



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**INCORPORACIÓN DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES  
NANOESTRUCTURADOS, POR INFILTRACIÓN CON ULTRASONIDO,  
PARA ALARGAR LA VIDA ÚTIL DE LA PAPA FRESCA CORTADA**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**I.A. SERGIO ARTURO OJEDA PIEDRA**

**TUTOR**

**DRA. MARÍA DE LA LUZ ZAMBRANO ZARAGOZA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente proyecto fue financiado por:

Proyecto PAPIIT IN 222520 “Manufactura, evaluación, caracterización y uso de sistemas nanoestructurados en el incremento de vida útil de alimentos” DGAPA-UNAM.

Proyecto PAPIIT IT201617, “Efecto de recubrimientos nanoparticulados y tratamiento con luz UV-C sobre la actividad antioxidante, enzimática e integridad de frutas y hortalizas cortadas.

Programa Interno de Apoyo a Proyectos de Investigación (PIAPI 1804) de la UNAM: Desarrollo y aplicación de nanocompuestos para la conservación de alimentos de origen vegetal refrigerados y/o congelados

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para y permitir mis estudios de Maestría, con No. de becario 885564.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por una nueva oportunidad de estudiar y permitir el desarrollar para mi formación profesional y al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, por todo el apoyo y confianza otorgada.

A mi tutora, la Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza, por el gran apoyo y la supervisión durante el desarrollo de este proyecto.

También agradezco el apoyo técnico en el acondicionamiento y envasado de las muestras a la Dra. María de los Ángeles Cornejo Villegas, en el Laboratorio de Transformación y Tecnologías Emergentes de Alimentos de la UIM y a la M. en I. Alicia del Real López de por el apoyo técnico en el área de microscopía del departamento de nanotecnología y microscopía de CFATA-UNAM.

Y especialmente Sergio Arturo Ojeda Piedra a la M. en M. Josefina Moreno Lara de la Unidad de Investigación de Granos y Semillas por el apoyo técnico y de interpretación del análisis de las pruebas microbiológicas.

### **Presentación en congresos:**

Ojeda-Piedra, S. A., Zambrano-Zaragoza, M. L. (2019). Incorporación de nanopartículas con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) mediante ultrasonido para la inhibición del oscurecimiento enzimático en papa (*Solanum tuberosum*). XII Congreso Internacional “Sobre Inocuidad, Calidad y Funcionalidad de los alimentos en la Industria y Servicios de Alimentación”. Ciudad de México, México.

### **Lugar de realización de la tesis:**

Laboratorio de Procesos de Transformación y Tecnologías Emergentes en Alimentos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM.

# ÍNDICE

Índice	i
Índice de Tablas	iii
Índice de Figuras	iv
Abreviaturas	vii
Resumen	viii
Introducción	ix

## Capítulo I ANTECEDENTES

1.1.Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	1
1.2.Obscurecimiento enzimático	2
1.2.1. Polifenol oxidasa	2
1.2.2. Polifenoles	4
1.2.3. Síntesis de fenoles	5
1.3.Ultrasonido	7
1.3.1. Equipos generadores de ultrasonido	8
1.3.2. Aplicaciones en la industria alimentaria	9
1.4.Nanotecnología	10
1.4.1. Nanopartículas	10
1.4.2. Aplicaciones de las nanopartículas	11
1.4.3. Caracterización de nanopartículas	12
1.4.4. Métodos de preparación de nanopartículas	14
1.5. Aditivos en la formulación de nanopartículas	15
1.5.1. Zeína	17
1.5.2. Lecitina	18
1.5.3. Alcohol polivinílico	19
1.5.4. Aceites esenciales	20

## Capítulo II METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Objetivos	23
2.1.1 Objetivo general	23
2.1.2. Objetivos particulares	23
2.2. Selección de material biológico	24
2.3. Selección de materiales para las nanopartículas	24

2.4. Desarrollo experimental	24
2.4.1. Formulaci3n y selecci3n de nanopartículas	24
2.4.1.1. Formulaci3n de nanopartículas	24
2.4.1.2. Caracterizaci3n	26
2.4.2. Selecci3n de condiciones de tratamiento del ultrasonido	28
2.4.3. Aplicaci3n de nanopartículas en la papa blanca fresca cortada	30
2.4.3.1. Acondicionamiento de la papa	30
2.4.3.2. Preparaci3n de soluciones a evaluar y envasado	30
2.4.3.3. Actividades experimentales para la evaluaci3n de la papa	32
2.5. Análisis estadístico	36

### **Capítulo III Análisis de Resultados**

3.1. Caracterizaci3n de nanopartículas	38
3.1.1. Tamaño de partícula	38
3.1.2. Índice de polidispersi3n	41
3.1.3. Potencial zeta	42
3.1.4. Eficiencia de encapsulaci3n	45
3.1.5. Estabilidad del sistema	47
3.1.6. Optimizaci3n del proceso	49
3.2. Selecci3n de condiciones de tratamiento	50
3.2.1. P3rdida de masa	51
3.2.2. Polifenol oxidasa e índice de obscurecimiento	54
3.2.3. Variaci3n parámetros de color	56
3.2.4. Optimizaci3n del proceso	58
3.3. Aplicaci3n de nanopartículas en la papa fresca cortada	59
3.3.1. Infiltraci3n de aceite de tomillo	59
3.3.2. Concentraciones de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>	61
3.3.3. P3rdida de masa	62
3.3.4. Variaci3n de conductividad eléctrica (Permeabilidad de membrana)	64
3.3.5. Almid3n/ Glucosa	66
3.3.6. Actividad fenilalanina amonio liasa	68
3.3.7. Polifenoles totales	71
3.3.8. Evaluaci3n de calidad microbiol3gica	73

3.3.9. Obscurecimiento enzimático	77
3.3.10. Cambios en los parámetros de color	83
Conclusiones	87
Referencias	

## Índice de Tablas

Tabla 1. Niveles de PVA aceptados para su aplicación en alimentos	20
Tabla 2. Niveles de PVA aceptados para su aplicación en alimentos	38
Tabla 3. Resultados caracterización de la papa posterior al tratamiento con ultrasonido $\pm$ desviación estándar	50
Tabla 4. Concentración de aceite de tomillo ( $\mu\text{l/ml}$ ) durante almacenamiento $\pm$ DE	60
Tabla 5. Permeabilidad de membrana (%) $\pm$ desviación estándar	64
Tabla 6. Concentración de almidón en la papa (%) $\pm$ desviación estándar	67
Tabla 7. Concentración de glucosa en la papa (%) $\pm$ desviación estándar.	68
Tabla 8. Crecimiento de bacteria aerobias (UFC/ml) $\pm$ desviación estándar	74
Tabla 9. Crecimiento de coliformes totales UFC/ml) $\pm$ desviación estándar	75
Tabla 10. Crecimiento de levaduras (UFC/ml) $\pm$ desviación estándar	76
Tabla 11. Índice de obscurecimiento durante el almacenamiento $\pm$ desviación estándar	78
Tabla 12a. Variación en el aspecto de la papa durante su almacenamiento para método de infiltración con y sin aceite de tomillo	81
Tabla 12b. Variación en el aspecto de la papa durante su almacenamiento por efecto de la incorporación de nanopartículas	82
Tabla 13. Variación de H durante el almacenamiento $\pm$ desviación estándar	85
Tabla 14. Variación de Croma durante el almacenamiento $\pm$ desviación estándar.	86

## Índice de Figuras

Figura 1. Reacciones de fenoles por la PFO	3
Figura 2. Estructura básica de los fenoles	4
Figura 3. Estructura de cumarinas (a), flavonas (b) y taninos (c)	5
Figura 4. Biosíntesis de compuestos fenólicos. Fenilalanina amonio liasa (FAL), tirosina amonio liasa (TAL), cinamato-4-hidroxilasa (C4H), cumaril-CoA ligasa (4CL), chalcosa sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavonona-3-hidroxilasa (F3H), flavonol sintasa (FLS), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), leucoantocianinina dioxigenasa (LDOX), factores de transcripción de la síntesis de antocianinas (AN1 y 2)	6
Figura 5. Desaminación de la L-fenilalanina mediante FAL	7
Figura 6. Formación de radicales libres y su recombinación	8
Figura 7. Equipo de ultrasonido con sonda	9
Figura 8. Tipos de nanopartículas (a) nanocápsulas y (b) nanoesferas	11
Figura 9. Mecanismos de inestabilidad de sistemas detectados por el Turbiscan	13
Figura 10. Geometrías del HPH	15
Figura 11. Método de nanoprecipitación	16
Figura 12. Estructura de la prolina	17
Figura 13. Estructura de la fosfatidilcolina	19
Figura 14. Unidad de repetición polimérica del alcohol polivinílico	20
Figura 15. Mecanismo antioxidante del galato	21
Figura 16. Estructura (a) timol y (b) carvacrol	22
Figura 17. Diagrama de proceso de la preparación de nanopartículas zeína-lecitina por el método de nanoprecipitación	25
Figura 18. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el tamaño de partícula	39
Figura 19. Efectos estandarizados para el tamaño de partícula	39
Figura 20. Gráfica de superficie para el tamaño de partícula en función a la concentración de lecitina/PVA.	40



Figura 21. Gráfica de superficie para el tamaño de partícula en función a la concentración de lecitina/PVA.	41
Figura 22. Efectos estandarizados para el IPD	42
Figura 23. Gráfica de superficie para IPD en función a los valores de pH/lecitina	42
Figura 24. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para $\zeta$	43
Figura 25. Gráfica de superficie de respuesta de $\zeta$ en relación con el valor de pH/lecitina	44
Figura 26. Contornos de $\zeta$ respecto a la relación PVA/lecitina	44
Figura 27. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la eficiencia de encapsulación	45
Figura 28. Efectos principales para la eficiencia de encapsulación	46
Figura 29. Perfil de retrodispersión de luz del sistema 1	47
Figura 30. Perfil de retrodispersión de luz del sistema 4	48
Figura 31. Variación de $\Delta$ BS respecto al tiempo	48
Figura 32. Optimización gráfica de las condiciones de preparación de nanopartículas de zeína-lecitina para la encapsulación de aceite esencial de tomillo	49
Figura 33. Variación de la pérdida de masa en papa respecto al tiempo	51
Figura 34. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la pérdida de masa	52
Figura 35. Contornos de pérdida de masa en función al valor de OP (potencia) y C (concentración de aceite esencial de tomillo)	53
Figura 36. Variación de la actividad PPO respecto al tiempo de análisis	54
Figura 37. Gráfica de barras de la inhibición de actividad PFO	55
Figura 38. Contornos para IO respecto C/OP	56
Figura 39. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de luminosidad	57
Figura 40. Efectos principales para Cromo	58
Figura 41. Optimización gráfica de las condiciones de proceso para la infiltración de nanopartículas de zeína-lecitina con ultrasonido	59
Figura 42. Disminución en la concentración del aceite esencial de tomillo durante almacenamiento	61

Figura 43. Variación en la concentración de CO <sub>2</sub> en el espacio de cabeza del envase durante el almacenamiento	62
Figura 44. Disminución en la concentración de ac. tomillo durante almacenamiento	63
Figura 45. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la pérdida de masa	63
Figura 46. Diagrama de Pareto para la variación de conductividad eléctrica	65
Figura 47. Modificaciones de la conductividad eléctrica	66
Figura 48. Gráfica de efectos principales para FAL	69
Figura 49. Producción de ácido-trans-cinámico	70
Figura 50. Producción de fenoles totales durante el almacenamiento	72
Figura 51. Gráfica de efectos principales para fenoles totales	72
Figura 52. Gráfica de efectos principales para bacterias aerobias	73
Figura 53. Diagrama de Pareto para crecimiento de levaduras	76
Figura 54. Diagrama de Pareto para el índice de obscurecimiento	77
Figura55. Actividad de la enzima polifenol oxidasa durante el almacenamiento	79
Figura 56. Porcentaje de inhibición de polifenol oxidasa por tratamiento	80
Figura 57. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para Cromo	83
Figura58. Variación de luminosidad (L) en la papa durante su almacenamiento	84
Figura 59. Escala de color CIE L-C-H	84

## Abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius	ml	Unidad de volumen en mililitros
μl	Unidad de volumen en microlitros	mM	Unidad de cantidad de sustancia en milimoles
a*	Espacio de color de verde a rojo	mm	Unidad de longitud en milímetros
b*	Espacio de color de azul a amarillo	NC	Nanopartículas con aceite esencial de tomillo
C	concentración de aceite esencial de tomillo en las nanopartículas	nm	Unidad de longitud en nanómetros
Cr	Croma en la medición de color	NP	Nanopartícula
DC	Pulsaciones del ultrasonido, por sus siglas en inglés	OP	Potencia de salida del ultrasonido por sus siglas en inglés
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	PFO	Enzima polifenol oxidasa
EAG	Equivalentes de ácido gálico	pH	Potencial de hidrógeno
EE	Eficiencia de encapsulación	pI	Punto isoelectrico
FAL	Enzima fenil amonio liasa	PT	Polifenoles totales
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos	PVA	Alcohol polivinílico
GRAS	Generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés	TP	Tamaño de partícula
H	Unidad de tiempo en horas	U/ml	Unidades por mililitro
H	Ángulo Hue en la medición de color	US	Ultrasonido
IO	Índice de obscurecimiento	W	Unidad de potencia, watts
IPD	Índice de polidispersión	Xg	Unidad de la fuerza centrífuga relativa
L*	Luminosidad en la medición de color	Carácteres griegos	
M	Unidad de longitud en metros	Abreviatura	Significado
mBar	Unidad de presión en mili Bar	ΔBS	Cambio en la retrodispersión de luz
min	Unidad de tiempo en minutos	Z	Potencial zeta

## RESUMEN

La papa es un producto importante en la dieta humana por su aporte energético y contenido en fenoles, durante su procesamiento y almacenamiento se promueven reacciones de oxidación que originan pérdida de calidad sensorial y microbiológica, por lo que el objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema de nanopartículas de zeína-lectina y aceite esencial de tomillo con capacidad antioxidante y antimicrobiano que permita incrementar la vida útil de la papa refrigerada a 4 °C. Las nanopartículas fueron preparadas por el método de nanoprecipitación, se empleó zeína, lecitina y aceite esencial de tomillo como fase orgánica, éstos fueron disueltos en una mezcla etanol-agua (80:20), mientras que la fase inorgánica estuvo compuesta por agua y alcohol polivinílico (PVA). Se empleó un diseño factorial para llevar a cabo la optimización gráfica de las condiciones de preparación de las nanopartículas, se consideraron como factores de variación la relación lecitina-zeína, pH del medio y concentración del PVA, las variables respuesta fueron: tamaño de partícula (TP), índice de polidispersidad (IPD), estabilidad física y eficiencia de encapsulación de las nanopartículas. Las condiciones ideales obtenidas fueron: 0.33% de PVA, relación lecitina-zeína (1:2) y pH 3.0, el TP promedio a estas condiciones fue de  $495 \pm 7$  nm, IPD de  $0.074 \pm 0.023$  y eficiencia de encapsulación de  $77 \pm 1\%$ , lo que evidenció un sistema con distribución de tamaño estrecha y una mayor cantidad de aceite esencial de tomillo atrapado en la matriz del polímero (zeína), este sistema fue estable físicamente durante las 24 h de análisis por retrodispersión de luz. También se establecieron las condiciones de infiltración de las nanopartículas con ultrasonido en la papa blanca fresca cortada, mediante una optimización gráfica del proceso, se demostró que a una potencia de 10 W, pulsaciones del 70% y concentración de aceite esencial de tomillo de 1.0 µl/ml existió una mayor inhibición en la actividad de la enzima polifenol oxidasa del  $81.52 \pm 0.30\%$  y una mayor inhibición en la pérdida de masa por deshidratación de la papa del  $15.18 \pm 0.01\%$  en un lapso de 24 h a condiciones ambientales. La papa cortada fue tratada en diferentes sistemas de inmersión para evaluar los efectos antioxidantes y antimicrobianos de los componentes de las nanopartículas por separado y en conjunto, se emplearon: nanopartículas cargadas con tomillo (NC), así como nanopartículas sin compuesto activo (NP), también se usó aceite esencial de tomillo en emulsión; se varió el uso del ultrasonido en la infiltración de los sistemas y se empleó inmersión en agua para evaluar sus efectos individuales en la papa.

Posterior al tratamiento con ultrasonido, se envasó la papa en bolsas plásticas de polietileno de mediana permeabilidad con una atmósfera de 5% de O<sub>2</sub> y 10% de CO<sub>2</sub> para un almacenamiento de 20 días en refrigeración. Cuando se infiltraron las nanopartículas con aceite esencial de tomillo (NC) con ultrasonido en la papa se presentó una disminución del crecimiento microbiano del 63% sobre el desarrollo de bacterias aerobias y en 93% para coliformes totales al comparar con producto sin algún tratamiento, con lo que se mantuvo la calidad microbiológica del mismo. También se incrementó la vida útil del producto hasta por 15 días, al disminuir la pérdida de peso por deshidratación y disminuir el oscurecimiento enzimático al regular la actividad de las enzimas polifenol oxidasa y fenilalanina amonio liasa.

## INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas son componentes importantes de la dieta diaria, siendo altamente perecederas, en especial al realizar operaciones de manipulación y transformación para su comercialización y consumo. Siendo necesario buscar alternativas de conservación que permitan incrementar su vida útil para el consumo humano (Ciurzynska et al., 2016).

La papa (*Solanum tuberosum*) es un tubérculo comestible de origen sudamericano. México se ubica entre los 7 primeros lugares de producción a nivel mundial y destina 54 mil hectáreas para el cultivo de papa, produciendo 1.7 millones de toneladas anuales, Sonora y Sinaloa son los principales productores con el 24 y 17% de la producción nacional total. La papa posee 80% de agua y 20% de materia seca, de ésta entre el 60-80% equivale a almidón. La función principal de la papa en la alimentación es energética, sin embargo, también cumple funciones reguladoras debido a su contenido de vitaminas hidrosolubles, minerales, fibra y compuestos bioactivos como los fenoles (Singh y Kaur, 2009).

Las papas pueden almacenarse a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo (6 a 7 meses); los tubérculos semilla requieren intervalos de entre 3 y 5 °C para disminuir su respiración, inhibiendo el desarrollo de microorganismos, sin embargo, el contenido en azúcares reductores aumentará debido a la degradación del almidón, promoviendo reacciones de oscurecimiento no enzimático durante el procesamiento, que al modificarse su calidad sensorial se vuelven inaceptables para su consumo. Las papas para consumo se almacenan a un intervalo de entre 7 y 10 °C para inhibir la aparición de azúcares reductores, manteniendo sus características sensoriales, pero a estas temperaturas se favorece la formación de brotes en los tubérculos, así como la inestabilidad del balance fitoquímico, permitiendo ataques de levaduras y bacterias (Raigond et al., 2018).

Una posible solución para la conservación de la papa, que permita inhibir las pérdidas de calidad microbiológica, nutricional, sensorial y fisicoquímica originadas por el almacenamiento o durante el procesamiento, como el escaldado previo a su congelación, es llevar a cabo operaciones mínimas de transformación empleando tecnologías de barrera como el envasado (Ciurzynska et al., 2016).

Para un adecuado envasado de la papa mínimamente procesada es necesario considerar que las operaciones previas como pelado y cortado pueden generar daño tisular, con lo que se incrementará la actividad metabólica y enzimática, esto promueve el obscurecimiento enzimático por la oxidación de los sustratos fenólicos (Cabezas-Serrano et al., 2009). Para evitar este daño los productos recién cortados pueden ser sometidos a tratamientos superficiales que incluyen la inmersión en soluciones con agentes antimicrobianos y antioxidantes como los aceites esenciales. Actualmente, existe un gran interés en emplear sustancias naturales que tengan un efecto antimicrobiano y antioxidante como los aceites esenciales para conservar propiedades y características de los productos frescos cortados, asegurando su calidad durante el almacenamiento e incrementando así su vida útil (Donst y Ferrari, 2016).

El aceite esencial de tomillo ha sido empleado en la conservación de diferentes alimentos de origen animal y vegetal, ya que ha mostrado tener propiedades antimicrobianas y antioxidantes asociadas a sus componentes principales como el timol y el carvacrol. El aceite esencial de tomillo se ha empleado en la preparación de biopelículas y recubrimientos, también se ha reportado su eficacia cuando se aplica por impregnación a productos envasados al vacío. Además, con la finalidad de proteger sus propiedades y componentes volátiles responsables de su acción antimicrobiana, se ha propuesto la encapsulación en nano y micropartículas (Sotelo-Boyás et al., 2017).

La nanoencapsulación es un proceso que permite proteger a los aceites esenciales de la degradación debido a condiciones ambientales como temperatura, humedad, O<sub>2</sub> o pH, previniendo la oxidación y volatilización de sus componentes, además, permite la modificación y control de la liberación de los compuestos al alimento, incrementando su compatibilidad en matrices con un contenido alto de humedad como es el caso de los alimentos (Arana Sánchez et al., 2010).

El ultrasonido es una tecnología no térmica usada para asistir en la infiltración de las nanopartículas en los alimentos al emplearse en un medio de inmersión, debido al efecto de cavitación y efecto esponja dentro del tejido causado por las ondas (Fernandes et al., 2008).

La generación de compresión y descompresión en los alimentos por el empleo del ultrasonido modifica la permeabilidad de los tejidos, formando canales internos, éstos promueven la liberación de agua de la estructura de frutas y hortalizas, facilitando la infiltración de sustancias de talla submicrónica por la fuerza impulsora de las ondas sonoras (Fernandes et al., 2008).



# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### 1.1. Papa (*Solanum tuberosum*)

La papa (*Solanum tuberosum*) es una especie de planta herbácea, originaria de la región del altiplano sur del Perú y noroeste de Bolivia, encontrándose naturalmente desde el sudoeste de Estados Unidos hasta la parte central de Argentina. Sus tubérculos son tallos modificados y constituyen los principales órganos de almacenamiento, en la mayoría de las variedades comerciales su forma varía entre redonda y ovalada (Singh y Kaur, 2009).

Es la cuarta cosecha más importante del mundo después del trigo, el maíz y el arroz; en 2017 se produjeron 388 millones de toneladas, más de la mitad de ésta se cosechó en Asia, siendo China el mayor productor con una producción superior a los 99 millones de toneladas anuales. El continente americano representa el 11.4% de la producción mundial (FAO, 2019).

La papa es un importante proveedor de energía en la dieta, por su alto contenido de almidón (12-18% del peso fresco), proporciona también compuestos bioactivos como proteínas (0.6-2.1%), vitaminas y polifenoles (123-441mg/100g). La papa es considerada la tercera fuente natural de fenoles después de manzanas y naranjas, presentes en la cascara y pulpa del tubérculo (Storey, 2007).

La comercialización de la papa como producto mínimamente procesado es limitada, ya que operaciones para el acondicionamiento de los tubérculos como lo son el lavado, pelado y cortado promueven reacciones de obscurecimiento enzimático, comprometiendo su calidad final. Los métodos de conservación más utilizados son la congelación (-30°C) con escaldado previo para inactivar las enzimas, sin embargo, este procesamiento origina modificaciones a las propiedades sensoriales y pérdida de calidad nutricional. Debido a las necesidades actuales de consumo se ha incrementado el uso de procesamiento mínimo para la conservación de la papa cortada durante su distribución y almacenamiento, esto para aumentar la disponibilidad del producto (Singh y Kaur, 2009).

Es importante resaltar que en este tipo de procesamiento se disminuye considerablemente el tiempo de vida útil comparado con la congelación o procesamiento térmico, por lo que continuamente se buscan alternativas que contribuyan a alargar el tiempo de comercialización y almacenamiento. Se han empleado para ello, tratamientos físicos como la irradiación UV-C, químicos como el ácido ascórbico, ácido acético y el cloruro de calcio con la finalidad de llevar a cabo la desinfección superficial e inhibir la acción de las polifenoloxidasas y otras enzimas responsables de la degradación del producto contribuyendo así a mantener el color y la firmeza (Storey, 2007). Otro tratamiento empleado con sustancias antioxidantes y antimicrobianas naturales es la infiltración de las mismas mediante tratamiento osmótico, que promueve la expulsión de agua del tejido que es sustituida por la solución concentrada (Singh y Kaur, 2009).

## **1.2. Obscurecimiento Enzimático**

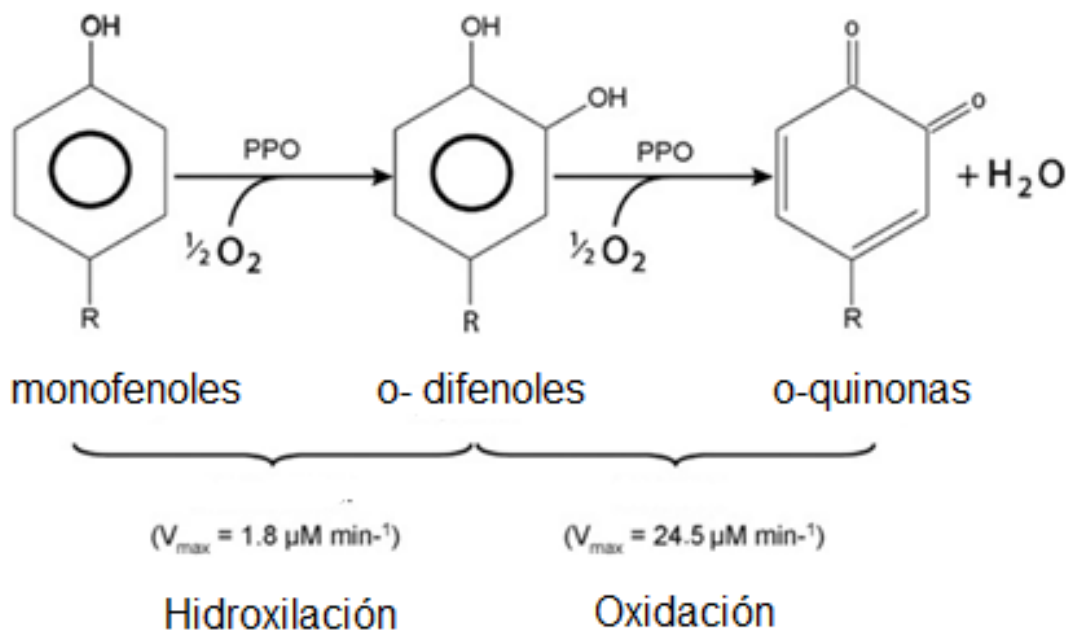
Los productos vegetales mínimamente procesados o frescos cortados tienen cambios de color y textura en poco tiempo debido a la actividad de las enzimas presentes, ya que son liberadas durante las operaciones de pelado y cortado, lo que disminuye en gran medida su aceptabilidad y apariencia. En general las frutas y hortalizas son apreciadas debido a su contenido de polifenoles, sin embargo, éstos son también responsables de las modificaciones superficiales del producto fresco cortado, ya que son el sustrato principal de las enzimas polifenol oxidasas que provocan el obscurecimiento enzimático, vinculados a la deshidratación y deterioro del tejido, siendo un problema particular de los productos con pulpa blanca como las manzanas, peras y papas (Toivonen y Brumell, 2008).

### **1.2.1. Polifenol oxidasa**

La enzima polifenol oxidasa (PFO) es una enzima tetramérica que contiene cuatro átomos de cobre por molécula, tiene sitios de unión para el oxígeno y los compuestos aromáticos como los polifenoles. La PFO y polifenoles normalmente se encuentran en compartimentos separados (cloroplastos y vacuolas, respectivamente), por lo que no tiene lugar ninguna reacción al interior de la célula vegetal (Jukanti, 2017).

En la fisiología vegetal la enzima PFO está implicada en la formación de pigmentos y en la eliminación del oxígeno de los cloroplastos. También, se ha encontrado que está ligada a los mecanismos de defensa de las plantas, sin embargo, tras la desorganización de la integridad de las células de forma natural en la senescencia o como consecuencia de daños mecánicos se origina la ruptura celular y puesta en contacto de la enzima PFO con los fenoles, esto promueve las reacciones de obscurecimiento enzimático características de frutos maduros, tejidos dañados o afectados por fisiopatologías, sugiriendo que la estabilidad de la membrana es un factor importante que controlar para inhibir el obscurecimiento enzimático (Toivonen y Brumell, 2008).

En la Figura 1 se muestra como la enzima PFO cataliza dos reacciones: (1) hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y (2) oxidación de difenoles a o-quinonas. La reacción de hidroxilación es relativamente lenta y forma productos incoloros, mientras que la reacción de oxidación es relativamente rápida y las o-quinonas resultantes son coloreadas. Posteriormente las o-quinonas se acumulan en los tejidos, produciendo polimerización y formación de melaninas, pigmentos de color marrón o negro, asociados con el obscurecimiento en los tejidos vegetales (Cefola et al., 2012).

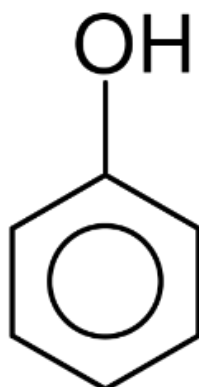


**Figura 1.** Reacciones de fenoles por la PFO (Toivonen y Brumell, 2008).

Las o-quinonas son especies muy reactivas capaces de modificar covalentemente especies nucleofílicas al interior de las células como los grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) y tiol ( $-\text{SH}$ ) de los aminoácidos, péptidos y proteínas, con lo cual se reduce el valor nutricional. Este fenómeno restringe la vida útil de los productos al modificarse características esperadas del producto, por lo que la medición del color debe ser un parámetro objetivo para la evaluación del procesamiento y almacenamiento de estos productos (Cefola et al., 2012).

### 1.2.2. Polifenoles

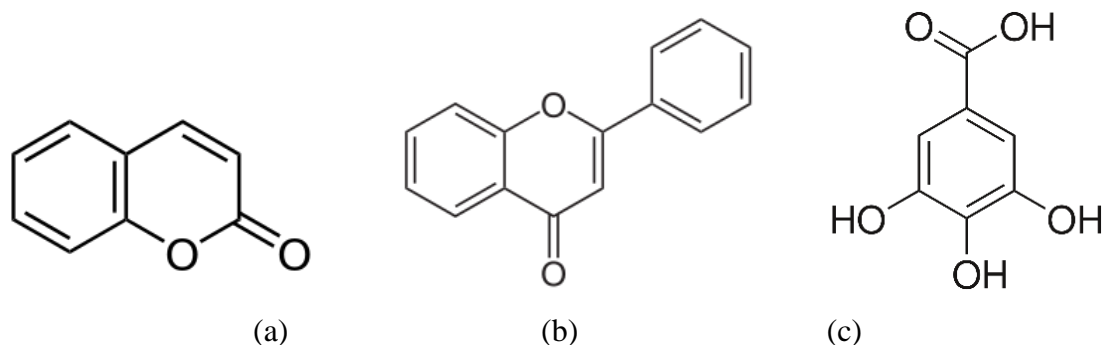
Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios, no esenciales en los procesos fotosintéticos o respiratorios, pero requeridos para su supervivencia. Dentro de esta clasificación se encuentran los compuestos fenólicos, caracterizados por tener un anillo de benceno ligado a un grupo hidroxilo ( $-\text{OH}$ ), como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Estructura básica de los fenoles (Toivonen y Brumell, 2008).

El término polifenol comprende a compuestos con más de un anillo fenólico. Los compuestos fenólicos poseen actividades bactericidas y fungicidas relacionadas con los mecanismos de protección de las plantas, en algunos casos cumplen funciones estructurales debido a su mecanismo de polimerización (lignificación). También actúan como reguladores o señalizadores químicos dentro de las plantas ya que modulan procesos fisiológicos como la transcripción, la permeabilidad de las membranas, la transducción de señales y el tráfico vesicular, inhibiendo el estrés oxidativo y regulando la respiración y la velocidad fotosintética (Volnová et al., 2015).

Los compuestos fenólicos son efectivos donadores de hidrógeno, sin embargo, su presencia en la papa promueve el oscurecimiento. Los compuestos fenólicos presentes en mayor proporción en tubérculos de papa son los fenoles monohídricos (Figura 2). En la Figura 3 se muestran otros fenoles presentes en la papa: cumarinas (a), flavonas (b), taninos (c) y ligninas, que son polímeros entrecruzados de fenoles (Peña y Restrepo, 2013).

