeable anti-hyperglycemic effect.

Anexo B.

Productos de trabajo presentados en eventos especializados

2019

IX Jornada del Herbario de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Análisis químico y efecto anti-hiperglucemiante de cuatro variedades de xoconostle dulce (*Stenocereus stellatus*).

Universidad Autónoma de la Ciudad de México. CDMX, México.

Simposios

2021

XLII Encuentro Nacional. Desafíos actuales en la investigación y docencia en ingeniería química. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ).

Caracterización fisicoquímica y química de cuatro colores de xoconostle dulce (*Stenocereus stellatus*).

CDMX, México.

2019

XLII The Chilean Biochemistry and Molecular Biology Society and the Chilean Society Of Plant Biologists

Molecular analysis of four variants of the *Stenocereus stellatus* species.

Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile.

Iquique, Chile.

2019

XXIV Simposio Departamento Ciencias de la Salud

Evaluación del efecto anti-hiperglucemiante de frutos de xoconostle dulce *Stenocereus stellatus*.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
CDMX, México.

2019

8° Simposio: Perspectivas en Biotecnología

Análisis molecular de cuatro variantes de la especie *Stenocereus stellatus*.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
CDMX, México.

2018

2nd Biotechnology World Symposium and 11° Encuentro Nacional de Biotecnología

SEQUENCE OF THE MARKER *psbA-trnH* and *matK* of SWEET XOCONOSTLE (*Stenocereus stellatus*) FOR THE CONTRIBUTION OF ITS MOLECULAR ANALYSIS.

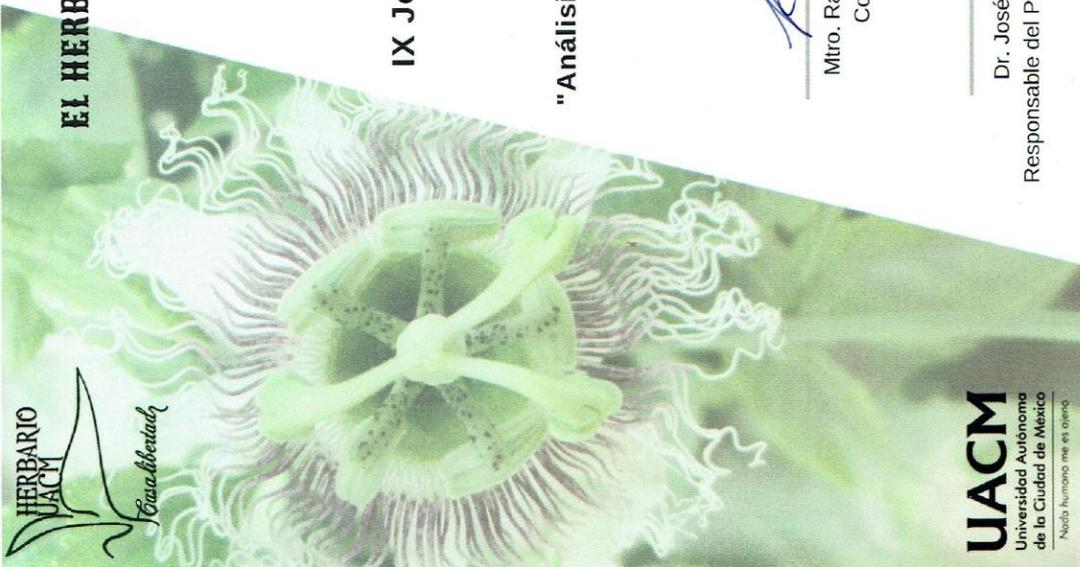
Baja California Sur, México.

2018

7° Simposio: Perspectivas en Biotecnología

AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR *psbA-trnH* DE XOCONOSTLE DULCE (*Stenocereus stellatus*) PARA EL APORTE DE SU ANÁLISIS MOLECULAR.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. CDMX, México.



HERBARIO
UACM
Casa Libertad

UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México
Nada humano me es ajeno

EL HERBARIO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

Otorga el presente reconocimiento a

Mtra. Clara Cervantes Arista.

Por su participación como conferencista en la

IX Jornada del Herbario de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Con la ponencia:

"Análisis químico y efecto antihiperglucemiante de 4 variedades de xoconostle dulce (*Stenocereus stellatus*)."

Ciudad de México, 24 de octubre de 2019

Mtro. Raúl Amilcar Santos Magaña
Coordinador Académico

Dr. José Alberto Mendoza Espinoza
Responsable del Programa de Productos Naturales Casa Libertad

Mtro. César Enrique Fuentes Hernández
Coordinador del CCyH

Biól. Bernarda García Ocón
Encargada del Herbario Casa Libertad

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia
en Ingeniería Química (AMIDIQ)

otorga la presente

CONSTANCIA

a:

CLARA CERVANTES ARISTA

Por su asistencia al XLII Encuentro Nacional de la AMIDIQ



Dra. María del Rosario Esquivel Rosado
PRESIDENTA DEL AMIDIQ Y DEL COMITÉ ORGANIZADOR



Dr. Tomás Viveros García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

Evento virtual del 08 al 11 de septiembre de 2021



Sociedad de Bioquímica
y Biología Molecular de Chile



CHILEAN
SOCIETY OF
PLANT BIOLOGISTS

**The Chilean Biochemistry and Molecular Biology Society
and the Chilean Society of Plant Biologists**

Certificate:

Clara Cervantes-Arista (Author), José Alberto Mendoza-Espinoza, Angélica Román-Guerrero, Fernando Díaz de León-Sánchez, Edgar Sierra-Palacios

Attended the XLII annual meeting of the Chilean Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBMCh) and XIV annual meeting of Chilean Society of Plant Biologists (CSPB), held at Iquique, Chile from October 8 to 11, 2019. With the presentation entitled:

Molecular analysis of four variants of the *Stenocereus stellatus* species

Patricio Ramos
Secretary SBBM of Chile

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
y
EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

Otorgan la presente

Constancia

a:

Cervantes Arista Clara, Mendoza Espinoza I. Alberto, Díaz de León Sánchez Fernando, Sierra Palacios Edgar, Pelayo Zaldívar Clara, Oidor-Chan V. Hugo, Román-Guerrero Angélica

Por la presentación del trabajo:

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERGLUCEMIANTE DE FRUTOS
DE XOCONOSTLE DULCE (*Stenocereus stellatus*)
en el XXIV Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud

Celebrado los días 30 de Septiembre al 04 de Octubre del 2019

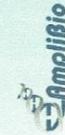
Dr. José Luis Gómez Olivares
Jefe del Dpto. de Ciencias de la Salud

Norma Edipo Drg

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Coordinadora

Carmy

Dra. Elisa Cervantes Ríos
Coordinadora



La División de Ciencias Biológicas y de la Salud y el Posgrado en Biotecnología

otorgan la constancia de participación en el

8° Simposio: Perspectivas en Biotecnología

a

Cervantes C., Mendoza J. A., Díaz de León F., Sierra E.,
Román A.

por el cartel



ANÁLISIS MOLECULAR DE CUATRO VARIANTES DE LA ESPECIE STENOCEREUS STELLATUS

Ciudad de México, a 6 de septiembre de 2019


Dra. Sara L. Camargo Ricalde
Directora de la División de CBS


Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Coordinadora Divisional de Posgrado


Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano
Coordinadora del Posgrado en Biotecnología



AL27

**Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas
Red de Biotecnología del IPN**

This is to certify that

Clara Cervantes, José Mendoza, Fernando Díaz de León, Clara Pelayo, Edgar Sierra,
Angélica Román

Has contributed with the work titled

Sequence of the marker psbA-trnH and matK of sweet xocnostle (*Stenocereus
stellatus*) for the contribution of its molecular analysis

