

# Tesis - Luz Clarita

*por* Luz Clarita CARRANZA CARRANZA

---

**Fecha de entrega:** 17-abr-2024 09:48p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2353416276

**Nombre del archivo:** TESIS\_LUZ\_CLARITA\_CARRANZA-sin\_referencia.docx (10.21M)

**Total de palabras:** 12186

**Total de caracteres:** 64330

<sup>1</sup>  
**UNIVERSIDAD NACIONAL**

**TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

**MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS BIOACTIVOS  
DE SUBPRODUCTOS DE *Psidium guajava* Y *Myrciaria dubia***

**Autor (a): Bach. Luz Clarita Carranza Carranza**

<sup>1</sup>  
**Asesor: Ms. Segundo Grimaldo Chávez Quintana**

**Registro: (.....)**

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2024**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL RESPOSITORIO  
INSTITUCIONAL DE LA UNTRM**

**ANEXO 3-H**

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, por siempre ser mi soporte en mi formación personal y profesional, por acompañarme brindándome su confianza y consejos, por haberme enseñarme los buenos valores para ser mejor persona y mostrarme que en esta vida es posible alcanzar toda meta trazada.

A mis hermanos, familia y amigos (as) quienes estuvieron siempre en mis mejores y peores momentos y brindarme apoyo moral para culminar esta meta.

## AGRADECIMIENTO

22  
Mi eterno agradecimiento a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional en todo momento para alcanzar mis sueños y metas, a mis amigos (as) por destinarme tiempo para aconsejarme y brindarme aportes invaluable que estarán presente en toda mi vida.

1  
Mi especial agradecimiento al Ing. MS. Segundo Grimaldo Chávez Quintana por brindarme su apoyo, guía paciencia y dedicación durante el desarrollo de tesis, así mismo agradezco a la Dra. Cristina dos Santos Ferreira por otorgarme la oportunidad de fortalecer mis conocimientos teóricos y prácticos.

2  
A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM) por acogerme y darme la oportunidad de culminar mi profesión, al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES), donde se desarrolló la tesis de manera exitosa.

1  
Esta investigación fue financiada por el Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA) – CONTRATO PE501081779-2022\_01 en el marco del concurso E074-2022-01 “Tesis y Pasantías en Ciencia, Tecnología e Innovación”

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRIGUEZ  
DE MENDOZA**

Ph. Dr. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA

**RECTOR**

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

**VICERRECTOR ACADÉMICO**

Dra. MARIA NELLY LUJÁN ESPINOZA

**VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN**

Dr. ERICK ALDO AUQUÍÑIVIN SILVA

**DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS**

**VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS**

**ANEXO 3-L**

**JURADO EVALUADOR DE TESIS**

-----  
Lic. Mg. Sc. ALINE CAMILA CAETANO

**PRESIDENTE**

-----  
Ing. Ms. ROBERTO CARLOS MORI ZABARBURÚ

**SECRETARIO**

-----  
Ing. Ms. ROBERT JAVIER CRUZALEGUI FERNANDEZ

**VOCAL**



**CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS**

**ANEXO 3-Q**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

**ANEXO 3-S**

## ÍNDICE

<b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL RESPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM</b> .....	ii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	iv
<b>AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA</b> .....	v
<b>VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS</b> .....	vi
<b>JURADO EVALUADOR DE TESIS</b> .....	vii
<b>CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS</b> .....	viii
<b>ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMEN</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
<b>2.1. Preparación de materiales y muestras</b> .....	20
<b>2.2. Caracterización de los subproductos</b> .....	20
<b>2.2.1. Humedad</b> .....	20
<b>2.2.2. pH</b> .....	20
<b>2.2.3. Densidad</b> .....	21
<b>2.2.4. Higroscopicidad</b> .....	21
<b>2.2.5. Solubilidad</b> .....	21
<b>2.2.6. Actividad de agua</b> .....	21
<b>2.2.7. Morfología y microestructura</b> .....	21
<b>2.3. Optimización de la extracción de compuestos bioactivos</b> .....	22
<b>2.3.1. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)</b> .....	22
<b>2.3.2. Extracción mediante agitación mecánica (AM)</b> .....	23
<b>2.3.3. Capacidad antioxidante (CA) y contenido fenólico total (CFT) de los extractos</b> .....	24
<b>2.4. Microencapsulación de los extractos bioactivos</b> .....	25
<b>2.4.1. Estabilidad de color de microcápsulas</b> .....	25

2.4.2.	Eficiencia de encapsulación .....	26
2.4.3.	Estabilidad de almacenamientos de microcápsulas .....	27
2.4.4.	Morfología de microcápsulas .....	27
2.5.	Análisis estadístico .....	27
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
3.1.	Características de subproductos .....	28
3.1.1.	Humedad y pH .....	28
3.1.2.	Densidad, índice de <i>Hausner</i> , higroscopicidad, solubilidad y actividad de agua .....	29
3.1.3.	Morfología y microestructura .....	30
3.2.	Optimización de extractos bioactivos .....	31
3.2.1.	Extracción asistida por ultrasonido .....	33
3.2.2.	Extracción mediante agitación magnética .....	34
3.2.3.	Modelos optimizados de obtención de extractos .....	36
3.2.4.	Validación del modelo de predicción .....	37
3.3.	Microencapsulación de los extractos .....	39
3.3.1.	Estabilidad de color .....	39
3.3.2.	Eficiencia de encapsulación .....	40
3.3.3.	Estabilidad de microcápsulas .....	42
3.3.4.	Morfología y microestructura .....	45
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>52</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>53</b>
<b>VII.</b>	<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>54</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>55</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diseño de matriz de Box-Beknhen.....	22
<b>Tabla 2.</b> Diseño de matriz Box-Beknhen .....	23
<b>Tabla 3.</b> Resultados del ajuste del modelo y análisis de varianza (ANOVA) para EAU ...	31
<b>Tabla 4.</b> Resultados del ajuste del modelo y análisis de varianza (ANOVA) para AM .....	32
<b>Tabla 5.</b> Modelos de optimización por cada variable de respuesta, para cada método de extracción (EAU y AM).....	36
<b>Tabla 6.</b> Validación de valores predichos con datos experimentales en el proceso de EAU para la combinación de todas las respuestas.....	37
<b>Tabla 7.</b> Validación de valores predichos y observados en las condiciones óptimas de los factores independientes en base a combinación de respuestas para extracción mediante AM.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Humedad y pH de CCC: cáscara de camu camu, SCC: semilla de camu camu, CG: Cáscara de guayaba .....	28
<b>Figura 2</b> Densidad, índice de Hausner, higroscopicidad, solubilidad y actividad de agua. Valores medios (n=3), desviación estándar y estadística Tukey. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) .....	29
<b>Figura 3</b> Micrografías de microscopía electrónica de barrido que representan la morfología de cáscara de <i>M. dubia</i> (a), semilla de <i>M. dubia</i> (b) y cáscara de <i>P. guajava</i> (c) con niveles de aumento de 1000X .....	30
<b>Figura 4</b> Superficie respuesta mostrando el efecto de las variables de extracción asistido por ultrasonido en compuestos bioactivos de tres subproductos .....	33
<b>Figura 5</b> Superficie respuesta mostrando el efecto de las variables de extracción mediante agitación mecánica en compuestos bioactivos de tres subproductos. ....	35
<b>Figura 6</b> Diferencia de color de microcápsulas durante su almacenamiento .....	40
<b>Figura 7</b> Eficiencia de encapsulación de microcápsulas. ....	40
<b>Figura 8</b> Estabilidad encapsulante sobre la capacidad antioxidante determinado por el método DPPH. ....	43
<b>Figura 9</b> Estabilidad encapsulante sobre el contenido fenólico total. ....	43
<b>Figura 10</b> Estabilidad encapsulante sobre la capacidad antioxidante determinado por el método FRAP .....	45
<b>Figura 11</b> Micrografías de microscopía electrónica de barrido que representan la morfología de paredes encapsulantes y microcápsulas con niveles de aumento de 2000X. ....	45
<b>Figura 12</b> Recepción de muestras de camu camu .....	55
<b>Figura 13</b> Recepción de muestras de guayaba .....	55
<b>Figura 14</b> Semilla de camu camu .....	56
<b>Figura 15</b> Cáscara de camu camu en polvo .....	56
<b>Figura 16</b> Semilla de camu camu en polvo .....	56
<b>Figura 17</b> Cáscara de guayaba en polvo .....	57
<b>Figura 18</b> Extracción asistida por ultrasonido .....	57
<b>Figura 19</b> Extracción mediante agitación mecánica .....	57
<b>Figura 20</b> Extractos bioactivos .....	58
<b>Figura 21</b> Preparación de extractos para determinar contenido fenólico total y capacidad antioxidante .....	58