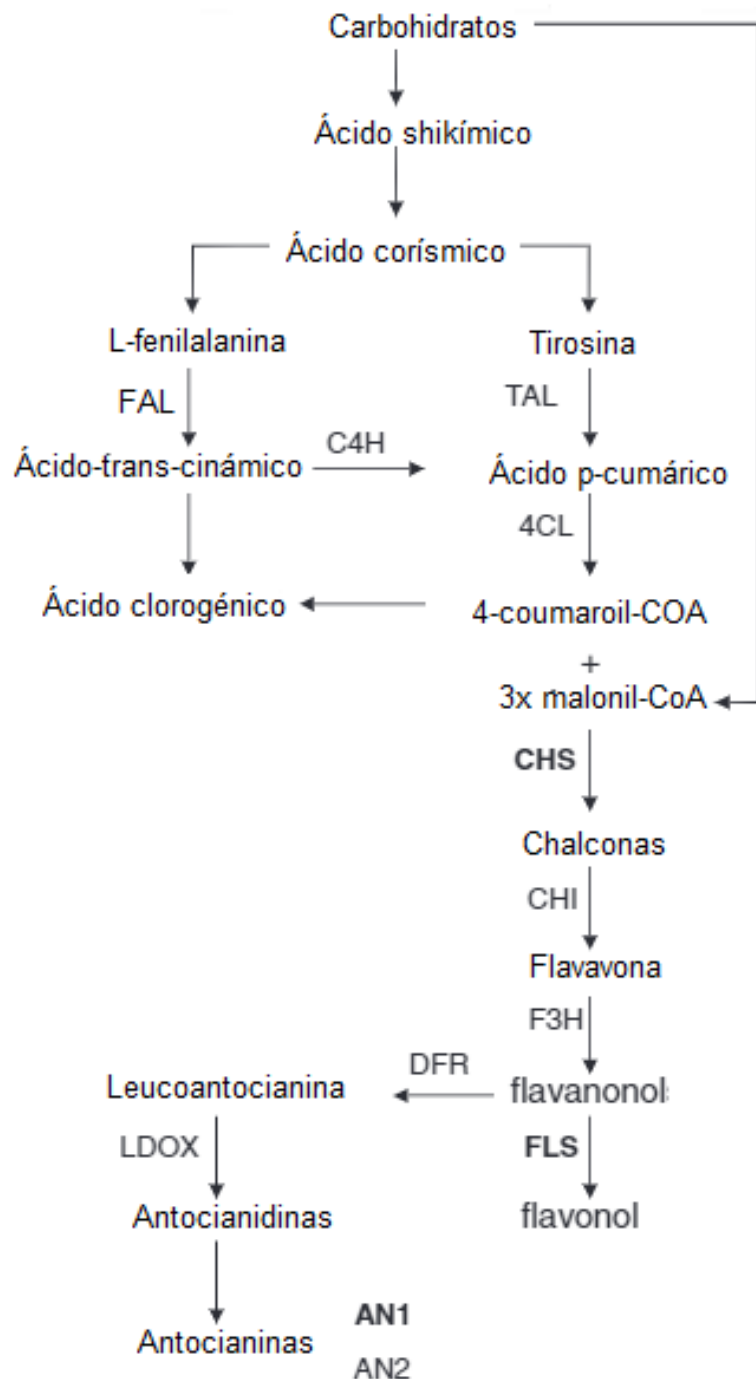


**Figura 3.** Estructura de cumarinas (a), flavonas (b) y taninos (c)  
(Toivonen y Brumell, 2008).

### 1.2.3. Síntesis de fenoles

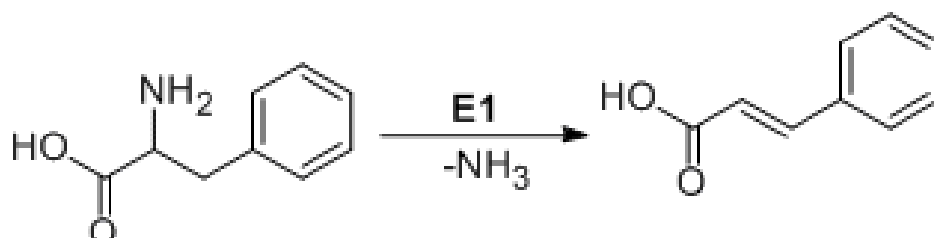
La biosíntesis de los compuestos fenólicos en las plantas se lleva a cabo en los cloroplastos a través de la ruta del ácido shikímico y la vía fenilpropanoide. Estas rutas producen compuestos fenólicos monoméricos y poliméricos. En la Figura 4 se muestra una versión simplificada de la formación de los principales grupos fenólicos presentes en la papa (Valcarcel et al., 2014).

El punto de entrada a la síntesis de la ruta de los fenilpropanoides está mediado principalmente por la enzima fenilalanina amonio-liasa (FAL), que desamina la L-fenilalanina para producir ácido-tans-cinámico, como se aprecia en la Figura 5, en una reacción de eliminación espontánea. Un mecanismo secundario implica la tirosina, que puede ser transformada por la tirosina amoniaco liasa (TAL) en ácido p-curámico y esto a su vez puede hidroxilarse en forma de ácido p-curámico (Valcarcel et al., 2014).



**Figura 4.** Biosíntesis de compuestos fenólicos. Fenilalanina amonio liasa (FAL), tirosina amonio liasa (TAL), cinamato-4-hidroxilasa (C4H), cumaril-CoA ligasa (4CL), chalcosa sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavonona-3-hidroxilasa (F3H), flavonol sintasa (FLS), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), leucoantocianinina dioxigenasa (LDOX), factores de transcripción de la síntesis de antocianinas (AN1 y 2) (Valcarcel et al., 2014).

La ruta de los flavonoides comienza con la reacción de 4-coumaroil-CoA y tres unidades de malonil-CoA para formar tetrahidroxi chalconas, catalizada por la enzima chalcona sintasa (CHS). A partir de este punto, la gran variedad de flavonoides que se encuentran en las plantas se sintetiza (Valcarcel et al. 2014).



**Figura 5.** Desaminación de la L-fenilalanina mediante FAL (Valcarcel et al. 2014).

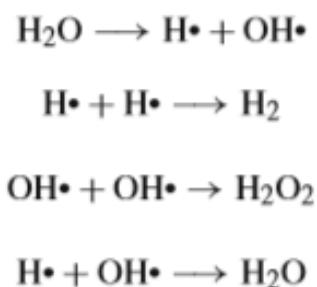
La FAL pertenece a la familia de isoenzimas que no requieren un cofactor para actuar, siendo dependiente de la luz. Una vez sintetizados, los compuestos fenólicos son transportados a la vacuola donde se encuentra cerca del 97% de los productos fenólicos. El estrés inducido provocado por el corte de los tejidos propicia un incremento significativo de la actividad FAL, con lo cual, se sintetizan y acumulan compuestos fenólicos en el sitio dañado; los fenoles generados son oxidados por la PFO aumentando con ello el oscurecimiento del producto cortado (Treutter, 2001).

### 1.3. Ultrasonido

El ultrasonido es una tecnología basada en la emisión de ondas acústicas que resultan imperceptibles al oído humano debido a que su frecuencia (repeticiones por segundo) se encuentra por encima de los 16 kHz (Ortega-Rivas, 2012).

La energía acústica del ultrasonido se transmite de una molécula a otra, cuando se propaga a través de un líquido se forman burbujas de vapor y colapsan por efecto de la compresión en el medio (presión positiva) y la descompresión (rarefacción), que implica la expansión de un cuerpo por efecto de la presión negativa. Al colapsar las burbujas se obtiene un aumento de temperaturas (hasta 5000 °C) y presión localizada (50 MPa) (Huang, 2012).

Estas condiciones producen cambios químicos dentro de la fase de vapor y en el líquido inmediato que la rodea, estos cambios son conocidos como sonoquímica (Ortega-Rivas, 2012). La principal reacción sonoquímica en medios acuosos es la formación de radicales primarios de hidrógeno (H) e hidroxilo (OH), éstos pueden recombinarse para formar productos moleculares como se muestra en la Figura 6 (Feng et al., 2011).



**Figura 6.** Formación de radicales libres y su recombinación (Feng et al., 2011).

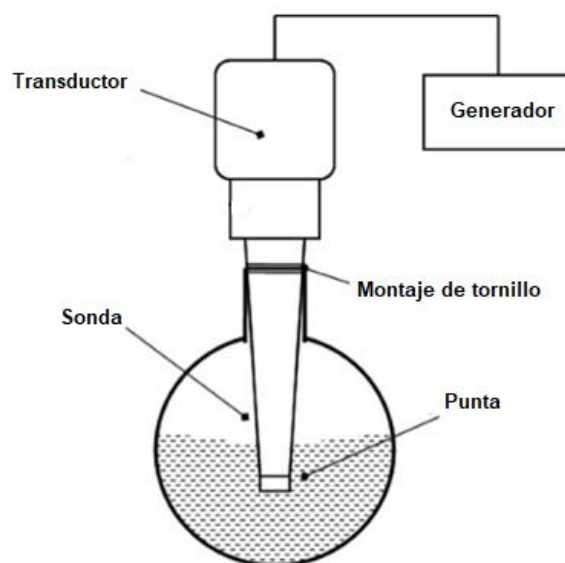
### 1.3.1. Equipo generador de ultrasonido

Para la aplicación real de ondas de ultrasonido existe la necesidad de que los equipos de ultrasonido cuenten con un instrumento conocido como transductor. En aplicaciones ultrasónicas, los transductores están diseñados para convertir energía mecánica o eléctrica en sonido de alta frecuencia (Feng et al., 2011).

Los sistemas ultrasónicos de sonda, mostrado en la Figura 7, consisten en una sonda, normalmente metálica o de vidrio, acoplada a un transductor ultrasónico, usado para amplificar la vibración producida por la sonda. Ésta debe ser de un material electrostrictivo, que se refiere a la modificación de sus dimensiones al aplicar campos eléctricos, para amplificar la vibración producida por el transductor (Ortega-Rivas, 2012).

El empleo de equipos con sonda implica la posibilidad de colocar directamente dentro del material a procesar, además de producir intensidades de ultrasonido controladas. Entre sus desventajas están la erosión de la punta de la sonda por cavitación, promover la formación de radicales libres y calentamiento del material (Ortega-Rivas, 2012).





**Figura 7.** Equipo de ultrasonido con sonda (Ortega-Rivas, 2012).

### 1.3.2. Aplicaciones en la industria alimentaria

El ultrasonido se ha empleado como herramienta para facilitar la transferencia de masa de un medio con el alimento, como es el caso de la deshidratación osmótica, también se ha estudiado su uso como tecnología auxiliar en la infiltración de sistemas de talla submicrónica a través de los tejidos (Ciurzynska et al., 2016). El uso de equipos ultrasónicos se ha popularizado para dispersar líquidos inmiscibles en otros y formar emulsiones (Huang, 2012).

El ultrasonido es ocupado para inhibir el crecimiento microbiano, debido al calentamiento y producción de radicales libres generados por la cavitación. La estructura de la pared celular de bacterias sufre adelgazamiento, provocando su posterior rompimiento, permitiendo la liberación del contenido del citoplasma, causando la muerte del microorganismo (Ortega-Rivas, 2012).

El mecanismo de inhibición de las enzimas es similar a la inactivación de microorganismos, provocado por la desnaturalización de las proteínas por efecto de la cavitación. Durante las condiciones de la sonicación se genera ruptura de los puentes de hidrógeno y las interacciones de Van der Waals, lo que lleva a la modificación de las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas (Feng et al., 2011).

Con tales cambios en la estructura de las proteínas la actividad biológica de la enzima se pierde. Los radicales libres formados por efectos de la sonoquímica también afectan la estabilidad de las enzimas al promover la recombinación con los residuos de aminoácidos libres (Feng et al., 2011).

## **1.4. Nanotecnología**

La nanotecnología es la disciplina que permite la manipulación de la materia a una escala nanométrica ( $10^{-9}$  m), ha tenido un gran impacto en diferentes áreas de la ciencia, incluyendo la conservación de alimentos, generando nuevas técnicas y materiales para incrementar la vida útil de los productos (Mora-Huertas et al., 2010).

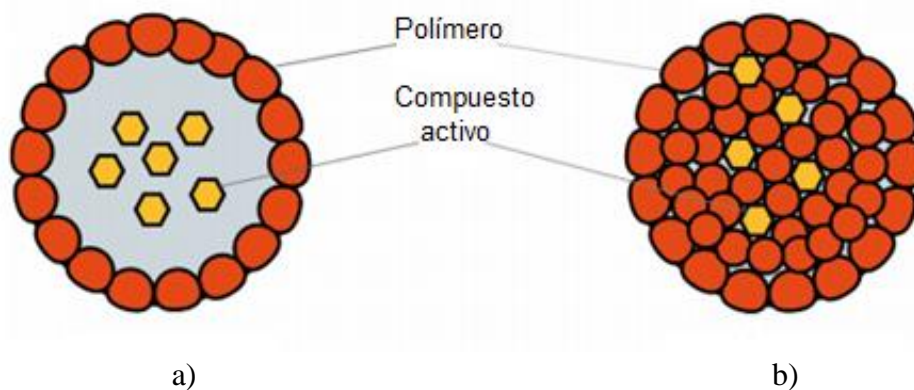
### **1.4.1. Nanopartículas**

Las nanopartículas se definen como partículas sólidas o coloidales que se encuentran en el intervalo de 1-100 nm, donde las propiedades físicas de los materiales pueden variar, pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica. Debido a fenómenos de inestabilidad de las dispersiones al emplear compuestos orgánicos como lípidos y proteínas se ha considerado incrementar el límite superior para las nanopartículas formadas a partir de polímeros naturales, por lo cual el prefijo ‘nano’ para estos materiales es aceptado para dimensiones menores a los 1,000 nm (Mora-Huertas et al., 2010)

Para la formación de sistemas submicrónicos para uso alimenticio se tienen que emplear compuestos reconocidos como seguros (por sus siglas en inglés GRAS) y polímeros biodegradables naturales o sintéticos. Existen diferentes estructuras de nanopartículas poliméricas con funciones de acarreadores, siendo las nanoesferas y nanocápsulas las más comunes para encapsular e incorporar agentes activos, las diferencias estructurales entre ellos se muestran en la Figura 8 (Ranjan-Rawil et al., 2016).

La diferencia principal entre ambas estructuras radica en su arquitectura, las nanocápsulas están compuestas por una barrera sólida que rodea una cavidad que se puede encontrar disponible o encapsular un compuesto activo, como se muestra en la Figura 8(a).

Las nanoesferas están compuestas por una densa matriz sin membranas o capas externas, donde el activo puede estar permanente o temporalmente disuelto o enlazado covalentemente a la matriz de la estructura (Mora-Huertas et al., 2010), su disposición se muestra en la Figura 8(b).



**Figura 8.** Tipos de nanopartículas acarreadoras (a) nanocápsulas y (b) nanoesferas (Mora-Huertas et al., 2010).

#### 1.4.2. Aplicaciones de las nanopartículas

Las nanopartículas se emplean para la generación de nuevos productos y procesos en la industria alimentaria, siendo utilizadas como sensores a condiciones medio ambientales como variaciones en la temperatura o atmósfera, también han sido ocupadas para la detección y neutralización de microorganismos, como recubrimientos en la conservación de vegetales donde actúan como nanoacarreadores, para incorporar nutrientes, antioxidantes, agentes antimicrobianos, aditivos para modificar o conservar propiedades sensoriales (Ranjan-Rawil et al., 2016).

Al incorporar agentes activos en los alimentos mediante nanopartículas se obtienen beneficios como la protección de los compuestos sensibles contra el efecto de degradación, al aumentar su estabilidad frente a factores ambientales como la presencia de oxígeno, variación de temperatura, humedad y luz, reduciendo su volatilización. Además de mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de materiales lipofílicos en matrices principalmente acuosas y disminuir la dosis requerida (Martínez Rivasa et al., 2017).

Con el empleo de las nanopartículas se puede modificar y controlar la cinética de liberación en los alimentos, permitiendo la focalización del compuesto activo e incrementar su absorción, aprovechando su funcionalidad y tener una liberación constante (Sabliov et al., 2015).

### **1.4.3. Caracterización de nanopartículas**

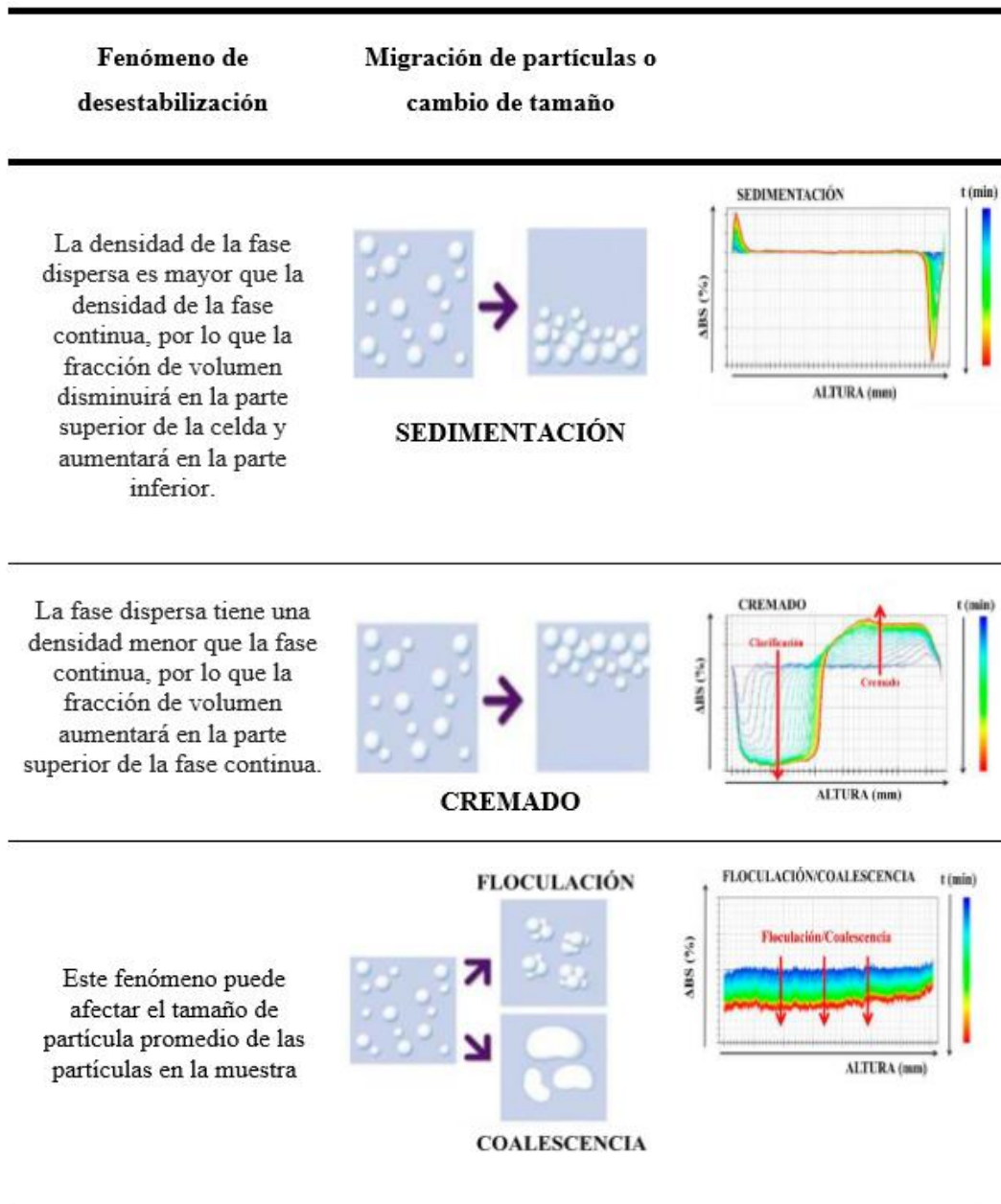
Las principales características a evaluar de las nanopartículas incluyen: el tamaño de las nanopartículas (TP), el índice de polidispersidad (IPD), el potencial zeta ( $\zeta$ ), la estabilidad física y la eficiencia de encapsulación de las mismas (Anandharamakrishnan, 2014).

El índice de polidispersidad (IPD) del sistema indica la distribución de los tamaños de las nanopartículas, se suele representar en una campana de Gauss. La dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) es la técnica más empleada para evaluar el tamaño de las partículas y el IPD. En la DLS se hace incidir un haz de luz en la muestra y cuantifica la variación de luz dispersada debida a las partículas suspendidas en el sistema debida al movimiento browniano de las mismas, donde una mayor velocidad de partícula y dispersión de luz es resultante de un menor diámetro (Anandharamakrishnan, 2014).

El potencial zeta ( $\zeta$ ) indica el valor de carga eléctrica superficial que una partícula adquiere en un determinado medio. Se mide mediante la técnica de movilidad electroforética, que aplica un campo eléctrico en el sistema para determinar la movilidad de las partículas, involucrando la interacción electrostática entre la fase continua y discontinua del sistema coloidal. El potencial zeta se relaciona con la estabilidad del sistema ya que indica el grado de repulsión electrostática entre partículas adyacentes, cargadas de manera similar. Un alto valor de  $\zeta$ , superior a 30 mV, indica estabilidad, al inhibirse la agregación de las partículas del sistema por estabilización eléctrica (Bala et al., 2005).

La estabilidad física del sistema indica la perdurabilidad de las nanopartículas, manteniendo sus características iniciales como el tamaño de partícula. Para evaluar la estabilidad de los sistemas nanoparticulados se emplea el equipo Turbiscan, este equipo es un analizador óptico que predice la desestabilización potencial de los sistemas

coloidales (sedimentación, cremado, floculación o coalescencia) mediante el análisis de dispersión de luz múltiple (Cosco et al., 2015). El principio de medición se basa en la detección de los cambios en la transmisión y la retrodispersión de luz en función de los movimientos de las partículas dentro del sistema. En la Figura 9 se muestran las imágenes correspondientes a los distintos mecanismos de inestabilidad que se pueden predecir mediante el Turbiscan y su correspondiente gráfico.



**Figura 9.** Mecanismos de inestabilidad de sistemas detectados por el Turbiscan (Mengual et al.,1999).

La eficiencia de encapsulación se define como la diferencia de concentración del compuesto activo libre en la suspensión (no encapsulado) y el contenido del agente en la matriz polimérica de la nanopartícula (encapsulado) (Gonçalves da Rosa et al., 2015).

#### **1.4.4. Métodos de preparación de nanopartículas**

Los métodos de fabricación de sistemas nanoestructurados se pueden dividir en dos: los métodos *Top-down* que implica el uso de energía mecánica para generar materiales en la escala micro o nanométrica, se emplean operaciones como el homogenizado y la molienda, donde se genera rompimiento y disminución del tamaño de los materiales (Sabliov et al., 2015). Algunos de estos métodos se describen a continuación.

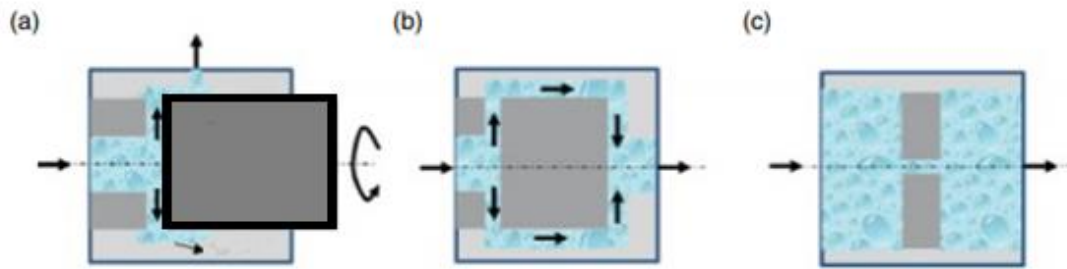
- Homogenización de alto cizallamiento

Se utiliza para procesar dispersiones por fuerzas de cizallamiento, típicamente a presión ambiente. Los equipos homogeneizadores aplican una configuración de rotor-estator o de disco (molino coloidal). Las superficies del rotor-estator se pueden fabricar para que sean lisas o dentadas, generando flujos laminares o turbulentos, mientras que los molinos coloidales sólo generan flujos turbulentos. El método de homogenización de alto cizallamiento se usa principalmente para dispersar partículas sólidas y emulsionar productos de alta viscosidad (Sabliov et al., 2015).

- Homogeneización a alta presión

La técnica de homogeneización a alta presión (por sus siglas en inglés HPH) es el método más popular para crear emulsiones y dispersiones en la industria alimentaria. Los sistemas HPH generan corrientes que colisionan en canales diseñados para originar cavitación y cizallamiento, disminuyendo el tamaño de partícula. Se alcanzan presiones internas superiores a 70 MPa (Huang, 2012).

Existen tres arreglos de canales que se muestran en la Figura 10. En la válvula homogeneizadora de la Figura 10 (a) el fluido entra y se desvía 90° y es homogenizado por la válvula móvil. En los dispersores de contracorriente, Figura 10 (b), el flujo se desvía en dos corrientes, originando un flujo turbulento al chocar posteriormente.



**Figura 10.** Geometrías del HPH (Huang,2012).

En los sistemas de flujo axial se fuerza una dispersión a través de un orificio de una boquilla como se muestra en la Figura 10 (c). Las configuraciones en los sistemas HPH se pueden diseñar y controlar para generar presiones de 5 a 400 MPa. Generalmente, una mayor presión durante la operación y un mayor número de recirculaciones permiten que se produzcan partículas de menor tamaño (Sabliov et al., 2015).

- Homogenización por ultrasonido

El ultrasonido como operación para la homogenización utiliza ondas de alta intensidad, siendo adoptado por la industria alimentaria para homogeneizar y reducir el tamaño de gota en emulsiones, también se usa para la despolimerización o reducción del tamaño de partículas sólidas (Sabliov et al., 2015).

En contraste los métodos *Bottom-up* implican la formación de los sistemas en el intervalo micro o nanométricos a partir de moléculas o partículas de menor tamaño dispersas o disueltas en un solvente, mediante métodos químicos o físicos, son llamados como métodos de baja energía (Sabliov et al., 2015). Existen varios métodos reportados en la literatura para la preparación de nanopartículas con activos lipofílicos a partir de polímeros *Bottom-up* siendo uno de los más empleados el método de nanoprecipitación (Mora-Huertas et al., 2010).

El método de nanoprecipitación, también llamado método de desplazamiento de disolvente, requiere de dos fases, fase acuosa (no disolvente) y fase orgánica (disolvente). La fase orgánica consiste en la mezcla del disolvente, parcialmente soluble en agua, del polímero empleado como barrera en la estructura y del compuesto activo (Mora-Huertas et al., 2010).

La fase no disolvente consiste generalmente de agua y un estabilizante (puede ser del tipo espesante o emulsionante) (Mora-Huertas et al., 2010).

En la Figura 11 se muestra el esquema general para la preparación de nanopartículas a partir de la nanoprecipitación, donde la fase orgánica se añade a una solución acuosa, generando la difusión del disolvente orgánico en el medio acuoso en presencia del estabilizante, esto genera una sobresaturación en el agua, disminuyendo la solvatación del polímero (Gonçalves da Rosa et al., 2015).

Las fluctuaciones de concentración causadas por la sobresaturación conducen a la formación de núcleos primarios de las nanopartículas. Posteriormente el disolvente se evapora a presión reducida desplazándose en su totalidad, formando las nanopartículas. La nucleación se detiene cuando la concentración del soluto se reduce por debajo de la concentración crítica de sobresaturación al formarse las nanopartículas, dando paso a la condensación. La condensación es la adición de moléculas individuales de soluto a la superficie de la partícula, producida cuando las interacciones atractivas (Van der Waals, interacciones hidrofóbicas) son más fuertes que las interacciones repulsivas (estéricas o electrostáticas) (Gonçalves da Rosa et al., 2015).



**Figura 11.** Método de nanoprecipitación (Gonçalves da Rosa et al., 2015).



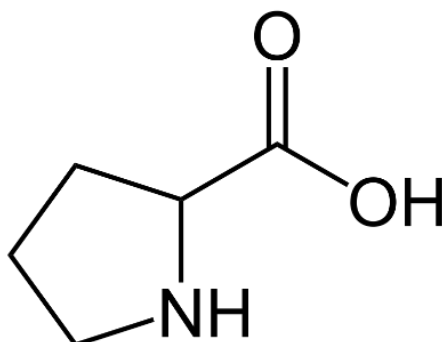
Las ventajas de la nanoprecipitación sobre otras técnicas de encapsulación son su simplicidad, facilidad de escalabilidad, buena reproducibilidad, obtención de tamaños de partículas en la escala submicrométrica con distribución de tamaños estrecha. Además, se pueden modificar diferentes parámetros durante el proceso de nanoprecipitación, como concentración de componentes, para obtener una formulación con las características deseables en términos de tamaño y estabilidad de almacenamiento. (Martínez Rivasa et al., 2017)

## 1.5. Aditivos en la preparación de nanopartículas

### 1.5.1. Zeína

La zeína es la principal proteína de almacenamiento del maíz, considerada como un aditivo reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). Consiste en tres fracciones que varían en su peso molecular (Mw) y solubilidad, éstas son:  $\alpha$ -zeína (Mw 19-24 kDa, 75-80% de la proteína total),  $\beta$ -zeína (17-18 kDa, 10-15% de la proteína total) y  $\gamma$ -zeína (27 kDa, 5-10% de la proteína total) (Dai et al., 2017).

Es una prolamina, que puede solubilizarse en soluciones acuosas de etanol a alta concentración (60-90%), esto es debido a la presencia de aminoácidos no polares en una concentración superior del 50%, siendo la prolina (Figura 12) la que se encuentra en mayor proporción, además de residuos de otros aminoácidos como leucina, fenilalanina y alanina (Dai et al., 2017).



**Figura 12.** Estructura de la prolina (Damodaran et al., 2008).

La zeína tiene la capacidad para actuar como una barrera contra el agua y al oxígeno, por lo que es empleada en el procesamiento de alimentos y productos farmacéuticos como recubrimiento para dulces, nueces, frutas, píldoras y medicamentos encapsulados (Dai et al., 2017).

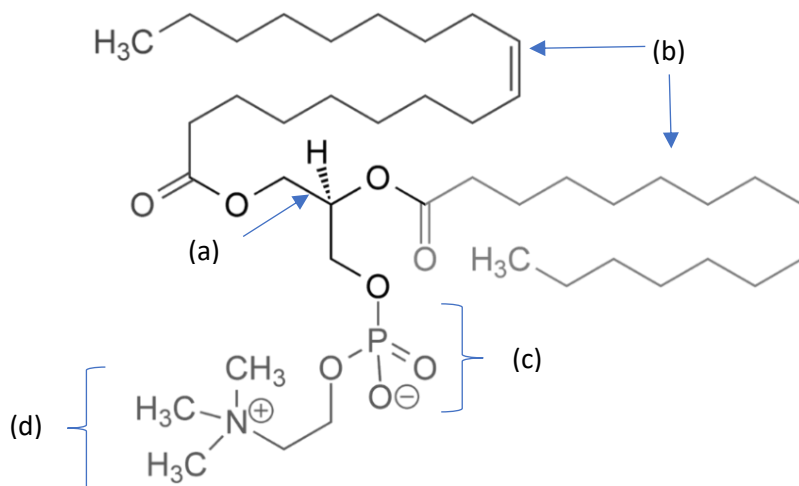
La hidrofobicidad de la zeína le da la capacidad de autoasociarse en presencia de disolventes polares como el agua, esta cualidad puede ser empleada para la preparación de nanopartículas y sistemas coloidales (Gonçalves da Rosa et al., 2015). Debido a la alta hidrofobicidad de la superficie de las nanopartículas de zeína, por su baja carga neta cerca del punto isoeléctrico (pI 6.2), éstas presentan baja estabilidad física, presentando fenómenos de coalescencia y floculación. Para estabilizarlas se han utilizado varios biopolímeros como el quitosano, el alginato de sodio y el caseinato de sodio como estabilizantes para evitar su desestabilización al reducir la superficie hidrofóbica, aumentando la repulsión electrostática o estérica (Dai et al., 2016).

Las interacciones entre proteínas y fosfolípidos pueden causar cambios en la actividad de la superficie, modificando la estructura de la proteína y su carga neta, además de formar micelas y vesículas alrededor de la proteína (Dai et al., 2016).

### **1.5.2. Lecitina**

La lecitina es una mezcla de fosfolípidos, es obtenida del desgomado de aceites vegetales crudos durante su refinado. Debido a que los fosfolípidos tienen diferentes propiedades, la lecitina generalmente se fracciona con disolventes orgánicos para obtener fracciones con funcionalidades específicas. Los cuatro componentes principales de la lecitina son: fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) y ácido fosfatídico (PA) (Xie y Dunford, 2019).

Los fosfolípidos presentes en la lecitina (Figura 13) tienen un esqueleto de glicerol (a), fosfoglicéridos esterificados con dos ácidos grasos (b) y un grupo fosfato (c). El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otras moléculas que generalmente contienen nitrógeno como la colina (d) (Dai et al., 2016).



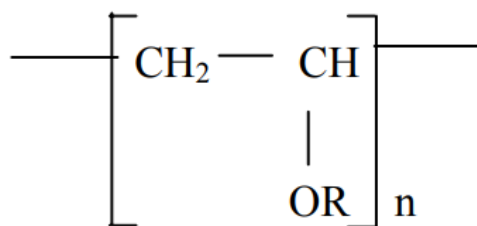
**Figura 13.** Estructura de la fosfatidilcolina (Xie y Dunford, 2019).

La lecitina se encuentra en la yema de huevo, soya, leche, algodón y aceite de girasol. El contenido de fosfolípidos para la lecitina de soya es de: 33–35% aceite de soya, 20–21% fosfatidilinositoles, 19–21% fosfatidilcolina, 8–20% fosfatidiletanolamina (Xie y Dunford, 2019).

Las interacciones con fosfolípidos pueden causar cambios en la actividad y estructura de las proteínas, así como en su carga neta. En solución acuosa los fosfolípidos pueden formar estructuras de agregación como liposomas, láminas bicapa, micelas o estructuras laminares, por lo que el complejo zeína-lecitina podría tener un gran potencial para formar nanopartículas e incorporar compuestos bioactivos, lo que ampliaría la aplicación de las proteínas insolubles en agua en la industria alimentaria (Dai et al., 2016).