During the

2nd Biotechnology World Symposium | **11^o Encuentro Nacional de Biotecnología**

October 16 - 20, 2018 at San José del Cabo, B.C.S. México


Dra. Claudia J. Hernández Guerrero
Presidente del Comité Organizador


Dr. Sergio Hernández Trujillo
Director del CICIMAR-IPN


Dr. Hervey Rodríguez González
Coordinador de la Red de Biotecnología

La División de Ciencias Biológicas y de la Salud y el Posgrado en Biotecnología

otorgan la constancia de participación en el

7° Simposio: Perspectivas en Biotecnología

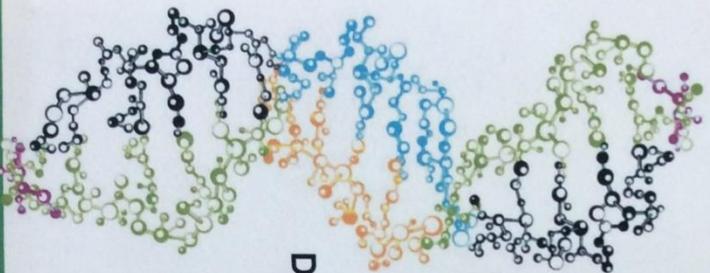
a

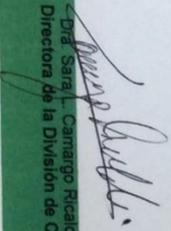
Cervantes-Arista C., Mendoza-Espinoza J. A., Díaz de León-Sánchez
F., Pelayo-Zaldívar C., Sierra-Palacios E., Román-Guerrero A.

por el cartel

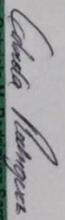
**AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR psbA-trnH DE XOCONOSTLE
DULCE (*Stenocereus stellatus*) PARA EL APORTE DE SU ANÁLISIS
MOLECULAR**

Ciudad de México, a 5 de abril de 2018.




Dra. Sara L. Carrasco Ricalde
Directora de la División de CBS


Dra. Concepción Martínez Ruiz
Coordinadora Divisional de Posgrado


Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano
Coordinadora del Posgrado en Biotecnología

Anexo 1.

Secuencias del marcador *psbA-trnH*

T1-Blanco Forward

AMTTYCGGATGCTCGAGTTTTTMMGCAGATGTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA
CTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATTGAAGCTCCGTCTACAAATGGATAAATTTTCG
TTCGTACAAGTTATGGAAAGTAAGGGGGCAATACCTGTTTCTTGACAGACCAGGA
AATTGGTTATTGCTTCTTTACTAGTTAGTATTTTTTTTAGTTTATAATTAACTTTTC
AATTTAAGTTTTTTTTTTTATTTATTAGTCTAAAACGTATCAATTTTTTATTTAGTAT
GAAATGATTCTATATGATATCTTCTTTTTAACTTTTTATAATAACTTTTTGAGTTTT
CAGGGATCCAATAGAAATGTTGAATTTCAATTAAGAATTAATCAAAGGCAATAA
ACAATAATTACGAATAATTTTTTTTTAAAGAAATCAAAAAGGGAAAGGGGGC
GGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCGCGATCTT
TCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTT
TATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAATAACTTATATTAAGAACTATGCTAA
CCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGCCAATCGACTCTC
ATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCA
TTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAAACTGAGACAGGAATTTTAT
TAAAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTTCAGGGTTAATAGCATCCATTTTTTGCTTTG
CAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATGTTTAAAGTTTAA
ACCTCCTGTGTGAAATTATTATCCGCTCATAATTCCACACATTATACGAGCCGGA
AGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCATAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTG
CGTTGCGCTCACTGCCAATTGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCAT
ATGAATCGYCAACGCGCGGAGAGGCGATTGCGTATGGATSCTCATCGCTTCTGSC
TCMCTGAACTCGCTGCGCCTCGGGTTCGATCG

T1-Blanco Reverse

>5525

TCMACCCMARGGCGTTTTTTCTGGGGKGAGCAAAAATCAGGAAGGCCAAAATGC
GCAAAAAGGGAATTAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTCCTTTT
TCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG
AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAA
GTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATA
GGCGTATCACGAGGCCGCCCTGCAGCCGAATTATATTATTTTTGCCAAATAATT
TTAACAAAAGCTCTGAAGTCTTCTTCATTTAAATTTCTTAGATGATACTTCATCTG
GAAAATTGTCCAATTAGTAGCATCACGCTGTGAGTAAGTTCTAAACCATTTTTTT
ATTGTTGTATTATCTCTAATCTTACTACTCGATGAGTTTTTCGGTATTATCTCTATTT
TTAACTTGGAGCAGGTTCCATTGTTTTTTTTTCATCATAGTGAATAAAATCAAC
TGCTTTAACACTTGTGCCTGAACACCATATCCATCCGGCGTAATACGACTCACTAT
AGGGAGAGCGGCCGCCAGATCTTCCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGTTA
TGCATGAACGTAATGCTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATTGAAGCTCC

GTCTACAAATGGATAAATTTTCGTTTCGTACAAGTTATGGAAAGTAAGGGGGCAAT
ACCTGTTTCTTGACAGACCAGGAAATTGGTTATTGCTTCTTTACTAGTTAGTATTT
TTTTAGTTTATAATTAACTTTTCAATTTTAAGTTTTTTTTTTTATTTATTAGTCTAAA
ACGTATCAATTTTTATTTAGTATGAAATGATTCTATATGATATCTTCTTTTTAACTT
TTTATAATAACTTTTTGAGTTTTTCAGGGATCCAATAGAAATGTTGAATTTCAATTA
AGAATTAATCAAAGGCAATAAACAACTAATTACGAATAATTTTTTTTTTAAAGAAA
TCAAAAAGGGAAAGGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGKATTGT
GAATCCACCATGCGCGATCTTCTAGAAGATCYCCTWCATTAMG

T2-Rojo Forward

>4711

CCTTCGGGAGGCTCGAGTTTTTAGCAGATCKKCGCATGGWGGATTCSMWYCCACT
GCCTTGATCCACTTGGCTACWTCCGCCCCCTTCCCTTTTTTGATTTCTTTAMWAA
AAAAC TATTCKYAATTARTTCTTTATTGCCTTTGATTAATTCTTAATTGAAATTCA
ACATTTTCYATTGGATCCCTGAAAAC TCAAAAAGTTATTATAAAAAGTTAARAARA
ASATATCATATAGAATCRTTTCATACTAAATAAAAATTGATACGTTTTAGACTAAT
AAATAAAAAAAAAAAATACTTAAAATTTAAAAGTTAATTATAAACTAAAAAAAAAA
GACTAACTAGTAAAGAAGCAATAACCAATTTCTGGTCTGTCAAGAAACRRGTAT
TGCCCCCTTACTTTCCATAACTCRWATACMCTAAACTACRAACGAAAATTTATCC
WTTTGTAGACSGASCTTCWWTAKCASCTAGGWCTASAGGGAAGTTATGAGCATT
ACKTTCATGCM T AACATCTTTCTAKAAKATCTCCTACAATATTCTCAKCTGCCAT
GGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCARGATTTTCAGGSTGYATATTA AAC
TTATATTAWKAACTATGCTRACCACCKCATCASGAACCGTTGTASGKGGCGKGS
TTTKCTTGGCARWCKACTCTCATGAAAAC TACGAGCTAAATATTCAATATGTTCC
TCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTTGAACGAGGTTTAKAGCAAGCTTCRRG
ARACTGAGACWGGAATTTTATTARAAATWTARATTTTGAAGAAAGYTCAGGRTT
AMTAGCATCCAWTTWTKTGCTTTRCAAGTTCCTCARCATTCTTAACAMAAGACR
TCTCTTTTGACRYGGTTAAAGTTYAAACCTCCTGTGTGAATTATTATCCYGCTCAT
AATTCCCACACATTATACGAGCYGGAAGCATMAAGTGTAACKCCTGRGRTGCCT
AATGAGTSAGCTARCWCACAYTCA YTGCGTGC GCTCGACTGCCAMCTTGCTTTC
TAGTCGGTAAACCTGTGCTGYAGCTGCATRATGATYCGGCCAYKCGCGGGSAY
AGCCGATTAGCAACTGGAGYCTCKTCAGCTTCTCGACTCCACTGACTYG