<b>Figura 22</b> Determinación de CFT y CA (DPPH y FRAP) en espectrofotómetro .....	58
<b>Figura 23</b> Agitación del extracto con la matriz encapsulante .....	59
<b>Figura 24</b> Congelamiento con nitrógeno líquido de las soluciones de extractos con matriz encapsulante .....	59
<b>Figura 25</b> Microencapsulación mediante liofilización.....	60
60	
<b>Figura 26</b> Microcápsulas en polvo.....	60
<b>Figura 27</b> Preparación de extractos bioactivos a partir de las microcápsulas .....	61
<b>Figura 28</b> Acondicionamiento de extractos para medir eficiencia y estabilidad encapsulante. ....	61
<b>Figura 29</b> Determinación de eficiencia y estabilidad encapsulante mediante fenoles totales y capacidad antioxidante .....	62
<b>Figura 30</b> Toma de imágenes de microcápsulas en microscopía electrónica de barrido. ..	62

## <sup>1</sup> RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo optimizar el proceso de extracción de compuestos bioactivos de subproductos de *Psidium guajava* y *Myrciaria dubia* y evaluar la microencapsulación mediante características de bioactividad. Se optimizaron la relación volumen-masa, tiempo de agitación y sonicación para extracción asistida por ultrasonido (EAU) y; relación volumen-masa, tiempo y velocidad de agitación para extracción por agitación mecánica (AM). Como variables respuesta se midió la capacidad antioxidante mediante DPPH y FRAP y, el contenido fenólico total con la técnica de Folin-ciocalteu. En una segunda etapa, se evaluó la microencapsulación de los extractos bioactivos con maltodextrina, almidón de yuca y plátano. Se evaluó la morfología de micropartículas, eficiencia de encapsulación, estabilidad de color y estabilidad encapsulante. Se obtuvo seis modelos optimizados de extracción: 1) una relación volumen-masa de 50 ml/g y 15 min de sonicación para extracto de cáscara de camu camu; 2) una relación volumen-masa de 60 ml/g y 15 min de sonicación para extracto de cáscara de guayaba; 3) una relación volumen-masa de 50 ml/g, 4,42 min de sonicación y 3 h de agitación para extracto de semilla de camu camu; 4) una relación volumen-masa de 60 ml/g, 2 horas y 172,2 rpm de agitación para extracto de cáscara de camu camu; 5) una relación volumen-masa de 60 ml/g, 6,39 horas y 250 rpm de agitación para extracto de cáscara de guayaba; 6) una relación volumen-masa de 60 ml/g, 7,72 horas y 256,3 rpm de agitación para extracto de semilla de camu camu. El almidón de plátano proporcionó colores más oscuros, mientras que el almidón de yuca proporcionó un color más claro a las microcápsulas de extractos bioactivos obtenidos mediante AM. Por otro lado, la microencapsulación con almidón de plátano fue más eficiente sobre la capacidad antioxidante medida por DPPH (hasta 98%) y el uso de almidón de yuca también fue más eficiente sobre el contenido fenólico total (hasta 98%) y capacidades antioxidantes medido por FRAP (hasta 75%) en microcápsulas de extractos obtenidos mediante EAU. Además, la mayoría de las microcápsulas producidas con almidón de plátano presentaron una mejor estabilidad. En conclusión, los modelos optimizados demostraron que AM es más eficiente que EAU en la extracción de compuestos bioactivos de subproductos de camu camu y guayaba y el uso de almidones otorgo mejores resultados en la microencapsulación de los extractos bioactivos.

**Palabras claves:** *Myrciaria dubia*, *Psidium guajava*, extractos bioactivos, microencapsulación, optimización, encapsulante.



## ABSTRACT

The objective of this research was to optimize the extraction process of bioactive compounds from *Psidium guajava* and *Myrciaria dubia* by-products and to evaluate the microencapsulation through bioactivity characteristics. The volume-mass ratio, agitation time and sonication were optimized for ultrasound-assisted extraction (UAE) and; volume-mass ratio, agitation time and speed for extraction by mechanical agitation (MA). As response variables, antioxidant capacity was measured by DPPH and FRAP, and total phenolic content by the Folin-ciocalteu technique. In a second stage, the microencapsulation of the bioactive extracts with maltodextrin, cassava and banana starch was evaluated. Microparticle morphology, encapsulation efficiency, color stability and encapsulation stability were evaluated. Six optimized extraction models were obtained: 1) a volume-to-mass ratio of 50 ml/g and 15 min of sonication for camu camu peel extract; 2) a volume-to-mass ratio of 60 ml/g and 15 min of sonication for guava peel extract; 3) a volume-to-mass ratio of 50 ml/g, 4.42 min of sonication and 3 h of shaking for camu camu seed extract; 4) a volume-to-mass ratio of 60 ml/g, 2 h and 172.2 rpm of agitation for camu camu peel extract; 5) a volume-to-mass ratio of 60 ml/g, 6.39 h and 250 rpm of agitation for guava peel extract; 6) a volume-to-mass ratio of 60 ml/g, 7.72 h and 256.3 rpm of agitation for camu camu seed extract. Plantain starch provided darker colors, while cassava starch provided a lighter color to the microcapsules of bioactive extracts obtained by AM. On the other hand, microencapsulation with banana starch was more efficient on antioxidant capacity measured by DPPH (up to 98%) and the use of cassava starch was also more efficient on total phenolic content (up to 98%) and antioxidant capacities measured by FRAP (up to 75%) in microcapsules of extracts obtained by UAE. In addition, most of the microcapsules produced with banana starch presented better stability. In conclusion, the optimized models demonstrated that AM is more efficient than EAU in the extraction of bioactive compounds from camu camu and guava by-products and the use of starches gave better results in the microencapsulation of bioactive extracts.

**Keywords:** *Myrciaria dubia*, *Psidium guajava*, bioactive extracts, microencapsulation, optimization, encapsulant.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción y procesamiento de alimentos generan grandes cantidades de subproductos y desechos los cuales son considerados residuos orgánicos, que por lo general no son utilizados y provocan serias preocupaciones ambientales (Ueda et al., 2022). La tercera industria generadora de residuos es la agricultura dedicada a la producción y procesamiento de frutas y hortalizas, por ello, es tendencia emergente la búsqueda de una adecuada gestión de subproductos agrarios (Oliver-Simancas et al., 2021; Sagar et al., 2018)

El camu camu (*Myrciaria dubia*) y la guayaba (*Psidium guajava*) son frutas tropicales reconocidas por su alto valor nutricional y contenido de compuestos bioactivos asociados a propiedades promotoras de la salud humana (Alvarez-Suarez et al., 2018; De Souza Schmidt Gonçalves et al., 2010; Silva et al., 2016); sin embargo el índice de desperdicio en cultivos de *M. dubia* y *P. guajava* es aproximadamente el 30% después del procesamiento, constituido principalmente por semillas y cáscara. La cáscara y semilla de camu camu son ricas en compuestos bioactivos incluso superior a la pulpa (Chagas et al., 2021; Fidelis et al., 2020; Neves et al., 2015). Los subproductos de *P. guajava* de descarte como la cáscara, tienen propiedades nutraceuticas, son fuente de diversos componentes nutricionales, incluidos polisacáridos, vitaminas, fenoles, carotenoides, junto con una amplia gama de bioactividad y propiedades funcionales (Darmasiwi et al., 2018).

Por otro lado, los actuales cambios en los hábitos de consumo tienden a priorizar la sustitución de aditivos alimentarios sintéticos por naturales. Esto ha motivado un incremento en el interés de los investigadores de considerar a los residuos como fuente de compuestos bioactivos renovable, procurando así optimizar el uso de los recursos económicos, para la industria agrícola, alimentaria o farmacéutica (Gullón et al., 2019). No obstante, la extracción de compuestos de interés tiene ciertas dificultades técnicas debido a que la eficiencia de extracción depende de varios factores, como el tipo del solvente y su concentración, tiempo, temperatura y método de extracción (Belwal et al., 2018; Hadidi et al., 2021; Wu et al., 2014).