### 1.5.3. Alcohol polivinílico

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético, es un polvo granular, inodoro, insípido y translúcido; tiene un punto de fusión de 180 °C. y un peso molecular de entre 26,300 y 30,000 Da. El PVA es soluble en agua por la presencia de grupos hidroxilo, como se muestra en la Figura 14, es ocupado por sus propiedades emulsionantes y adhesivas. Además, actúa como estabilizante en diversos sistemas dispersos por efecto estérico, originado por sus largas cadenas hidrocarbonadas (FAO, 2004).



Donde: R= H o COCH<sub>3</sub>

**Figura 14.** Unidad de repetición polimérica del alcohol polivinílico (FAO, 2004).

El PVA es capaz de alterar la permeabilidad al agregarse a moléculas hidrofóbicas como los aceites esenciales y partículas de zeína. Al emplearse con proteínas puede generar entrecruzamiento con ellas mediante la formación de enlaces covalentes y agregarse a la superficie de películas y partículas debido a las interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno (Liang y Chen, 2018).

La FAO ha regulado el uso del PVA como aditivo alimentario de acuerdo con la información presentada en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Niveles de PVA aceptados para su aplicación en alimentos (FAO, 2004).

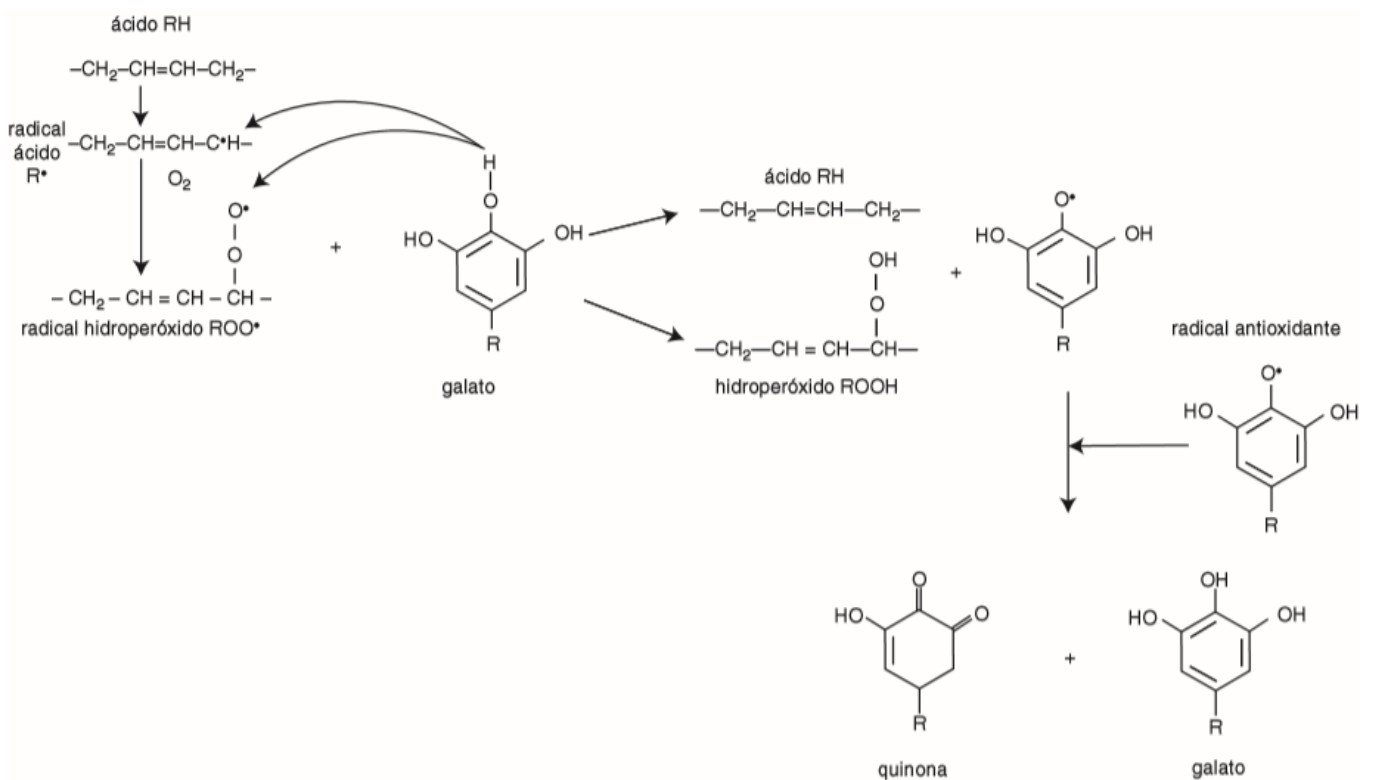
Categoría de alimentos	Alimento propuesto	Concentración máxima de PVA aceptado (%)
Confitería	Barras de chocolate	1.5
Cereales	Cereales de desayuno	0.5
Suplementos alimenticios	Tabletas, vitaminas	1.8
Botanas	Nueces y mezcla de frutas	1.5
Postres lácteos	Helados, yogurt	0.2

#### 1.5.4. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas de origen lipofílico y altamente volátiles, son obtenidos a partir de flores, semillas, hojas, corteza, hierbas, frutas y raíces por medio de hidrodestilación, destilación seca o mediante un proceso mecánico. Generalmente son reconocidos como seguros (GRAS) por la FDA (Mohammad et al., 2018).

Son usados como antioxidantes y como agentes antimicrobianos, tienen un amplio espectro de componentes activos que exhiben actividades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias y antivirales; estas propiedades están en función a su contenido en compuestos fenólicos y terpenoides (Mohammad et al., 2018).

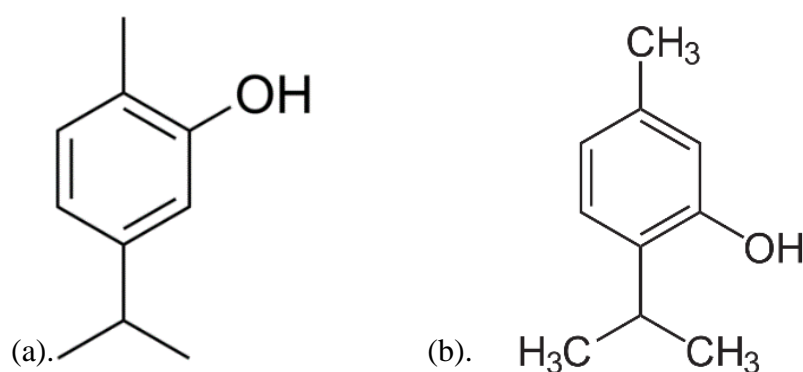
El potencial antioxidante de los polifenoles depende del número y de la posición de los grupos hidroxilos y de su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, son altamente estables por la capacidad que posee el grupo aromático de permitir el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones- $\pi$  (Peña y Restrepo, 2013). Sus productos no promueven la oxidación como lo hacen los radicales de especies de oxígeno o ácidos grasos. Actúan en la iniciación y propagación durante la reacción de oxidación, al ceder un hidrógeno a los radicales libre, restaurándolos; al ceder su electrón los fenoles se convierten en un radical que interactúa con otra molécula igual, reponiendo el antioxidante y formando una quinona, como se muestra en la Figura 15 (Damodaran et al., 2008).



**Figura 15.** Mecanismo antioxidante del galato (Damodaran et al., 2008).

Los aceites esenciales son empleados en la conservación de vegetales por promover la activación de la enzima FAL, que incrementa la actividad antioxidante debido a la síntesis de componentes fenólicos (Khumalo et al., 2017).

El aceite de tomillo (*Tymus vulgaris*) ha sido usado por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes, debida a su concentración de fenoles y terpenoides. Sus principales componentes son el timol (38.1%) 5-metil-2-(1-metiletil) fenol y el carvacrol (29.1%) 2-metil-5-(1-metiletil) fenol (Sarikurkcu et al., 2015), sus estructuras se muestran en la Figura 16.



**Figura 16.** Estructura (a) timol y (b) carvacrol (Sarikurkcu et al., 2015).

El aceite esencial de tomillo es un líquido amarillo claro o marrón rojizo muy oscuro con un olor y sabor penetrante a tomillo que se mezcla fácilmente con aceites vegetales. Se han buscado formulaciones que inhiban su efecto en las propiedades sensoriales, sin embargo, el mayor desafío en el uso de estos compuestos en la forma convencional radica en su inestabilidad química que limita su bioactividad a largo plazo. La encapsulación o el atrapamiento de los compuestos en matrices poliméricas es una alternativa para la prolongación y preservación de sus características intrínsecas (Gonçalves da Rosa et al., 2015).

Se ha reportado la actividad antimicrobiana del carvacrol y timol en bacterias Gram (+) y levaduras. Aunque los mecanismos de acción no han sido completamente elucidados, se ha sugerido que estos compuestos interactúan sobre la membrana celular, modificando la permeabilidad y la actividad enzimática, incluyendo la producción de energía y síntesis de metabolitos esenciales. También, interactúa con el material genético libre, presente en el citoplasma (Viacava et al., 2018).

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **2.1. Objetivos**

##### **2.1.1. Objetivo general**

Evaluar los efectos de la infiltración con ultrasonido de nanopartículas de zeína-lecitina cargadas con aceite esencial de tomillo en papa blanca fresca cortada, estudiando la modificación de sus propiedades en almacenamiento a 4 °C durante 20 días, para determinar la efectividad de las nanopartículas como sistema antioxidante y antimicrobiano.

##### **2.1.2. Objetivos particulares**

1. Caracterizar los sistemas de nanopartículas zeína-lecitina al variar su relación, el pH del medio de formación y concentración de alcohol polivinílico, para determinar las condiciones óptimas de preparación de las mismas y eficiencia de encapsulación del aceite esencial de tomillo para su posterior empleo en el envasado y almacenamiento de papa blanca fresca cortada.
2. Determinar el efecto de las variables de proceso del ultrasonido, potencia de salida y pulsaciones empleadas para la infiltración de nanopartículas de zeína-lecitina, cargadas con diferentes concentraciones de aceite esencial de tomillo en papa blanca fresca cortada, relacionándolas con el daño estructural generado en el producto.
3. Analizar la variación en las propiedades físicas, fisicoquímicas, actividad enzimática y crecimiento microbiológico de la papa blanca fresca cortada durante su envasado y almacenamiento a 4°C por 20 días, tratadas con ultrasonido para la infiltración de nanopartículas de zeína-lecitina cargadas con aceite esencial de tomillo.

## **2.2. Selección de material biológico**

Se emplearon papas blancas, variación Alpha (*Solanum tuberosum*), adquiridas en la central de abastos de la alcaldía Iztapalapa de Ciudad de México. Fueron seleccionadas mediante inspección visual, buscando homogeneidad de tamaño, textura y color, eliminando aquellas que presentaran daño mecánico y fisiológico, requisitos especificados en NMX-FF-022-2002, norma de productos alimenticios (tubérculos de papa) no industrializados para uso humano.

El producto fue almacenado a 7 °C para inhibir la formación de pigmentos oscuros debido a la degradación del almidón en azúcares reductores y a una humedad relativa de 80- 90%, en obscuridad para inhibir el deterioro físico y degradación, de acuerdo con Wang et al. (2015), almacenándose por un tiempo no mayor a 3 días previo a su procesamiento y envasado.

## **2.3. Selección de materiales para las nanopartículas**

Para la preparación de las nanopartículas se emplearon como polímeros barrera zeína de la marca Sigma-Aldrich, Inc. (San Luis, EE.UU.) y lecitina de soya grado alimenticio de la Droguería Cosmopolita (Ciudad de México, México). Como estabilizante por su efecto estérico se ocupó alcohol polivinílico (PVA) grado alimenticio y como agente activo aceite esencial de tomillo, ambos obtenidos en la Droguería Cosmopolita. Todo el tomillo empleado durante la experimentación corresponde al mismo lote.

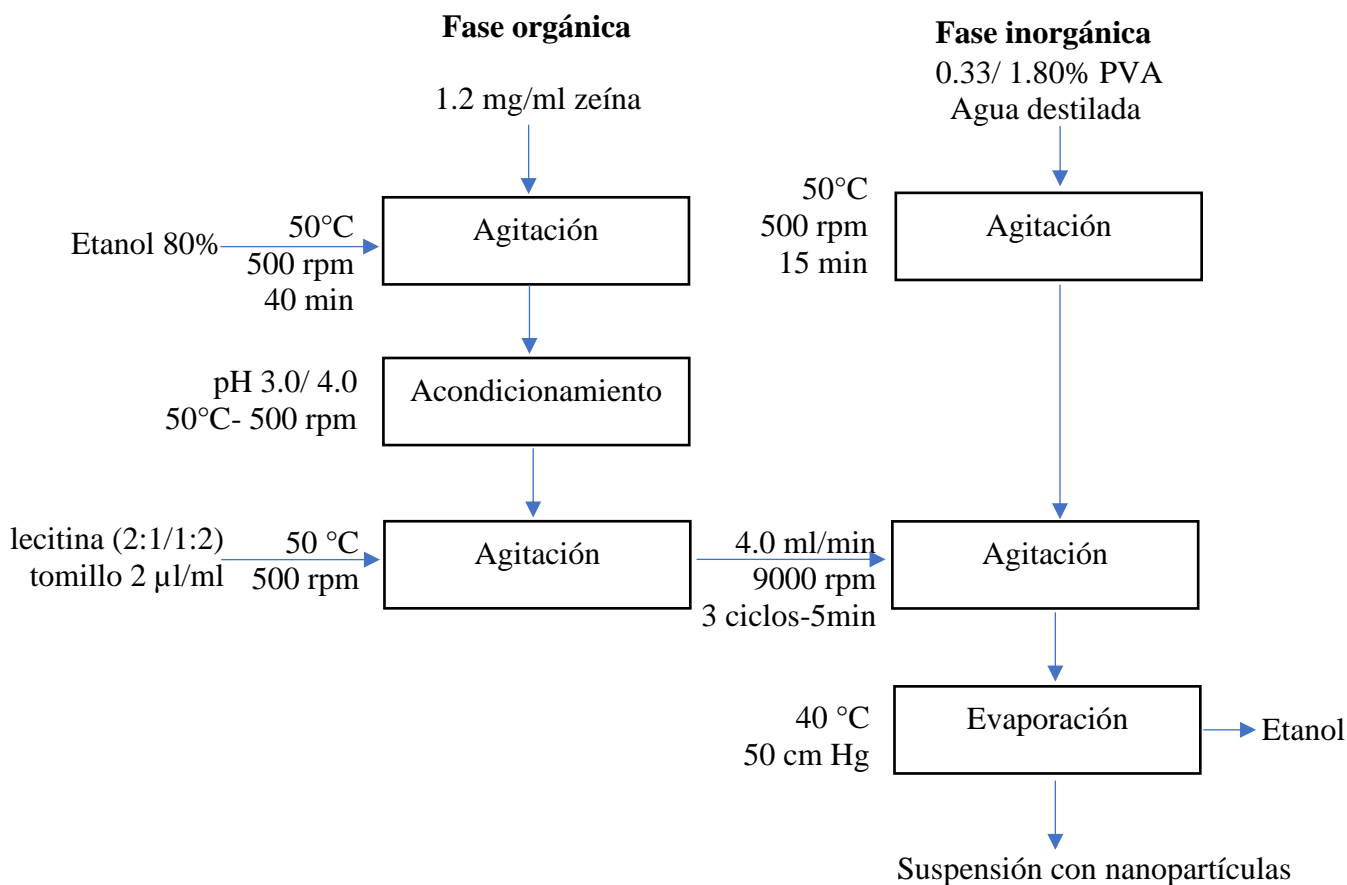
## **2.4. Desarrollo experimental**

### **2.4.1. Formulación y selección de nanopartículas**

#### **2.4.1.1. Preparación de nanopartículas**

Las nanopartículas fueron elaboradas mediante el método de nanoprecipitación con modificaciones de acuerdo con Gonçalves da Rosa et al. (2015) y Dai et al. (2016), el proceso de elaboración se muestra en la Figura 17





**Figura 16.** Diagrama de proceso de la preparación de nanopartículas zeína-lecitina por el método de nanoprecipitación.

Para la preparación de la fase orgánica se disolvió zeína a una concentración de 1.2 mg/ml en una solución de etanol al 90% y ácido ascórbico (3.33 mM) en una parrilla ThermoFisher (Waltham, EE.UU.) modelo SP-131325 a 500 rpm a una temperatura de 50 °C por 40 min. Posteriormente se incorporó lecitina de soya, en relaciones zeína-lecitina (2:1 y 1:2) y se dejó en agitación, el pH del medio fue regulado a 3.0 y 4.0, condiciones seleccionadas por estudios previos de formación del composito de acuerdo con Dai et al. (2016). Al final se incorporó el aceite esencial de tomillo en una concentración de 2.0 µl/ml.

En la fase inorgánica se empleó agua destilada para disolver el alcohol polivinílico (PVA), las concentraciones de estabilizante probadas fueron de 0.33 y 1.80 % de PVA, mínima y máxima proporción recomendadas para su empleo como estabilizante en productos alimenticios para su consumo humano de acuerdo a FAO (2004).

Para la preparación de las nanopartículas la fase inorgánica se agitó en un sistema rotor-estator Ultra-Turrax de IKA, modelo T18 SN (Staufen, Alemania), a una velocidad de 9,000 rpm durante 3 ciclos de trabajo-reposo de 5 min, agregándose de manera continua la fase orgánica por medio de una bomba de desplazamiento positivo marca New Era Pump Systems (EE.UU.) modelo NE-4000, a un flujo de 4.0 ml/min. Al finalizar, el exceso de disolvente fue eliminado mediante evaporación a 40 °C a presión reducida de 50 cm de Hg en un rotavapor modelo RV10 de la marca IKA.

#### **2.4.1.2. Caracterización de las nanopartículas**

- **Evaluación del tamaño de partícula e índice de polidispersidad**

La distribución del tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersidad (IPD) de los sistemas nanoparticulados se determinaron mediante la técnica de dispersión dinámica de luz láser con un ángulo fijo de 90° usando un equipo Zetasizer Nano ZS90 de Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido). Todas las mediciones se realizaron por triplicado, obteniendo la distribución de tamaños de partícula con su correspondiente índice de polidispersidad.

- **Potencial zeta**

El potencial zeta ( $\zeta$ ) de las dispersiones se determinó con el equipo Zetasizer Nano. Se emplearon soluciones diluidas (1:2) de las dispersiones en agua MilliQ. Se cuantificó el valor de  $\zeta$  en relación con su movilidad electroforética, tomando como referencia dispersiones de poliestireno ( $\zeta = -55$  mV).

- **Eficiencia de encapsulación**

Se realizó una prueba de barrido espectral con el aceite esencial de tomillo utilizado en la preparación de las nanopartículas para determinar la longitud de onda en la que se maximiza su cuantificación mediante un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S (Madison, EE.UU.).

Se determinó que a 269 nm se tuvo una mayor absorbancia para el aceite esencial de tomillo, por lo que a esta longitud de luz se realizó la curva patrón (absorbancia/concentración en  $\mu\text{l/ml}$ ) para determinar la concentración presente en las nanopartículas. La Ecuación 1 representa la relación obtenida con un valor de  $R^2= 0.991$ .

$$y=3.4982x + 0.0014 \quad (1)$$

Para determinar la eficiencia los sistemas fueron centrifugados a 3,000 xg durante 30 min con la finalidad de separar las nanopartículas del medio acuoso. El sedimento resultante fue disuelto en ciclohexano (2 ml) para permitir la liberación del aceite esencial de tomillo incorporado a la matriz polimérica (zeína-lecitina), obteniéndose la concentración de aceite de tomillo presente con el espectrofotómetro Genesys 10S.

La eficiencia de encapsulación fue obtenida de acuerdo a la Ecuación 2, donde se relaciona la concentración de aceite esencial de tomillo encapsulada con la concentración inicial del sistema de nanopartículas (Gonçalves da Rosa et al., 2015).

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \left( \frac{\mu\text{l/ml aceite encapsulado}}{\mu\text{l/ml aceite tomillo total}} \right) \times 100 \quad (2)$$

- **Estabilidad física**

La estabilidad física de las nanopartículas se determinó con un equipo Turbiscan Classic MA 2000 (Toulouse, Francia). El equipo emplea pulsaciones de luz infrarroja (880 nm), para realizar las mediciones cada 8 min en un lapso de 24 h.

La muestra fue colocada en celdas cilíndricas de vidrio de 5 ml, el equipo tomó lectura cada 5 mm hasta una altura final de 50 mm con los que se obtuvieron perfiles de retrodispersión de luz (BS, por sus siglas en inglés) de las dispersiones. Los comportamientos obtenidos en los perfiles de luz retrodispersada fueron relacionados con los fenómenos de desestabilización de los sistemas dispersos como se muestra en la Figura 9. También se graficó la diferencia de retrodispersión de luz promedio (ABS %), tomando en cuenta las alturas 10 a 45 mm de la muestra y su variación respecto al tiempo de análisis.

#### 2.4.2. Selección de condiciones de tratamiento con ultrasonido

Previo al tratamiento de infiltración de las nanopartículas de aceite esencial de tomillo en papa fresca cortada para su almacenamiento, fue necesario establecer las condiciones del procesamiento con ultrasonido. Se empleó un equipo UP200Ht de Hielscher Ultrasonics (Teltow, Alemania), con una potencia de salida de 200 W, 26 kHz de frecuencia máxima y amplitud máxima de 9  $\mu\text{m}$ . Se ocupó el sonotrodo de vidrio S26d25G. Las variables de proceso a determinar para una adecuada infiltración de las nanopartículas e inhibir el daño a la estructura de la papa fueron: potencia de salida, pulsaciones y la concentración de aceite esencial de tomillo presente en la solución del tratamiento.

Se estableció el tiempo del procesamiento en el ultrasonido en 1.0 min de acuerdo con lo reportado por Kiani et al. (2015), a este tiempo se genera un menor daño estructural y celular en la papa blanca durante la infiltración de compuestos activos al emplearse como pretratamiento al almacenamiento frigorífico. Se consideraron como variables las pulsaciones del ultrasonido (70 y 100%), potencia de salida (10 y 20 W), condiciones que se ha reportado permiten una mayor infiltración de compuestos activos en papa de acuerdo a Sun y Li (2003); también se consideró la variación en la concentración de aceite esencial de tomillo en la dispersión de nanopartículas (1.0, 1.5 y 2.0  $\mu\text{l/ml}$ ), concentraciones obtenidas a partir de la dilución del sistema nanoparticulado (2.0  $\mu\text{l/ml}$ ) con agua destilada. Las variables de respuesta consideradas fueron con base a los parámetros de variación de color ángulo de tono, saturación de color, Luminosidad, índice de oscurecimiento e inhibición de la actividad polifenol oxidasa (PFO), determinados de acuerdo con la metodología que a continuación se describe.

- Color

El color se determinó con un espectro colorímetro CM-600d de la marca Konica Minolta (Osaka, Japón), el equipo se configuro con el iluminante D65 a un ángulo del observador de 10°, fue calibrado con una placa blanca estándar y posteriormente obtener los parámetros de la escala CIE  $L^*a^*b^*$ . La coordenada  $L^*$  representa la luminosidad,  $a^*$  variaciones en la escala rojo-verde y  $b^*$  variación en la escala amarillo-azul.

La variación en luminosidad ( $\Delta L$ ) se obtuvo relacionando los valores de luminosidad al tiempo inicial ( $L_0$ ) y final ( $L$ ) del almacenamiento mediante la Ecuación 3.

$$\Delta L = L - L_0 \quad (3)$$

El espacio de color CIE  $L^*Cr^*H^*$  emplea coordenadas cilíndricas en vez de usar coordenadas rectangulares, adaptándose mejor con la forma en que el ser humano percibe el color. En este espacio  $H$  representa el tono (ángulo Hue), obtenido con la Ecuación 4, mientras que  $Cr$  representa la saturación de color, Ecuación 5 (Amaral et al., 2015).

$$Hue = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right) \quad (4)$$

En caso de que el valor de  $a$  sea  $\leq 0$  se debe sumar  $180^\circ$

$$C = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (5)$$

El índice de oscurecimiento (IO) fue calculado mediante la Ecuación 6 que indica el oscurecimiento producido en los alimentos por vía enzimática y no enzimática, representando la formación de pigmentos (color café) (Cefola et al, 2012).

$$IO = \frac{100(x-0.31)}{0.17} \quad (6)$$

El valor de  $x$  se obtiene de la Ecuación 7, empleando los valores del final del almacenamiento.

$$x = \frac{a+1.75 L}{5.645 L + a - 3.012 b} \quad (7)$$

- Actividad de la enzima polifenol oxidasa

La inhibición en la PFO se determinó midiendo el cambio de absorbancia del extracto enzimático obtenido de la papa tratada respecto al extracto de la papa blanca testigo (recién cortada y sin tratamiento), en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S.

El extracto enzimático fue preparado homogenizando 5 g de papa con 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.0), cloruro de sodio 0.1 M y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1 mM; todos los reactivos empleados fueron grado analítico de la marca J.T. Baker (Waltham, EE.UU.). El extracto obtenido se agitó a una temperatura promedio de 4 °C por 20 min con 0.5 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) de la marca Sigma Aldrich, peso molecular promedio 40,000 Da. Posteriormente se centrifugó a 6,000 xg por 15 min a 4 °C.

La actividad de la enzima PFO fue determinada de acuerdo con el método propuesto por Sukhonthara et al. (2016). El medio de reacción consistió en 2.8 ml de solución amortiguadora de fosfatos-citratos, concentración 50 mM de catecol (pH 6.5). Se midió el incremento en la absorbancia a 420 nm durante 3 min, siguiendo la oxidación del catecol en o-benzoquinona. Los resultados fueron reportados como el porcentaje en inhibición de la actividad PFO al comparar la absorbancia de los tratamientos con la absorbancia del testigo mediante la Ecuación 8.

$$\text{Inhibición PFO (\%)} = \left( \frac{\text{Absorbancia Testigo} - \text{Absorbancia Muestra}}{\text{Absorbancia Testigo}} \right) \times (100) \quad (8)$$

### **2.4.3. Aplicación de nanopartículas en la papa blanca fresca cortada**

#### **2.4.3.1. Acondicionamiento del producto**

La papa blanca fue lavada y desinfectada con suspensión de plata coloidal (10 ml/L) durante 10 min, se peló y cortó en cubos homogéneos (1.2 x 1.2 x 1.2 cm) utilizando un cortador Nicer Dicer (EE.UU.), con placa cuadrada de acero inoxidable.

#### **2.4.3.2. Formación de soluciones a evaluar y envasado**

Se emplearon diferentes medios de inmersión para determinar la efectividad de tratamiento con nanopartículas en la papa blanca fresca cortada, evaluando los efectos antioxidantes y antimicrobianos de cada uno de los componentes de manera individual y en conjunto de los componentes del sistema nanoparticulado.

También se varió el uso del ultrasonido (US) durante la inmersión, para evaluar los efectos que tiene sobre el procesamiento de las papas. Como constantes de proceso se estableció 1 min de inmersión. En las muestras donde se usó el ultrasonido se mantuvo constante una potencia de salida de 10 W y pulsaciones del 70%, condiciones seleccionadas en las actividades del punto 2.4.2. Los medios de inmersión ocupados para el estudio fueron:

- Agua destilada para la muestra control (C) y como medio de inmersión para el estudio del ultrasonido (US) como proceso de tratamiento individual.
- Emulsión de aceite de tomillo (T) a la concentración seleccionada en el punto 2.4.2 (1.0  $\mu\text{l/ml}$ ); elaborada por medio de un sistema rotor-estator a 6,000 rpm en 3 ciclos con reposos de 5 min y una concentración de 0.2% de monooleato de polioxietilen (20) sorbitano (Tween 80) obtenido en la droguería Cosmopolita, grado alimenticio. Se buscó que el sistema tuviera un tamaño de partícula similar a las nanopartículas para eliminar el efecto del tamaño de partícula, obteniendo un diámetro de  $300 \pm 50$  nm con un IPD  $< 0.305$ .
- Sistema nanoparticulado zeína-lecitina y alcohol polivinílico, sin agente activo encapsulado (NP), formado con las condiciones seleccionadas del punto 2.4.1.
- Sistema nanoparticulado zeína-lecitina y aceite esencial de tomillo (1.0  $\mu\text{l/ml}$ ) y alcohol polivinílico (NC), formado a las condiciones seleccionadas del punto 2.4.1.

Posterior al tratamiento por inmersión las papas blancas frescas cortadas fueron envasadas para su almacenamiento. Se emplearon bolsas plásticas de polietileno de mediana permeabilidad, selladas en una campana de envasado Multivac (Alemania) modelo C200. Se eliminó el aire del empaque por reducción de presión a 40 mBar y se inyectó una atmósfera modificada a 400 mBar; la mezcla de aire empleada fue a una concentración de 5% de  $\text{O}_2$  y 10% de  $\text{CO}_2$ .

Los envases fueron almacenados a  $4^\circ\text{C}$  para el estudio de la variación en las propiedades físicas, fisicoquímicas y la actividad enzimática y microbiológica, durante 20 días. Las muestras para los estudios posteriores fueron tomadas durante el primer día de almacenamiento y cada 5 días (día 5, 10, 15 y 20 de almacenamiento).

### 2.4.3.3. Actividades experimentales para la evaluación y muestreo de las papas

Una vez tratadas y envasadas las papas, se determinaron las variaciones en color y actividad PFO de acuerdo con la metodología descrita en el punto 2.4.2. Además, se realizaron otros estudios para evaluar la influencia de los tratamientos en la vida útil del producto que se describen a continuación.

- Pérdida de masa

Para determinar el efecto del tratamiento con nanopartículas y ultrasonido sobre la humedad del producto se midió la pérdida de masa (g) con respecto a la masa inicial expresada en porcentaje de acuerdo con la Ecuación 9.

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \left( \frac{\text{masa inicial} - \text{masa final}}{\text{masa inicial}} \right) \times 100 \quad (9)$$

- Variación en conductividad eléctrica

El deterioro de la membrana celular de frutas y hortalizas ha sido observado como consecuencia de su procesamiento y almacenamiento, modificando su permeabilidad y relacionándose con la velocidad de pérdida de electrolitos y por lo tanto con la variación de la conductividad eléctrica (Spychalla y Desborough, 1990).

Para evaluar el deterioro en la membrana celular se emplearon 3 g de muestra de papa cortadas en láminas de 3 mm de espesor, éstas fueron sumergidas por 2 h a 25 °C en 50 ml de agua doblemente destilada, de acuerdo con adecuaciones de Zhang et al. (2017). La pérdida de electrolitos fue evaluada midiendo el aumento en la conductividad del medio (mS/cm) con un conductímetro modelo HI2020 de la marca Hanna instruments (Woonsocket, EE. UU.), posteriormente se hirvió por 20 min a 120 °C y se dejó enfriar a condiciones ambientales y medir nuevamente la conductividad eléctrica. Los resultados se reportan en variación de la conductividad eléctrica (%) descrito en la Ecuación 10.

$$\text{Variación de conductividad (\%)} = \left( \frac{\text{Conductividad inicial}}{\text{Conductividad final}} \right) \times 100 \quad (10)$$



- Actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa

La actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa (FAL) fue evaluada de acuerdo con el método descrito por Kovácik y Klejdus (2012). El extracto enzimático se obtuvo homogenizando 4 g de papa con 16 ml de solución amortiguadora de boratos 0.1 M (pH 8.8) marca J.T. Baker, 2-mercaptoetanol 15 mM marca Sigma Aldrich y 0.4 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) de la marca Sigma Aldrich. El extracto enzimático fue agitado por 15 min a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 6,000 xg y a 4 °C por 30 min, el sobrenadante constituyó el extracto enzimático.

La muestra fue preparada al mezclar 1 ml de solución amortiguadora de boratos, 1-fenilalanina 0.1 M y se adicionó el extracto enzimático. Se determinó el incremento en la absorbancia que la muestra tuvo en un lapso de 2 h a 40 °C en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S. Este incremento es debido a la producción de ácido trans-cinámico debida a la desaminación de la l-fenilalanina. La concentración final de ácido trans-cinámico en la muestra fue determinada mediante una curva patrón representada en la Ecuación 11,  $R^2 = 0.997$ .

$$y = 0.0409x + 0.0027 \quad (11)$$

- Polifenoles totales

Los polifenoles totales se determinaron de acuerdo con el método propuesto por Teoh et al. (2016). La extracción de los compuestos fenólicos se obtuvo mediante la homogenización de 5 g de papa en 10 ml de metanol, la muestra se dejó en reposo en obscuridad por 1 h, la mezcla fue centrifugada a 2,000 xg y 4 °C por 15 min, el sobrenadante obtenido constituyó el extracto polifenólico.

El contenido de polifenoles totales se midió por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Se mezclaron 100 µl de extracto con 3.0 ml de agua destilada y 250 µl de reactivo comercial Folin-Ciocalteu de la marca Biopack diluido, en una relación 1:10; después de 8 min de reposo en obscuridad se adicionaron 750 µl de carbonato de sodio saturado (200 g/l) marca J.T. Baker.