T2-Rojo Reverse

>5526

CTTTGWCCAGCGATTCTAGTGAGCAAATCAGGAAGGCAAATGCCGCCAAAAT
GGATTACGACGACACCGGAAATGTGGAATACTCATACTCCTCCTTTTCAATATTA
TGAAGCATTTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTA
GAAAATAACAAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAC
GTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGA
GGCKGCYCCTGCAGCCGAATTATATTATTTTTGCCAAATAATTTTTAACAAAAGC
TCTGAAGTCTTCTTCATTTAAATTCTTAGATGATACTTCATCTGGAAAATTGTCCC
AATTAGTAGCATCACGCTGTGAGTAAGTTCTAAACCATTTTTTTTATTGTTGTATTA
TCTCTAATCTTACTACTCGATGAGTTTTCGGTATTATCTCTATTTTTAACTTGGAGC
AGGTTCCATTCAATTGTTTTTTTCATCATAGTGAATAAAAATCAACTGCTTTAACACT
TGTGCCTGAACACCATATCCATCCGGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGG
CCGCCAGATCTTCCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCGCGCATGGTGGATT

CACAATCCACTGCCTTGATCCACTTGGCTACATCCGCCCCCTTCCCTTTTTTGATT
TCTTTAAAAAAAATACTATTCGTAATTAGTTCTTTATTGCCTTTGATTAATTCTTAA
TTGAAATTCAACATTTCTATTGGATCCCTGAAAACCTCAAAAAGTTATTATAAAAA
GTTAAAAAGAAGATATCATATAGAATCATTTCATACTAAATAAAAATTGATACGT
TTTAGACTAATAAATAAAAAAAAAAATACTTAAAATTTAAAAGTTAATTATAAAC
TAAAAAAAAAAGACTAACTAGTAAAGAAGCAATAACCAATTTCTGGTCTGTCAA
GAAACAGGTATTGCCCCCTTACTTTCCATAACTCGTATACAMTAACTACGAACG
AAAATTTATCCATTTGTAGACGGAGCTTCAATAGCAGCTAGGTCTAGAGGGAAGT
TATGAGCATTACGTTTCATGCATAACATCTTCTAGAAGATCTCCYWACAWTTA

T3-Púrpura Forward

>4712

CAMTTTCGGGATGCTCGAGTTTTTCAGCAGATGCKCATGGTGGATTCACWRTCCA
CTGCSTTGATCCACTTGGCTACWTCGCCCCCTTCCCTTTTTTGATTTCTTTAAAA
AAAAACTATTCSTAATTASTTCTTTATTGCCTTTGATTAATTCTTAATTGAAATTCA
ACMTTCTATTGGATCCCTGAAAACCTCAAAAAGTTATTATAAAAAGTTAAAAAGA
AGATATCATATGGAATCATTTCATACTAAATAAAAATTGATACGTTTTAGACTAA
TAAATAAWGAAMAAATACTTAMAATTTAAAAGTTAATTATAAACTAAAAAAAA
GACTAACTAGTAAAGAAGCAATAACCAATTTCTGGTCTGTCAAGAACAGGTAT
TGCCCCCTTACTTTCCATAACTCGKATACRCTAACTACSAACGAAAATTTATCCA
TTTGTAACGGAGCTTCRATARCAGCTAGGTCTASAGGGAAGTTATGAGCATTAC
STTCATGCWTAACATCTTTCTAGAASATCTCCTACAATATTCTCAGCTGSCATGGA
AAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAWGATTTTCASGCTGTRTATTAWAECTTA
TATTAAGAACTATGCTAACCACCTCATCAKGAACCGTTGTASGTGGCGTGGGTTT
TCTTGSSAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTT
GACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTTGAACGAGGTTTASAGCAAGCTTCAGGAAAC
TGAGACAGGAATTTTATTAAAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTTCAGGGTTAATAG
CATCCATTTTTTTGCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTTTTT
GACATGTTTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTATWATCCGCTCATAATTCCA
CRCATTATACGAGCCGGAAGCATAMAGTGTAARGCCTGSSGSTGSCCTAATGAS
TGAKCTAACTCASATTKAATTGCGGTWGMGCTSACTGCCAATTGCCTTTCCAGGT
CAGGCAARCTGTCKTGCCAGCTGCATTTAATGAAGTCRKCCYAACGYSCGKGGTA
GGAGGCCGGTTTGCCGTAAGGCGCTCGTCRGCAACCTCSCCKCAYCTGAACTC
GACTGGCSGSTTYC

T3-Púrpura Reverse

>5527

GGGSTGTTKCWATMCAAAAAWACAGGTAAGGGCCAAAAAAGTCTAGCAAAAAA
ATGGCAATAATCGGCGGMCAAYGGAAAMTAKWTGAAATRRCTCAKACTTCTTCGG
TYTTCARTWTTKATTKGMAGCAGTTATKCWGGGTTACWTGTYTTCATSAKCGG
RKACATAGTYTGCATGKTATTTAGWWAATAATTAACRAMATAGSSGRTTTCCKGM
AGCACATTTTCCCGAAAAAGTGCCRCACGTACRTCTAAGAAACCATTAWTATCAT
GACATTAACCTATAAAAATAGGYGTATCRCGAGGCCGCCSTGCAGCCGAATTAT
ATTATKTWRCCAAATAATKTKTAACAAAAGCTAWGAAGTCTTCTCAKTKAAA
TTCTTAGATGATRCTTCATCTGGAAAATTGTCCCAATTAGTAGCATCACKCTGTGA
GTAAGTTSTAAACCAKYGTYTTATWGTTGTATYATCTCTAATCTTACTACTCGATG

AGTTTTCGGTATTATCTSTATTTTTTRRCWWGGAGCAGGTTCCATTTCATTGKTTTT
TCATCATAGTGAATAAAATCAACTGCTTTAACACTTGTGCCTGAACWCCATATCC
ATCCGGCGTAATAYGACTCAMTATAGGGAGAGCGGCCGCCAGATCTTCCGGATG
GCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATC
CACTTGGCTACATCCGCCCCCTTTCCCTTKTTTTGATTTCTTTAAAAAAAACACTATT
CGTAATTAGTTCTTTATTGCCTTTGATTAATMTTAATTGAAATTCAACATTTCTA
TTGGATCCYYGAAAACACTCAAAAAGTTATWATAAAAAGTTAAAAAGAAGATATCA
TATAGAATCATTTCATACTAAATAAAAATTGATACGTTTTAGACTAATAAATAAA
AAAAAATACTTAAAATTTAAAAGTTAATTATAAACTAAAAAAAAGACTAACTA
GTAAAGAAGCAATAWCCAATTCYTGGTCTGTCAAGAAACAGGTATTGCCCCCTT
RCTTTCCATAACTCGTATACASTAARCTMCGAMCGAAAATTTATCCATTKGTAGA
CGGAGCTTCAATAGCAGYTAGGTMTRGAGGGAAGTTATGAGCAKTACGTCAYS
ATAACATCTTCTAGAAGATCTCCACAATTC

T4-Naranja Forward

>4713

GCCTTTCGGATGCTCGAGTTTTTCAGCAGATGTTATGCATGAACGTAATGCTCATA
ACTTCCCTCTAGACCTAKCTGCTATKGAAGCTCCGTCTACAAATGGATAAATTTTC
GTTTCGTAGTTAKTGTATACGAGTTATGGAAAGTAAGGGGGCAATACCTGTTGCT
TGACAGACCAGGAAATTGGTTATTGCTTCTTACTARTTAGTCTTTTTTTTTAGTTA
TAATTAACTTTTAAATTTTAAGTATTTTTTTTTTTATTTATTAGTCTAAAACGTATCA
ATTTTTATTTARTATGAAATGATTCTATATGATATCTTCTTTTTTAACTTTTTATAAT
AACTTTTTGAGTTTTTCAGGGATCCAATASAAATGTTGAATTTCAATTAAGAATTAA
TCAAAGGCAATAAAGAACTAATTACGAATAGTTTTTTTTTTAAAGAAATCAAAAAA
GGGAAAGGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGtGCRGTGGATTGTGAATCCA
CCATGCGCATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAAT
CGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAAACTTATATTA
AGAACTATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTG
GCAATCGACTCTCATGAAAACACTACGAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACC
AACTTTATTCTGCATTTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAS
ACAGGAATTTTATTA AAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTTCAGGGTTAATAGCATC
CATTTTTTGCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACA
TGTTTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTATTATCCGCTCATAATTCCACACAT
TATACGAGCCGGAAGCRTAAAGTGTAAGCCTGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCT
AACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCAATTGCTTTCAGTCCGGGAAACCTG
TCGTGCYAGCTGCATTAATGAATCGGYCCAACGCGCGGGGAGAGGCCGGATTGR
CGTAATGRGGRCGCTCATTCCGRMTGTCCGTTCGMCTTCMACGTGATATTCG