Además, los compuestos bioactivos son considerados sensibles e inestables lo cual genera pérdidas nutricionales, por ello, actualmente se desarrollan estudios con alto rendimiento para extraer, identificar y conservar compuestos (de Abreu Figueiredo et al., 2020;

Rodrigues et al., 2020). Existe una gran variedad de técnicas de obtención de compuestos bioactivos a partir de fuentes vegetales, que pueden incluir procesos que mejoran la extracción como la homogenización, sonicación, cambios de temperatura, baño de agua con agitación, uso de pulsos eléctricos, procesos enzimáticos y uso de fluidos supercríticos. Cada uno de estos métodos tienen distintas aplicaciones y eficiencia según el material tratado (Hadidi et al., 2024; Khan et al., 2010).

Una de las técnicas es la extracción asistida por ultrasonido (UAE), la cual es considerada una tecnología verde, limpia y respetuosa con el medio ambiente, además tiene la ventaja de facilidad de uso, bajo costo y buena eficiencia, los factores que podrían interferir en la efectividad de extracción son la fuente ultrasónica, la frecuencia e intensidad de operación, el tiempo, la temperatura, el tipo de solvente y la relación entre solvente-material (Adetunji et al., 2017; Moorthy et al., 2017; Palma et al., 2023; Tiwari, 2015). Por otro lado, está la extracción mediante agitación (MS) la cual puede minimizar la degradación de los compuestos naturales sensibles al calor, además es un proceso económico y consume poca energía, los parámetros que podrían afectar la eficiencia de dicho método son la velocidad de agitación, el tiempo de extracción, la temperatura y la relación solvente-material (Ghafoor et al., 2020; Kim et al., 2022; Sultana et al., 2009).

Los compuestos bioactivos pueden ser usados como aditivos naturales puesto que son más seguros para la salud, además, son muy utilizados para producir alimentos funcionales; sin embargo, pueden ser degradados al interactuar con enzimas; debido a ello muchas industrias buscan sistemas de protección, siendo una de las técnicas más utilizadas la microencapsulación (ME) mediante el uso de polímeros (Navarro-Valdez et al., 2020; Ríos-Aguirre y Gil-Garzón, 2021; Tangarife et al., 2021). La ME separa la sustancia activa de tamaño micrométrico y protege por una membrana que facilita su manejo; es aplicada con la finalidad de mejorar y preservar el sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de productos; no obstante, también mejora la liberación de componentes bioactivos (Luna Guevara et al., 2016; Nava Reyna et al., 2015).

Existen muchos métodos para microencapsular compuestos bioactivos, los dos más utilizados son el secado por aspersión y la liofilización; donde la liofilización es más útil para secar compuestos sensibles al calor, puesto que este método expone a las sustancias alimenticias a temperaturas de congelación a una presión muy baja (Laurenti et al.,

2023). Ya que muchos de los compuestos bioactivos son termolábiles, la liofilización es una técnica más efectiva para microencapsularlos, debido a que, presentan una mejor conservación durante su almacenamiento según Da Silva et al. (2020). Las sustancias más utilizadas como pared microencapsulante son gomas (Agar, goma arábica), carbohidratos (jarabe de maíz, maltodextrina), lípidos (ceras, aceites, grasas) y celulosas (Luna et al., 2016).

En consecuencia, esta investigación se centró en optimizar los parámetros del proceso de extracción de bioactivos a partir de subproductos de *P. guajava* y *M. dubia* y microencapsular los extractos bioactivos obtenidos en condiciones óptimas. Se buscó extraer los bioactivos mediante agitación mecánica y extracción asistida por ultrasonido; además, microencapsular con almidones nativos y polímero comercial mediante la técnica de liofilización.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Preparación de materiales y muestras

La fruta de *M. dubia* se obtuvo en la ciudad de Tarapoto, región San Martín y *P. guajava* se obtuvo del distrito de Mariscal Benavides región de Amazonas. Se adquirieron 15 kg de cada fruta, fueron desinfectadas por inmersión en hipoclorito de sodio 0.1 N por 15 min. Luego, se separó la semilla y cáscara de manera manual. Los subproductos se secaron en una estufa a 55°C por 8 h siguiendo la metodología descrita por Chagas et al. (2021). El material deshidratado fue triturado en un molino tipo Willye (modelo TE-650/1) y el polvo obtenido se conservó en bolsas herméticas protegidos con papel aluminio a temperatura ambiente hasta su utilización posterior.

El almidón de plátano (AP) comercial fue obtenida del mercado “Requejo” del distrito de Chachapoyas, provincia Chachapoyas de la región Amazonas; el almidón de yuca (AY) se obtuvo del centro comercial “Plaza Vea” y la maltodextrina (MD) fue adquirida de la empresa “Química Industrial”

### 2.2. Caracterización de los subproductos

Todos los análisis de caracterización fisicoquímica se realizaron por triplicado para cada subproducto.

#### 2.2.1. Humedad

La humedad de los subproductos deshidratados se determinó por desecación, siguiendo el procedimiento de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 2005). 5 g de cada subproducto se secó en una estufa a 105 °C verificando cada 2 h, hasta alcanzar un peso constante. La humedad será expresada en porcentaje según la ecuación 1.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{pérdida de peso en g}}{\text{peso de muestra en g}} \times 100 \quad \text{Ec.1}$$

#### 2.2.2. pH

El pH de los subproductos se midió con un potenciómetro portátil digital (HANNA HI 98130) aplicando el método 981.12 de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 2005). Se diluyó 1 g de muestra en 10 ml de agua destilada y luego se realizó la lectura.

### 2.2.3. Densidad

Para medir la densidad aparente se colocó muestra en una probeta de 15 ml y se registró el volumen y midió el peso, luego se calculó la densidad aparente (peso por volumen). La densidad aprovechada se calculó golpeando la probeta durante 5 min, 32 golpes por minuto, el volumen final se registró para calcular la densidad aprovechada (Jangam y Thorat, 2010), el Índice de Hausner (IH) que es un valor relacionado con la fluidez de un polvo se calculó siguiendo la fórmula:  $IH = \text{Densidad aprovechada} / \text{Densidad Aparente}$ .

### 2.2.4. Higroscopicidad

Para medir higroscopicidad se siguió el método descrito por Cai y Corke (2000) con algunas modificaciones. Se pesó 1 g de muestra en placas de plástico, luego fue colocado en un desecador a 25 °C con una solución saturada de NaCl (75,29 % HR), las muestras se pesaron cada 2 h hasta obtener peso constante, la higroscopicidad se expresó como gramos de humedad por 100 g de materia seca.

### 2.2.5. Solubilidad

Para determinar la solubilidad se pesó 0,25 g de cada subproducto y se mezcló en 25 ml de agua destilada en un agitador magnético (Benchmark, 2018) a 1550 rpm durante 5 min, luego la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y se dejó en reposo por 30 min. Se transfirió 4 ml del sobrenadante a cajas petri pesadas y se secó en estufa a 105 °C durante 5 h. La solubilidad se determinó por diferencia de peso (Santhalakshmy et al., 2015).

### 2.2.6. Actividad de agua

La actividad del agua (aw) se determinó con un medidor de actividad de agua (AquaLab Serie 3) en condiciones ambientales.

### 2.2.7. Morfología y microestructura

La morfología superficial y la microestructura de los subproductos se estudió utilizando un microscopio electrónico de barrido SEM (QUANTA FEG 250) a un voltaje de aceleración de X. Las muestras se dispersaron en una cinta conductora adhesiva de doble cara, se usó un evaporador de vacío para la deposición de muestras, luego la cinta se recubrió con una capa dorada y se aplicaron a la superficie del trozo SEM, se observaron y registraron las imágenes con un aumento de 1000X (Cortez-Trejo et al., 2021; Mu et al., 2022; Rosales-Chimal et al., 2023).

## 2.3. Optimización de la extracción de compuestos bioactivos

Las extracciones se realizaron en soluciones acuosas utilizando un diseño experimental de superficie respuesta (Box Beknhen), la optimización de las variables de entrada se ejecutó a partir de diseños experimentales (Favre y col., 2018, Favre y col., 2020) para los dos métodos de extracción.