La mezcla se agitó ligeramente manteniéndose a temperatura ambiente y a obscuridad durante 30 min; se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S (Madison, EE.UU.). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por gramo de peso fresco, obtenidos a partir de una curva patrón de ácido gálico, representado en la Ecuación 12,  $R^2= 0.993$ .

$$y = 1.551884 \times 10^{-3} (x) \quad (12)$$

- Concentración de Glucosa/ Almidón

Para la cuantificación de la concentración de glucosa y del almidón en la papa se empleó el kit de determinación *Glucose* (GO) y *Starch* (GO) de Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU.), que por medio de la degradación del almidón y oxidación de la glucosa vía enzimática se promueve la oxidación del indicador o-dianisidina, promoviendo cambios en la absorbancia y color de la muestra para su cuantificación.

Para la prueba de almidón se molieron 100 mg de papa en 5.0 ml de etanol (80%), incubando la mezcla a 80 °C por 5 min y se centrifugó a 2,000 xg a 4 °C por 10 min, el precipitado fue resuspendido en 10 ml de etanol y se volvió a centrifugar, el precipitado obtenido fue mezclado con 0.2 ml de etanol (80%), 0.02 ml del reactivo con enzima  $\alpha$ -amilasa y se llevó a un volumen final de 10 ml con agua destilada. Posteriormente se continuó con la digestión, incubando la mezcla a 60 °C durante 15 min y se diluyó en una relación 1:10 con agua destilada para proceder a la determinación de glucosa.

Para la determinación de glucosa se empleó 1 ml del extracto obtenido de la digestión del almidón y 2 ml del reactivo con la enzima glucosa oxidasa, la muestra fue incubada por 30 min a 37 °C. En el espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S se midió la absorbancia de la muestra a 540 nm, resultante de la producción de  $H_2O_2$  por la oxidación de la glucosa y la enzima peroxidasa que oxidan al indicador o-dianisina (color café) y posteriormente al añadir 2.0 ml de ácido sulfúrico 12 N virar a tonos rosados.

Los resultados se reportan como almidón en porcentaje, al relacionarse con la absorbancia de un estándar 5% de glucosa, a partir de la Ecuación 13 propuesta por el proveedor del kit.

$$\text{Almidón (\%)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra} \times F \times V \times SF \times SDF \times VGA \times MWF \times 100}{\text{masa muestra}} \quad (13)$$

Donde:

*F*: glucosa del estándar / Absorbancia del estándar a 540 nm (0.05 mg/Abs<sub>540</sub>),

*V*: Volumen inicial de la muestra (10 ml)

*SF*: Volumen total empleado/ volumen de prueba (20 ml /10 ml)

*SDF*: Factor de dilución (1:10)

*VGA*: Volumen inicial del ensayo de glucosa (1.0 ml)

*MWF*: Relación del peso molecular del monómero del almidón y la glucosa (162/180)

Para la determinación de glucosa se preparó el extracto con 0.5 g de papa homogenizada en 9.5 ml de agua desionizada e incubó a 75 °C por 15 min. El sobrenadante fue ocupado para la determinación, reportándose los resultados como mg de glucosa presentes de acuerdo a la Ecuación 14.

$$\text{Glucosa (mg)} = \frac{\text{Absorbancia prueba} \times \text{mg glucosa estándar}}{\text{Absorbancia del estándar}} \quad (14)$$

- Concentración aceite de tomillo a lo largo del tiempo

En las muestras que contenían aceite esencial de tomillo se evaluó la cantidad de aceite infiltrado y la modificación de su concentración durante el almacenamiento, empleando la curva patrón ocupada para la eficiencia de encapsulación descrita en el punto 2.4.1.2.

- Determinación O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el espacio libre de cabeza

La concentración de gases en el espacio libre de cabeza de los envases fue determinada con un medidor de gases marca Quantek Instruments (Grafton, EE.UU.) modelo 902D, colocando un septo (barrera de etilvinilacetato) sobre la bolsa plástica y perforando para la medición de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

- **Análisis Microbiológico**

Se emplearon placas como medios de cultivos MC-Media Pads de la marca Merck (Darmstadt, Alemania) para la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) de coliformes totales, aerobios y hongos-levaduras.

Para la preparación de la muestra se homogenizó papa en agua destilada en una relación 1:10 para el primer día de almacenamiento. Se incrementó el factor de dilución a  $10^{-2}$  para hongos-levaduras y  $10^{-3}$  para los cultivos de bacterias aerobias y coliformes totales para mantener como contable el número de UFC para las muestras de los días 10 y 20 de almacenamiento. Las placas inoculadas para coliformes totales y bacterias aerobias fueron incubadas a  $35 \pm 1$  °C por 24 h, mientras que el medio de cultivo para hongos-levaduras se incubó a  $25 \pm 1$  °C durante 72 h. Los resultados son expresados en UFC/ml de acuerdo con lo expresado en NOM-092-SSA1-1994 para bacterias aerobias en placa, NOM-111-SSA1-1994 para conteo de levaduras en alimentos y NOM-113-SSA1-1994 para conteo de microorganismos coliformes totales en placa

## **2.5. Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos fueron tratados utilizando el software estadístico Minitab 18. Se emplearon diseños factoriales completos con un nivel de confianza del 95%. Se obtuvieron diagramas de Pareto de efectos estandarizados, gráficas de efectos estandarizados y principales para identificar la significancia estadística de las variables de proceso sobre las variables respuesta, así como su importancia. También se emplearon gráficas de contorno y superficie para ejemplificar los comportamientos de las interacciones entre variables.

Para el objetivo 1 (condiciones de preparación de las nanopartículas) se empleó un diseño factorial con punto intermedio (relación zeína-lecitina 1:1.25, concentración de alcohol polivinílico 1.065%, pH 3.5), obteniéndose nueve corridas experimentales. Para los objetivos 2 y 3 se obtuvieron 8 corridas experimentales siguiendo las variables de los puntos 2.4.2 y 2.4.3, analizando los resultados en función al tiempo de almacenamiento y tipo de tratamiento.

Se emplearon gráficas de optimización para determinar las condiciones ideales de preparación de nanopartículas y condiciones de procesamiento con el ultrasonido que permitir inhibir el daño a la estructura de la papa blanca fresca cortada durante su tratamiento.

## CAPÍTULO III

### ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1. Caracterización de nanopartículas

En la Tabla 2 se muestran los resultados promedio de la caracterización de las nanopartículas resultante de la variación de las condiciones de preparación, estos resultados serán analizados en los puntos siguientes.

**Tabla 2.** Resultados de la caracterización de nanopartículas promedio.

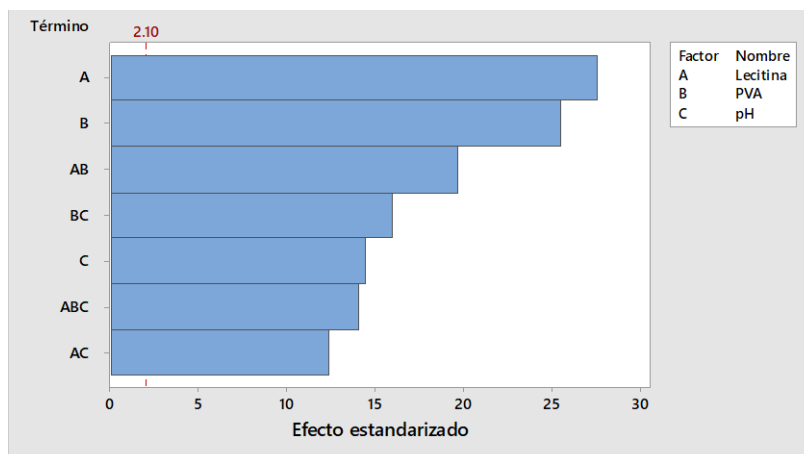
Condiciones de preparación (lecitina/zeína, PVA, pH)	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersidad (IPD)	Potencial zeta (mV)	Eficiencia de encapsulación (%)
1. 0.5, 0.33%, 3.0	495 ± 7 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.06 ± 0.14 <sup>a</sup>	77.02 ± 0.84 <sup>a</sup>
2. 0.5, 0.33 %, 4.0	598 ± 29 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.53 ± 0.09 <sup>b</sup>	77.42 ± 1.19 <sup>a</sup>
3. 0.5, 1.80 %, 3.0	2600 ± 147 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.11 <sup>c</sup>	-0.63 ± 0.02 <sup>c</sup>	76.85 ± 0.74 <sup>a</sup>
4. 0.5, 1.80 %, 4.0	1020 ± 131 <sup>d</sup>	0.64 ± 0.11 <sup>d</sup>	-1.05 ± 0.03 <sup>d</sup>	77.52 ± 0.04 <sup>a</sup>
5. 1.25, 1.065 %, 3.5	406 ± 7 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.09 <sup>b</sup>	-2.73 ± 0.21 <sup>c</sup>	74.82 ± 0.56 <sup>b</sup>
6. 2.0, 0.33 %, 3.0	339 ± 6 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.03 <sup>c</sup>	-2.96 ± 0.06 <sup>e</sup>	75.38 ± 0.18 <sup>b</sup>
7. 2.0, 0.33 %, 4.0	333 ± 5 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.09 <sup>b</sup>	-6.80 ± 0.15 <sup>f</sup>	71.26 ± 0.14 <sup>c</sup>
8. 2.0, 1.80 %, 3.0	551 ± 18 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>c</sup>	4.4 ± 0.04 <sup>g</sup>	71.23 ± 0.61 <sup>c</sup>
9. 2.0, 1.80 %, 4.0	442 ± 37 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.12 <sup>b</sup>	-9.56 ± 0.17 <sup>h</sup>	72.72 ± 0.74 <sup>c</sup>

Letras diferentes en una misma columna implican diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ) entre tratamientos, siendo el resultado de tres repeticiones,  $\pm$  desviación estándar.

##### 3.1.1. Tamaño de partícula

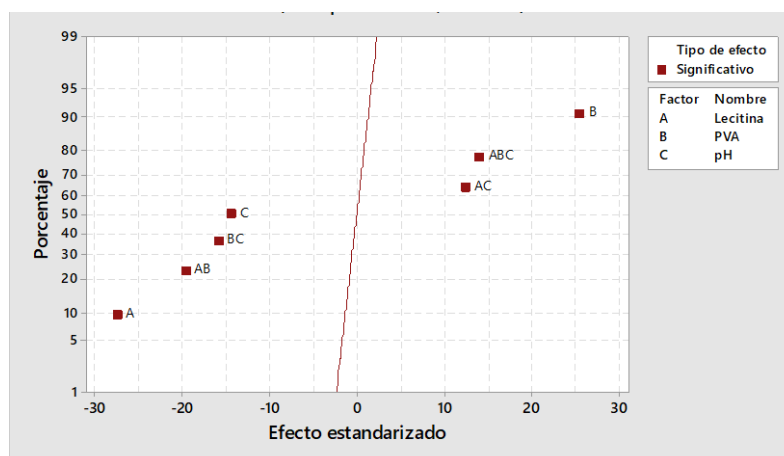
El tamaño promedio de partícula para la mayoría de los sistemas fue  $< 1000$  nm, entrando dentro de la clasificación de talla submicrónica de acuerdo con Mora-Huertas et al. (2010), a excepción de los sistemas 3 ( $2600 \pm 147$  nm) y 4 ( $1020 \pm 131$ ), los valores obtenidos mostraron diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ).

En la Figura 18 se muestra el diagrama de Pareto, donde se encontró todas las variables tuvieron influencia significativa, sin embargo, se tuvo una mayor dependencia de la concentración de lecitina, alcohol polivinílico (PVA) y la interacción entre ambos componentes (AB).



**Figura 18.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el tamaño de partícula.

La concentración de lecitina tuvo un efecto inverso sobre el tamaño de partícula, ya que al incrementar la proporción de lecitina respecto a la zeína (2:1) se presentó una disminución en el tamaño de partícula como se muestra en la Figura 19, valores de entre 333 y 339 nm al emplearse una concentración de 0.33% de PVA. Este comportamiento es atribuido a que una mayor presencia de la lecitina inhibe el comportamiento hidrofóbico de la zeína, disminuyendo la desestabilización de las partículas por dichas interacciones que promueven la aparición de floculación y coalescencia de las nanopartículas que incrementan el diámetro de las partículas como se reporta en Hu y Mc Clements (2014).

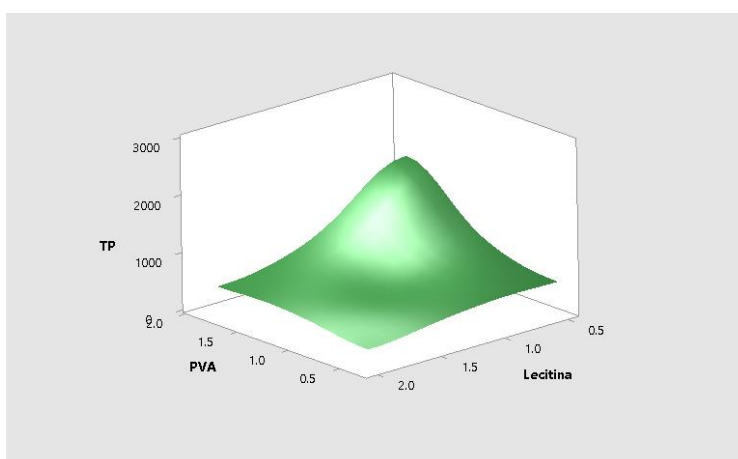


**Figura 19.** Efectos estandarizados para el tamaño de partícula.

De acuerdo con Cuiping et al. (2012) la interacción entre los fosfolípidos (lecitina) con las proteínas se promueve la aparición de vesículas, quedando la proteína al centro de la estructura. Por lo que al incorporar lecitina se actúa sobre las fuerzas hidrófobas de las

prolaminas de la zeína, al promoverse la formación de puentes de hidrógeno y otras interacciones electrostáticas que permiten la asociación de la lecitina-zeína, actuando como fuerzas estabilizadoras por cargas y por efectos estéricos.

Una mayor concentración de PVA influye de manera directa en el tamaño de partícula por sus cadenas hidrocarbonadas que se agregan a la superficie, generando estabilización por efecto estérico como lo mencionan Piorkowski y Mc Clements (2014). Los sistemas 3 y 4 mostraron talla micrométrica debido principalmente a la interacción lecitina y PVA, siendo ésta la principal interacción en importancia durante la preparación de las nanopartículas, donde a mayor concentración de PVA (1.8%) y menor relación de lecitina-zeína (1:2) se propicia un incremento en la talla de partícula, como se muestra en la Figura 20.



**Figura 20.** Gráfica de superficie para el tamaño de partícula en función a la concentración de lecitina/PVA.

Por otro lado una menor concentración de lecitina permite que la zeína interactúe en mayor grado con el PVA dando lugar a partículas de menor tamaño, coincidiendo con Huaiqiong y Qixin (2015), quienes mencionan que las proteínas en medio ácido, por debajo de su punto isoeléctrico (zeína pI = 6.2), se cargan positivamente por la protonación de los grupos amino y carboxilo, a estas condiciones se promueven la formación de puentes de hidrógeno y enlaces con los grupos hidroxilos y residuos de acetato del PVA, impidiendo la interacción zeína-lecitina.



### 3.1.2. Índice de polidispersidad

La mayoría de los sistemas mostraron una distribución normal, presentando valores de índice de polidispersidad (IPD)  $\leq 0.30$ , lo que implica una distribución de tamaños estrecha y homogénea de acuerdo a Mora-Huertas et al. (2010). El diagrama de Pareto de la Figura 21 muestra que la concentración del alcohol polivinílico (PVA) tiene la mayor influencia en el IPD, seguido por la interacción lecitina y PVA (AB) y en menor medida la interacción lecitina y pH del sistema (AC).

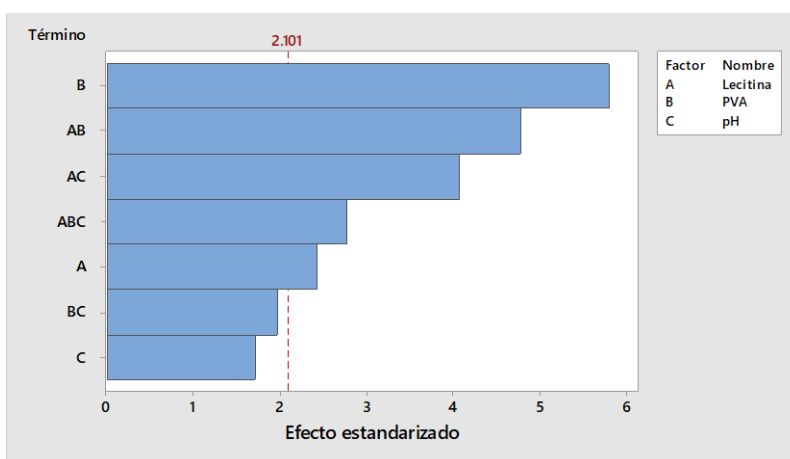


Figura 21. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el IPD.

En la Figura 22 se aprecia que a mayor concentración de PVA existió un incremento en el IPD, resultando en una menor homogeneidad en el sistema, esto debido a la agregación heterogénea del PVA a la superficie de las nanopartículas durante la evaporación del disolvente, como lo reportaron Piorkowski y Mc Clements (2014).

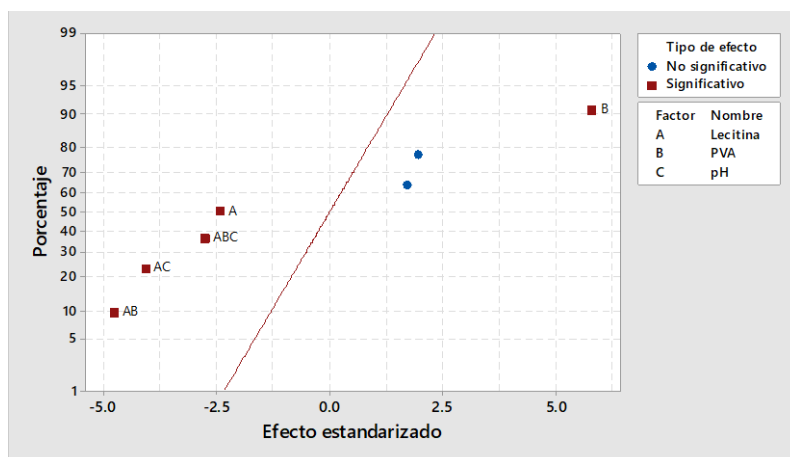
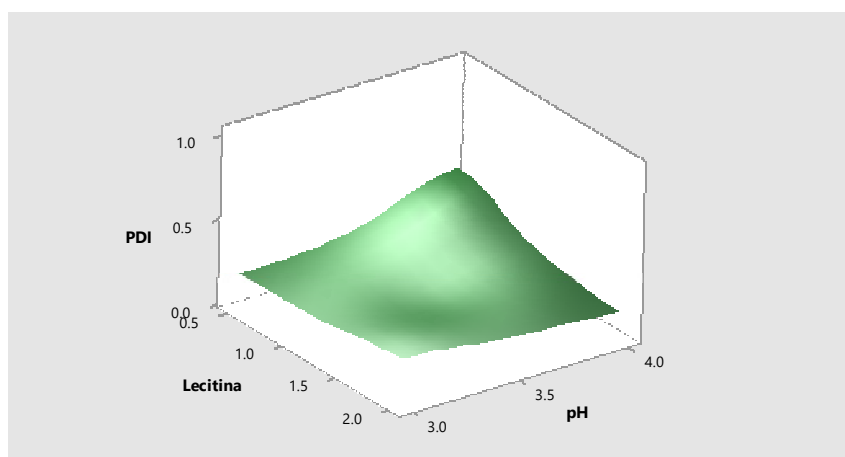


Figura 22. Efectos estandarizados para el IPD.

También en la Figura 22 se muestra un comportamiento similar al mencionado en el análisis de tamaño de partícula para la interacción lecitina-PVA, indicativo de que las micelas formadas con la relación 2:1 lecitina-zeína y menor concentración de PVA (0.33%) disminuyen la probabilidad de formar agregados manteniendo el tamaño de partícula y la homogeneidad del sistema.

En la Figura 23 se aprecia que menores valores de IPD se logran a un pH de 3.0 y una mayor proporción de lecitina (2:1), permitiendo la formación de micelas que previenen agregación. Además, a un pH menor (3.0) se incrementa el grado de protonación de las proteínas, incorporando un sistema adicional de estabilización, ya sea por la promoción de una mayor interacción con la lecitina (estructura de micelas) o por el aumento de la carga superficial de las nanopartículas que permite inhibir la formación de agregados, vía repulsión electrostática y mantener el tamaño de partícula como fue propuesto por Huaiqiong y Qixin (2015).



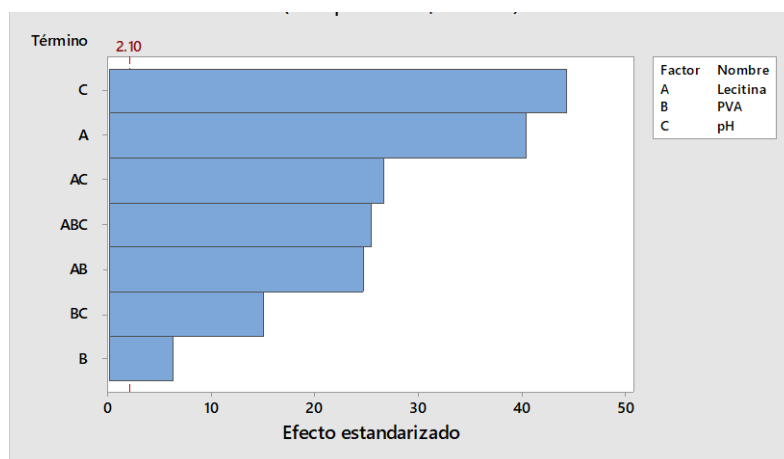
**Figura 23.** Gráfica de superficie para IPD en función a los valores de pH/lecitina.

### 3.1.3. Potencial zeta

Los valores absolutos de potencial zeta ( $\zeta$ ) menores a 30 mV no describen la estabilidad de las nanopartículas a partir de un sistema de interacciones con cargas de acuerdo con Gonçalves da Rosa et al. (2015). El mayor valor absoluto de potencial zeta observado durante la experimentación fue de  $9.56 \pm 0.17$  mV, esto debido a la presencia del alcohol polivinílico (PVA), que actúa como agente estabilizante por efecto estérico, al ser un

compuesto no iónico, donde las ramificaciones de su cadena impiden posibles agregaciones (Piorkowski y Mc Clements, 2014).

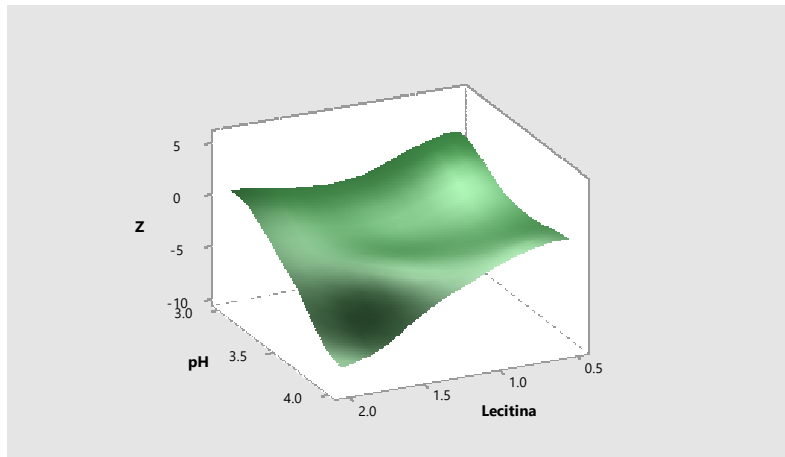
En la Figura 24, se aprecia que todas las interacciones y componentes del sistema influyen en el valor del  $\zeta$ , mostrándose una mayor dependencia del pH del medio y la variación en la relación lecitina-zeína, así como la interacción entre ellos (AC).



**Figura 24.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para  $\zeta$ .

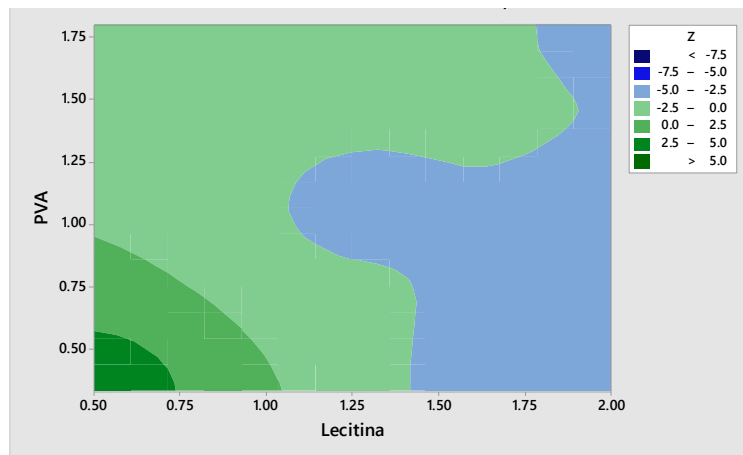
La presencia de pequeñas concentraciones de lecitina puede modificar las características eléctricas de la zeína, disminuyendo el valor de su potencial zeta. El valor del  $\zeta$  de la zeína a un pH 2.0 es aproximadamente 31 mV, debido a la protonación de sus grupos, con la presencia de lecitina se disminuye este valor hasta valores negativos debido a las interacciones con las terminales catiónicas de la zeína alcanzando con los grupos negativos del enlace fosfato éster de la lecitina (Dai et al., 2016).

En la Figura 25 se muestra el comportamiento del  $\zeta$  por efecto del pH, lo que concuerda con el análisis del tamaño de partícula y el IPD. A pH 3.0 se incrementa la protonación de zeína, mientras que a pH 4.0 se disminuye la formación de cargas catiónicas provocando cambios en el  $\zeta$  que disminuyen la estabilidad del sistema. A una relación lecitina-zeína (2:1) la carga aniónica generada por el fosfolípido tiene un efecto principal, debido a la formación de vesículas alrededor de la zeína, lo que concuerda con lo propuesto por Huaiqiong y Qixin (2015). A pH 3.0 y una menor proporción de lecitina se generaron agregados superficiales que no permiten la formación de vesículas por lo que el  $\zeta$  es positivo.



**Figura 25.** Gráfica de superficie de respuesta de  $\zeta$  en relación con el valor de pH/lecitina.

Los valores de potencial zeta negativos en las nanopartículas de zeína-lecitina también son influenciados por la presencia del PVA, atribuido a la presencia de grupos hidroxilos y acetato residuales de acuerdo con Brunchi et al. (2016). En la Figura 26, gráfico de contorno de  $\zeta$  en función al contenido de PVA/ lecitina, se muestra la interacción entre ambos en la formación del sistema nanoestructurado.



**Figura 26.** Contornos de  $\zeta$  respecto a la relación PVA/lecitina.

Al aumentar la concentración de PVA, a partir de 1.0% en concentración e igualando la relación entre lecitina-zeína, se incrementaron los grupos aniónicos en la estructura de la nanopartícula, modificando la eficiencia de encapsulación proporcionalmente ( $p \leq 0.05$ ) al valor de  $\zeta$ .

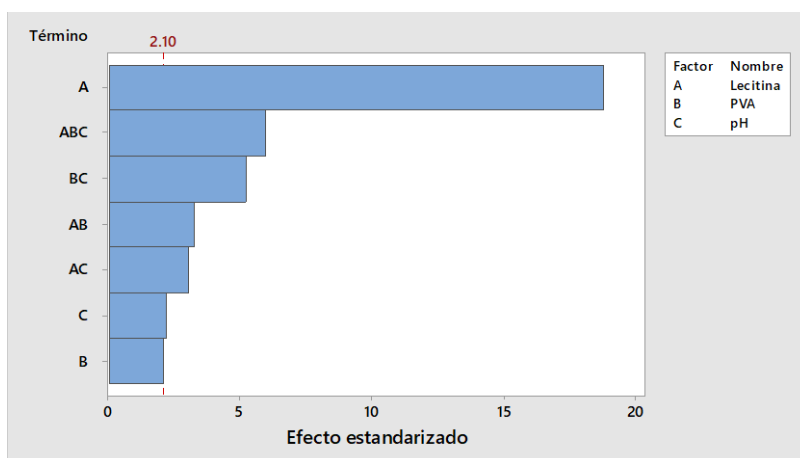
Las cargas negativas parciales que presentan algunas estructuras presentes en el aceite esencial de tomillo, como fenoles y terpenoides, interactúan con los grupos amino ( $\text{NH}_3^+$ ) de la zeína para asociarse, formando la matriz de la nanopartícula como lo establecieron Huaiqiong y Qixin (2015).

### 3.1.4. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación es un parámetro importante por evaluar en los sistemas nanoparticulados empleados como sistemas de liberación de compuestos activos. En alimentos es importante considerar el activo no encapsulado por su efecto protector inicial que puede conferirle a productos frescos cortados, mientras que los compuestos en la matriz encapsulada contribuyen a incrementar la vida útil del producto al liberarse durante el almacenamiento (Zambrano-Zaragoza et al., 2017).

La eficiencia de encapsulación del aceite esencial de tomillo para todas las condiciones experimentales fue superior al 70%, valor reportado para nanopartículas producidas por el método de nanoprecipitación y compuestos activos lipofílicos por Mora-Huertas et al. (2010). La mayor eficiencia de encapsulación fue de  $77.42 \pm 1.19 \%$  a pH 4.0 y menor concentración de lecitina y alcohol polivinílico (PVA).

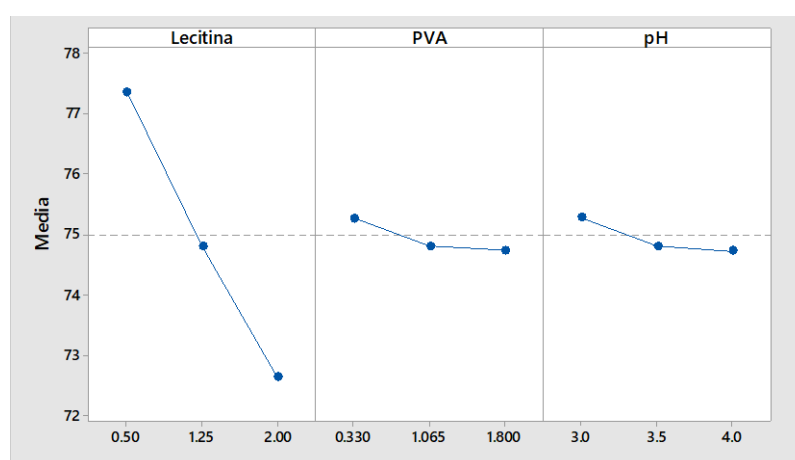
La Figura 27 muestra que la eficiencia de encapsulación es principalmente dependiente de la concentración de lecitina y el factor de menor importancia es la presencia de PVA.



**Figura 27.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la eficiencia de encapsulación.

El PVA fue el componente con menor influencia debido a que las interacciones requeridas para encapsular el aceite esencial de tomillo son formadas durante la agitación de la fase orgánica, mientras que, al inyectarse la fase orgánica a la fase acuosa, el PVA forma enlaces de manera superficial en las nanopartículas (Brunchi et al., 2016).

En la Figura 28, se aprecia que las variaciones en la proporción lecitina-zeína tiene un comportamiento inverso, donde a menor concentración de lecitina se tuvo una mayor eficiencia de encapsulación de aceite esencial de tomillo.



**Figura 28.** Efectos principales para la eficiencia de encapsulación.

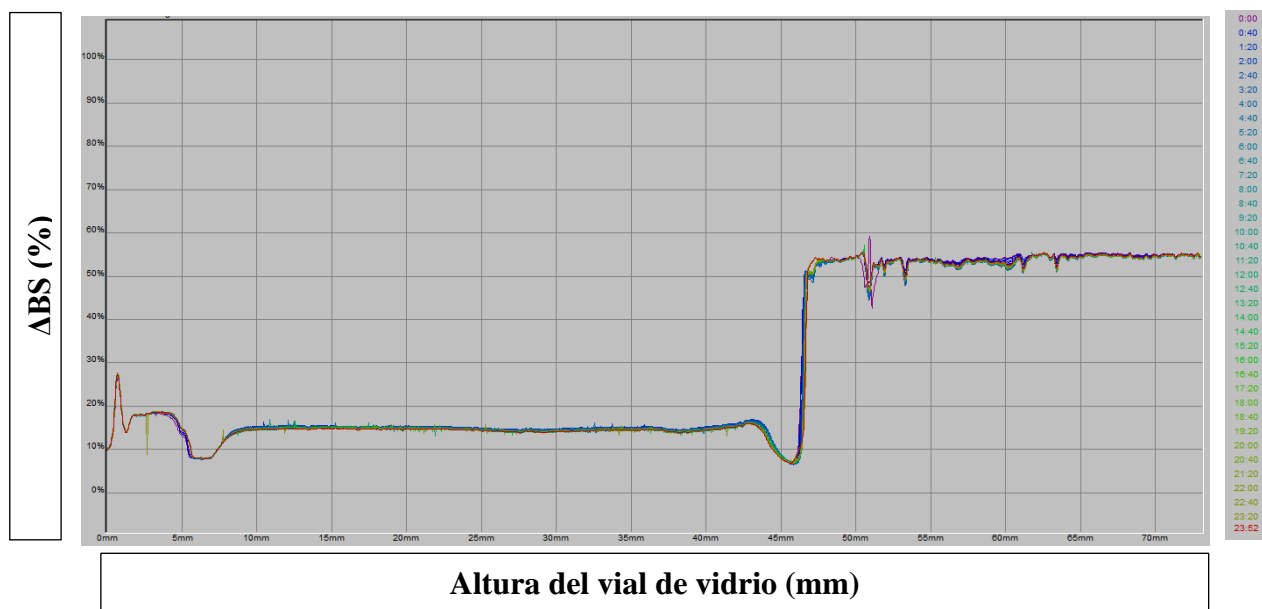
A partir de los resultados obtenidos de  $\zeta$  y su relación con la eficiencia de encapsulación se establece que el aceite de tomillo (compuesto aniónico por los grupos hidroxilos de los grupos fenólicos) se agrega a la zeína (compuesto catiónico debido a la protonación en medio ácido) por medio de un mecanismo de cargas y no por un efecto antisolvente durante la inyección de la fase orgánica en el agua, donde se generan interacciones hidrófobas. La lecitina se agrega a la zeína mediante sus cargas aniónicas, limitando los puntos de interacción entre el aceite y la proteína, como se describe en Mora-Huertas et al. (2010).