T4-Naranja Reverse

>5528

CARGTTCCGAATGTAACCCACACYCGTGCACCCACTGATCTCAGCATCTTACTTTCA
CCCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAGGCAAAATGCGCAAAAAGGGGAAT
AAGGCGACACGGAAATGTGAATACTCATACTTCTTTTCAATATTATGAAGC
ATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAA
ATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTA
AGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCG
CCCCTGCAGCCGAATTATATTATTTTTGCCAAATAATTTTTAACAAAAGCTCTGAA

GTCTTCTTCATTTAAATTCTTAGATGATACTTCATCTGGAAAATTGTCCCAATTAG
TAGCATCACGCTGTGAGTAAGTTCTAAACCATTTTTTTATTGTTGTATTATCTCTA
ATCTTACTACTCGATGAGTTTTTCGGTATTATCTCTATTTTTAACTTGGAGCAGGTT
CCATTCATTGTTTTTTTCATCATAGTGAATAAAATCAACTGCTTTAACACTTGTGC
CTGAACACCATATCCATCCGGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGCCGCC
AGATCTTCCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCCCTTTTTTGATTTCTTTAAA
AAAAGACTATTCGTAATTAGTTCTTTATTGCCTTTGATTAATTCTTAATTGAAATT
CAACATTTCTATTGAATCCCTGAGAACTCAAAAAGTTATTATAAAAAGTTAAAAA
GAAGATATCATATAGAATCATTTCATACTAAATAAAAATTGATACGTTTTAGACT
AATAAATAAAAAAAAAAATACTTAAAATTTAAAAGTTAATTATAAACTAAAAAAAAA
GACTAACTAGTAAAGAAGCAATAACCAATTTCTGGTCTGTCAAGAAACAGGTAT
TGCCCCCTTACTTTCCATAACTCGTATACACTAACTACGAACGAAAATTTATCCA
TTTGTAGACGGAGCTTCAATAGCAGCTAGGTCTAGAGGGAAGTTATGAGCATTAC
GTTTCATGCATAATCTTCTAGAAGATCTCCWGCATC

Secuencias del marcador *matK*

T1-Blanco Forward

>10564

```
AWTTCCGGATGCTCGAGTTTTTCAGCAGATTCTAGCACACGAAAGTCGAAGTA
TTTCCTTTTTTCGAGGACAAATTCTTACATTTAAATTATGTGTTAGAAATATTA
TACCTTACCCCATCCATCTGGAAATTTGGTTCAAACCTCTTCGTTACTGGGTGA
AAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGATTCTTTCTTTATGAGTATCGTAATTG
GAATAGTCTTATTACTCCCCAAAAATCCATTTCTATTTTTTCAAAAAGGAATCA
ACGATTATTCTTGTTCCTATATAATTTCCATGTATGTGAATACGAATCCATTTTC
GTTTTTCTCTGTAACCAATCCTCTCATTACGATCAACATCTTTTGGAGCCCTTC
TTGAACGAAATTATTTTTCTGGAAAGCTAGAATATCTAGTAAAAGTATAAACTT
TACTAAGGATTTTTGTGTTATCTTATGCCTTTTCAAAGACCCTTTCCTGCATTA
TGTTAGGTATCGAGGAAAATCAATTCTGGCTTCAAAGGGGACGTCTCTTCTAAT
GCATAAATGGAAATATTATCTTTTCAATTTTTGGCAATGTCATTTTTCCCTGTGG
TCTCCACCAAGAAGAATCTATATCAATCGGTTATCAAAGCATCTCTCGACTTT
ATGGGTTTTTTTTCAAGTGTTGACTCAATTCTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
GTAGAAAATTCATTTCTAATAGATAATCCTATTAAGAAATTCGATACCATAGTT
CGAATTATTCCTCTGGTTGGATCGTTGGCTGAAGCGCAATTTTGTAAACGTATTA
GGACATCCCATTAGTAAGTCGGTCTGGACCGATTTATTGGATTCTGATATTATT
GATCGGTTTGGGCGCATATGCAGAAATCCTTTCCATTATTATAGTGGCTCTTC
AAGAAAAAAGAGTTGGTATCGAATAAAGTATATACTTCGACTTTCGTGTGCTA
GAATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATG
TTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGCTGTATATTA AAACTTATATTAGACTA
TGCTACCACCTCATCAGAACYCGTGTAGTKGCGTGGGCTTTCTTGCAATCGACT
TCTCAATGAAAACCTTACCGAGCCTA
```

T1-Blanco Reverse

>10568

```
GATTGWAGAGATCTTCTAGAAGATTCTAGCACACGAAAGTCGAAGTATATACT
TTATTCGATACCAACTCTTTTTTCTTGAAGAGCCACTATAATAATGGGAAAGAT
TTCTGCATATGCGCCCAAACCGATCAATAATATCAGAATCCAATAAATCGGTCC
AGACCGACTTACTAATGGGATGTCCTAATACGTTACAAAATTGCGCTTCAGCCA
ACGATCCAACCAGAGGAATAATTCGA ACTATGGTATCGAATTTCTTAATAGGA
TTATCTATTAGAAATGAATTTTCTACCATTTGACTCCGTACCACTGAAGAATTG
AGTCGAACACTTGAAAAAAAACCCATAAAGTCGAGAGAATGCTTTGATAACCG
ATTGATATAGATTCTTCTTGGTGGAGACCACAGGGAAAAATGACATTGCCAAA
AATTGAAAAGATAATATTTCCATTTATGCATTAGAAGAGACGTCCCCTTTGAAG
CCAGAATTGATTTTCTCGATACCTAACATAATGCAGGAAAGGGTCTTTGAAAA
GGCATAAGATAACACAAAAATCCTTAGTAAAAGTTTATACTTTTACTAGATATT
CTAGCTTTCCAGAAAAATAATTTTCGTTCAAGAAGGGCTCCAAAAGATGTTGATC
GTAAATGAGAGGATTGGTTACAGAGAAAAACGAAAATGGATTTCGTATTCACAT
ACATGGAAATTATATAGGAACAAGAATAATCGTTGATTCCTTTTTGAAAAAAT
AGAAATGGATTTTTGGGGAGTAATAAGACTATTCCAATTACGATACTCATAAA
GAAAGAATCGTAATAAATGCAAAGAAGAAGCATCTTTCACCCAGTAACGAAGA
GTTTGAACCAAAAATTTCCAGATGGATGGGGTAAGGTATTAATATTTCTAACACA
TAATTTAAATGTAAGAATTTGTCTCGAAAAAAGGAAATACTTCGACTTTCGTG
```

TGCTAGAATCTTGCTGAAAACTCGAGCCATCCGGGAAGATCTGGCGGCCGCT
CTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCCGGATGGATATGGTGTTCAGGCACAAGTG
TAAAGCAGCTGGATTTTATTCACTATGATGAAAAACATGCATGCATCTTGCT
CAGGTAAAATAGAGATAATACCGAAAAAACT