### 2.3.1. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

En este método se consideró 3 parámetros de entrada en 3 niveles como se muestra en la tabla 1. Los parámetros fueron: tiempo de agitación (h), tiempo de sonicación (min) y relación volumen-masa (ml/g). El procedimiento de extracción se realizó en tubos falcón, pesando la muestra seca y agregando agua bidestilada (según la relación volumen-masa del diseño); se colocaron los tubos en baño maría con hielo, se sonico en un equipo tipo Ultrasonic (UP100H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany) y finalmente se agitó en un agitador magnético a temperatura ambiente según cada tratamiento. Los extractos se almacenaron en refrigeración durante 24 h para su análisis posterior.

**Tabla 1**

*Diseño de matriz de Box-Beknhen*

N° Experimentos	Cáscara de <i>M. dubia</i>			Semilla de <i>M. dubia</i>			Cáscara de <i>P. guajava</i>		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	1,5	0	50	1,5	0	50	0	15	50
2	1,5	7,5	30	1,5	7,5	30	3	10	40
3	0	7,5	10	0	7,5	10	3	15	50
4	1,5	7,5	30	1,5	7,5	30	0	5	50
5	1,5	7,5	30	1,5	7,5	30	3	10	60
6	3	15	30	3	15	30	1,5	15	60
7	1,5	0	10	1,5	0	10	0	10	40
8	0	7,5	50	0	7,5	50	0	10	60
9	0	15	30	0	15	30	1,5	5	40
10	3	0	30	3	0	30	1,5	10	50
11	0	0	30	0	0	30	3	5	50
12	1,5	15	50	1,5	15	50	1,5	10	50

<b>13</b>	3	7,5	50	3	7,5	50	1,5	5	60
<b>14</b>	1,5	7,5	30	1,5	7,5	30	1,5	10	50
<b>15</b>	1,5	7,5	30	1,5	7,5	30	1,5	10	50
<b>16</b>	3	7,5	10	3	7,5	10	1,5	10	50
<b>17</b>	1,5	15	10	1,5	15	10	1,5	15	40

A: Tiempo de agitación (h); B: Tiempo de sonicación (min); C: Relación m/v (ml/g).

### 2.3.2. Extracción mediante agitación mecánica (AM)

En este método se consideró 3 parámetros de entrada en 3 niveles <sup>6</sup> como se muestra en la tabla 2. Los parámetros son: velocidad de agitación (rpm), relación volumen-masa (ml/g) y tiempo de agitación (h). En tubos falcón se pesó la muestra y se agregó agua bidestilada según la relación volumen-masa, seguidamente se homogenizó colocando el tubo falcón en un agitador orbital shaker (Orbi-Shaker) por 3 tiempos y 3 velocidades. Los extractos se almacenaron en refrigeración durante 24 horas para sus análisis posteriores (Repo De Carrasco et al., 2008; Rodrigues da Silva et al., 2022)

**Tabla 2**

*Diseño de matriz Box-Beknhen*

N° Experimentos	Cáscara de <i>M. dubia</i>			Semilla de <i>M. dubia</i>			Cáscara de <i>P. guajava</i>		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>1</b>	150	50	2	150	40	8	250	50	6
<b>2</b>	150	50	6	150	60	8	300	40	6
<b>3</b>	200	30	4	200	40	6	300	60	6
<b>4</b>	100	50	4	200	50	8	300	50	8
<b>5</b>	150	40	4	200	50	8	250	50	6
<b>6</b>	100	40	6	200	50	8	200	50	4
<b>7</b>	200	40	6	200	60	6	250	40	8
<b>8</b>	200	40	2	250	50	6	200	60	6
<b>9</b>	150	40	4	200	40	10	250	60	8
<b>10</b>	150	40	4	200	50	8	250	60	4
<b>11</b>	150	30	2	250	60	8	250	40	4



12	100	40	2	150	50	6	250	50	6
13	150	30	6	250	40	8	250	50	6
14	200	50	4	200	50	8	200	50	8
15	150	40	4	150	50	10	300	50	4
16	150	40	4	250	50	10	200	40	6
17	100	30	4	200	60	10	250	50	6

A: Velocidad de agitación (rpm); B: Relación v/m (ml/g); C: Tiempo de agitación (h).

### 2.3.3. Capacidad antioxidante (CA) y contenido fenólico total (CFT) de los extractos

Se colocaron 1.5 ml de los extractos en tubos Eppendorf de 2ml, luego se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos; el sobrenadante fue separado y filtrado, se almacenó en refrigeración hasta sus próximos análisis. Las determinaciones de CA y CFT se realizaron con 3 repeticiones para cada tratamiento.

#### ✓ Capacidad antioxidante (DPPH)

La capacidad antioxidante se determinó a través del ensayo DPPH siguiendo la metodología descrita por Chaillou y Nazareno (2006); para ello, se preparó 50mg de DPPH en 50ml de etanol al 96% en un vaso de precipitados, se disolvió, luego la solución se llevó a una absorbancia entre 0,9-1 diluyendo con etanol al 96%. En tubos eppendorf de 2ml se agregó 950uL de la solución DPPH y 50uL de muestra, seguidamente se agitó y dejó incubar por 30 minutos. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 517 nm usando etanol como blanco. Los resultados son expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mgEAG/g) obtenido mediante una curva estándar ( $R^2=0,99432$ ).

#### ✓ Contenido fenólico total

Los fenoles totales fueron determinados mediante la técnica de Folin Ciccalteau (Santos Ferreira et al., 2016; Singleton y Rossi, 1965). En tubos eppendorf se colocó 50ul de extracto, 800ul de agua bidestilada, 125 ul de  $Na_2CO_3$  al 20% en NaOH (0.1N) y 125ul de Folin, luego se agitó y colocó en oscuridad por 30 minutos para su incubación. La absorbancia fue medida a 765nm en un espectrofotómetro utilizando como blanco agua

bidestilada. El contenido fenólico total fue expresado en mg equivalente de ácido gálico por gramo de muestra obtenido mediante una curva estándar ( $R^2= 0,9989$ ).

#### ✓ Capacidad antioxidante (FRAP)

Para determinar el poder antioxidante se siguió la técnica utilizada por Abrahão et al. (2019; Benzie y Strain, (1996) y Pulido et al. (2000) con algunas modificaciones. El reactivo de FRAP fue compuesto por, 25ml de buffer acetato de sodio a 0,3mM (pH 3,6), 2,5ml de solución 2,4,6-tri (2-piridil) s-triazina (TPTZ) a 10mM y 2,5ml de  $FeCl_3$  a 20 mM. Una vez preparado el reactivo FRAP se midió la absorbancia a 595nm lo cual fue cercano a 0; luego en tubos eppendorf se agregó 60ul de muestra y 840 uL de FRAP preparado, se homogenizó y se midió la absorbancia a 595nm utilizando como blanco agua. Las determinaciones se realizaron mediante una curva de calibración ( $R^2= 0,9998$ ) y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mgEAG/g).

#### 2.4. Microencapsulación de los extractos bioactivos

La microencapsulación se desarrolló mediante la técnica de liofilizado; para ello, tras la optimización de los parámetros para la extracción de bioactivos mediante los dos métodos de extracción, se realizó extracción con las condiciones óptimas tanto para EAU y para AM. Los extractos se centrifugaron a 4500 rpm por 20 minutos y el sobrenadante se recuperó. Se mezcló la proporción de 4ml de cada extracto centrifugado/ 1g de matriz encapsulante (Maltodextrina, almidón de yuca y almidón de plátano), luego se homogenizaron durante 20 minutos en agitador magnético, finalmente a cada muestra se realizó un congelamiento rápido con nitrógeno líquido por 3 minutos para después ser liofilizados por un mínimo de 48 horas (Abrahão et al., 2019; Hu et al., 2018; Yinbin et al., 2018). Las muestras liofilizadas fueron refinadas y almacenadas en bolsas con cierre hermético en desecador, en ambiente oscuro hasta sus posteriores análisis.

##### 2.4.1. Estabilidad de color de microcápsulas

La estabilidad de color de microcápsulas durante su almacenamiento a temperatura ambiente, se determinó mediante la cinética de diferencia de color total ( $\Delta E$ ) aplicando la ecuación 2 (Pathare et al., 2012). Se empleó un fotocolorímetro de marca Konika Minolta (CR-400) para las mediciones de los parámetros  $L^*$  (Luminosidad),

a\*(rojo/verde) y b\*(amarillo/azul). Las mediciones se realizaron cada 10 días dentro de 60 días.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2} \quad \text{Ec.2}$$

#### 2.4.2. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia se identificó mediante las ecuaciones 3, 4 y 5, de acuerdo a Yinbin et al. (2018) relacionando los compuestos totales y superficiales de las microcápsulas.