Se mostró que el tamaño de partícula presenta una relación proporcional con la eficiencia de encapsulación ( $p \leq 0.05$ ) debido a la incorporación del compuesto activo a la matriz, esto concuerda con lo descrito por Gonçalves da Rosa et al. (2015).

### 3.1.5. Estabilidad del sistema nanoparticulado

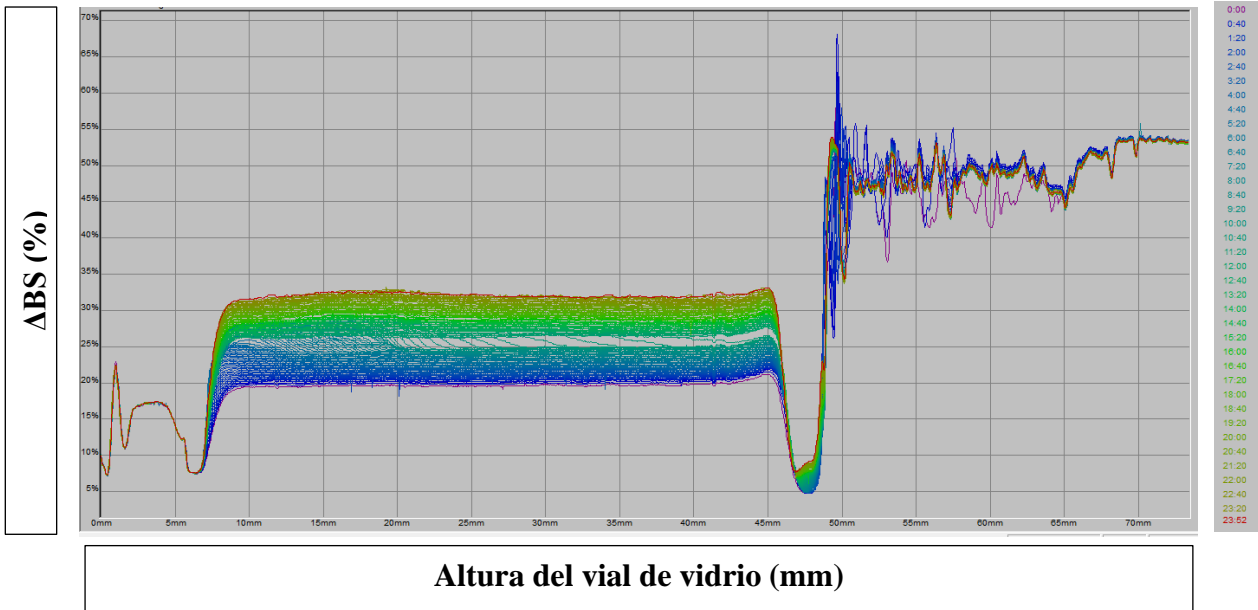
Se evaluaron los perfiles de retrodispersión de luz obtenidos para las nueve corridas experimentales, para la mayoría de los casos (a excepción del experimento 3 y 4) se mostró una disminución promedio menor al 5% en la variación de retrodispersión de luz ( $\Delta$ BS por sus siglas en inglés).

En la Figura 29 se muestra el patrón obtenido. El comportamiento global de las muestras en el segmento 5 mm a 45 mm del vial mostró una disminución del valor de  $\Delta$ BS, sin embargo, este cambio no es apreciable en algunas de las regiones, indicando que en las 24 h de evaluación se tiene estabilidad en los sistemas para su posterior empleo, de acuerdo con Wang et al. (2018).



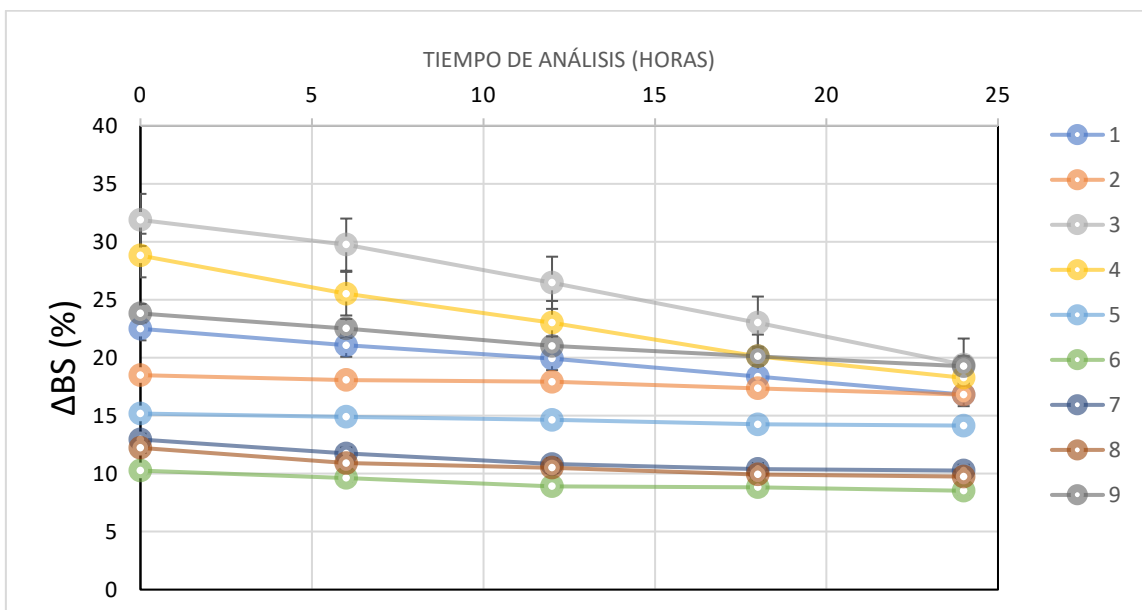
**Figura 29.** Perfil de retrodispersión de luz.

En la Figura 30 se muestra la variación del  $\Delta$ BS, donde existe una variación promedio del 12.48% en la retrodispersión de la luz entre el inicio y final de la prueba, esta variación es debido al mayor valor de IPD de  $0.64 \pm 0.11$  del sistema 4 (relación lecitina-zeína 1:2, PVA 1.8% Y pH 4.0); el sistema 3 (lecitina-zeína 2:1, PVA 1.8% y pH 3.0) muestra un perfil similar al tener una variación promedio de  $\Delta$ BS de 11.55%, debido al mayor tamaño de partícula presente en el sistema  $2600 \pm 147$  nm, fuera del intervalo nanométrico.



**Figura 30.** Perfil de retrodispersión de luz.

En la Figura 31 se presentan las variaciones promedio de  $\Delta BS$  respecto al tiempo de análisis. Se muestra una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el valor de la pendiente de la línea recta de los sistemas 3 y 4 con respecto a las demás corridas experimentales, debido a la mayor variación de retrodispersión de la luz, presentando valores de pendiente superiores a  $0.5 \Delta BS \%/h$ .



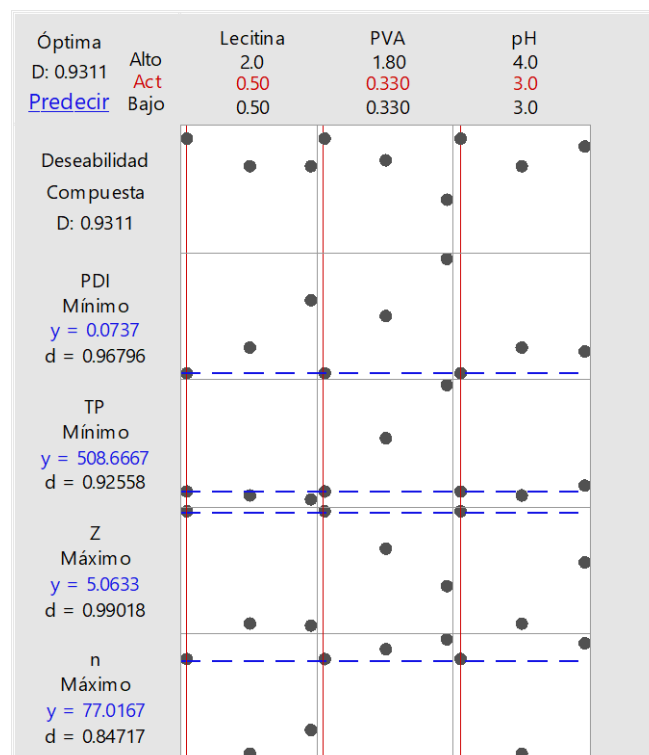
**Figura 31.** Variación de  $\Delta BS$  respecto al tiempo de las muestras 1-9 como se reportó en la Tabla 2.



Las mayores variaciones de  $\Delta BS$  se relacionan con el tamaño de partícula, y con altos valores de IPD que no cumplen con una distribución normal, que al presentar una mayor heterogeneidad en la talla de partícula vuelve a los sistemas propensos a la desestabilización por efecto de las fuerzas gravitacionales, como lo describen McClements y Rao (2011). El en el tamaño de partícula es de manera homogénea en el intervalo de 5 nm a 45 nm de la muestra, indicando inestabilidad durante las 24 h del análisis de acuerdo con Wang et al. (2018) por floculación y coalescencia.

### 3.1.6. Optimización del proceso

En la Figura 32 se muestran las condiciones óptimas de preparación de nanopartículas con aceite esencial de tomillo, basada en deseabilidad considerando: menor tamaño de partícula y bajo IPD, máxima eficiencia de encapsulación y potencial zeta ( $\zeta$ ), este parámetro se tomó en cuenta debido a la influencia que tienen las cargas catiónicas en la eficiencia de encapsulación. Así, las condiciones seleccionadas fueron: 0.33% PVA, relación de lecitina-zeína (1:2) y pH del medio de 3.0. Obteniéndose tamaño de partícula de  $495 \pm 7$  nm, IPD de  $0.074 \pm 0.023$  y eficiencia de encapsulación de  $77.02 \pm 0.84$  %.



**Figura 32.** Optimización gráfica de las condiciones de formación de nanopartículas de zeína-lectina para la encapsulación de aceite esencial de tomillo.

### 3.2. Selección de condiciones de tratamiento

Para la selección de las condiciones de tratamiento con el ultrasonido se ocupó la dispersión de nanopartículas formada a partir de las condiciones seleccionadas: concentración 0.33% de alcohol polivinílico, relación de lecitina-zeína (1:2) y pH del medio de 3.0. El sistema nanoparticulado fue empleado como medio de inmersión para la papa blanca fresca cortada durante la aplicación del ultrasonido. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 3.** Resultados caracterización de la papa posterior al tratamiento con ultrasonido.

Condiciones de trabajo	$\Delta L$	IO	$\Delta h$	$\Delta Cr$	Pérdida de masa (%)	Inhibición actividad PFO (%)
10 W 70 % 1.0 $\mu\text{l/ml}$	$-0.35 \pm 0.17^a$	$1.05 \pm 0.05^a$	$-2.57 \pm 0.74^a$	$0.34 \pm 0.38^a$	$15.18 \pm 0.01^a$	$81.52 \pm 0.30^a$
10 W 70 % 2.0 $\mu\text{l/ml}$	$-3.64 \pm 1.46^b$	$8.14 \pm 1.83^b$	$-5.53 \pm 1.78^b$	$2.43 \pm 0.23^b$	$16.97 \pm 0.01^b$	$75.24 \pm 0.14^b$
10 W 100 % 1.0 $\mu\text{l/ml}$	$-1.75 \pm 0.50^c$	$3.72 \pm 2.76^c$	$-6.04 \pm 1.28^b$	$0.69 \pm 0.45^a$	$16.00 \pm 0.01^c$	$47.17 \pm 0.46^c$
10 W 100 % 2.0 $\mu\text{l/ml}$	$-1.20 \pm 0.28^d$	$5.38 \pm 1.05^{c,d}$	$-3.80 \pm 0.79^c$	$0.85 \pm 0.57^a$	$18.75 \pm 0.01^d$	$76.81 \pm 0.47^b$
20 W 70 % 1.0 $\mu\text{l/ml}$	$-3.23 \pm 0.82^b$	$6.56 \pm 0.53^d$	$-5.39 \pm 1.35^b$	$1.55 \pm 0.61^c$	$19.35 \pm 0.01^e$	$3.66 \pm 0.38^d$
20 W 70 % 2.0 $\mu\text{l/ml}$	$3.04 \pm 1.16^b$	$6.06 \pm 1.36^d$	$-2.22 \pm 0.99^a$	$3.71 \pm 0.89^d$	$22.52 \pm 0.01^f$	$53.53 \pm 0.31^e$
20 W 100 % 1.0 $\mu\text{l/ml}$	$-1.36 \pm 0.02^d$	$5.72 \pm 2.06^d$	$-4.83 \pm 0.81^b$	$1.87 \pm 0.71^c$	$21.21 \pm 0.01^f$	$17.19 \pm 0.01^f$
20 W 100 % 2.0 $\mu\text{l/ml}$	$1.52 \pm 1.06^{b,c}$	$5.54 \pm 1.87^d$	$-2.37 \pm 1.58^a$	$2.84 \pm 0.91^b$	$22.25 \pm 0.04^f$	$41.76 \pm 0.44^c$

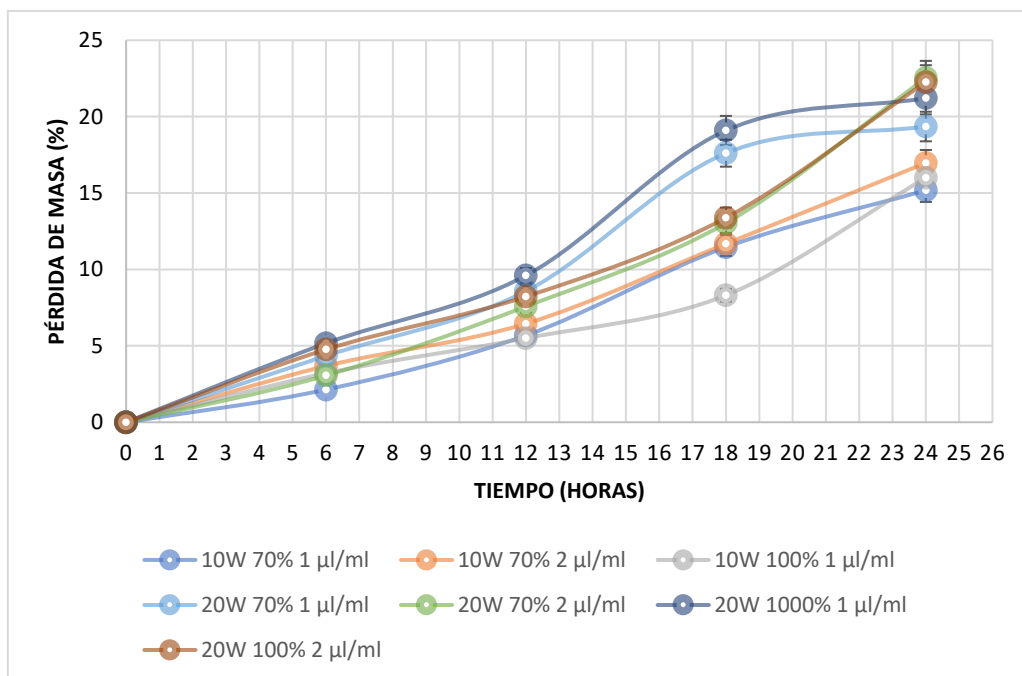
Letras diferentes en la misma columna, implican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ( $\alpha = 005$ ). Las medias son el resultado de tres repeticiones,  $\pm$  desviación estándar.

A una potencia de salida de 10 W, pulsaciones del 70% y una concentración de 1.0 µl/ml de aceite esencial de tomillo en las nanopartículas se obtuvieron menores variaciones en los parámetros evaluados luminosidad, índice de oscurecimiento (IO) y existió un mayor porcentaje de inhibición en la actividad de la enzima PFO.

### 3.2.1. Pérdida de masa

La pérdida de masa en los productos de origen vegetal durante el almacenamiento es debida principalmente a la deshidratación generada por la diferencia de humedad entre el ambiente y el producto, así como por su respiración que consiste en la formación de agua y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a partir de la degradación de la glucosa (Viacava et al., 2018).

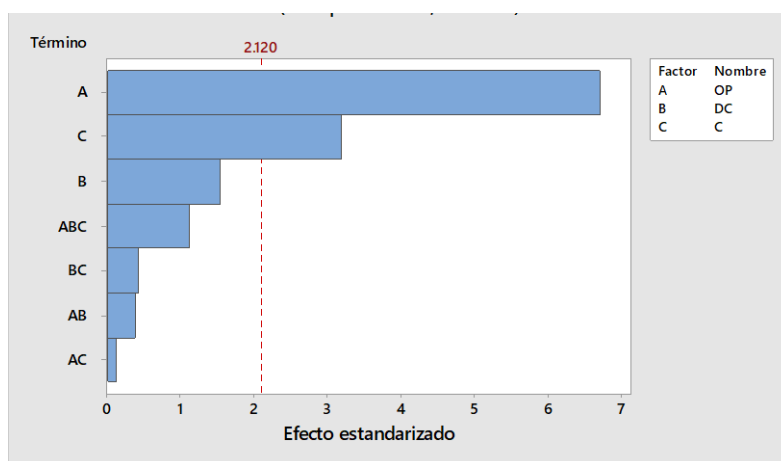
Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre la masa de las papas con diferentes tratamientos debida a la deshidratación por las modificaciones de la matriz del producto. A partir de las 18 h de estudio se obtuvo una mayor pérdida de masa a 20 W al comparar respecto al uso de 10 W de potencia de salida como se aprecia en la Figura 33.



**Figura 33.** Variación de la pérdida de masa en papa respecto al tiempo.

La mayor variación final fue de  $22.52 \pm 0.01$  % al emplearse una potencia de 20 W, pulsaciones del 70% y 2  $\mu\text{l/ml}$  de aceite de tomillo; la menor variación fue de  $15.18 \pm 0.01$  % a 10 W, 70% y 1  $\mu\text{l/ml}$ . No se encontró una diferencia significativa en los resultados al compararse el empleo de diferentes pulsaciones del ultrasonido a iguales condiciones de concentración de aceite de tomillo y potencia de salida.

En el diagrama de Pareto de la Figura 34 se muestra que existió una dependencia significativa en la pérdida de masa de las papas durante el estudio con la potencia de salida del ultrasonido y de la concentración del aceite esencial de tomillo en el sistema nanoparticulado, el efecto entre ambos no presentó una interacción significativa.

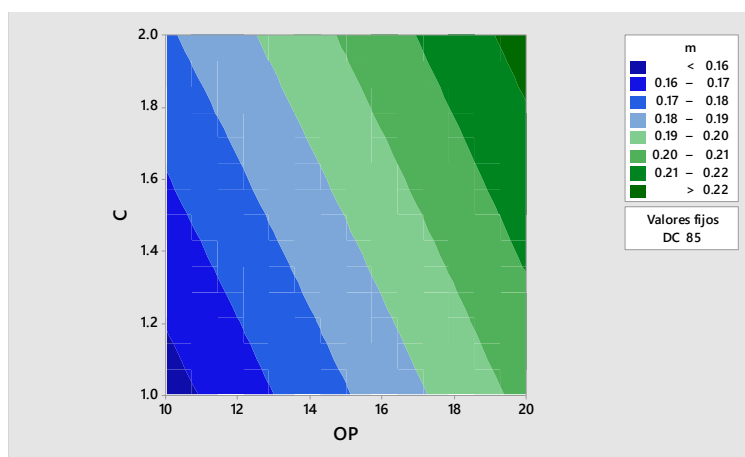


**Figura 34.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la pérdida de masa.

Al aumentar la potencia (OP) suministrada al sistema por el ultrasonido de 10 a 20 W se encontró un aumento promedio en la pérdida de masa de  $4.61\% \pm 0.01$  al comparar los resultados entre iguales condiciones de concentración de aceite de tomillo (C) y pulsaciones del ultrasonido (DC).

En la Figura 35 se aprecia que con el aumento de la potencia suministrada se promueve la pérdida de masa en la papa durante el transcurso del tiempo. Esto debido a que una mayor potencia aplicada incrementa los cambios en la estructura de la papa, se ha sugerido que la cavitación forma canales en el producto, permitiendo flujo por capilaridad, además de generarse daños en la pared y membrana celular, modificando su permeabilidad y liberando materiales de plástidos y otros organelos al citoplasma celular para posteriormente expulsarlo al exterior de la célula, como es el caso de enzimas,

almidón y agua (90-95% del agua en la papa se encuentra de forma intracelular). Con las modificaciones a la estructura celular se aumenta la disponibilidad del agua y se inhibe su interacción con otros componentes, facilitando su liberación como lo reporta Rojas y Augusto (2018).



**Figura 35.** Contornos de pérdida de masa en función al valor de potencia suministrada y concentración de aceite esencial de tomillo.

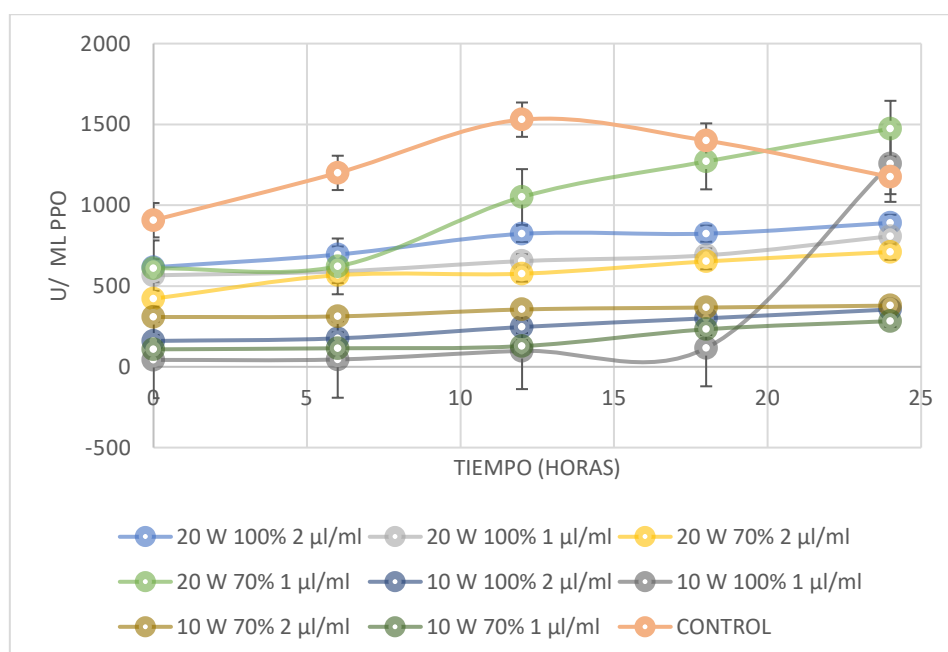
En la Figura 35 también se observa que un aumento en la concentración de aceite de tomillo y de nanopartículas en el medio donde se aplicó el ultrasonido promueve una mayor pérdida de masa durante el almacenamiento, mostrando un efecto proporcional aditivo con la potencia del ultrasonido, esto debido a que la interacción entre ambos componentes no es significativa, pero su influencia es en el mismo sentido.

A pesar de que al ingresar compuestos hidrófobos a matrices alimentarias se promueve una disminución de la actividad de agua y generación de un sistema de baja permeabilidad a la humedad, protegiendo al producto de pérdida de masa. Se ha probado que el aumento en la concentración de nanopartículas junto con ultrasonido promueve el ingreso del compuesto activo y su agregación dentro del alimento, modificando su estructura y en algunos casos rompimiento de acuerdo a Rojas et al. (2019); el reacomodo de enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y de fuerzas hidrofóbicas, que inhiben puntos de enlace del agua, además de promover el ingreso de compuestos activos de manera intracelular que dañan la pared y la membrana celular (Zhu, 2015).

### 3.2.2. Polifenol oxidasa e índice de obscurecimiento

El obscurecimiento en frutas y hortalizas se debe primordialmente a la reacción oxidativa de la enzima PFO, ésta es liberada de plástidos o cloroplastos al momento de la ruptura del tejido, lo que la ponen en contacto con los fenoles, contenidos en las vacuolas, originando compuestos coloreados como las o-quinonas (Cabeza-Serrano et al., 2009).

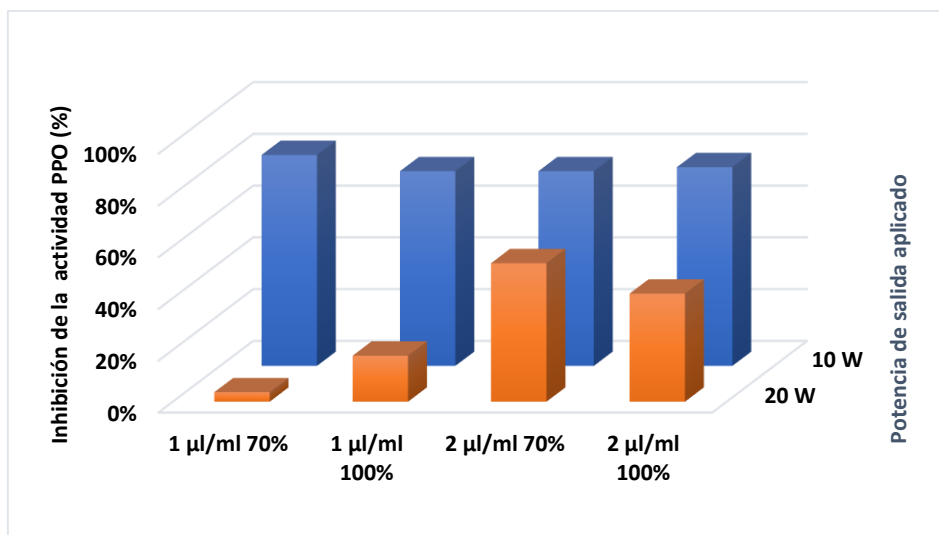
En la Figura 36 se presenta el incremento en la actividad de la enzima PFO en función al tiempo de almacenamiento. Se aprecia un pico máximo de actividad en el día 15 para la muestra control (1,577 U/ml), mientras que en las muestras tratadas con ultrasonido y dispersión de nanopartículas como líquido de inmersión presentan el incremento en la actividad PFO hasta el día 20, manteniéndose por debajo de la actividad de la muestra control. Esto demuestra que el tratamiento propuesto es efectivo para retardar e inhibir la actividad de la enzima PFO.



**Figura 36.** Variación de la actividad PPO respecto al tiempo de análisis.

La inhibición de la actividad enzimática de los diferentes tratamientos se obtuvo contrastando la actividad PFO de las muestras control con respecto a cada tratamiento, encontrándose variaciones estadísticamente significativas en función a la potencia de salida del ultrasonido con una correlación negativa (-0.874,  $p \leq 0.05$ ).

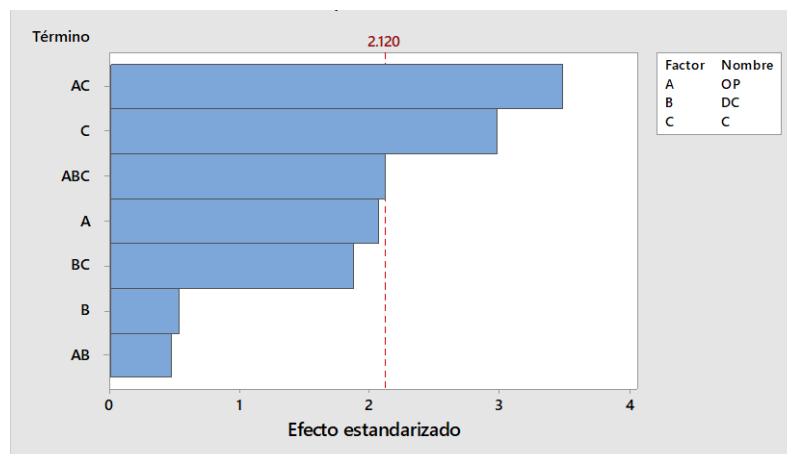
En la Figura 37, se muestra la inhibición de la actividad enzimática en relación con la concentración de aceite esencial de tomillo y las pulsaciones del ultrasonido empleadas respecto a las potencias de salida analizadas (10 y 20 W).



**Figura 37.** Gráfica de barras de la inhibición de actividad PFO.

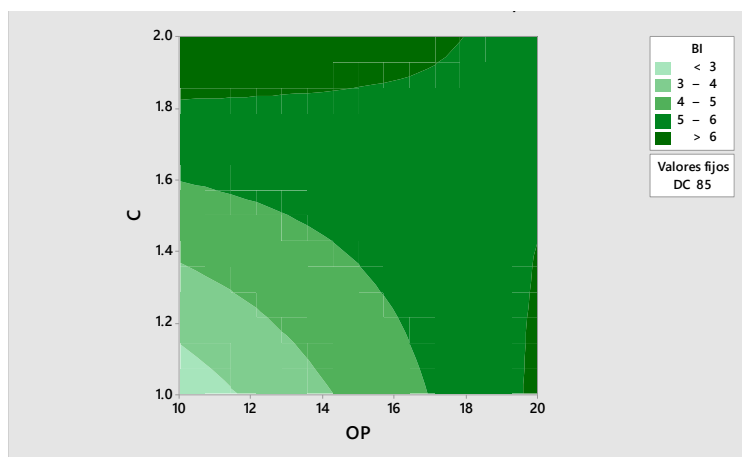
Se tuvo una inhibición en la actividad de la enzima PFO de  $81.52 \pm 0.30\%$  a las condiciones de potencia de 10 W, pulsaciones del 70% y concentración de  $1.0 \mu\text{l/ml}$  de aceite de tomillo; al variar la potencia de salida a 20 W en iguales condiciones se obtuvo una inhibición de  $3.66\% \pm 0.38$ . Se observó que con el incremento de la potencia de salida se promueve la inactivación de la enzima, sin embargo, se modifica la estructura del producto lo que promueve la ruptura de un mayor número de células y por ende se incrementa la expulsión de contenido celular, lo que hace que fenoles y enzima entren contacto, esto es descrito por Comandini et al. (2013).

El índice de obscurecimiento presentó una relación significativa con la inhibición de la enzima polifenol oxidasa ( $p \leq 0.05$ ), donde a mayor inhibición se disminuye el índice de obscurecimiento. En la Figura 38, se observa su dependencia del efecto conjunto de la potencia de salida y la concentración del aceite esencial de tomillo. Las muestras sonicadas por mayor tiempo o con una mayor potencia presentan un mayor índice de obscurecimiento y un aumento en la saturación del color (Cr) de acuerdo con Amaral et al. (2015).



**Figura 38.** Diagrama de Pareto de efectos para el índice de obscurecimiento.

En la Figura 39 se muestran los contornos de la interacción entre aceite de tomillo y la potencia del ultrasonido donde a una menor presencia de compuestos fenólicos y menor potencia se disminuye el valor del índice de obscurecimiento; este incremento se debe a que una mayor concentración de aceite de tomillo y de fenoles promueve la polimerización de estos compuestos al aplicarse el ultrasonido, aumentando la saturación en el color del producto de acuerdo a Malgorzata y Malgorzata (2016).



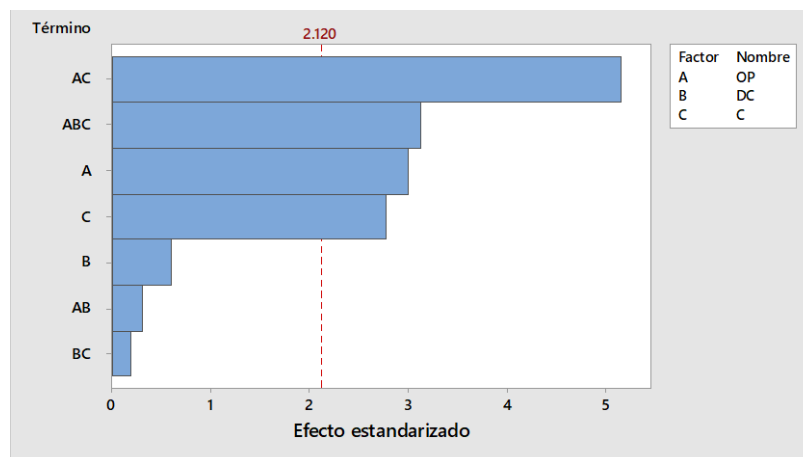
**Figura 39.** Contornos para Índice de obscurecimiento respecto a la concentración de tomillo y potencia de salida.