T2-Rojo Forward

>10565

GATTTCCGGATGCTCGAGTTTTTCAGCAGATTCTTSYAYTCRTTCGTCATTTCTCT
TTTTCCAAGATATTGAATGCATAGATCGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACCTATT
CTCTCCTGCCATGGAAAATGGTGTCTTCTTTTATTCTCTCRWGATTTACGCGCT
GTCTTTGAAATCTTATATAATCAACTATGCTAACCACCTCATCTGGAACCGTTG
TAKGTGGCGTGGGTTTTCTTGGCAATCGACTCTCATGAGAACTACSAACTAAAT
ATTCAATATGTTCCCTCTTGACCAACTTTATTCTGATTTTTTTTTGAACGAGGTTA
GAGCCGCTTTCGAAACTGAAACAGGAATTTTATTAARAATTTCWATTTTGAAR
AAAGTTCWSGGKTAATAKCRGCCATTTTTTGCTTTGCAAGTTCCTCASCATTCTT
AACWGAGKACKTCTCTTTTGACATGWTCAAAGTTTAAACCTCCTGGGTGAAAT
TATTATCCGCTCATAATTCCACACATTATACGAGCCGGAACCATAAAGTGWAT
GGCCTGRGGAGCCTAAYGAKTGAKGTMACTGWCATTAWTTGCKGTGCKCTCA
CTGCCRATTGCTTTCCAKEYCRGCAAACCTGWCRTGCCTCCTGCRTTATTGAATC
KTTCAATTCRCGKGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCA
CTCACTGACTCKCTGCGCTCGGTCTATCGGCTGCGGCGAGCGRTATCAGCTCAC
TATTCGGCTGTWAGACTCKTATCCTCAGAATCARGTGATAACGSARGAAAGAA
CATGTGATCRAAAGGCSAGCTGRACCCAKGAACCGTAAAAAGAYCGCGTTGCT
GGSKTTGTTCCMTAAGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACARWGRYTCGACSC
TCAARTCAGAGGTGGTATAAACCRCRKGTAATATAGAYWTCAGGCGTGY
TCCCCTKGTAAAGCTCCCTCSTGCCGCTCAYATGTYTCAGACYSCYGMCGGCW
TWACTCGGATACCYGTCCTKYATTTCTCTCAWSRKKTAAGCAGTGTSTMTAT
CTCATCGTCWTCAYKCATGTACGTAACKCTCAGCWTCGGTCRTMAGGWCRACT
CGCTKCAAGCTGCACTGATTGCACTGACYACTCCGACTCCAKMYSGAACMCGC
TMTYGCSAGCCCTTAAATWG

T2-Rojo Reverse

>10569

AATGTAGAGACTTCTAGAAGATTCTTCTACACRTTCRWCATTTTCATAGAGTTTA
TTTTACCTTCCCTGTGTTCTAATCTAGCCGATAAACTCRAGCCATCCAGAACA
GCWGGCGCCCCCTCTCCCATCARTGATACGTAATACCCCGGATGGATATGGTG
TTCACTTACTARTGGKATGTCCTATGATTTTACTCACTTGCCTATAACCACCRA
TCCWGCCACCTGATCCATTCTAACTATGGAATCGTTTTCTTAACTCGATTATCT
ATTAGAAATGAGATTTCTACCTTTGACTCCTGGTTTATGACTAATTGACTCSAA
GATGTTACTAAWTGGGACWAWTTTCCAGAGGAWGYATTGACWAMSAATTGA
TATGAATTCKACTTGGTGGAGACCGTTRGGATTAATGACATTGCCTAATATTGA
TCGGCTGCATTTCCRTTTTCGCGTTACACCAATTGTCCCCTTTGAATGCCRAGAT
GATTTTGCTCTCTTCCAARTCTAGTGCMRGTTTTGGGCTTTGAGAGCGCGGAAC
CCCTATTTGTTTCCTTTCTAAAAGTTTTTACTTTTACATCATATTCTGATTTCCAR
ACCTGAATTTGCTTCARAARGGCTCCAAAAGAAGTAGATCGARWATGCRASG
ATTGCKTGCCGACCTTATCCCTTTGTAGTCGYATTCTGCCTTCCCTGATATTGCT
CACCAACAARAACCTGGTGAAGATTCTTTTGGAAAAARATCAAWTGGATGCWT

GAGTGGKWTACATACWATTGCATCTCCRAWRCTCWTAGATCCTTGAGAGTTTT
CGCCCCRAAGAARAANKCATCCAATGATGAGYAMCKWARAGGTTCTGCTAWRW
GTTCCGGATGGTATGCGCGTATTGTATTMATATTTCTAACACMTMRKTCRCCTG
WTASACTATTTTCYCSRAWGACWTGRWTGAGTGAATGAMYAGWCMCGATAA
WAGCWTCWWACKCATGGCCATGACGGAAGATCKRRYTRTSCGSTGYYGCCAT
AATCAGTSAGTGTAMGCACKGAYGGGMYATCGTRCTCATGMCACGAKCTGAG
MACCGTRAGTAKCTWCGCATKATTGACACAACCATGAGKGATCACGTGACTCG
AGCTTGATCGTATCGTACTGCAGCAKGACTIONGATGCGTAGCTAAGCTACGAAGC
GAGTTAC

T3-Púrpura Forward

>10566

CCTTCGGAKGMTCGAGTTTTTCAGCAAGATTCTAGCACACGAAAGTCGAAGTA
TTTTCTTTTTTCGAGGACAAATTTCTTGCATTTAAATTATGTGTTAGAAATATTA
TACCTTACCCCATCCATCTGGAAATTTGGTTCAAACCTTTCGTTACTGGGTGA
AAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGATTCTTTCTTTATGAGTATCGTAATTG
GAATAGTCTTATTACTCCCCAAAAATCCATTTCTATTTTTTCAAAAAGGAATCA
ACGATTATTCTTGTTCCTATATAATTTCCATGTATGTGAATACGAATCCATTTTC
GCTTTTCTCTGTAACCAATCCTCTCATTACGAGCAACATCTTTTGGAGCCCTTC
TTGAACGAAATTATTTTTCTGGAAAGCTAGAATATCTAGTAAAAGTAAAAACTT
TACTAAGGATTTTTGTGTTATCTTATGCCTTTTCAAAGACCCTTTCCTGCATTA
TGTTAGGTATCGAGGAAAATCAATTCTGGCTTCAAAGGGGACATCTCTTCTAAT
GCATAAATGGAAATATTATCTTTTCAATTTTTGGCAATGTCATTTTTCCCTGTGG
TCTCCACCAAGAAGAATCTATATCAATCGGTTATCAAAGCATTCTCTCGACTTT
ATGGGTTTTTTTTCAAGTGTTCCGACTCAATTCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATGG
TAGAAAATTCATTTCTAATAGATAATCCTATTAAGAAATTCGATACCATAGTTC
GAATTATCCTCTGGTTGGATCGTTGGCTAAAGCGCAATTTTGTAACGTATTAG
GACATCCCATTAGTAAGTCGGTCTGGACCGATTTATTGGATTCTGATATTATTG
ATCGGTTTGGGCGCATACGCAGAAATCTTCTCATTATTATAGTGGCTCTTCAA
GAAAAAAGAGTTTGTATCGAATAAAGTATATACTTCGACTTTCGTGTGCTAGAA
TCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGCAAAAATCGATGTTT
TTCTTTTATTCTCTCAGATTTTCAGCTGTATATTA AAACTTATATTAGACTATGC
TACCACTCATCAGGAACGTGTAGTGCCKGGTTTTCTTTGTCAATYCGAACTCTCG

T3-Púrpura Reverse

>10570

TTACGGGTCGCATGTAGAGACTTCTAGAAGATTCTAGCACACGAAAGTCGAAG
TATATACTTTATTCGATACAAACTCTTTTTTCTTGAAGAGCCACTATAATAATGA
GAAAGATTTCTGCGTATGCGCCCAAACCGATCAATAATATCAGAATCCAATAA
ATCGGTCCAGACCGACTTACTAATGGGATGTCCTAATACGTTACAAAATTGCGC
TTTAGCCAACGATCCAACCAGAGGAATAATTCGAACTATGGTATCGAATTTCTT
AATAGGATTATCTATTAGAAATGAATTTTCTACCATTTGACTCCGTACCACTGA
AGAATTGAGTCGAACACTTGAAAAAAACCCATAAAGTCGAGAGAATGCTTTGA
TAACCGATTGATATAGATTCTTCTTGGTGGAGACCACAGGGAAAAATGACATT
GCCAAAAATTGAAAAGATAATTTCCATTTATGCATTAGAAGAGATGTCCCCT
TTGAAGCCAGAATTGATTTTTCTCGATACCTAACATAATGCAGGAAAGGGTCTT
TGAAAAGGCATAAGATAACACAAAAATCCTTAGTAAAAGTTTTTACTTTTACTA