##### ✓ Extracción de compuestos totales de microcápsulas

Para extraer por completo los compuestos de las microcápsulas se siguió la técnica descrita por Tolun et al. (2020) con pequeños ajustes. Se disolvieron 0,5 g de cada microcápsula en una solución de 5 ml de etanol: ácido acético: agua (50:8:42, v/v/v). La mezcla se agitó durante 2 minutos, luego se sonicó por 20 minutos a 21 °C en un baño ultrasónico de la marca Branson Ultrasonics (CPX3800H-E / CPX952338R). El sobrenadante de la mezcla se separó después de la centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos; al residuo se agregó 3 ml de solución etanol: ácido acético: agua (50:8:42, v/v/v), se agitó, luego se centrifugó y nuevamente el sobrenadante se separó y homogenizó con el primer sobrenadante extraído. Finalmente, el sobrenadante fue almacenado en refrigeración hasta sus análisis siguientes.

##### ✓ Extracción de compuestos superficiales de microcápsulas

Se pesaron exactamente 0,25 g de microcápsulas y se disolvieron en 2,5 ml etanol al 50% para arrastrar los fenoles de la superficie. Después de agitación de 1 minuto, el sobrenadante de la mezcla se separó después de la centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos (Zheng et al., 2011). El sobrenadante fue almacenado en refrigeración hasta sus análisis siguientes.

##### ✓ Eficiencia por capacidad antioxidante medido por DPPH

<sup>10</sup> La determinación de capacidad antioxidante de extractos de compuestos totales y superficiales, se realizó con la técnica DPPH descrita en la sección 2.3.3. La eficiencia fue determinada según la ecuación 3.

$$EE (\%) = \left( 1 - \frac{CA(DPPH) \text{ superficiales de la microcapsula}}{CA(DPPH) \text{ totales de la microcapsula}} \right) \times 100 \quad \text{Ec.3}$$

#### ✓ <sup>38</sup> Eficiencia por contenido fenólico total

El contenido fenólico total tanto de extractos con compuestos totales como superficiales, se determinó con la técnica folin ciccalteau; técnica descrita en la sección 2.3.3. La eficiencia fue determinada aplicando la ecuación 4.

$$EE (\%) = \left( 1 - \frac{CFT \text{ superficiales de la microcapsula}}{CFT \text{ totales de la microcapsula}} \right) \times 100 \quad \text{Ec.4}$$

#### ✓ Eficiencia por capacidad antioxidante medido por FRAP

Tanto para extractos de compuestos totales como para superficiales, la capacidad antioxidante se midió con la técnica FRAP descrita en la sección 2.3.3 y la eficiencia fue determinada según la ecuación 5.

$$EE (\%) = \left( 1 - \frac{CA(FRAP) \text{ superficiales de la microcapsula}}{CA(FRAP) \text{ totales de la microcapsula}} \right) \times 100 \quad \text{Ec.5}$$

### <sup>21</sup> 2.4.3. Estabilidad de almacenamientos de microcápsulas

La estabilidad de las microcápsulas se determinó a través de la medición de capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) y contenido fenólico total cada 10 días dentro de 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente, siguiendo <sup>51</sup> las técnicas descritas en la sección 2.4.2.

### 2.4.4. Morfología de microcápsulas

La morfología superficial y <sup>25</sup> la microestructura de las microcápsulas se estudió utilizando un microscopio electrónico de barrido SEM (QUANTA FEG 250) y <sup>3</sup> se siguió la metodología descrita en el apartado 2.2.8.

### 2.5. Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados por triplicado y se sometidos a análisis de varianza y prueba de Tukey para la mínima diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre medias utilizando el programa estadístico SPSS. Los análisis de fenoles y antioxidantes se realizaron utilizando un diseño experimental de superficie respuesta (Box Beknhen) en el programa Desing Expert 11.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Características de subproductos

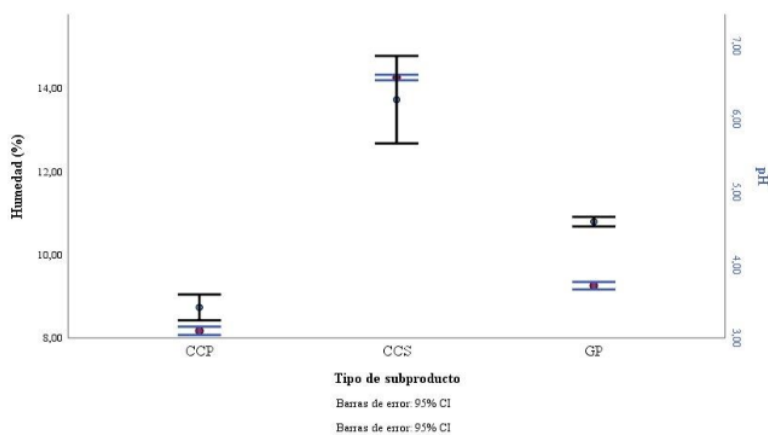
##### 3.1.1. Humedad y pH

El contenido de humedad de la cáscara de *M. dubia* fue  $8,73 \pm 0,1$  %, de la semilla  $13,72 \pm 0,3$ % y de cáscara de *P. guajava*  $10,79 \pm 0,03$  %. La cáscara de *M. dubia* presentó un pH menor que la semilla ( $3,09 \pm 0,018$  y  $6,57 \pm 0,012$ ), mientras que la cáscara de *P. guajava* tuvo un pH de  $3,71 \pm 0,016$ .

Como se muestra en la figura 1; el contenido de humedad de los materiales estudiados está relacionado directamente con el pH, puesto que, el pH cuando la humedad aumenta; además, el contenido de humedad y pH de cáscara de *P. guajava* fueron mayores a los de cáscara de *M. dubia* y menores a los de semilla de *M. dubia*.

#### Figura 1

Humedad y pH de CCC: cáscara de camu camu, SCC: semilla de camu camu, CG: Cáscara de guayaba.

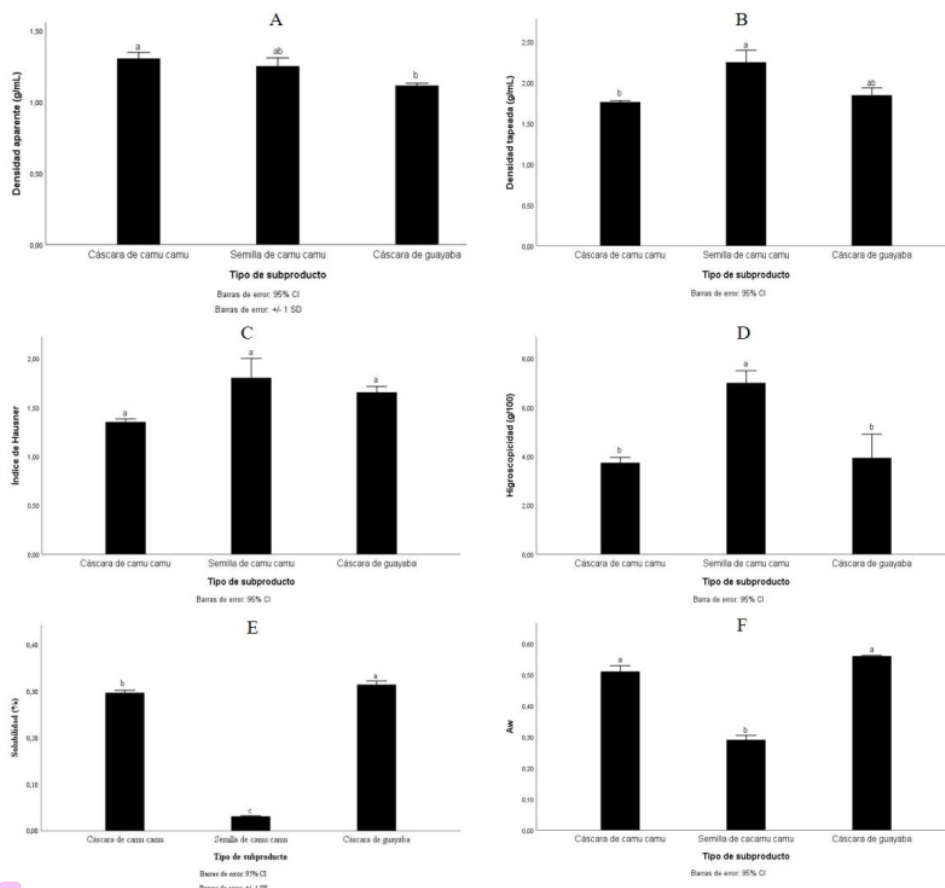


Nota. Valores medidos (n=3) y desviación estándar.