### 3.2.3. Variación parámetros de color

Los cambios en luminosidad ( $L^*$ ) están asociados con las modificaciones de la superficie tisular causadas por la actividad de la enzima polifenol oxidasa que ocasiona el obscurecimiento del producto (Zambrano-Zaragoza et al., 2014).



En la Figura 39 se muestra una mayor incidencia en la variación de la luminosidad debido a un mayor efecto del OP y la concentración del aceite de tomillo (C), mismas condiciones que afectan la inhibición de la actividad PFO y el índice de obscurecimiento.



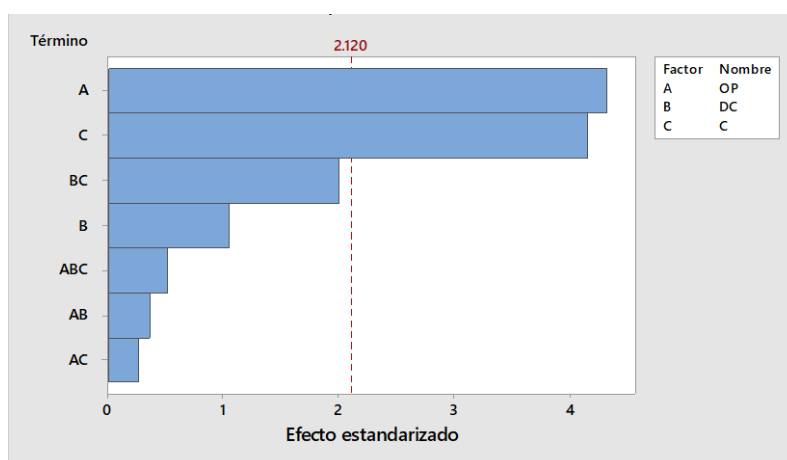
**Figura 39.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la luminosidad.

En general la luminosidad disminuyó en las muestras posterior al tratamiento con ultrasonido, salvo en el caso de la aplicación de 20 W y 2  $\mu$ l/ml como se muestra en la Tabla 3, obteniéndose un incremento en la luminosidad de  $3.047 \pm 1.164$  con pulsaciones del 70.0% y de  $1.520 \pm 1.068$  para pulsaciones del 100.0%. Esto debido a una mayor pérdida de masa e incremento en la incorporación de nanopartículas a estas condiciones; Malgorzata y Malgorzata (2016) establecieron que materiales con menor humedad presentan un aumento en luminosidad, debido al aumento de la reflexión de la luz en materiales sólidos, además que se fomenta la aparición de poros e irregularidades en la superficie con el uso del ultrasonido.

Las papas tuvieron un valor promedio de ángulo Hue de  $91.29 \pm 1.29$  °, que representa el color amarillo ( $90^\circ$ ), con el paso del tiempo su valor disminuyó a un valor promedio de  $87.14 \pm 1.47$  °, acercándose levemente al color naranja ( $45^\circ$ ), debido al incremento de la producción de compuestos de color (o-quinonas) por la enzima PFO.

La saturación de color (Croma) tuvo un valor promedio de  $17.48 \pm 1.67$  y tuvo un incremento promedio de  $19.07 \pm 1.43$ . Los resultados se ven modificados por la concentración de sólidos totales en la matriz del alimento (Amaral et al., 2015), ambos

factores de proceso (potencia de salida del ultrasonido y concentración de aceite de tomillo) tuvieron un efecto significativo como se ve en la Figura 40.



**Figura 40.** Efectos principales para Cromo.

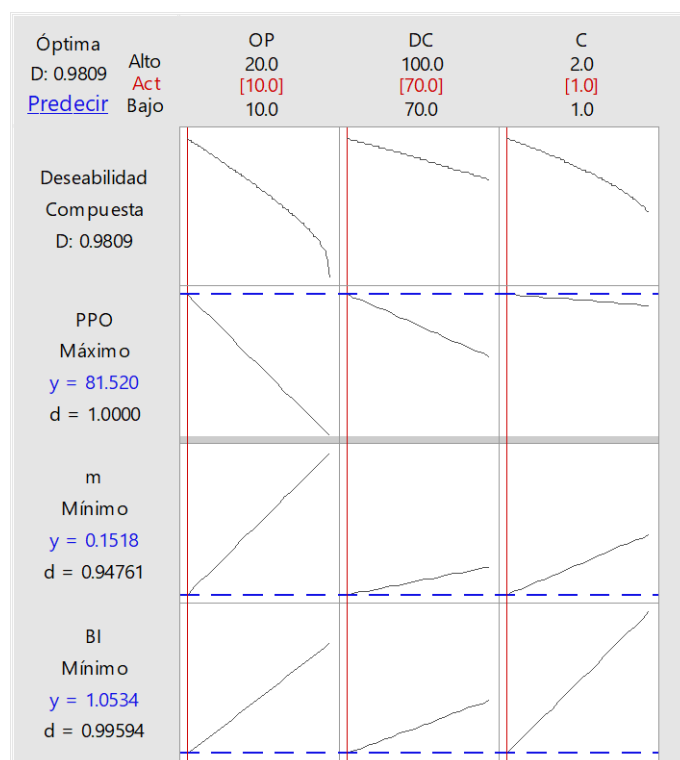
Las condiciones que indican una mayor ganancia de sólidos (20 W y 2  $\mu\text{l/ml}$ ) en la matriz de la papa a partir de las nanopartículas y concentración de éstos por pérdida de humedad representan una mayor modificación a la variación de este parámetro, esto se demuestra con la correlación encontrada de la variación de croma con el porcentaje de masa perdida de 0.740 ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.2.4. Optimización del proceso

Al analizar los resultados por medio de un gráfico de optimización, Figura 41, se encontraron las condiciones adecuadas para inhibir la actividad PFO y el daño a la membrana celular durante el tratamiento con ultrasonido empleando el sistema de nanopartículas como líquido de inmersión. Para la obtención de las condiciones se consideró tener una menor variación en la masa perdida e índice de obscurecimiento, así como un mayor efecto inhibitor de la actividad PFO para tener menor producción de compuestos coloreados que afectan la calidad final de la papa.

La deseabilidad compuesta del sistema fue de 0.9809 obteniendo que, 10 W de potencia de salida, 70% de amplitud del ultrasonido y una concentración 1.0  $\mu\text{l/ml}$  de aceite esencial de tomillo contribuyen a disminuir la pérdida de masa ( $15.18\% \pm 0.01$ ) e índice de obscurecimiento de la papa blanca fresca cortada ( $1.05 \pm 0.05$ ), debida a la mayor

inhibición de la actividad PFO ( $81.52\% \pm 0.30$ ) al comparar con papa blanca sin tratamiento. De tal manera que a estas condiciones se llevó a cabo la infiltración de nanopartículas de aceite esencial de tomillo en las etapas experimentales que a continuación se describen.



**Figura 41.** Optimización gráfica de las condiciones de proceso para la infiltración de nanopartículas de zeína-lecitina con ultrasonido.

### 3.3. Aplicación de las nanopartículas en la papa fresca cortada

#### 3.3.1. Infiltración de aceite de tomillo

Como se mencionó previamente, se estudió el efecto antioxidante y antimicrobiano de los diferentes componentes de la formulación del sistema de inmersión con nanopartículas con aceite esencial de tomillo encapsulado, al igual que el efecto que tiene el empleo del ultrasonido (US). Se determinó la concentración de aceite esencial de tomillo infiltrado en las papas frescas cortadas, estudiando su empleo en emulsión (T) y en nanopartículas (NC), así como su disminución durante el almacenamiento del producto. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

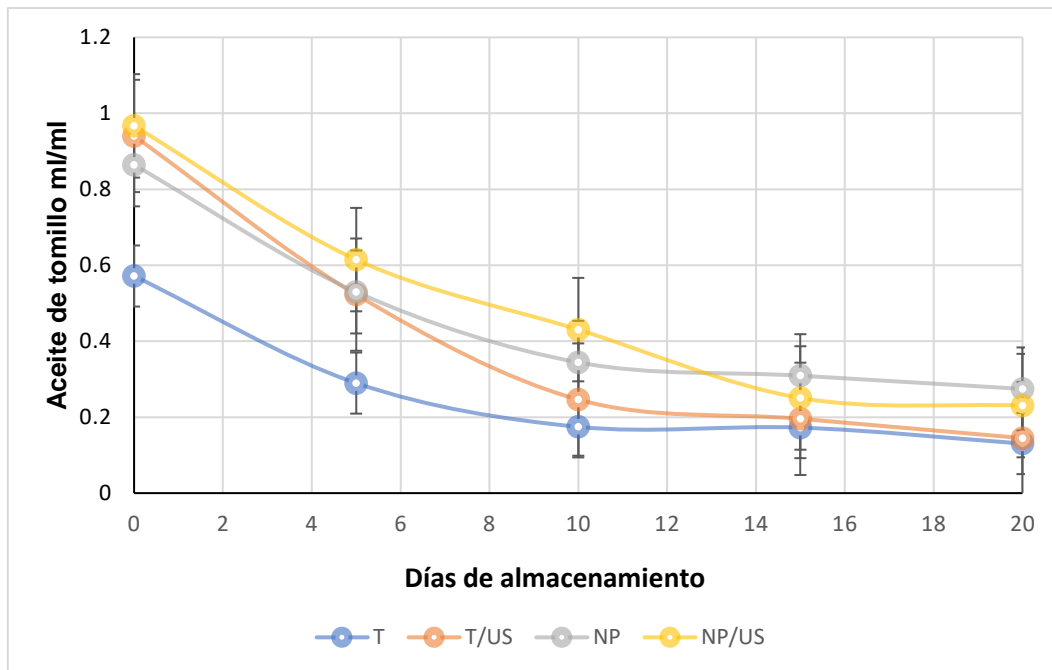
**Tabla 4.** Concentración de aceite de tomillo ( $\mu\text{l/ml}$ ) durante almacenamiento.

Días almacenamiento	0	5	10	15	20
Tratamiento					
T	$0.57 \pm 0.01^{a,a}$	$0.29 \pm 0.01^{a,b}$	$0.17 \pm 0.01^{a,c}$	$0.17 \pm 0.01^{a,c}$	$0.13 \pm 0.01^{a,d}$
T/US	$0.94 \pm 0.02^{b,a}$	$0.52 \pm 0.01^{b,b}$	$0.25 \pm 0.04^{b,c}$	$0.20 \pm 0.01^{b,c}$	$0.15 \pm 0.01^{a,d}$
NC	$0.86 \pm 0.02^{c,a}$	$0.53 \pm 0.01^{b,b}$	$0.34 \pm 0.01^{c,c}$	$0.31 \pm 0.01^{c,c}$	$0.27 \pm 0.01^{b,d}$
NC/US	$0.97 \pm 0.01^{b,a}$	$0.62 \pm 0.11^{b,b}$	$0.43 \pm 0.01^{d,c}$	$0.25 \pm 0.01^{d,d}$	$0.23 \pm 0.01^{c,d}$

Las letras diferentes a la izquierda muestran diferencias entre columnas (tratamientos); letras diferentes a la derecha representan diferencias entre filas (días de almacenamiento), el nivel de significancia fue de 0.05,  $\pm$  desviación estándar.

En la Tabla 4, se observa que existió diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la infiltración del aceite esencial de tomillo cuando se emplea como fuerza motriz ultrasonido ya que hubo un incremento del  $39.22 \pm 8.56$  % cuando el tomillo se incorporó en emulsión y del  $10.62 \pm 1.05$  % cuando se infiltró en forma de nanopartículas, sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la infiltración de aceite de tomillo en emulsión o nanopartículas cuando se emplea ultrasonido ( $p > 0.05$ ), por lo que el ultrasonido es un tratamiento importante en la infiltración de aceite esencial de tomillo en papa, ya que se promueve la transferencia de masa y formación de enlaces no covalentes entre el almidón y grupos fenólicos mayoritarios del aceite de tomillo (carvacrol y timol), lo que incrementa la concentración en la matriz del producto (Zhu, 2015). La generación de los enlaces es posible gracias a la cavitación producida por el ultrasonido que produce un desdoblamiento y rompimiento de enlaces intrínsecos del almidón por la formación y colapso de burbujas originadas por el aumento de la presión y temperatura del medio (Feng y Barbosa-Cánovas, 2011).

Se presentó una mayor liberación del aceite esencial de tomillo durante los primeros 10 días como se muestra en la Figura 42. En este tiempo, las nanopartículas (NP), tuvieron una liberación del  $42.17 \pm 3.32$  % y del  $28.36 \pm 3.31$  % en las muestras con tomillo en emulsión. Esto demuestra el efecto de las nanopartículas como sistema de protección a los compuestos activos con un mejor control de liberación. La zeína aplicada en la matriz de la nanopartícula es empleada por sus interacciones hidrofóbicas útiles en la formación de estructuras de talla submicrónica, permitiendo que éstas se aprovechen al encapsular agentes hidrofóbicos, como lo estudiado por Gonçalves da Rosa et al. (2015).



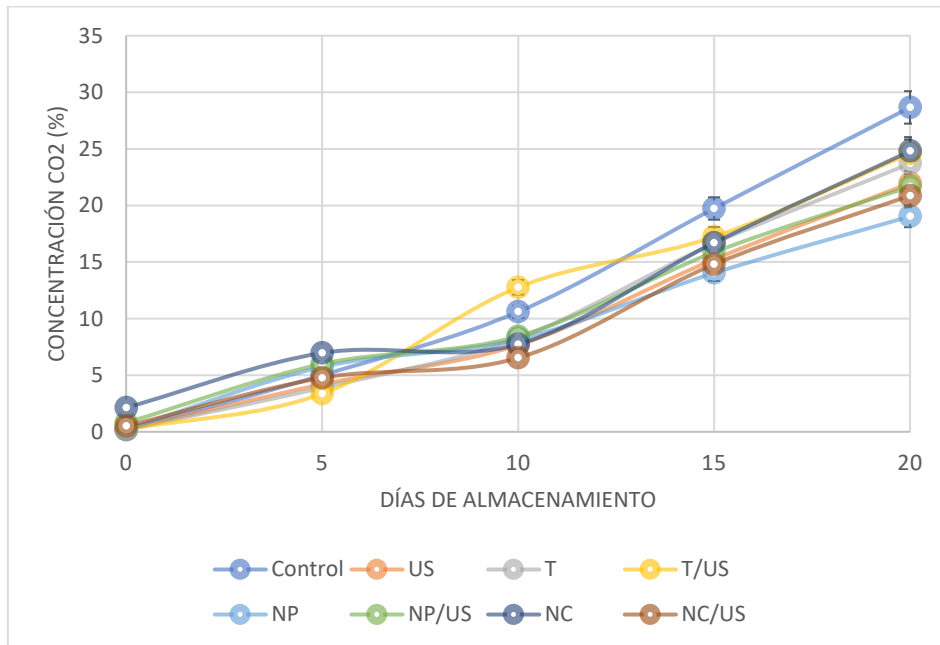
**Figura 42.** Disminución en la concentración del aceite esencial de tomillo durante almacenamiento.

Al emplear lecitina en la formación de nanopartículas se promueve no sólo la estabilización de la estructura, sino la modificación de interacciones entre la zeína y el aceite de tomillo, generando una barrera física y química extra, que modifica permeabilidad de la superficie. En la Figura 42 se observa que después de transcurridos 15 días las variaciones en las concentraciones de aceite esencial de tomillo tuvieron variaciones mínimas, sin diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre el empleo de nanopartículas y emulsión.

### 3.3.2. Concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>

En los productos de origen vegetal se utiliza el término respiración que involucra cambios en la composición gaseosa como producto del metabolismo del producto, liberando CO<sub>2</sub>, energía y calor, esto implica la oxidación enzimática de las moléculas orgánicas como carbohidratos, ácidos grasos y proteínas, además de que la respiración provee las necesidades básicas del tejido y células para mantener actividades fisiológicas y metabólicas (Thompson, 2016).

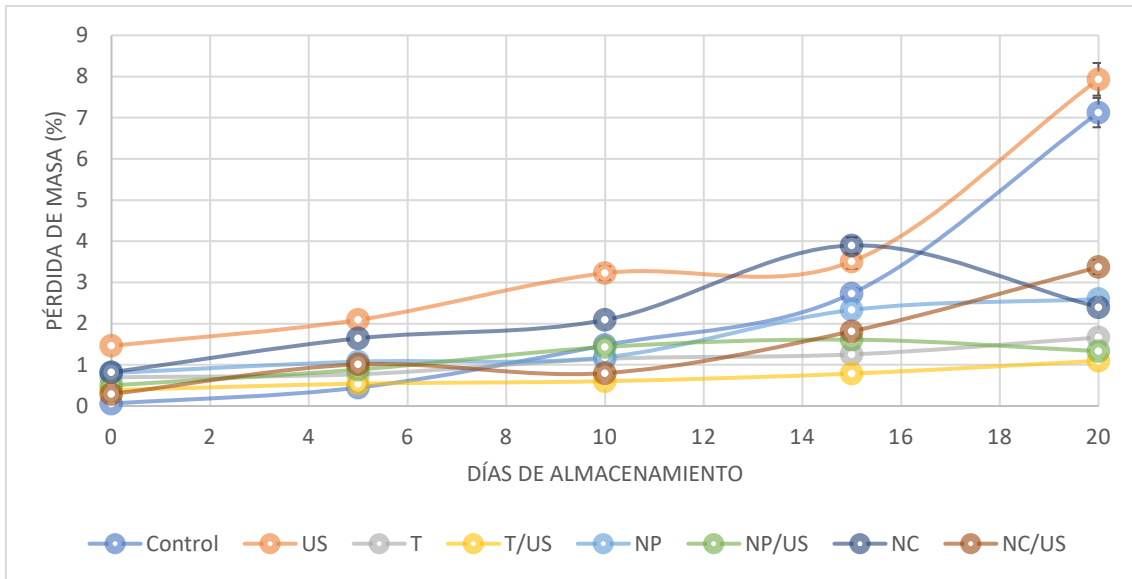
Los tratamientos presentaron una disminución en la concentración de O<sub>2</sub> de  $4.8 \pm 0.6\%$  al inicio del estudio a  $1.2 \pm 0.5\%$  al término del almacenamiento, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el comportamiento de los diferentes tratamientos ( $p > 0.05$ ). En cuanto a la producción de CO<sub>2</sub> se encontró una diferencia significativa en la concentración final de almacenamiento (día 20). En la Figura 43 se muestra el aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> en el espacio libre del envase, mostrando una mayor producción en la muestra control ( $28.67\% \pm 1.53$ ), existiendo una relación entre las 3 variables de proceso para promover la producción y aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> al influir directamente en los procesos enzimáticos, de oxidación y crecimiento microbiano en la papa fresca cortada.



**Figura 43.** Variación en la concentración de CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza del envase durante el almacenamiento.

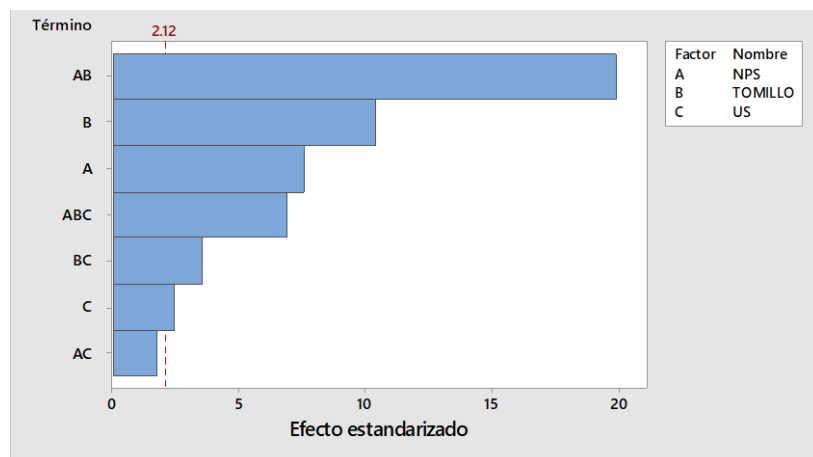
### 3.3.3. Pérdida de masa

En la Figura 44, se muestra el comportamiento de la pérdida de masa durante el almacenamiento refrigerado, las muestras control fueron las que mostraron mayor pérdida de masa con  $7.12 \pm 1.51\%$  para las papas que fueron inmersas en agua y de  $7.93 \pm 0.11\%$  para aquellas que fueron tratadas con ultrasonido (US).



**Figura 44.** Disminución en la concentración de ac. tomillo durante almacenamiento

La menor pérdida de masa la mostraron aquellas papas tratadas con aceite esencial de tomillo (1  $\mu\text{l/ml}$ ) independientemente del sistema infiltrado (emulsión o nanopartículas zeína-lectina), atribuido a su naturaleza hidrófoba que modifica la permeabilidad de las membranas y restringe la liberación de agua y por ende su pérdida a través de la superficie del producto (Viacava et al., 2018). En la Figura 45 se muestra el diagrama de Pareto para la pérdida de masa.



**Figura 45.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la pérdida de masa.

Se encontró que las nanopartículas cargadas con aceite esencial de tomillo (NC) es el líquido de inmersión con mayor significancia en el procesamiento de papa fresca cortada.

La papa es considerada como un producto no poroso, con sólo un 2% de espacio intercelular en su tejido, la formación de canales y modificaciones a su estructura por el efecto de la cavitación mediante ultrasonido requiere frecuencias elevadas, que puedan incorporar alta cantidad de energía a su matriz de acuerdo a Schössler et al. (2012), por lo que la potencia de 10 W disminuye el efecto del procesamiento en el daño de la papa, al mostrar menor significancia que las otras variables respuesta.

### 3.3.4. Variación de conductividad eléctrica (Permeabilidad de la membrana)

En la Tabla 5 se muestran las variaciones en conductividad eléctrica para los diferentes tratamientos. Al evaluar la variación de conductividad eléctrica, producida por la liberación de iones a través de la membrana en las células de la papa, se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los valores obtenidos posterior al procesamiento y al finalizar el almacenamiento. El mayor cambio en conductividad eléctrica lo presentaron las muestras infiltradas con nanopartículas sin ultrasonido (NP) con un valor inicial de  $34.11 \pm 1.19\%$  y final de  $62.92 \pm 0.96\%$ .

**Tabla 5.** Variación de conductividad eléctrica (%).

Muestra	Días de almacenamiento				
	0	5	10	15	20
Control	23.21 $\pm$ 1.48 <sup>a,a</sup>	37.94 $\pm$ 5.99 <sup>a,b</sup>	23.73 $\pm$ 1.77 <sup>a,a</sup>	36.32 $\pm$ 0.29 <sup>a,b</sup>	51.78 $\pm$ 5.91 <sup>a,c</sup>
US	20.47 $\pm$ 1.62 <sup>a,a</sup>	48.06 $\pm$ 5.14 <sup>b,b</sup>	23.2 $\pm$ 1.94 <sup>a,a</sup>	31.98 $\pm$ 5.52 <sup>b,c</sup>	52.72 $\pm$ 4.28 <sup>a,d</sup>
T	27.69 $\pm$ 3.22 <sup>b,a</sup>	37.71 $\pm$ 4.71 <sup>a,b</sup>	26.41 $\pm$ 2.87 <sup>b,a</sup>	38.52 $\pm$ 2.98 <sup>a,b</sup>	39.63 $\pm$ 1.2 <sup>b,b</sup>
T/US	30.99 $\pm$ 2.2 <sup>b,a</sup>	39.12 $\pm$ 5.56 <sup>a,b</sup>	30.96 $\pm$ 10.79 <sup>b,a</sup>	39.69 $\pm$ 5.3 <sup>a,b</sup>	42.59 $\pm$ 10.62 <sup>c,b</sup>
NP	34.11 $\pm$ 1.19 <sup>c,a</sup>	40.2 $\pm$ 0.14 <sup>a,b</sup>	49.16 $\pm$ 0.2 <sup>c,c</sup>	53.63 $\pm$ 2.00 <sup>c,d</sup>	62.92 $\pm$ 0.96 <sup>d,e</sup>
NP/US	22.39 $\pm$ 0.11 <sup>a,a</sup>	37.87 $\pm$ 0.37 <sup>a,b</sup>	39.99 $\pm$ 1.55 <sup>d,b</sup>	45.02 $\pm$ 0.38 <sup>d,c</sup>	46.58 $\pm$ 0.77 <sup>c,c</sup>
NC	29.17 $\pm$ 6.78 <sup>b,a</sup>	40.26 $\pm$ 1.38 <sup>a,b</sup>	41.7 $\pm$ 1.91 <sup>d,b</sup>	42.83 $\pm$ 3.21 <sup>a,b</sup>	49.79 $\pm$ 4.65 <sup>a,c</sup>
NC/US	31 $\pm$ 2.42 <sup>b,a</sup>	45.68 $\pm$ 1.03 <sup>b,b</sup>	33.1 $\pm$ 0.11 <sup>b,a</sup>	36.71 $\pm$ 4.54 <sup>a,d</sup>	50.0 $\pm$ 0.12 <sup>a,e</sup>

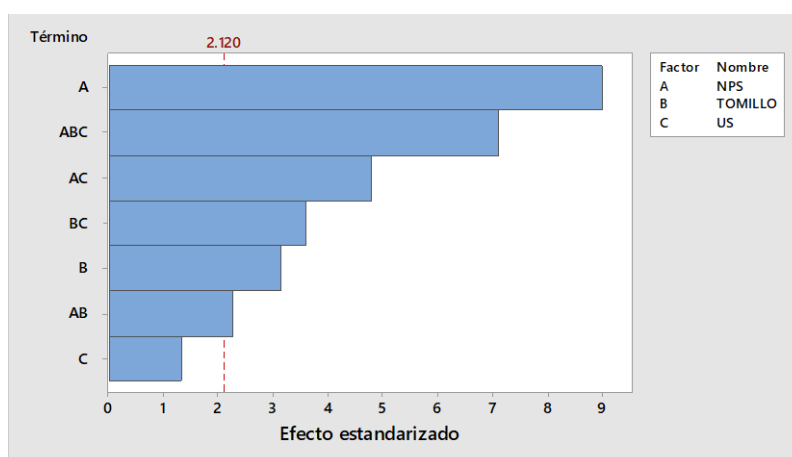
Las letras diferentes a la izquierda muestran diferencias entre columnas (tratamientos); letras diferentes a la derecha representan diferencias entre filas (días de almacenamiento),  $\pm$  desviación estándar.



El incremento en la variación de conductividad eléctrica y por lo tanto de la permeabilidad de membrana mostró valores máximos al término del almacenamiento (día 20) para todos los tratamientos.

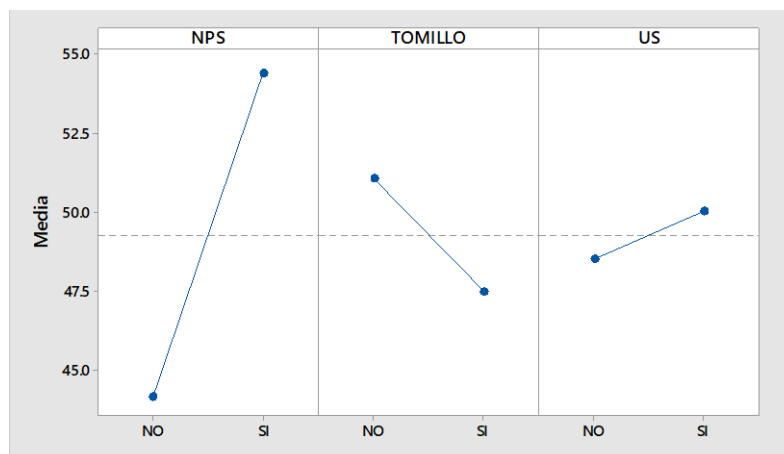
Las muestras de nanopartículas con aceite esencial de tomillo (NC) y aquellas que fueron infiltradas por ultrasonido (NC/S), mostraron menores variaciones en función al tiempo de almacenamiento durante los primeros 15 días, lo que implica que la liberación controlada del aceite de tomillo hacia la matriz de la papa, producida por las nanopartículas, mantiene la permeabilidad de la membrana viéndose reflejada en la conductividad eléctrica.

En la Figura 46 se muestra el efecto de los factores sobre la variación de la conductividad eléctrica, se aprecia un mayor efecto dado por las nanopartículas, seguida por la interacción entre las nanopartículas, aceite de tomillo y empleo de ultrasonido (NC/US).



**Figura 46.** Diagrama de Pareto para la variación de conductividad eléctrica.

En la Figura 47 se aprecia que al emplear las nanopartículas y el ultrasonido como tratamiento se promovió el aumento de la variación de la conductividad eléctrica y con ello el daño estructural que facilitó la pérdida de iones, esto es debido al efecto de la cavitación que promueve la formación de radicales a partir del agua ( $H_2O \rightarrow \cdot OH + \cdot H$ ) y en presencia de la lecitina de la superficie de las nanopartículas se favorecen reacciones de peroxidación, afectando los lípidos de la membrana, modificando su permeabilidad y facilitar la liberación de sustancias intracelulares (Feng et al., 2011).



**Figura 47.** Modificaciones de la conductividad eléctrica.

También en la Figura 47 se aprecia que la presencia de aceite esencial de tomillo promueve la inhibición de la formación de radicales que generen daño en la membrana, disminuyendo los efectos del deterioro durante el almacenamiento, presentando menor liberación de iones en la de membrana. La actividad antioxidante del aceite de tomillo es debida a la presencia de compuestos fenólicos, principalmente carvacrol y timol (Damodaran et al., 2008).

### 3.3.5. Almidón/ Glucosa

El almidón es un carbohidrato complejo, formado por cadenas de  $\alpha$ -amilosa y amilopectina, que forma parte de los carbohidratos de reserva de los tubérculos y representa cerca del 88% de los carbohidratos totales en la papa; se ubica en los plástidos (leucoplastos) dentro de las células vegetales. Durante el almacenamiento se promueve la formación de azúcares reductores, glucosa y fructuosa, por el rompimiento de enlaces por parte de diversas enzimas, siendo la amilasa la principal de ellas, reduciendo el valor del producto (Jakubowski, 2019).

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de concentración de almidón en la papa y sus variaciones durante el almacenamiento. La concentración promedio de todas las muestras experimentales de papa del almidón fue de  $12.07 \pm 1.58\%$  y se mostró una disminución hasta llegar a un valor promedio de  $7.49 \pm 2.52\%$ .

**Tabla 6.** Concentración de almidón en la papa (%).

Muestra	Días de almacenamiento		
	0	10	20
Control	14.01 ± 0.01 <sup>a,a</sup>	11.69 ± 0.02 <sup>a,b</sup>	7.04 ± 0.02 <sup>a,c</sup>
US	12.48 ± 0.01 <sup>b,a</sup>	12.9 ± 0.05 <sup>b,a</sup>	9.56 ± 0.09 <sup>b,b</sup>
T	11.3 ± 1.57 <sup>b,a</sup>	9.06 ± 0.02 <sup>c,b</sup>	5.62 ± 1.04 <sup>c,c</sup>
T/S	9.51 ± 0.03 <sup>c,a</sup>	6.42 ± 0.08 <sup>d,b</sup>	5.36 ± 0.11 <sup>c,c</sup>
NP	10.47 ± 0.01 <sup>c,a</sup>	8.85 ± 0.02 <sup>c,b</sup>	8.26 ± 0.01 <sup>d,b</sup>
NP/S	13.93 ± 0.03 <sup>b,a</sup>	11.98 ± 2.73 <sup>a,b</sup>	10.18 ± 0.06 <sup>b,b</sup>
NC	12.18 ± 0.01 <sup>b,a</sup>	7.68 ± 0.04 <sup>e,b</sup>	7.19 ± 0.03 <sup>a,b</sup>
NC/S	12.65 ± 0.39 <sup>b,a</sup>	9.23 ± 0.03 <sup>c,b</sup>	8.75 ± 0.07 <sup>d,b</sup>

Las letras diferentes a la izquierda muestran diferencias entre columnas (tratamientos); letras diferentes a la derecha representan diferencias entre filas (días de almacenamiento) con un nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ),  $\pm$  desviación estándar.

La variación en la concentración de almidón y glucosa en productos almacenados están relacionadas con la permeabilidad de membrana y daño a la estructura celular. En este estudio, se encontró una correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ) de la variación de conductividad eléctrica y por lo tanto de la permeabilidad con la glucosa (0.701), mientras que con el contenido en almidón la relación fue negativa (-0.714). Esto implica que un incremento en la permeabilidad de membrana permite una mayor liberación de almidón de los plástidos al interior de la célula y posteriormente al medio externo, permitiendo quede expuesta la molécula a reacciones de hidrólisis enzimática, como fue establecido por Jakubowski (2019). Los resultados obtenidos para el incremento de la concentración de glucosa durante el almacenamiento se muestran en la Tabla 7.