GATATTCTAGCTTTCCAGAAAAATAATTTTCGTTCAAGAAGGGCTCCAAAAGAT
GTTGCTCGTAAATGAGAGGATTGGTTACAGAGAAAAGCGAAAATGGATTGCGTA
TTCACATACATGGAAATTATATAGGAACAAGAATAATCGTTGATTCCTTTTTGA
AAAAATAGAAATGGATTTTTGGGGAGTAATAAGACTATTCCAATTACGATACT
CATAAAGAAAGAATCGTAATAAATGCAAAGAAGAAGCATCTTTCACCCAGTAA
CGAAGAGTTTGAACCAAAATTTCCAGATGGATGGGGTAAGGTATTAATATTTCT
AACACATAATTTAAATGCAAGAATTTGTCCTCGAAAAAAGGAAATACTTCGAC
TTTCGTGTGCTAGAATCTTGCTGAAAACTCGAGCCATCCGGAAGATCTGGCGG
CCGCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGGATGGATATGGTGTTCAGGCACA
GTGTAAGCAGTTGATTTTTATTCACTATGATGAAAAACATKGAATGGCAATC
TGCTCCAAGTTAAAAAATTAGCG

T4-Naranja Forward

>10567

CMTTCAGATGAMTCGAGTTTTTTCGAGATTCTAGCACACGAAAGTCGAAGTAT
ATACTTTATTTCGATACRRACTCTTTTTCTTGAAGAGCCACTATAATAATGAGA
AAGATTTCTGCATATGCGCCCAAACCGATCAATAATATCAGAATCCAATAAAT
CGGTCCAGACCGACTTACTAATGGGATGTCCTAATACGTTACAAAATTGCGCTT
TAGCCAACGATCCAACCAGAGGAATAATTCGAACTATGGTATCGAATTTCTTA
ATAGGATTATCTATTAGAAATGAATTTTCTACCATTTGACTCCGTACCCTGAA
GAATTGAGTCGAACACTTGAAAAAAAACCCATAAAGTCGAGAGAATGCTTTGA
TAACCGATTGGTATAGATTCTTCTTGGTGGAGACCACAGGGAAAAATGACATT
GCCAAAAATTGAAAAGATAATATTTCCATTTATGCATTAGAAGAGATGTCCCCT
TTGAAGCCAGAATTGATTTTTCTCGATACCTAACATAATGCAGGAAAGGGTCTT
TGAAAAGGCATAAGATAACACAAAAATCCTTAGTAAAAGTTTTACTTTTACTA
GATATTCTAGCTTTCCAGAAAAATAATTTTCGTTCAAGAAGGGCTCCAAAAGAT
GTTGATCGTAAATGAGAGGATTGGTTACAGAGAAAACGAAAATGGATTGCGTA
TTCACATACATGGAAATTATATAGGAACAAGAATAATCGTTGATTCCTTTTTGA
AAAAATAGAAATGGATTTTTGGGGAGTAATAAGACTATTCCAATTACGATACT
CATAAAGAAAGAATCGTAATAAATGCAAAGAAGAAGCATCTTTCACCCAGTAA
CGAAGAGTTTGAACCAAAATTTCCAGATGGATGGGGTAAGGTATTAATATTTCT
AACACATAATTTAAATGTAAGAATTTGTCCTCGAAAAAAGGAAATATTGAATG
AATAGATCGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACATATTCTCAGCTGCCATGMKSAA
AATCGATGTTCTCTTTATTCTCTCAGATTTTCAGCTGTATATTAAACTTATATAG
GACTATGCTTACACTCATCAGGAACGTGTAGKCGTGGGTTTTTCTTGACATCC
GACTYCTYG

T4-Naranja Reverse

>10571

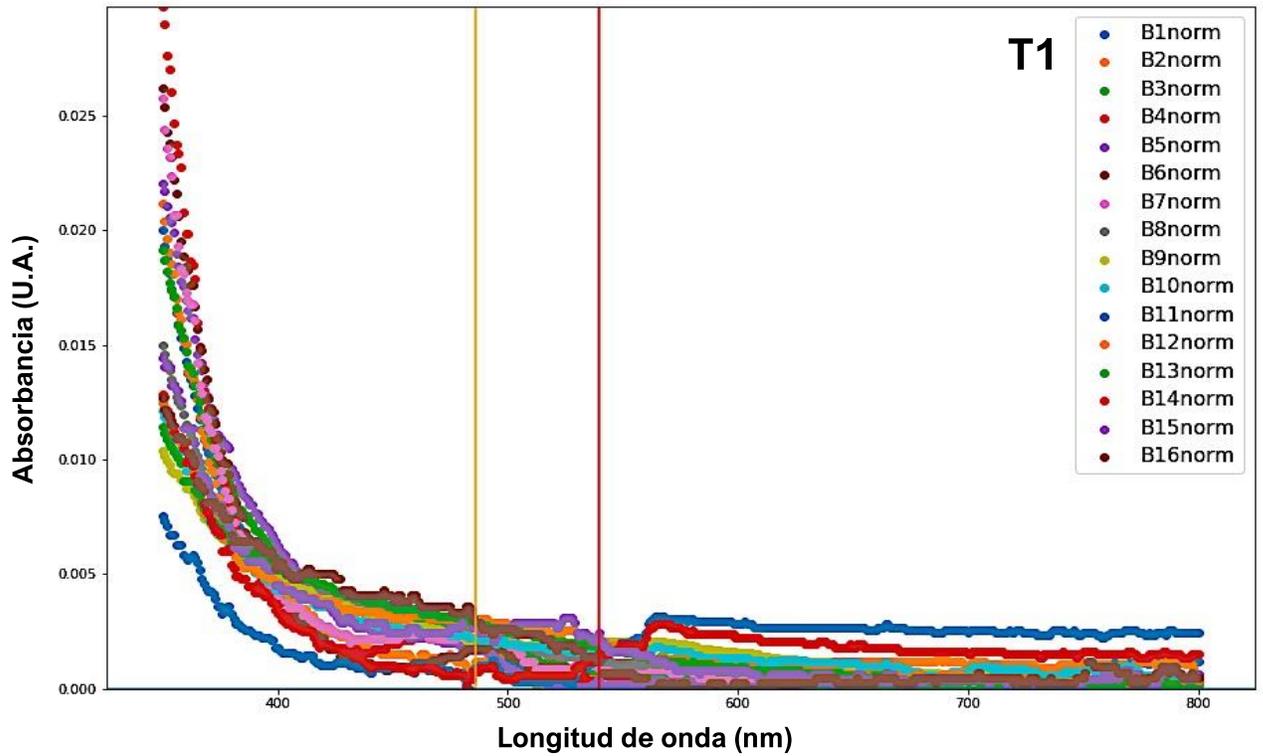
GWCGGAGATCTTCTAGAAGATCGATCTATTCATTCAATATTTTCCTTTTTTCGAG
GACAAATTCTTACATTTAAATTATGTGTTAGAAATATTAATACCTTACCCCATC
CATCTGGAAATTTTGGTTCAAACCTTTCGTTACTGGGTGAAAGATGCTTCTTCTT
TGCATTTATTACGATTTCTTTTATGAGTATCGTAATTGGAATAGTCTTATTAC
TCCCCAAAATCCATTTCTATTTTTTCAAAGGAATCAACGATTATTCTTGTTCC
CTATATAATTTCCATGTATGTGAATACGAATCCATTTTCGTTTTTCTCTGTAACC