### 3.1.2. Densidad, índice de *Hausner*, higroscopicidad, solubilidad y actividad de agua

**Figura 2**

Densidad, índice de *Hausner*, higroscopicidad, solubilidad y actividad de agua. Valores medios ( $n=3$ ), desviación estándar y estadística Tukey.



**2** Nota. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

La densidad aparente de los subproductos de *M. dubia* fueron  $1,3 \pm 0,04$  y  $1,25 \pm 0,06$ , mientras que los valores de la densidad tapeada fueron de  $1,76 \pm 0,02$  y  $2,25 \pm 0,15$  (cáscara y semilla respectivamente); por otro lado, los valores de densidad aparente y tapeada de la cáscara de *P. guajava* fueron  $1,11 \pm 0,02$  y  $1,84 \pm 0,09$  respectivamente.

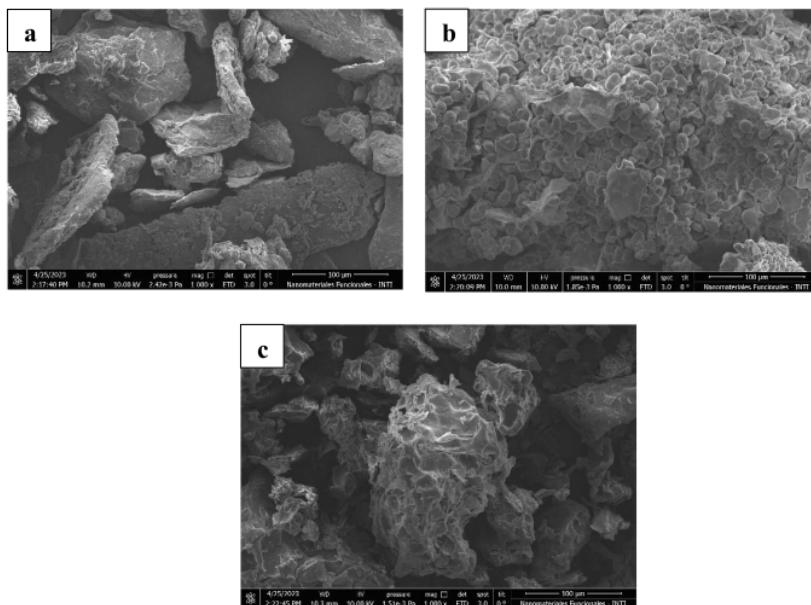
En la figura 2, el grafico C muestra que, el IH de la cáscara y semilla de *M. dubia* ( $1,8 \pm 0,19$ ) es mayor a los de cáscara de *M. dubia* ( $1,35 \pm 0,03$ ) y *P. guajava* ( $1,65 \pm 0,06$ ); por otro lado, el grafico D muestra que, el valor de higroscopicidad de semilla de *M. dubia* ( $7,1 \pm 0,49$  agua absorbida/100 g) fue más alto a comparación de cáscara de *M. dubia* ( $3,73 \pm 0,22$  agua absorbida/100 g) y *P. guajava* ( $3,93 \pm 0,97$  agua absorbida/100 g). Los gráficos E y F muestran que los valores de solubilidad y actividad de agua de la semilla de *M. dubia* son más bajos que los valores de la cáscara de *M. dubia* y *P. guajava*.

### 3.1.3. Morfología y microestructura

Tal como se observa en la figura 3, la microestructura morfológica de cáscara de *M. dubia* (a) tiene forma de astillas planas, largas y porosa; la semilla de *M. dubia* (b) tiene forma ovalada con superficies lisas; la cáscara de *P. guajava* (c) tiene una forma amorfa con una superficie poroso y rugosa.

#### Figura 3

Micrografías de microscopía electrónica de barrido que representan la morfología de cáscara de *M. dubia* (a), semilla de *M. dubia* (b) y cáscara de *P. guajava* (c) con niveles de aumento de 1000X



### 3.2.Optimización de extractos bioactivos

Los resultados del ajuste del modelo y análisis de varianza para EAU y AM se presentan en la tabla 3 y 4 respectivamente. El valor de  $p < 0,05$  indica que el modelo es significativo y está bien ajustado así mismo los valores altos del  $R^2$  respalda la idoneidad del modelo.

Tal como se muestra en la tabla 3 y 4 los modelos para EAU y AM de bioactivos de los subproductos de *M. dubia* y *P. guajava* tanto para CFT y CA (DPPH y FRAP) tienen valores de  $p < 0,050$  y los valores de  $R^2$  son mayores a 0,8361, los cuales confirman la adecuación de los modelos. Dichos resultados sugieren que un modelo cuadrático es lo más apropiado para predecir el rendimiento de CFT y CA en las condiciones experimentales utilizadas.

**Tabla 3**

*Resultados del ajuste del modelo y análisis de varianza (ANOVA) para EAU*

Fuente	Cáscara de <i>M dubia</i>			Semilla de <i>M dubia</i>			Cáscara de <i>P guajava</i>		
	CA- DPPH (mg EAG/g)	CFT (mgEAG /g)	CA- FRAP (mgEAG /g)	CA- DPPH (mg EAG/g)	CFT (mgEAG /g)	CA- FRAP (mgEAG /g)	CA- DPPH (mg EAG/g)	CFT (mgEAG /g)	CA- FRAP (mgEAG /g)
Modelo	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0103</b>	<b>0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0386</b>	<b>0,0031</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,0037</b>	<b>0,0414</b>
Tiempo de agitación (A)	0,4486	<b>0,0057</b>	0,1062	0,5125	<b>0,0110</b>	<b>0,0007</b>	0,8554	0,9765	0,4049
Tiempo de sonicación (B)	0,1638	<b>0,0146</b>	0,5983	0,2286	0,3218	0,7586	0,6995	0,0663	<b>0,0161</b>
Relación volumen-masa (C)	<b>&lt; 0,0001</b>	0,2079	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0480</b>	<b>0,0005</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0002</b>	0,4480
AB	0,8046	0,1517	0,7645	0,7172	0,7052	0,8179	0,0794	0,8836	0,8517
CA	0,4412	<b>0,0015</b>	0,1887	0,4620	0,3948	0,1456	0,4516	0,3915	0,5180
BC	<b>0,0305</b>	0,1248	<b>0,0015</b>	<b>0,0057</b>	0,4963	<b>0,0292</b>	0,2601	<b>0,0081</b>	0,1876
A <sup>2</sup>	<b>0,0292</b>	<b>0,0085</b>	0,0592	0,2206	<b>0,0492</b>	<b>0,0297</b>	<b>0,0075</b>	<b>0,0206</b>	<b>0,0463</b>
B <sup>2</sup>	0,0689	<b>0,0180</b>	<b>0,0286</b>	<b>0,0452</b>	0,8652	0,4067	0,1544	0,1597	<b>0,0080</b>
C <sup>2</sup>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0222</b>	<b>0,0431</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0108</b>	0,4993	<b>0,0066</b>	<b>0,0492</b>	0,4209
R <sup>2</sup>	0,9998	0,9221	0,9825	0,9992	0,8732	0,9273	0,9441	0,9238	0,8361

Como se aprecia en la tabla 3, el tiempo de agitación (A) y tiempo de sonicación (B) individualmente no son significativos en gran parte de los modelos, sin embargo, la



relación masa volumen (C) no es significativa para CFT y CA (FRAP) de cáscaras de *M. dubia* y *P. guajava* respectivamente. El efecto de la interacción AB no es significativa en todos los modelos, CA solo es significativa en CFT de cáscara de *M. dubia* y BC es significativa en la mayoría de modelos. Los efectos cuadráticos, por otro lado, son significativos en la mayoría de modelos.