Los efectos principales para la producción de glucosa presentaron el mismo sentido y significancia que para el incremento de la variación de conductividad eléctrica, siendo la presencia del aceite de tomillo la variable con mayor significancia, ya que permite inhibir la actividad enzimática y por ende la formación de glucosa. En estudios como Cengiz et al. (2015) se ha probado que el carvacrol y el timol inhiben la actividad de las enzimas involucradas en la hidrólisis de los enlaces del almidón,  $\alpha$ -amilasa y glucosidasas.

**Tabla 7.** Concentración de glucosa en la papa (%).

Muestra	Días de almacenamiento		
	0	10	20
Control	0.006 ± 0.001 <sup>a,a</sup>	0.011 ± 0.001 <sup>a,b</sup>	0.027 ± 0.001 <sup>a,c</sup>
US	0.013 ± 0.001 <sup>b,a</sup>	0.013 ± 0.002 <sup>a,a</sup>	0.025 ± 0.001 <sup>a,b</sup>
T	0.005 ± 0.001 <sup>a,a</sup>	0.011 ± 0.001 <sup>a,b</sup>	0.014 ± 0.002 <sup>b,c</sup>
T/US	0.005 ± 0.001 <sup>a,a</sup>	0.009 ± 0.001 <sup>b,b</sup>	0.014 ± 0.002 <sup>b,c</sup>
NP	0.012 ± 0.001 <sup>b,a</sup>	0.014 ± 0.001 <sup>c,b</sup>	0.038 ± 0.001 <sup>c,c</sup>
NP/US	0.010 ± 0.001 <sup>b,a</sup>	0.011 ± 0.001 <sup>a,a</sup>	0.039 ± 0.001 <sup>c,b</sup>
NC	0.014 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.016 ± 0.001 <sup>d</sup>	0.030 ± 0.002 <sup>d</sup>
NC/US	0.009 ± 0.001 <sup>d,a</sup>	0.017 ± 0.001 <sup>d,b</sup>	0.057 ± 0.002 <sup>e,c</sup>

Las letras diferentes a la izquierda muestran diferencias entre columnas (tratamientos); letras diferentes a la derecha representan diferencias entre filas (días de almacenamiento) con un nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ),  $\pm$  desviación estándar.

En las muestras tratadas con ultrasonido se obtuvo una alta producción de glucosa ( $0.025 \pm 0.001\%$ ) en comparación con las otras muestras, sin embargo, reporta una menor variación en la concentración del almidón al compararse al inicio y final del almacenamiento ( $2.92 \pm 1.26\%$ ), esto es debido a su efectividad como tratamiento antifúngico en la papa.

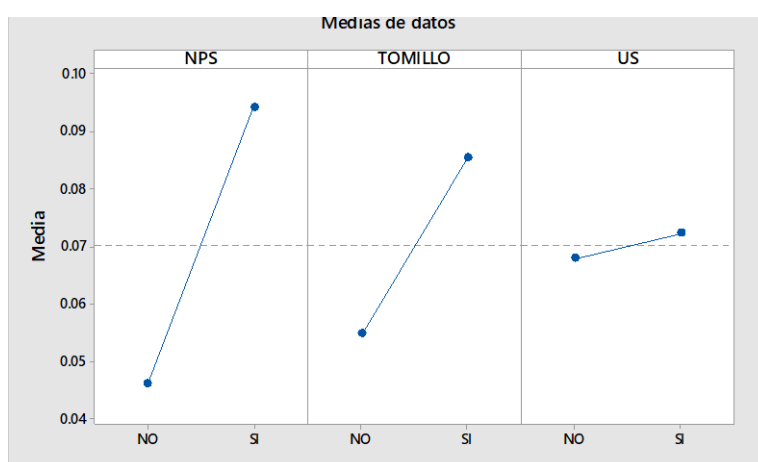
Las muestras tratadas con nanopartículas presentaron menor disminución en la concentración del almidón  $2.21 \pm 0.02\%$  (NP) y  $3.75 \pm 0.06\%$  (NP/US), esto se debe a la formación de interacciones mediante fuerzas de Van der Waals con el almidón, inhibiendo su deterioro químico y enzimático, esto concuerda con lo reportado por Feng et al. (2011).

### 3.3.6. Actividad fenilalanina amonio-liasa

La enzima FAL es la responsable de catalizar la reacción donde la l-fenilalanina sufre una desaminación para formar ácido-trans-cinámico, primer intermediario en la vía de formación de los fenilpropanoides, empleados para sintetizar diferentes polifenoles como las ligninas y flavonoides (Kováčik y Klejdus, 2012).

La FAL se activa cuando el tejido vegetal se encuentra expuesto al estrés celular por presencia de patógenos, descenso en la temperatura y variación de la luz, resultando en una acumulación de los compuestos fenólicos (Kováčik y Klejdus, 2012).

La actividad de la enzima FAL tuvo variaciones significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) al presentarse cambios en la producción de ácido-trans-cinámico. En la Figura 48 se muestra que la presencia de nanopartículas y aceite esencial de tomillo promueve un incremento en la actividad FAL, mientras que el tratamiento con ultrasonido no mostró una variación significativa.



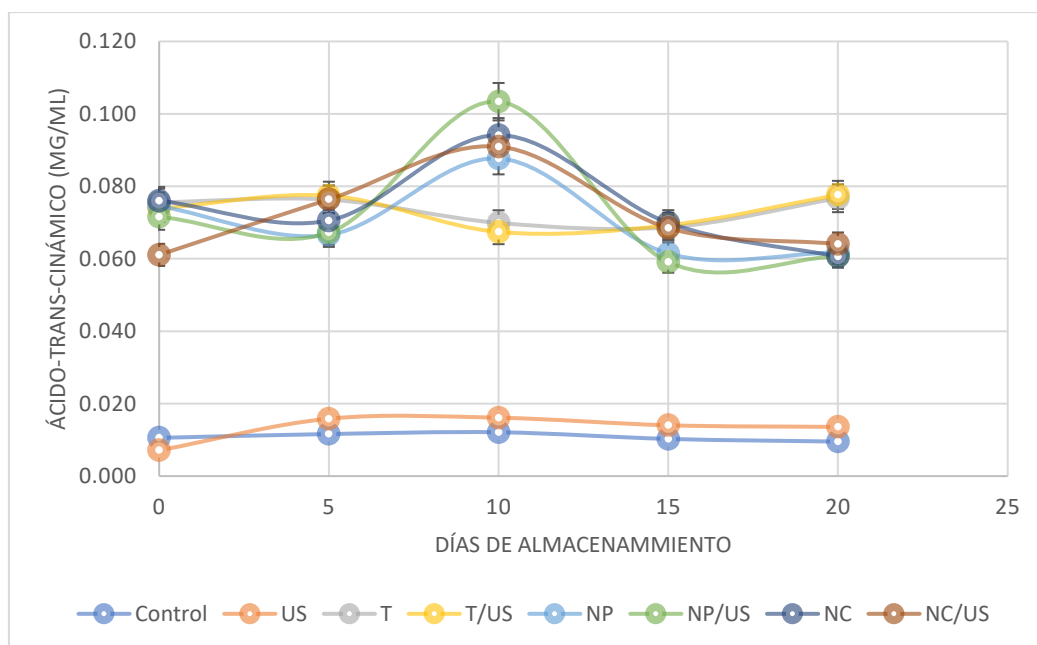
**Figura 48.** Gráfica de efectos principales para FAL.

La adición de fenoles a productos de origen vegetal mínimamente procesados estimula la actividad FAL al promover la polimerización con fenoles ya presentes en la pared celular, originando procesos de protección mediante la lignificación, además de actuar como compuesto de señalización, al generar una señal de estrés en el tejido (Meluci et al., 2016).

En la Figura 49 muestra el perfil de producción de ácido-trans-cinámico durante el almacenamiento, encontrándose que en aquellas muestras donde se incorporó un agente externo (aceite de tomillo o nanopartículas) incrementó la actividad enzimática de la FAL.

Se obtuvo una mayor producción de ácido-trans-cinámico al décimo día de almacenamiento en las muestras incorporadas con nanopartículas. Esto puede deberse a una desestabilización del sistema nanoparticulado que generó estrés en los tejidos, además de presentarse una mayor liberación de aceite esencial de tomillo durante el

quinto y décimo día de almacenamiento por las nanopartículas con agente activo incorporado (NC); mientras que en las muestras donde se incorporó el aceite esencial de tomillo en emulsión la producción de ácido-trans-cinámico se mantuvo constante durante el almacenamiento.



**Figura 49.** Producción de ácido-trans-cinámico durante el almacenamiento.

La muestra control y aquella donde sólo se aplicó el ultrasonido no presentó una producción significativa de ácido-trans-cinámico al comparar con las demás muestras, a pesar del mayor incremento en la permeabilidad de su membrana,  $51.78 \pm 5.91\%$  y  $52.72\% \pm 4.28$  para aplicación de ultrasonido respectivamente, resultando en un mayor daño. Por lo tanto, se puede establecer que la incorporación de polifenoles, a través del aceite de tomillo o el empleo de un sistema nanoparticulado es importante para estimular la actividad FAL como fue reportado por Kováčik y Klejdus (2012).

Al activarse la FAL como mecanismo de defensa a estímulos ambientales, se encontró una relación significativa ( $p \leq 0.05$ ) con la pérdida de masa donde a una mayor producción de ácido-trans-cinámico hay una menor pérdida de masa, por la posible polimerización de polifenoles en la pared y membrana celular que inhiban la pérdida de humedad, concordando con lo establecido por Meluci et al. (2016).

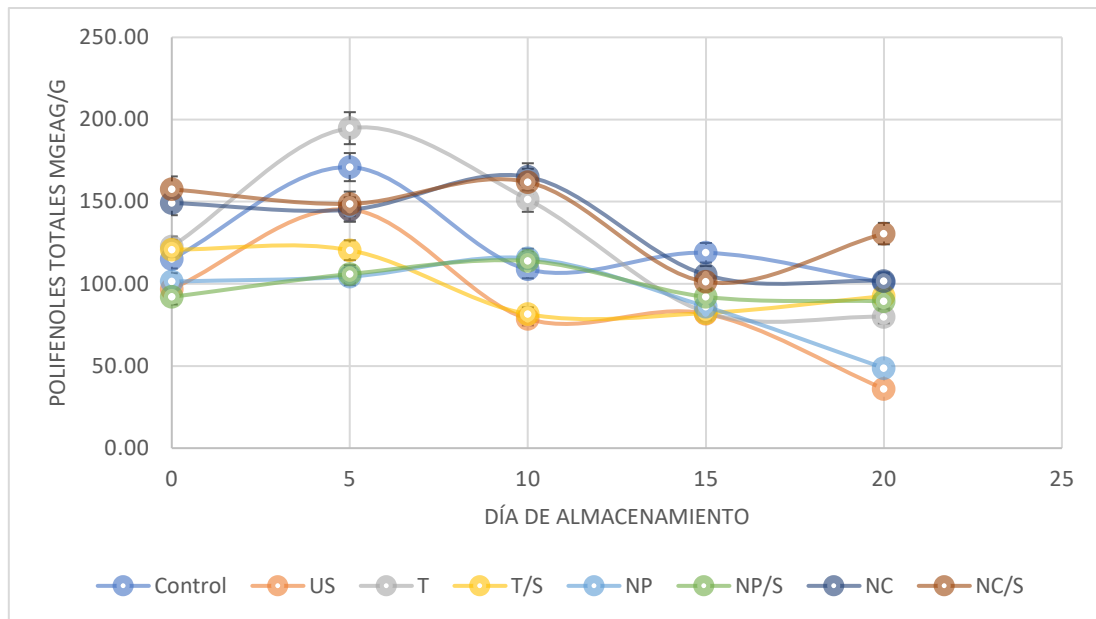
### 3.3.7. Polifenoles totales

Al ser los polifenoles producto de la vía metabólica de los fenilpropanoides existe una correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ) con la producción del ácido-trans-cinámico, establecida en el día de máxima producción de ambos compuestos.

Al igual que durante la evaluación de la actividad en la enzima FAL, existe una relación negativa significativa entre la concentración de polifenoles totales y la pérdida de humedad. Esto debido al efecto de la disminución de la actividad de agua del alimento al incrementar la concentración de compuestos hidrofóbicos, capaces de formar una barrera a la evaporación del agua, así como del efecto de la polimerización de los polifenoles, produciendo ligninas que puedan evitar la migración de agua intracelular al exterior, como fue establecido por Viacava et al. (2018).

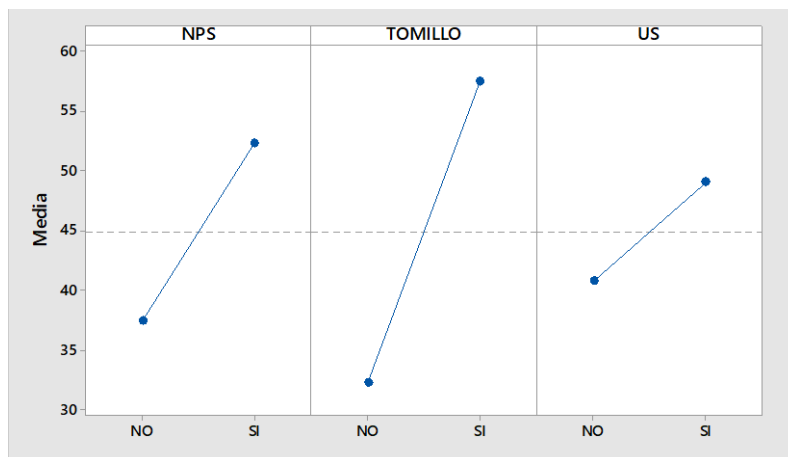
Al analizar la máxima concentración de polifenoles existe una relación significativa ( $p \leq 0.05$ ) con todas las variables del proceso, siendo la más significativa la incorporación de aceite de tomillo. En la Figura 50 se muestra que al emplearse en emulsión el aceite esencial de tomillo (T) se alcanzó un pico máximo de  $194.73 \text{ mgEAG/mg} \pm 1.05$  el quinto día de almacenamiento, mismo día que mostró la mayor producción de ácido-trans-cinámico a estas condiciones, esto debido a la mayor biodisponibilidad de los fenoles del tomillo durante los primeros días del almacenamiento, mientras que al incorporarse el aceite esencial de tomillo mediante nanopartículas (NC) se obtuvo una menor concentración ( $165.12 \text{ mgEAG/mg} \pm 0.96$ ) debida a la liberación controlada del aceite de tomillo, al inhibir la volatilización del aceite de tomillo (Viacava et al. (2018).

Las muestras tratadas con nanopartículas sin aceite de tomillo fueron las que menor concentración de polifenoles presentaron al inicio del almacenamiento, sin embargo, el estrés de la incorporación de las nanopartículas permitió su formación y liberación, manteniendo una menor variación en la concentración durante el almacenamiento a comparación de la muestra control, que presentó un descenso significativo en la producción de los polifenoles totales.



**Figura 50.** Producción de fenoles totales durante el almacenamiento.

En la Figura 51 se muestra que con la aplicación del ultrasonido en la papa blanca fresca cortada se promueve la producción de fenoles totales, esto se debe a que este tratamiento permite la liberación extracelular de los polifenoles (Cabeza-Serrano et al., 2009).



**Figura 51.** Gráfica de efectos principales para fenoles totales.

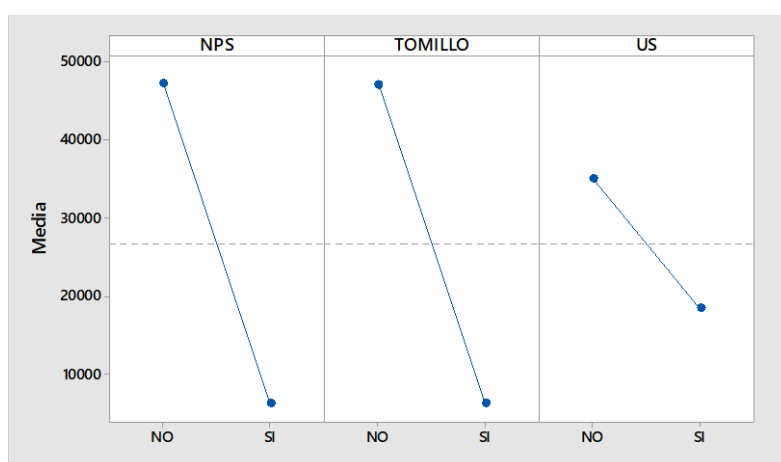
También se mostró una relación significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los polifenoles con el menor número de UFC/ml para los cultivos de coliformes totales, bacterias aerobias y levaduras/hongos. Esto debido a que los polifenoles pueden interactuar con la membrana celular de los microorganismos, deteriorándola y liberando el contenido del citoplasma al exterior, como lo describe Jakubowski (2019).



### 3.3.8. Evaluación de calidad microbiológica

Se evaluó el crecimiento microbiológico en las muestras de papa durante su almacenamiento, midiendo la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro de extracto de papa (UFC/ml). Se presentó una disminución significativa en el desarrollo de UFC para coliformes totales, bacterias aerobias y levaduras al implementarse pretratamientos en la papa mínimamente procesada al comparar con la muestra control.

La reducción de microorganismos es resultado de la oxidación y daño a los organelos celulares, así como la inhibición de la actividad enzimática en levaduras, resultando en envejecimiento acelerado; mientras que los daños generados a la membrana celular, promueven desgarre y liberación de compuestos intracelulares que afectan principalmente a las bacterias (Jakubowski, 2019). En la Figura 52 se muestra el efecto que tuvieron en la inhibición en la producción de UFC de los microorganismos con el empleo de nanopartículas, aceite esencial de tomillo y ultrasonido sobre las muestras de papa. Este comportamiento se obtuvo tanto para coliformes totales, bacterias aerobias y levaduras/hongos.



**Figura 52.** Gráfica de efectos principales para bacterias aerobias, donde SI indica el efecto obtenido al emplear las tecnologías a evaluar y NO su ausencia.

En la Tabla 8 se muestran los resultados del incremento en la UFC/ml durante el almacenamiento de bacterias aerobias en la papa.

Se encontró una menor presencia de microorganismo al final del almacenamiento al emplearse las nanopartículas con aceite esencial de tomillo y ultrasonido (NC/US), al compararse los resultados a estas condiciones con la muestra control se obtuvo una disminución del crecimiento del 65.60%.

**Tabla 8.** Crecimiento de bacteria aerobias (UFC/ml)  $\pm$  desviación estándar.

Aerobios (UFC/ml)			
Días de almacenamiento	0	10	20
Control	0	1700 $\pm$ 100	12500 $\pm$ 2000
US	60 $\pm$ 20	170 $\pm$ 10	54000 $\pm$ 200
T	60 $\pm$ 10	670 $\pm$ 10	5500 $\pm$ 300
T/US	30 $\pm$ 10	200 $\pm$ 50	4500 $\pm$ 200
NP	0	170 $\pm$ 20	8600 $\pm$ 1500
NP/US	0	230 $\pm$ 10	7700 $\pm$ 600
NC	0	600 $\pm$ 100	4800 $\pm$ 500
NC/US	30 $\pm$ 10	340 $\pm$ 20	4000 $\pm$ 500

Unos de las principales limitantes para emplear compuestos fenólicos como antioxidantes es la baja solubilidad que pueden presentar, sin embargo, la incorporación mediante nanopartículas incrementa su biodisponibilidad, permitiendo disminuir el crecimiento microbiológico, como fue reportado por Yegin et al. (2016).

El ultrasonido presenta un menor efecto sobre la inhibición del desarrollo de bacterias aerobias al compararse con el empleo del aceite esencial de tomillo, tanto en emulsión como en nanopartículas. A pesar de que la cavitación promueve deterioro celular, la menor presencia de estructuras intracelulares en las bacterias las vuelve menos sensibles a este efecto al comparar con las estructuras más complejas de las levaduras, volviéndose más significativo el efecto de los fenoles y las interacciones que generan con los fosfolípidos de las membranas bacterianas, esto concuerda con lo observado por Xue et al. (2015).

Se ha mostrado mayor efectividad de los aceites esenciales en bacterias gram positivas, por su ausencia de membrana externa, aumentando la posible interacción entre fosfolípidos y grupos fosfatos de la membrana citoplasmática; mientras que para bacterias

gram negativas se requiere dosis mayores para inhibir el crecimiento al contar con una doble membrana, con lipopolisacáridos en la capa externa, que impide la penetración de los compuestos fenólicos (Sarikurkcu et al., 2015).

A pesar de que los coliformes son bacilos gram negativos, se encontró una disminución en el crecimiento por debajo de las bacterias aerobias, atribuido a una menor presencia desde el comienzo del almacenamiento. Los resultados en el crecimiento de coliformes totales se muestran en la Tabla 9.

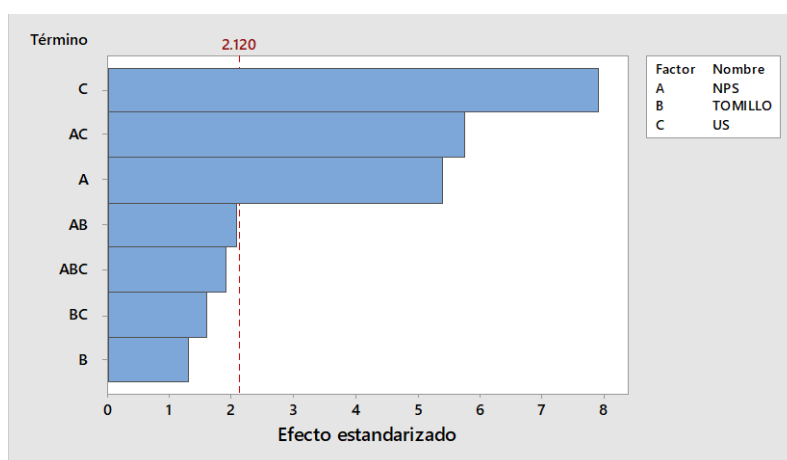
**Tabla 9.** Crecimiento de coliformes totales (UFC/ml)  $\pm$  desviación estándar.

Coliformes			
Días de almacenamiento	0	10	20
Control	0	0	44000 $\pm$ 2000
US	0	0	41000 $\pm$ 1000
T	0	0	4300 $\pm$ 500
T/ US	0	150 $\pm$ 20	4700 $\pm$ 200
NP	0	0	6000 $\pm$ 300
NP/ US	0	0	6000 $\pm$ 500
NC	0	0	4000 $\pm$ 200
NC/ US	0	330 $\pm$ 50	2200 $\pm$ 100

Al igual que en las pruebas con bacterias aerobias, se encontró un menor crecimiento al final del almacenamiento en las muestras donde se infiltró aceite de tomillo nanoparticulado con ultrasonido (NC/US), presentándose 2200 UFC/ml  $\pm$  100, al comparar con la muestra control se obtuvo una inhibición en el crecimiento del 92.73%.

Las muestras donde se aplicaron nanopartículas sin aceite esencial de tomillo (NP) también presentaron actividad antimicrobiana, debido a daño estructural que se pueden promover en la membrana por posibles interacciones con ella y a la formación de radicales de la lecitina que promueven oxidación de los fosfolípidos del exterior de las bacterias (Schössler et al., 2012).

A diferencia de los cultivos bacterianos, el crecimiento de levaduras tuvo una mayor inhibición por el efecto del ultrasonido, como se aprecia en la Figura 53.



**Figura 53.** Diagrama de Pareto para crecimiento de levaduras.

El colapso de burbujas de la cavitación ha sido reportado como promotor de la formación de radicales que interactúan con los organelos y estructuras internas y externas de las levaduras, promoviendo su envejecimiento y muerte celular (Zhang et al, 2014). También existe una relación entre el empleo de nanopartículas y ultrasonido al promoverse la formación de radicales. En la Tabla 10 se muestran los resultados para el crecimiento de levaduras, obteniéndose menores UFC/ml al comparar entre muestras donde se empleó el ultrasonido.

**Tabla 10.** Crecimiento de levaduras (UFC/ml)  $\pm$  desviación estándar.

Levaduras			
Días de almacenamiento	0	10	20
Control	0	10 $\pm$ 0	1600 $\pm$ 100
US	0	0	400 $\pm$ 20
T	0	0	960 $\pm$ 70
T/US	0	0	600 $\pm$ 50
NP	0	30 $\pm$ 10	290 $\pm$ 70
NP/US	0	0	170 $\pm$ 10
NT	3 $\pm$ 1	10 $\pm$ 0	190 $\pm$ 30
NT/US	0	10 $\pm$ 0	100 $\pm$ 10

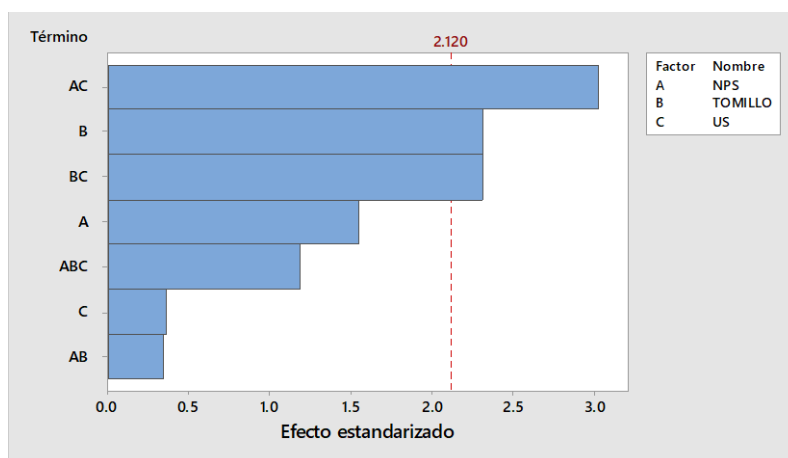
Las levaduras llevan a cabo procesos de fermentación de carbohidratos a bajos niveles de oxígeno liberando CO<sub>2</sub> en el medio, por lo que se existieron relaciones significativas ( $p \leq 0.05\%$ ) con la formación de CO<sub>2</sub> en el envase (0.826) y con la disminución en la concentración del almidón en la papa (0.730).

### 3.3.9. Obscurecimiento enzimático

La enzima polifenol oxidasas (PFO) cataliza la hidroxilación de fenoles y posteriormente los oxida a o-quinonas. Éstas, son especies reactivas capaces de modificar covalentemente a especies nucleofílicas, como las aminas, del interior de las células, conduciendo a la formación de polímeros marrones responsables del obscurecimiento y pérdidas de calidad de frutos y vegetales (Toivonen y Brumell, 2008).

Existió una diferencia significativa en el índice de obscurecimiento (IO) de las muestras durante el almacenamiento, mostrándose un valor de IO en la muestra control de  $30.37 \pm 1.37$ , presentando una variación de  $8.28 \pm 1.33$ , esta variación se origina por la producción de o-quinonas y su polimerización. En la tabla 11 se muestran las variaciones de IO durante el almacenamiento.

En la Figura 54 se muestra una mayor dependencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el desarrollo de obscurecimiento superficial con la aplicación de nanopartículas en presencia del ultrasonido.



**Figura 54.** Diagrama de Pareto para el índice de obscurecimiento.

**Tabla 11.** Índice de obscurecimiento durante el almacenamiento.

Muestra	Días de almacenamiento				
	0	5	10	15	20
Control	22.08 ± 1.48 <sup>a,a</sup>	25.68 ± 2.15 <sup>a,b</sup>	26.30 ± 1.92 <sup>a,b</sup>	28.48 ± 2.22 <sup>a,b</sup>	30.37 ± 1.85 <sup>a,c</sup>
US	19.87 ± 0.55 <sup>b,a</sup>	20.71 ± 0.47 <sup>b,b</sup>	21.28 ± 0.52 <sup>b,b</sup>	21.91 ± 0.27 <sup>b,b</sup>	22.76 ± 0.93 <sup>b,c</sup>
T	18.22 ± 4.39 <sup>b,a</sup>	22.53 ± 1.88 <sup>b,a</sup>	23.86 ± 3.25 <sup>b,a</sup>	26.69 ± 3.72 <sup>a,b</sup>	29.44 ± 4.09 <sup>a,c</sup>
T/S	16.34 ± 0.19 <sup>c,a</sup>	20.71 ± 2.56 <sup>b,b</sup>	21.28 ± 2.21 <sup>b,b</sup>	21.91 ± 3.46 <sup>b,b</sup>	29.56 ± 0.38 <sup>a,c</sup>
NP	18.96 ± 1.44 <sup>b,a</sup>	20.78 ± 0.59 <sup>b,a</sup>	21.71 ± 0.79 <sup>b,a</sup>	22.68 ± 0.86 <sup>b,b</sup>	24.38 ± 1.81 <sup>c,c</sup>
NP/S	20.91 ± 3.00 <sup>b,a</sup>	21.31 ± 2.43 <sup>b,a</sup>	22.64 ± 2.07 <sup>b,a</sup>	23.51 ± 1.17 <sup>b,a</sup>	26.09 ± 0.56 <sup>d,c</sup>
NC	15.82 ± 3.81 <sup>c,a</sup>	18.36 ± 3.74 <sup>b,a</sup>	21.77 ± 2.87 <sup>b,b</sup>	24.12 ± 2.68 <sup>c,b</sup>	25.31 ± 2.92 <sup>d,b</sup>
NC/S	19.40 ± 3.95 <sup>b,a</sup>	21.77 ± 1.46 <sup>b,a</sup>	23.67 ± 2.18 <sup>b,b</sup>	25.72 ± 2.54 <sup>c,b</sup>	29.51 ± 3.67 <sup>a,c</sup>

Las letras diferentes a la izquierda muestran diferencias entre columnas (tratamientos); letras diferentes a la derecha representan diferencias entre filas (días de almacenamiento) con un nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ),  $\pm$  desviación estándar.

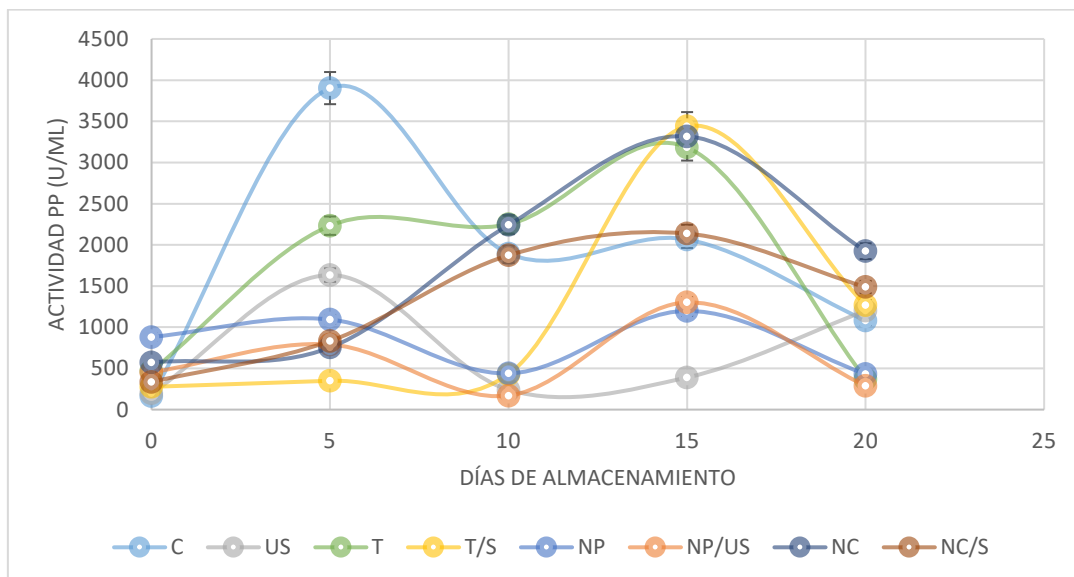
Las papas tratadas con ultrasonido presentaron un valor de IO al final del almacenamiento de  $22.76 \pm 0.93$ , sin embargo, mostraron una variación menor en el valor de IO ( $2.89 \pm 0.69$ ), mostrando la efectividad del tratamiento para inhibir el obscurecimiento debido a la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PFO), que sufre desnaturalización por este proceso a pesar de una mayor liberación de la enzima y compuestos fenólicos por la disrupción de la membrana, sin embargo, en las muestras donde se aplicaron nanopartículas y aceite de tomillo se incrementó el valor de IO y la variación del mismo.

Como se ha mencionado previamente, la incorporación de agentes externos a la matriz de la papa puede originar estrés, aumentando la actividad enzimática como mecanismo de defensa, Jukanti (2017) ha reportado que la presencia de ácidos grasos libres promueve la activación de la PFO. Altos valores de IO al emplear ultrasonido y nanopartículas son debido a la desestabilización del composito zeína-lecitina que promueve la formación de radicales, activando el mecanismo de defensa celular, como lo describe Jukanti (2017), además, de promover interacciones para la formación de o-quinonas.

Las muestras tratadas con aceite de tomillo en emulsión presentan un mayor obscurecimiento al promoverse la formación de fenoles por parte de las células vegetales,

mientras que si se incorporan en nanopartículas su exposición a los tejidos se hace de manera controlada, inhibiendo acción de la enzima PFO, permitiendo actúen como antioxidantes e inhibir la formación de radicales, manteniendo constante su concentración en el medio, tal como fue planteado por Viacava et al. (2018). Esto se puede comprobar con la disminución en la variación de IO al emplear aceite nanoparticulado (NC),  $5.41 \pm 1.20$  sin ultrasonido y  $5.18 \pm 1.82$  con ultrasonido, mientras que en las muestras con tomillo en emulsión (T) se obtuvo una mayor variación ( $11.22 \pm 1.94$  y  $13.22 \pm 2.61$  respectivamente).