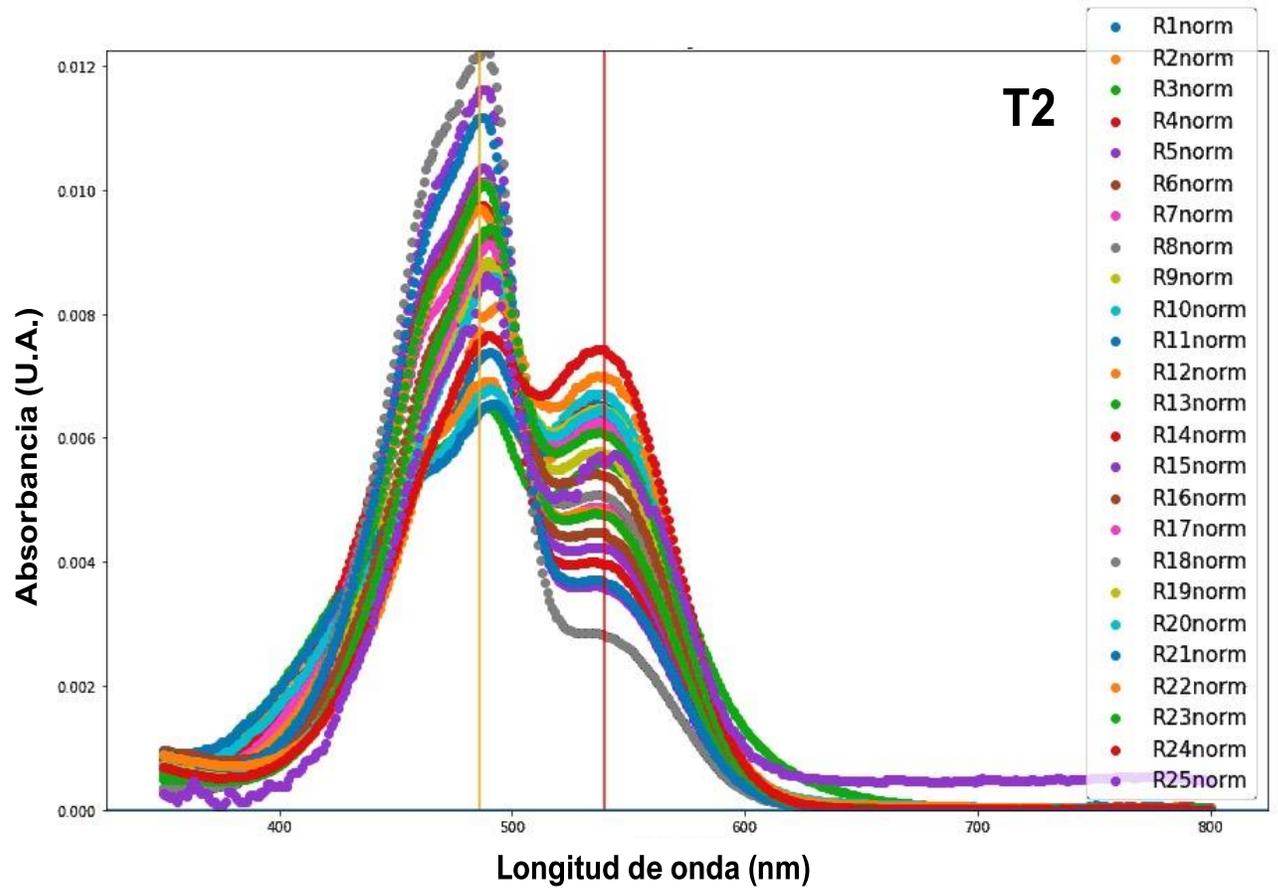
AATCCTCTCATTTACGATCAACATCTTTTGGAGCCCTTCTTGAACGAAATTATTT
TTCTGGAAAGCTAGAATATCTAGTAAAAGTAAAACTTTTACTAAGGATTTTTG
TGTTATCTTATGCCTTTTCAAAGACCCTTTCCTGCATTATGTTAGGTATCGAGGA
AAATCAATTCTGGCTTCAAAGGGGACATCTCTTCTAATGCATAAATGGAAATAT
TATCTTTTCAATTTTTGGCAATGTCATTTTTCCCTGTGGTCTCCACCAAGAAGAA
TCTATACCAATCGGTTATCAAAGCATTCTCTCGACTTTATGGGTTTTTTTTCAAG
TGTTTCGACTCAATTCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATGGTAGAAAATTCATTTCT
AATAGATAATCCTATTAAGAAATTCGATACCATAGTTCGAATTATTCCTCTGGT
TGGATCGTTGGCTAAAGCGCAATTTTGTAACGTATTAGGACATCCCATTAGTAA
GTCGGTCTGGACCGATTTATTGGATTCTGATATTATTGATCGGTTTGGGCGCAT
ATGCAGAAATCTTTCTCATTATTATAGTGGCTCTTCAAGAAAAAAGAGTTTGTA
TCGAATAAAGTATATACTTCGACTTTCGTGTGCTAGAATCTTGCTGAAAACTC
GAGCCATCCGGAAGATCTGGCGGCCGCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCC
GGATGGATATGGTGTACAGGCACAGTGTAAGCAGCTGAATTTTATTCACTATG
AATGAAAAACAATGAATGCAACTKGCTTCAGATTAGATAGAGATAAATCGTAA
CTCAATCGAGCTAGTAAAGGCAAT