Además, la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos depende del tiempo de agitación para las tres fuentes estudiadas y para cáscara de *M. dubia*, también el tiempo de sonicación fue un factor determinante ( $p < 0,05$ )

**Tabla 4**

*Resultados del ajuste del modelo y análisis de varianza (ANOVA) para AM*

Fuente	Cáscara de <i>M dubia</i>			Semilla de <i>M dubia</i>			Cáscara de <i>P guajava</i>		
	CA-DPPH (mg EAG/g)	CFT (mgEAG /g)	CA-FRAP (mgEAG /g)	CA-DPPH (mg EAG/g)	CFT (mgEAG /g)	CA-FRAP (mg GAE/g)	CA-DPPH (mg EAG/g)	CFT (mgEAG /g)	CA-FRAP (mgEAG /g)
Modelo	< 0,0001	0,0092	< 0,0001	0,0014	0,0309	0,0007	0,0004	0,0014	0,0129
Velocidad de agitación (A)	0,2483	0,0012	0,0409	0,1185	0,3793	< 0,0001	0,0150	0,9854	0,0979
Relación volumen-masa (B)	< 0,0001	0,0208	< 0,0001	< 0,0001	0,2159	0,2140	< 0,0001	< 0,0001	0,0106
Tiempo de agitación (C)	0,3747	0,3761	0,0409	0,3217	0,2242	0,0079	0,0103	0,0039	0,0074
AB	0,3966	0,0326	0,0026	0,6455	0,0242	0,1229	0,3815	0,5145	0,1997
CA	0,0104	0,3096	0,4941	0,5927	0,1445	0,0003	0,0940	0,3361	0,7668
BC	0,6361	0,0852	0,0006	0,9888	0,5049	0,2022	0,0139	0,0176	0,0690
A <sup>2</sup>	0,2129	0,1018	0,0269	0,2013	0,0050	0,0350	0,0429	0,0371	0,0189
B <sup>2</sup>	0,0319	0,0187	0,0177	0,0274	0,0364	0,6150	0,0378	0,0604	0,0486
C <sup>2</sup>	0,1240	0,4949	0,0470	0,4294	0,5168	0,2817	0,4257	0,1872	0,1650
R <sup>2</sup>	0,9848	0,8989	0,9835	0,9437	0,8513	0,9537	0,9618	0,9434	0,8877

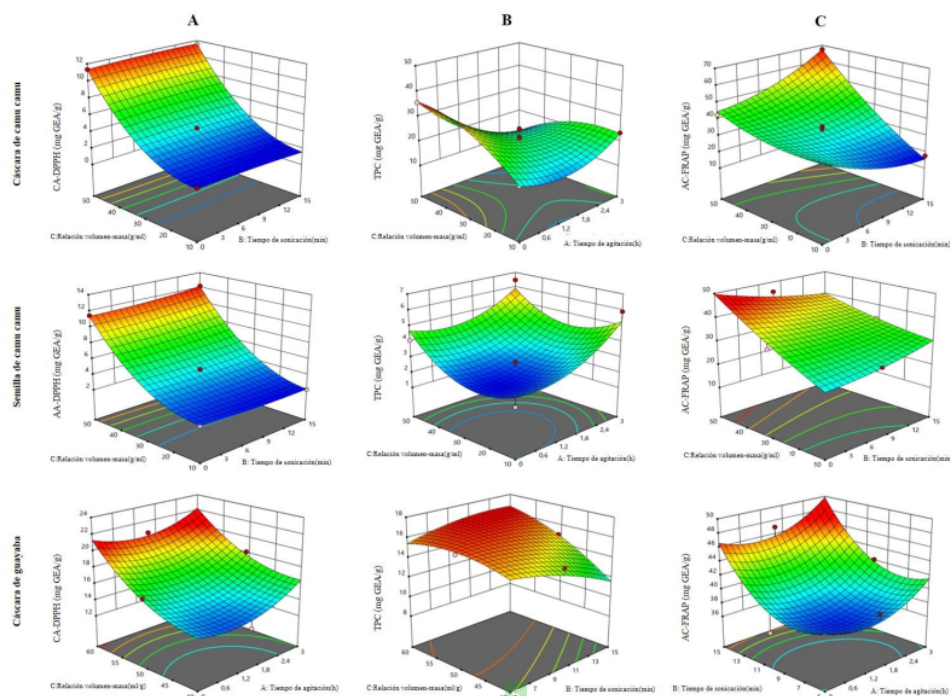
La tabla 4 muestra que la velocidad de agitación (A) es significativa en 4 modelos, la relación volumen-masa (B) no es significativa en 2 modelos (CFT y CA-FRAP de semilla de *M. dubia*) y tiempo de agitación (C) es significativo en gran parte de los modelos. Los efectos de las interacciones lineales (AB, CA y BC) no son significativos en la mayoría de

los modelos. Los efectos cuadráticos, por otro lado, ( $A^2$  y  $B^2$ ) son significativos en casi todos los modelos, sin embargo,  $C^2$  solo es significativo en CA (FRAP) de cáscara de *M. dubia*. En el presente estudio, mediante extracción por AM, la relación volumen-masa fue el factor más influyente en la extracción de componentes bioactivos (CA y CFT). Curiosamente, el tiempo y velocidad de agitación también son factores que cumplen un papel importante en la extracción de compuestos.

### 3.2.1. Extracción asistida por ultrasonido

**Figura 4**

Superficie respuesta mostrando el efecto de las variables de extracción asistido por ultrasonido en compuestos bioactivos de tres subproductos.



Nota. A: Capacidad antioxidante (DPPH); B: Contenido fenólico total y C: Capacidad antioxidante (FRAP).

En la figura 4 se muestran las interacciones de los factores que resultaron significativas ( $p < 0.05$ ). La capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) de cáscara y semilla de *M. dubia* se ve afectada significativamente por la relación volumen-masa y el tiempo de sonicación. El

aumento del tiempo de sonicación, afecta negativamente la capacidad antioxidante al ser medida con la técnica FRAP; mientras que los valores determinados mediante DPPH se mantuvieron constantes.

<sup>46</sup> En la extracción de los compuestos fenólicos de cáscara *M. dubia*, al disminuir el solvente en el sólido y aumentar el tiempo de agitación, el CFT disminuye; sin embargo, el efecto de la interacción de ambos factores conlleva a un aumento y luego a una leve disminución. Por otro lado, al emplear semillas de *M. dubia*, se observa un aumento en la concentración de CFT a medida que aumenta el solvente y, el incremento del tiempo de agitación favorece la extracción de compuestos fenólicos. El efecto de la interacción de ambos factores muestra una disminución instantánea y un aumento en la respuesta (curvatura hacia arriba) (Figura 4).

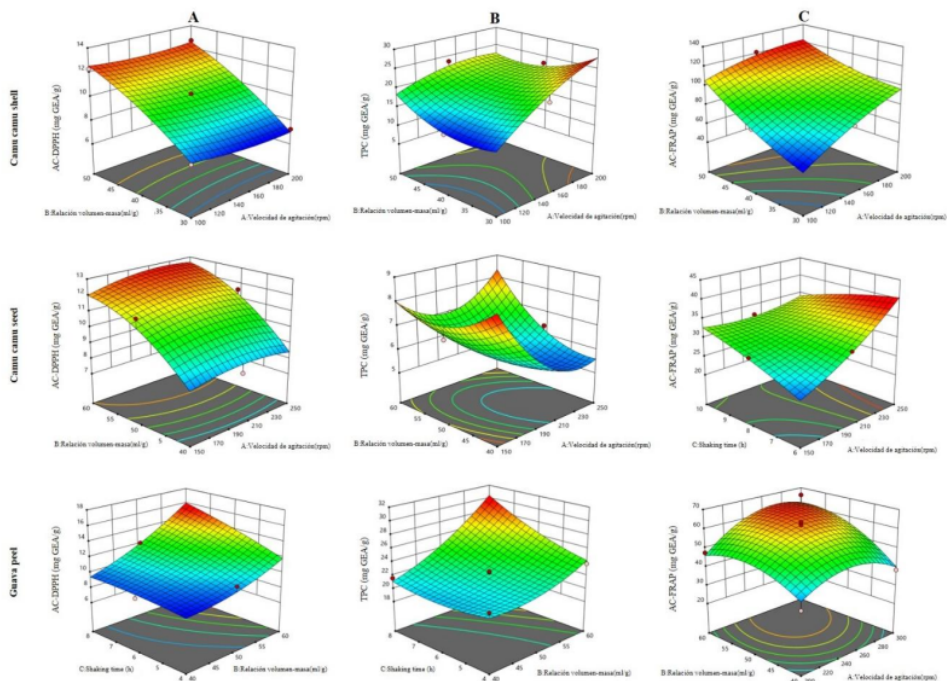
Además, en la figura 4 se aprecia que, para la obtención de extractos de cáscara de *P. guajava*, el aumento del solvente y su interacción con el tiempo de agitación incrementó el valor de capacidad antioxidante obtenido por el método DPPH. Por otro lado, el CFT disminuyó con el aumento del tiempo de sonicación; incrementó y luego disminuyó ligeramente al aumentar el solvente; mientras que, la interacción de ambos factores conlleva a un aumento de este. La aplicación de sonicación y agitación, al igual que su interacción permite la reducción inicial de la actividad antioxidante medida mediante el método FRAP, para luego experimentar un incremento.