En la Figura 55 se muestra la variación en la actividad de la enzima PFO respecto al tiempo de almacenamiento de la papa blanca fresca cortada.



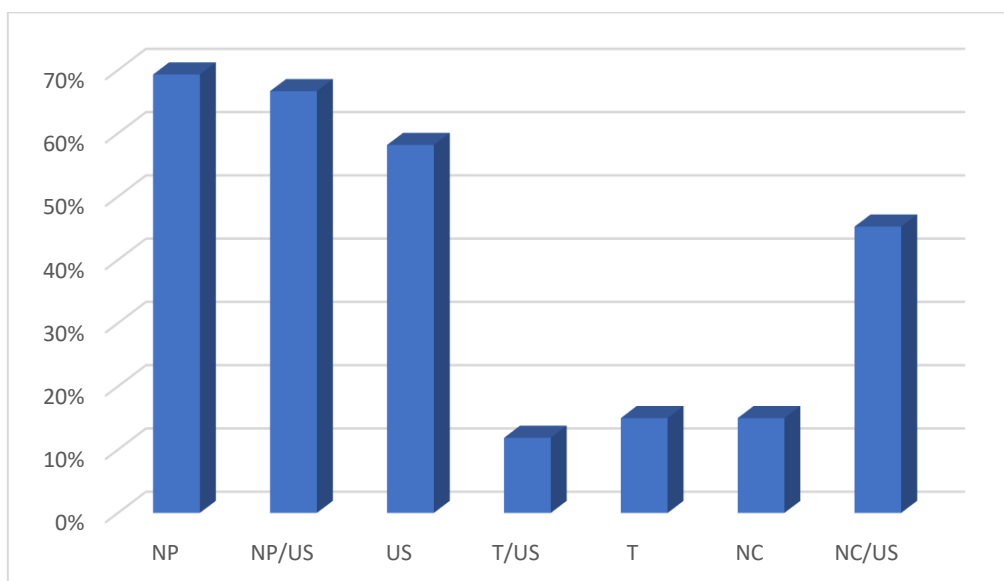
**Figura 55.** Actividad de la enzima polifenol oxidasa durante el almacenamiento.

Al comparar los resultados de IO con la actividad de la enzima PFO se presenta una correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ) de 0.734. Se encontró una mayor actividad de la enzima PFO en la muestra control el quinto día del almacenamiento de  $3,903.33 \text{ U/ml} \pm 546.33$ , ese mismo día se encontró un incremento en la actividad de la enzima para las muestras tratadas con ultrasonido, este pico máximo se anticipó a los demás tratamientos por la falta de incorporación de un sistema antioxidante que pudiera modificar sostenidamente la actividad PFO.

El ultrasonido no sólo se promovió la desnaturalización de la proteína, sino que al generar un mayor daño estructural se pudo incrementar la actividad de la enzima PFO al quinto día de almacenamiento, dando origen a una mayor variación del índice de obscurecimiento durante este periodo ( $0.83 \pm 0.08$ ), disminuyendo para el resto del tiempo de almacenamiento.

En la Tabla 12 (a y b) se puede ver el mayor desarrollo de obscurecimiento al comparar muestras con aceite esencial de tomillo en emulsión (T) con aquellas muestras con aceite en nanopartículas (NC), debido a la mayor biodisponibilidad de los fenoles por ausencia de un polímero barrera, permitiendo su polimerización y oxidación (Rios-Romero et al., 2017). Las muestras que presentaron un mayor grado de obscurecimiento aparente son las papas control y aquellas que fueron tratadas solamente con ultrasonido (US).





















Las muestras que presentaron menor incremento en el índice de obscurecimiento, nanopartículas sin presencia de aceite de tomillo (NP), mostraron una menor actividad enzimática de  $1,198.22 \text{ U/ml} \pm 236.316$  para su incorporación sin ultrasonido y de  $1,301.33 \text{ U/ml} \pm 115.695$ , empleando ultrasonido, esto implica que la inhibición por la inactivación mediante generación de radicales de la lecitina, es más significativa que aquella realizada por la actividad de los fenoles del aceite esencial de tomillo (Gao et al., 2014). Los resultados se muestran en la Figura 56.























**Figura 56.** Porcentaje de inhibición de la enzima PFO por tratamiento.



**Tabla 12a.** Variación en el aspecto de la papa durante su almacenamiento para método de infiltración con y sin aceite de tomillo

Días de almacenamiento	Control	US	T	T/ US
0				
5				
10				
15				
20				

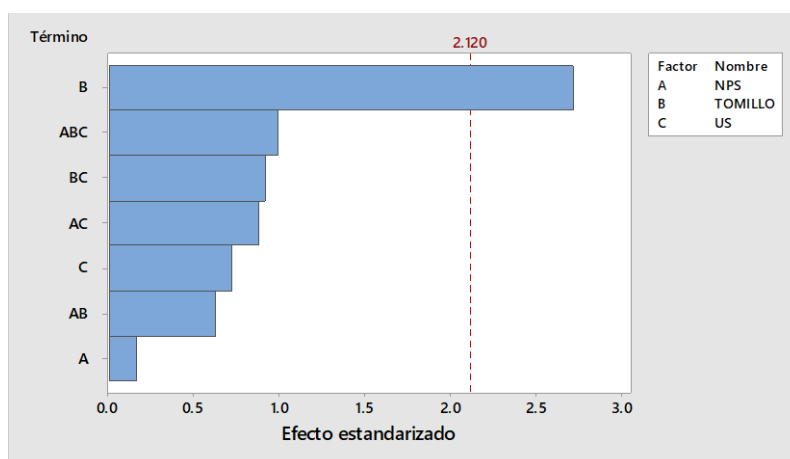
**Tabla 12b.** Variación en el aspecto de la papa durante su almacenamiento por efecto de la incorporación de nanopartículas

Días de almacenamiento	NP	NP/ US	NC	NC/ US
0				
5				
10				
15				
20				

Dentro de las funciones de la PFO se encuentra la defensa a agentes patógenos como insectos y bacterias, esto concuerda con la correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ) mostrada con la aparición de unidades formadoras de colonias en bacterias aerobias y coliformes totales. Las o-quinonas interactúan con proteínas de la membrana bacteriana y promueven la formación de radicales y peróxidos que la deterioran (Jukanti, 2017).

### 3.3.10. Cambios en los parámetros de Color

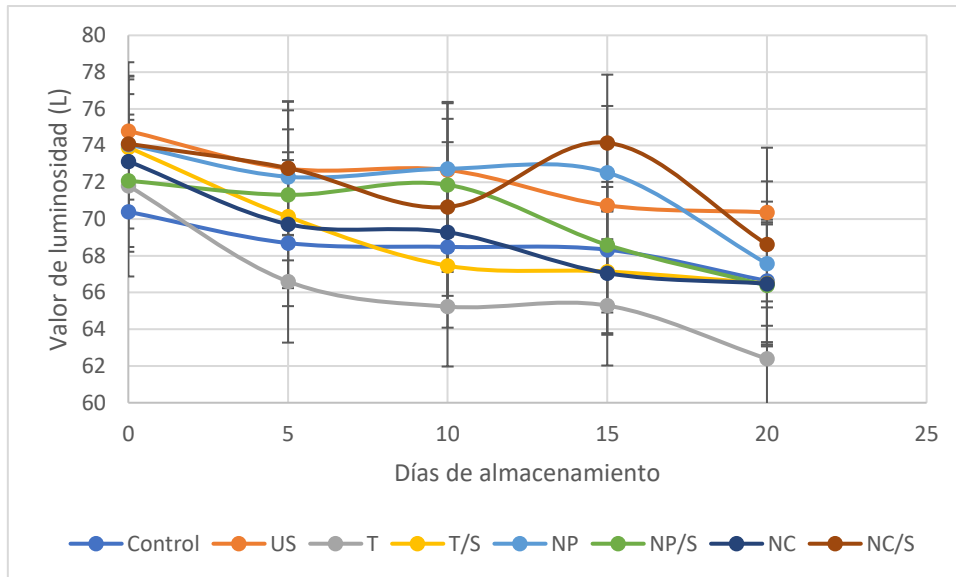
El aumento en el índice de obscurecimiento (IO) modificó los parámetros de color evaluados de forma significativa ( $p \leq 0.05$ ). Siendo la aplicación de aceite esencial de tomillo la variable que modificó los valores de  $L^*$ ,  $H^*$  y  $Cr$ , como se aprecia en la Figura 57, debido a la promoción de formación de compuestos fenólicos propios de la papa y favorecer su polimerización, permitiendo su acumulación en los tejidos superficiales.



**Figura 57.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para  $L^*H^*Cr$ .

También se encontró una relación significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre el aumento de croma (saturación del color), disminución del valor del ángulo Hue (matiz) y el descenso en la luminosidad del producto.

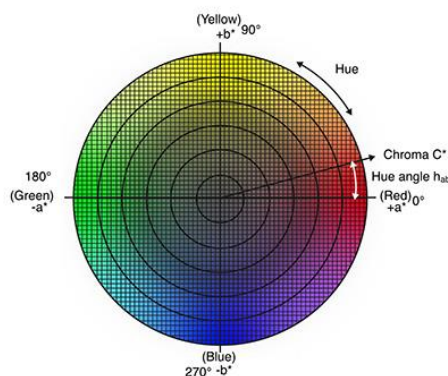
La luminosidad en la superficie de las papas va en decremento para todos los tratamientos por la presencia de compuestos coloreados, que generan el obscurecimiento superficial de los tejidos durante el almacenamiento, originando pérdida de luminosidad, como fue establecido por Zambrano-Zaragoza et al. (2014); esta tendencia se representa en la Figura 58.



**Figura 58.** Variación de luminosidad (L) en la papa durante su almacenamiento.

La muestra infiltrada con tomillo fue la que presentó la mayor disminución ( $9.41 \pm 2.05$ ) y menor valor de  $L^*$  al final del almacenamiento ( $62.47 \pm 3.35$ ), esto se relaciona con la menor inhibición de la actividad de la enzima PFO a comparación de la muestra control (15.0%), además, esta muestra presentó un alto valor de IO ( $29.44 \pm 4.09$ ). La menor variación en luminosidad se presentó en las muestras tratadas con ultrasonido (US) ( $3.76 \pm 0.67$ ), presentando un menor valor de IO, debido a la desactivación de la enzima PFO y no promover formación y acumulación de fenoles en los tejidos.

El valor promedio de ángulo Hue (H) para las papas al comienzo de la experimentación fue de  $90.16 \pm 0.62^\circ$ , encontrándose en las coordenadas del color amarillo (Figura 59) y descendió durante el almacenamiento a  $87.52 \pm 1.24^\circ$ , acercándose al color naranja ( $45.0^\circ$ ), esto demuestra la acumulación de pigmentos en la superficie.



**Figura 59.** Escala de color CIE  $L^*H^*Cr$ .

Se encontró concordancia entre los valores de H con los obtenidos para IO, los resultados se muestran en la Tabla 13. Se obtuvo una mayor variación de H en las muestras con aceite esencial de tomillo de  $5.05 \pm 1.13^\circ$ , alcanzando el menor valor de  $85.72 \pm 2.13^\circ$ .

**Tabla 13.** Variación de H durante el almacenamiento  $\pm$  desviación estándar.

Días	0	5	10	15	20
Control	$89.10 \pm 0.70$	$88.18 \pm 1.11$	$88.25 \pm 1.69$	$87.41 \pm 0.98$	$86.44 \pm 0.94$
US	$90.85 \pm 1.05$	$90.41 \pm 1.45$	$89.65 \pm 0.45$	$89.63 \pm 1.40$	$88.97 \pm 2.10$
T	$90.77 \pm 0.92$	$90.34 \pm 0.48$	$86.64 \pm 0.43$	$88.86 \pm 1.53$	$85.72 \pm 2.13$
T/US	$90.82 \pm 0.48$	$90.65 \pm 0.19$	$87.73 \pm 0.17$	$89.29 \pm 0.15$	$87.29 \pm 0.72$
NP	$89.95 \pm 0.68$	$88.60 \pm 0.39$	$89.10 \pm 1.07$	$89.23 \pm 0.82$	$88.51 \pm 0.54$
NP/US	$90.04 \pm 0.89$	$89.69 \pm 1.00$	$89.31 \pm 1.71$	$89.24 \pm 0.76$	$88.62 \pm 2.76$
NC	$89.96 \pm 0.90$	$88.84 \pm 1.01$	$87.90 \pm 0.99$	$89.01 \pm 0.63$	$87.32 \pm 2.07$
NC/US	$89.82 \pm 0.79$	$89.05 \pm 1.17$	$87.92 \pm 0.71$	$89.15 \pm 0.20$	$87.27 \pm 1.83$

Las muestras con menor incremento en el valor de H fueron aquellas con menores valores de IO y mayor inhibición de la enzima PFO; las muestras con ultrasonido presentan una variación de  $1.88 \pm 0.15^\circ$ , mientras que al usar nanopartículas (NP) se obtuvieron variaciones de  $1.44 \pm 0.54^\circ$  y  $1.42 \pm 0.76^\circ$  (al aplicar ultrasonido, NP/US).

La acumulación de pigmentos no sólo modificó el matiz, sino que la polimerización de los polifenoles implica la saturación del color, por la concentración de los pigmentos, incrementando el valor de Cromo, los resultados se muestran en la Tabla 14.

Con estos resultados se puede concluir que el índice de obscurecimiento (IO) sirve como parámetro en el cambio global de color cuando se evalúan las modificaciones en base a la actividad de la enzima PFO durante el almacenamiento de la papa

**Tabla 14.** Variación de Croma durante el almacenamiento  $\pm$  desviación estándar.

Día	0	5	10	15	20
Control	16.85 $\pm$ 1.19	18.99 $\pm$ 0.49	17.92 $\pm$ 2.62	19.57 $\pm$ 0.37	20.53 $\pm$ 1.19
US	16.51 $\pm$ 0.73	17.98 $\pm$ 0.26	18.03 $\pm$ 0.98	18.25 $\pm$ 0.54	18.61 $\pm$ 0.29
T	14.74 $\pm$ 1.79	15.26 $\pm$ 2.69	18.35 $\pm$ 0.42	16.40 $\pm$ 1.19	19.52 $\pm$ 1.51
T/US	14.63 $\pm$ 0.57	17.87 $\pm$ 3.43	18.12 $\pm$ 1.93	14.95 $\pm$ 1.01	20.77 $\pm$ 0.80
NP	16.21 $\pm$ 0.64	16.97 $\pm$ 1.01	18.19 $\pm$ 0.65	18.06 $\pm$ 1.44	18.81 $\pm$ 0.93
NP/US	16.03 $\pm$ 2.12	17.91 $\pm$ 0.83	18.18 $\pm$ 3.00	18.93 $\pm$ 0.81	19.91 $\pm$ 1.34
NC	14.18 $\pm$ 0.62	17.52 $\pm$ 3.74	16.54 $\pm$ 2.27	16.86 $\pm$ 1.38	18.44 $\pm$ 3.24
NC/US	16.21 $\pm$ 0.77	18.37 $\pm$ 1.70	20.56 $\pm$ 3.25	17.50 $\pm$ 3.00	21.65 $\pm$ 1.60

## CONCLUSIONES

Se determinó que el sistema formado por la interacción entre la zeína y la lecitina es adecuado para la preparación de nanopartículas mediante el proceso de nanoprecipitación, además, tienen la capacidad de actuar como nanoacarreadores al presentar altas eficiencias de encapsulación de aceite esencial de tomillo (superiores al 70%), siendo aptas para su empleo como sistemas de liberación continua de agentes activos durante el almacenamiento refrigerado, ayudando en la conservación de alimentos, manteniendo las características sensoriales y de calidad del producto.

La concentración de lecitina tiene un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) en el tamaño de partícula, atribuido a los enlaces hidrofóbicos formados con la zeína, que junto al empleo de alcohol polivinílico (PVA), previenen fenómenos de desestabilización de las nanopartículas, manteniendo la talla submicrónica de las mismas mediante interacciones estéricas, disminuyendo la influencia de las cargas superficiales, obteniéndose bajos valores de potencial zeta e índice de polidispersidad.

Se seleccionó la concentración de 0.33% de PVA, pH 3.0 y menor concentración de lecitina respecto a la zeína (1:2) por su mayor encapsulación del aceite esencial de tomillo de  $77.02\% \pm 0.84$ , tamaño de partícula ( $495 \pm 7$ ) y un IPD  $0.074 \pm 0.023$ , que refleja una mayor homogeneidad en el tamaño de las nanopartículas.

Al estudiar el ultrasonido como tratamiento para la infiltración de las nanopartículas en la papa blanca fresca cortada se observó que altos valores de potencia de salida (20 W) y concentración de aceite esencial de tomillo nanoparticulado de  $2 \mu\text{l/ml}$  promueven una mayor pérdida de masa por deshidratación, deteriorando la estructura celular y apariencia de la papa, ya que se promueve la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PFO).

Se estableció que el empleo de 10 W y pulsaciones del 70% del ultrasonido son las condiciones de proceso óptimas para la infiltración de aceite esencial de tomillo nanoparticulado a una concentración de  $1 \mu\text{l/ml}$  en papa blanca fresca cortada, generando un sistema antioxidante capaz de inhibir reacciones de oscurecimiento enzimático y pérdida de masa.

Las nanopartículas con aceite esencial de tomillo son efectivas para inhibir el crecimiento de coliformes totales y bacterias aerobias, manteniendo la calidad microbiológica de la papa durante su almacenamiento, al infiltrarse con ultrasonido se promueve la inhibición del crecimiento y aparición de levaduras.

Se observó que las nanopartículas en conjunto con el ultrasonido promueven el estrés y deterioro en la estructura de la papa, siendo la presencia de tomillo importante para inhibir estos efectos, ya que compuestos como timol y carvacrol disminuyen la formación de radicales formados a partir de la lecitina, promoviendo su capacidad antioxidante.

Las nanopartículas no sólo aumentaron la concentración de fenoles por adición debido a la presencia del aceite esencial de tomillo, sino que se incrementó la formación de compuestos fenólicos debido a la activación de la enzima fenil amonio-liasa (FAL), permitiendo la defensa de la célula vegetal e impidiendo la oxidación de estos compuestos por la PFO, esto permitió que se mantuviera la concentración de antioxidantes en el sistema hasta el décimo día de almacenamiento, donde existió un incremento en el índice de obscurecimiento (IO) y mayor variación en los parámetros de color.

Al emplear aceite de tomillo en emulsión se incrementó la actividad antioxidante y efectos sobre los parámetros medidos, sin embargo, su mayor biodisponibilidad no mantuvo sus propiedades antimicrobianas ni antioxidantes durante el almacenamiento, por lo que se puede determinar la importancia de su empleo en nanopartículas, al poseer propiedades de agente barrera y de transporte para agentes activos como los aceites esenciales durante su incorporación a productos alimenticios.



## REFERENCIAS

- Alarcón Hernández, E. (2016). Caracterización interfacial de emulsiones agua-aceite estabilizadas por asfaltenos usando espectometría de masas (*Tesis de Doctorado*). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Bucaramanga, Colombia.
- Amaral, B. C., Benedetti, M., Pujola, I., y Achaerandio, M. L. (2015). Effect of ultrasound on quality of fresh-cut potatoe during refrigerated storage. *Food Engineering Reviews*, 7, 176-184.
- Anandharamakrishnan, C. (2014). *Techniques for nanoencapsulation of food ingredients*. (1st ed.). Nueva York: Springer, 1-16
- Arana Sánchez, A., Estarrón Espinoza, M., Obledo Vázquez, E., Padilla Camberos, E., Silva Vázquez, R., y Lugo Cervantes, E. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of mexican spices essential oils with different composition when microencapsulated. *Applied Microbiology*, 50, 585-590.
- Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Sitterberg, J., Bakowsky, U., y Ravi-Kumar, M. N. (2005). Design of biodegradable nanoparticles: a novel approach to encapsulating poorly soluble phytochemical ellagic acid. *Nanotechnology*, 16(12), 2819-2822.
- Brunchi, C. E., Bercea, M., Moraiu, S., y Avadanei, M. (2016). Investigations on the interactions between xanthan gum and poly(vinyl alcohol) in solid state and aqueous solutions. *European Polymer Journal*, 84, 161-172.
- Cabeza-Serrano, A., Amodio, M., Cornacchia, R., Rinaldi, R., y Colelli, G. (2009). Suitability of five different potato cultivars to be processed as fresh-cut products. *Postharvest Biology and Technology*, 53(3), 138-144.
- Cefola, M., De Antuono, I., Pace, B., Calabrese, N., Carito, A., Linsalata, V., y Cardinalli, A. (2012). Biochemical relationships and browning index for assessing the storage suitability of artichoke genotypes. *Food Research International*, 48, 397-403.
- Cengiz, S., Gokhan, Z., y Mustafa, O. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178-184.
- Ciurzynska, A., Kowalska, H., Czajkowska, K., y Lenart, A. (2016). Osmotic dehydration in production of sustainable and healthy food. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 186-192.
- Comandini, P., Blanda, G., Soto-Caballero, M., Sala, V., Tylewicz, U., Mujica-Paz, H., y Gallina, T. (2013). Effects of power ultrasound on immersion freezing parameters of potatoes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18, 120-125.

- Cosco, D., Paolino, D., De Angelis, F., Cilurzo, F., Celia, C., Di Mazizo, L., y Fresta, M. (2015). Aqueous-core, PE-coated, PLA nanocapsules for an efficient entrapment of water soluble anticancer drugs and a smart therapeutic response. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 89, 445-456.
- Cuiping, Z., Xuejun, X., Yuling, L., y Lin, L. (2012). The preparation of a complex of insulin-phospholipids and their interaction mechanism. *Journal of Peptide Science*, 18(9), 541-548.
- Dai, L., Sun, C., Li, R., Mao, L., Liu, F., y Gao, Y. (2017). Structural characterization, formation mechanism and stability of curcumin in zein-lecithin composite nanoparticles fabricates by antisolvent co-precipitation. *Food Chemistry*, 237, 1163-1171.
- Dai, L., Sun, C., Wang, D., y Gao, Y. (2016). The Interaction between zein and lecithin in ethanol-water solution and characterization of zein-lecithin composite colloidal nanoparticles. *Food Chemistry*, 11(11), 1-20.
- Damodaran, S., Parkin, K., y Fennema, O. (2008). *Fennema's food chemistry*. London: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Donst, F., y Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233, 106-120.
- Duan, X., Lui, T., Zhang, D., Su, X., Lin, H., y Jiang, Y. (2011). Effect of pure oxygen atmosphere on antioxidant enzyme and antioxidant activity of harvest litchi fruit during storage. *Food Research International*, 44, 1905-1911.
- FAO (2004). *Chemical and Technical Assessment, Polyvinilol Alcohol*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-at998e.pdf>
- FAO (2019). *FAOSTAT*. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- Feng, H., Barbosa-Cánovas, G., y Weiss, J. (2011). *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*. Nueva York: Springer.
- Fernandes, F., Gallao, M., y Rodrigues, S. (2008). Effect of osmotic dehydration and ultrasound pre treatment on cell structure. *Food Science and Technology*, 41(4) 604-610.
- Gao, M., Feng, L., y Jiang, T. (2014). Browning inhibition and quality preservation of button mushroom by essential oils fumigation treatment. *Food Chemistry*, 149, 107-113.
- Gonçalves da Rosa, C., Vinicius de Oliveira, M., Maciela, B., Matos de Carvalho, S., y Zapelini de Melo, A. P., Jummesa, B. (2015). Characterization and evaluation of physiochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. *Colloids and Surfaces*, 481, 337-344.
- He, X., Deng, H., y Hwang, H. (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of food drug analysis*, 7, 1-21.

- Hu, K., y Mc Clements, D. J. (2014). Fabrication of surfactant stabilized zein nanoparticles; a pH modulated antisolvent precipitation method. *Food Research International*, 64, 329-335.
- Huaiqiong, C., y Qixin, Z. (2015). A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. *Food Hydrocolloids*, 42, 593-602.
- Huang, Q. (2012). *Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical industries*. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Jakubowski, T. (Junio de 2019). The influence of selected physical methods on the content of starch and simple sugars in stored potato tubers. *Applications of electromagnetic in modern engineering and medicine (PTZE)*. Congreso llevado a cabo en Janów, Polonia.
- Jukanti, A. (2017). *Polyphenol oxidases (PPOs) in plants*. Singapore: Springer.
- Khumalo, K., Tinyane, P., Soundy, P. R., y Sivaakumar, D. (2017). Effect of thyme oil vapour exposure on the brown rot infection PAL activity, phenolic content and antioxidant activity in red and yellow skin peach cultivars. *Scientia Horticulturae*, 214, 95-199.
- Kiani, H., Zhang, Z., y Sun, D. W. (2015). Experimental analysis and modeling of ultrasound assisted freezing of potato spheres. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 321-331.
- Kováčik, J., y Klejdus, B. (2012). Tissue and method specificities of phenylalanine ammonia-lyase assay. *Journal of Plant Physiology*, 169, 1317-1320.
- Liang, J., y Chen, R. (2018). Impact of cross-linking mode on the physical properties of zein/PVA composite films. *Food Packaging and Shelf Life*, 18, 101-106.
- Malgorzata, N., y Malgorzata, W. (2016). Effect of ultrasound treatment on microstructure, colour and carotenoid content in fresh and dried carrot tissue. *Applied Acoustics*, 103, 163-171.
- Martínez Rivasa, C. J., Tarhina, M., Badria, W., Miladia, K., Greige-Gerges, H., Agha-Nazaric, Q., y Álvarez Román, R. (2017). Nanoprecipitation process: from encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532, 66-81.
- McClements, D., y Rao, L. (2011). Food grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate and potential toxicity. *Food Science and Nutrition*, 51(4), 285-330.
- Meluci, D., Puffy, S., Romanazzi, G., y Sivakumar, D. (2016). Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado. *Postharvest Biology and Technology*, 116, 9-17.
- Mengual, O., Meunier, G., Puech, K., y Snabre, P. (1999). Turbiscan MA 2000: Multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50(2), 445-456.

- Mohammad, S., Mousavi, A., y Santana, A. (2018). *Essential oils in food processing*. Oxford: Wiley Blackwell.
- Mora-Huertas, C., Fessi, H., y Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142.
- NMX-FF-022-2002. Productos alimenticios no industrializados para uso humano. Tubérculo, papa (*Solanum tuberosum*). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 9 de agosto de 2002.
- NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aeróbicas en placa. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de diciembre de 1995.
- NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de diciembre de 1995.
- NOM-113-SSA1-1994. Métodos para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de diciembre de 1995.
- Ortega-Rivas, E. (2012). *Non thermal food engineering operations*. Nueva York: Springer.
- Peña, C. B., y Restrepo, L. P. (2013). Compuestos fenólicos y carotenoides en la papa: revisión . *Actualización En Nutrición*, 14(1), 25-32.
- Piorkowski, D. T., y Mc Clements, D. J. (2014). Beverage emulsions: recent developments in formulation, production and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5-41.
- Ranjan-Rawil, S., Dasgupta, N., y Lichfouse, E. (2016). *Nanoscience in food and agriculture*. Nueva York: Springer.
- Rios-Romero, E., Ochoa-Martínez, L., Morales-Castro, J., Bello-Pérez, L., Quintero-Ramos, A., y Gallegos-Infante, J. (2017). Ultrasound in orange sweet potato juice: bioactive compounds antioxidant activity and enzymatic inactivation. *Journal of Food Processing and Preservation* , 42(6),1-8.
- Rojas, M., y Augusto, P. (2018). Ethanol and ultrasound pre-treatments to improve infrared drying of potato. *Innovative Food Science and Technologies*, 49(5),65-75.
- Rojas, M., Alvim, I., y Duarte, P. (2019). Incorporation of microencapsulated hydrophilic and lipophilic nutrients into foods by using ultrasound as a pre-treatment for drying: a prospective study. *Ultrasonics-Sonochemistry*, 54, 153-161.
- Sabliov, C., Chen, H., y Yada, R. (2015). *Nanotechnology and Functional foods*. Hoboken : Wiley Blackwell.

- Sarikurkcuca, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., y Aktumsek, A. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178-184.
- Schössler, K., Thomas, T., y Knorr, D. (2012). Modification of cell structure and mass transfer in potato tissue by contact ultrasound. *Food Research International*, 49(1), 425-431.
- Singh, J., & Kaur, L. (2009). *Advances in potato chemistry and technology*. Oxford: Elsevier.
- Sotelo Boyás, M., Correa Pacheco, Z., Bautista Baños, S., y Gómez, Y. (2017). Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 409-414.
- Spychalla, J. P., y Desborough, S. (1990). Fatty acids, membrane permeability and sugars of stored potato tubers. *Plant Physiology*, 94(3), 1207-1213.
- Storey, M. (2007). *The harvest crop in: potato biology and biotechnology avances and perspectives*. Oxford: Elsevier.
- Sukhonthara, S., Kaewka, K., y Theerakulkait, C. (2016). Inhibitory effect of rice bran extracts and its phenolic compounds on polyphenol oxidase activity and browning in potato and apple puree. *Food Chemistry*, 190, 922-927.
- Sun, D.W., y Li, B. (2003). Microstructural change of potato tissues frozen by ultrasound-assisted immersion freezing. *Journal of Food Engineering*, 57(4), 337-345.
- Teoh, L. S., Lasekan, O., Mohd, N., y Hashim, N. (2016). The effect of ultraviolet treatment enzymatic activity and total phenolics content of minimally processed potato slices. *Food Science and Technology*, 53(7), 3035-3042.
- Thompson, A. (2016). *Fruit and vegetable storage, hypobaric, hyperbaric and controlled atmosphere*. Huddersfield: Springer.
- Toivonen, P., y Brumell, D. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 48(1), 1-14.
- Treutter, D. (2001). Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 71-89.
- Valcarcel, J., Reilly, K., y Gaffney, M. O. (2014). Levels of potential bioactive compounds including carotenoids, vitamin C and phenolic compounds and expression of their cognate biosynthetic vary significantly in different varieties of potato grown uniform cultural conditions. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 96(3), 1018-1026.
- Viacava, G., Ayala-Zavala, J., González-Aguilar, G., y Ansorena, M. (2018). Effect of free and microencapsulated thyme essential oil on quality attributes of minimally processed lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 145, 125-133.

- Volnová, B., Musilová, J., Hrabovska, D., Judith, B., y Kavalconá, K. (2015). The research of total polyphenols content and their changes in different varieties of potatoes. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 15, 181-184.
- Wang, K., Li, G., y Zhang, B. (2018). Opposite results of emulsion stability evaluated by the TSI and the phase separation proportion. *Colloids and Surfaces*, 558, 402-409.
- Wang, X., Sun, H., Sun, J., Zhu, X., Zhang, K., Shen, J., y Cai, X. (2015). Effects of different storage temperature on nutritional quality of potato cultivar. *Agricultural Science and Technology*, 16 (4), 810-814.
- Xie, M., y Dunford, N. (2019). Fractionating of canola lecithin from acid degumming and its effect. *Food Chemistry*, 300, 125-217.
- Xue, J., Davidson, M., y Zhong, Q. (2015). Antimicrobial activity of thyme oil con-nanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 1-8.
- Yegin, Y., Perez-Lewis, K., Zhang, M., Akbulut, M., y Taylor, T. (2016). Development and characterization of geraniol-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 170, 64-71.
- Zambrano-Zaragoza, M., Mercado-Silva, E., Del Real, A., Guitérrez-Cortez, M., Cornejo-Villegas, M., y Quintanar-Guerrero, D. (2014). The effect of nano-coatings with tocopherol and xanthan gum on shelf life and browning index of fresh cut "Red Delicious" apples. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 188-196.
- Zambrano-Zaragoza, M., Mercado-Silva, E., Ramirez-Zamorano, R., Cornejo-Villegas, M., Gutiérrez-Cortez, E., y Quintanar-Guerrero, D. (2013). Use of solid lipid nanoparticles (SLNs) in edible coatings to increase guava (*Psidium guajava* L.) shelf-life. *Food Research International*, 51 (2), 946-953.
- Zambrano-Zaragoza, M. L., Quintanar-Guerrero, D., Del Real, A., Piñon-Segundo, E., y Zambrano-Zaragoza, J. F. (2017). The release kinetics of  $\beta$ -carotene nanocapsules/xanthan gum coating and quality changes in fresh-cut melon (cantaloupe). *Carbohydrate Polymers*, 157, 1874-1882.
- Zhang, L., Jin, Y., Xie, Y., Wu, X., y Wu, T. (2014). Releasing polysaccharide and protein from yeast cells by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2 (2), 576-581.
- Zhang, T., Che, F., Zhang, H., Pan, Y., Xu, M., y Ban, Q. (2017). Effect of nitric oxide treatment on chilling injury, antioxidant enzymes and expression of the CmCBF3 genes in cold-stored Hami melon fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 127, 88-98.
- Zhu, F. (2015). Interactions between starch and phenolic compound. *Trends in Food Science and Technology*, 43, 129-143.