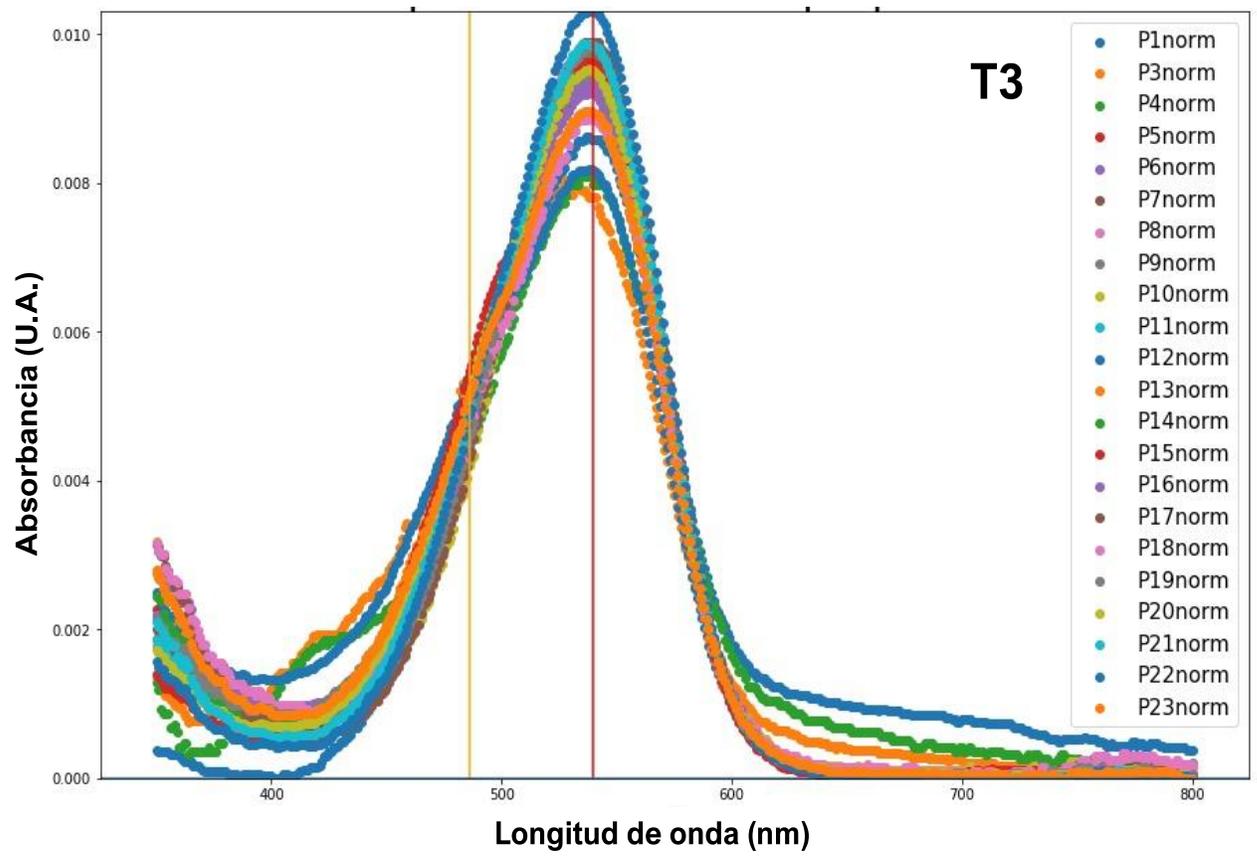
Anexo 2

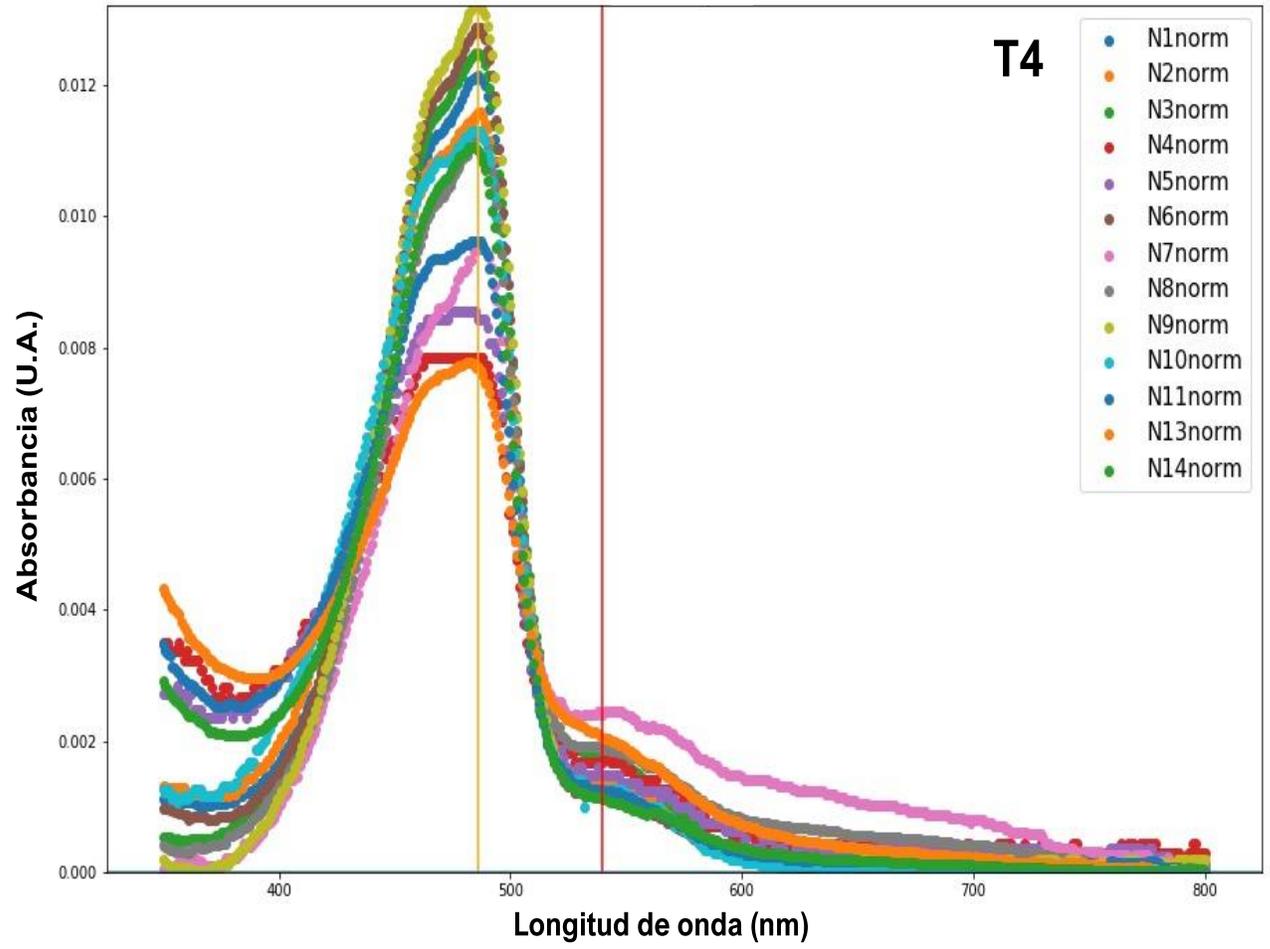
Espectros de absorción de T1 a T4

*Espectros normalizados de los frutos de color blanco (B_n), rojos (R_n), púrpura (P_n) y naranjas (N_n) donde n es el número de frutos.









Anexo 3

ANOVA optimización condiciones de extracción

Tabla A3.1. Análisis de Varianza (ANOVA) y significancia de los coeficientes de regresión para BX, BC y BT.

Fuente	GL	BX			BC			BT		
		SC Ajust.	Valor F	Valor p	SC Ajust.	Valor F	Valor p	SC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	14	0.038	10.3	*0.0000	0.059	20.0	*0.0000	0.188	15.0	*0.0000
Lineal	4	0.013	12.9	*0.0000	0.029	34.6	*0.0000	0.082	22.9	*0.0000
W	1	0.005	19.1	*0.0010	0.007	35.3	*0.0000	0.025	27.6	*0.0000
X	1	0.004	16.3	*0.0010	0.010	46.5	*0.0000	0.027	30.2	*0.0000
Y	1	0.001	3.2	0.0940	0.004	17.1	*0.0010	0.008	8.9	*0.0100
Z	1	0.003	12.8	*0.0030	0.008	39.5	*0.0000	0.022	24.9	*0.0000
Cuadrado	4	0.014	13.8	*0.0000	0.015	17.3	*0.0000	0.058	16.1	*0.0000
W²	1	0.004	14.3	*0.0020	0.005	24.3	*0.0000	0.018	19.7	*0.0010
X²	1	0.004	15.0	*0.0020	0.005	22.7	*0.0000	0.017	19.4	*0.0010
Y²	1	0.000	1.7	0.2120	0.002	8.1	*0.0130	0.004	4.4	0.0560
Z²	1	0.011	42.9	*0.0000	0.010	46.0	*0.0000	0.042	46.7	*0.0000
Interacción de 2 factores	6	0.010	6.2	*0.0020	0.015	12.1	*0.0000	0.049	9.0	*0.0000
W*X	1	0.004	15.0	*0.0020	0.005	21.4	*0.0000	0.017	18.9	*0.0010
W*Y	1	0.000	0.0	0.9420	0.000	0.1	0.7170	0.000	0.0	0.8910
W*Z	1	0.000	0.3	0.5940	0.000	1.4	0.2560	0.001	0.8	0.3990
X*Y	1	0.004	15.6	*0.0010	0.009	43.9	*0.0000	0.026	28.7	*0.0000
X*Z	1	0.001	5.4	*0.0350	0.001	3.3	0.0900	0.004	4.6	0.0500
Y*Z	1	0.000	0.7	0.4150	0.000	2.1	0.1680	0.001	1.4	0.2650
Error	14	0.004			0.003			0.013		
Falta de ajuste	10	0.003	3.2	0.1350	0.003	4.5	0.0800	0.011	3.7	0.1090
Error puro	4	0.000			0.000			0.001		
Total	28	0.041			0.062			0.201		

W= pH, X= temperatura de extracción (°C), Y= tiempo de extracción (min), Z= relación solvente (agua:etanol). *Coeficiente significativo p < 0.05.

Tabla A3.2. Análisis de Varianza (ANOVA) y significancia de los coeficientes de regresión para CFT y CA.

Fuente	GL	FT			CA		
		SC Ajust.	Valor F	Valor p	SC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	3.132	5.8	*0.0150	111.269	12.1	*0.0020
Lineal	3	2.367	13.1	*0.0030	18.393	6.0	*0.0240
W	1	0.484	8.0	*0.0250	8.985	8.8	*0.0210
X	1	1.815	30.0	*0.0010	9.398	9.2	*0.0190
Y	1	0.069	1.1	0.3220	0.010	0.0	0.9240
Cuadrado	3	0.348	1.9	0.2150	91.560	29.9	*0.0000
W*W	1	0.135	2.2	0.1790	42.264	41.4	*0.0000
X*X	1	0.012	0.2	0.6720	18.169	17.8	*0.0040
Y*Y	1	0.217	3.6	0.1000	21.913	21.5	*0.0020
Interacción de 2 factores	3	0.417	2.3	0.1640	1.317	0.4	0.7380
W*X	1	0.248	4.1	0.0820	0.928	0.9	0.3720
W*Y	1	0.157	2.6	0.1510	0.389	0.4	0.5570
X*Y	1	0.012	0.2	0.6740	0.000	0.0	0.9960
Error	7	0.423			7.146		
Falta de ajuste	3	0.423	1360.7	0.0000	7.010	69.0	0.0010
Error puro	4	0.000			0.136		
Total	16	3.555			118.415		

W= pH, X=temperatura de extracción (°C), Y= tiempo de extracción (min). *Coeficiente significativo p < 0.05.