### 3.2.2. Extracción mediante agitación magnética

En la figura 5 se muestran las interacciones de los factores que resultaron significativas ( $p < 0,05$ ). Para la obtención de extractos de cáscara de *M. dubia*, el incremento de la velocidad de agitación afectó positivamente al CFT y capacidad antioxidante medido mediante FRAP; sin embargo, los valores de capacidad antioxidante medido por DPPH se mantuvo constante. Por otro lado, la adición del solvente y la interacción de ambos factores aumentó los valores de capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) y CFT.

Figura 5

Superficie respuesta mostrando el efecto de las variables de extracción mediante agitación mecánica en compuestos bioactivos de tres subproductos.



Nota. A: Capacidad antioxidante (DPPH); B: Contenido fenólico total y C: Capacidad antioxidante (FRAP).

En la extracción de compuestos bioactivos de semilla de *M. dubia*, la capacidad antioxidante medida mediante DPPH se mantuvo constante al aumentar la velocidad de agitación y aumentó con el incremento del solvente e interacción de los dos factores. Al incrementar la velocidad de agitación, el CFT disminuyó; mientras que, incrementó para tratamientos con mayor solvente y con la interacción de los factores. Por otro lado, el tiempo, velocidad de agitación y la interacción de ambos, favorecen la capacidad antioxidante evaluado por FRAP (Figura 5).

Como se muestra en la figura 5, el tiempo de agitación no afectó la capacidad antioxidante determinada por DPPH y CFT de los extractos de cáscara de *P. guajava*; mientras que, su

combinación con altas velocidades de agitación mejora los valores de dichos resultados. Inicialmente hubo un aumento prominente y luego una disminución de la capacidad antioxidante medida mediante el método FRAP gracias a la interacción de la adición del solvente con la velocidad de agitación.

### 3.2.3. Modelos optimizados de obtención de extractos

**Tabla 5**

*Modelos de optimización por cada variable de respuesta, para cada método de extracción (EAU y AM).*

Variable	Fuente vegetal*	EAU					AM				
		Factores óptimos**			Valor (mg/E AG/g)	Deseabilidad	Factores óptimos**			Valor (mgEA G/g)	Deseabilidad
		A	B	C			D	E	F		
CA-DPPH	CCC	3	11,2	50	11,8	0,99	150	50	2	12,8	1
	SCC	0,99	15	50	12,1	0,99	221,5	60	10	12,8	0,99
	CG	0,07	10,4	59,7	20,8	1	200,06	58,9	7,96	15,5	1
CFT	CCC	0,1	5,5	44,4	36,6	1	196,6	30,05	2,1	27,3	1
	SCC	3	15	50	6,2	0,95	249,98	59,98	7,8	8,5	1
	CG	2,8	11,1	57,1	16,8	1	232,8	59,3	7,9	29,9	1
CA-FRAP	CCC	1,8	14,99	49,9	67,8	0,83	194,2	49,8	2,03	122,1	1
	SCC	2,9	1,4	47,9	46,3	1	249,8	44,3	6,2	38,98	1
	CG	2,5	14,95	40,5	47,8	1	266,5	53,6	7,02	66,04	1

\*CCC: Cáscara de *M. dubia*, SCC: Semilla de *M. dubia*, CG: Cáscara de *P. guajava*

\*\* A: Tiempo de agitación (h); B: Tiempo de sonicación (min); C: Relación volumen-masa (ml/g); D: Velocidad de agitación (rpm); E: Relación volumen-masa (ml/g); F: Tiempo de agitación (h).

Los resultados de la tabla 5 presenta los factores óptimos para cada variable de respuesta y sus valores predichos para cada método de extracción. Los resultados indicaron que todos los modelos lograron obtener valores de optimización, excepto en CFT de SCC para EAU y CA- DPPH de CCC para AM. La deseabilidad en los modelos para EAU es mayor a 0.83; mientras que, para AM es más alto (>0,99), lo que quiere decir que los modelos para AM son más ideales.

14 La capacidad antioxidante determinados mediante DPPH y FRAP de extracto de cáscara de *M. dubia* obtenidos mediante EAU fueron menores a los del extracto obtenido mediante AM; aunque, con el CFT sucedió lo contrario. La capacidad antioxidante medido por DPPH y el CFT (12,1 y 6,2 mgEAG/g respectivamente) de extracto de semilla de *M. dubia*

obtenidos mediante EAU fueron menores que del extracto obtenido mediante AM (12,8 y 8,5 mgEAG/g respectivamente); sin embargo, la capacidad antioxidante medido por FRAP para EAU fue mayor al de AM. El CFT y capacidad antioxidante determinado por FRAP de extracto de cáscara *P. guajava* obtenido mediante EAU fueron menores a los del extracto obtenido mediante AM, caso contrario a la capacidad antioxidante determinado por DPPH.

### 3.2.4. Validación del modelo de predicción

Para ambos métodos de extracción se realizó experimentos para validar los parámetros de extracción optimizados para la actividad antioxidante y contenido fenólico total de los extractos de tres subproductos (tablas 6 y 7). Los resultados experimentales para la extracción realizada según las condiciones óptimas fueron cercanos a los predichos por los modelos de optimización; además, los valores de la deseabilidad compuesta son cercanos a 1 (> 0,88) lo que indica que los modelos permiten optimizar los factores de extracción.

**Tabla 6**

*Validación de valores predichos con datos experimentales en el proceso de EAU para la combinación de todas las respuestas.*

	Fuente vegetal *	Factores óptimos**			CA-DPPH (mgEAG/g)	CFT (mgEAG/g)	CA-FRAP (mgEAG/g)	Deseabilidad compuesta
		A	B	C				
Valores predichos	CCC	0	15	50	11,67	31,11	59,50	0,88
	SCC	3	4,42	50	11,24	5,73	45,82	0,91
	CG	0	15	60	22,26	16,73	46,19	0,97
Valores observados	CCC	0	15	50	11,19±0,19	26,15±0,1	67,57±1,37	-
	SCC	3	4,5	50	11,14±0,005	7,67±0,378	44,67±4,46	-
	CG	0	15	60	20,06±0,06	14,78±0,02	49,9±0,77	-

*Nota.* Los datos experimentales son presentados como media ± DE (n = 3).

\* CCC: Cáscara de *M. dubia*, SCC: Semilla de *M. dubia*, CG: Cáscara de *P. guajava*

\*\* A: Tiempo de agitación (h), B: Tiempo de sonicación (min), C: Relación volumen-masa (ml/g)

La tabla 6 indica los parámetros óptimos para el proceso de extracción de compuestos mediante EAU. Para extraer compuestos de extractos a base de cáscara *M. dubia* y *P. guajava*, no se requiere agitación; sin embargo, se requiere sonicación prolongada (15 min) y un alto contenido de solvente (50 y 60 ml/g respectivamente). Por otro lado, se necesita

alto contenido de solvente (50 ml/g), un tiempo corto de sonicación (4,4 min) y mayor tiempo de agitación (3 h) para extractos de semilla de *M. dubia*.

**Tabla 7**

*Validación de valores predichos y observados en las condiciones óptimas de los factores independientes en base a combinación de respuestas para extracción mediante AM.*

	Fuente vegetal*	Factores óptimos**			CA-DPPH (mgEAG/g)	CFT (mgEAG/g)	CA-FRAP (mgEAG/g)	Deseabilidad compuesta
		**						
		A	B	C				
Valores predichos	CCC	172,24	50	2	12,59	22,97	121,65	0,89
	SCC	250	60	6,39	12,47	8,41	35,53	0,90
	CG	256,26	60	7,72	14,93	29,66	61,17	0,92
Valores observados	CCC	172	50	2	13,16±0,16	27,92±2,07	126,93±2,53	-
	SCC	250	60	6,4	9,96 ±0,09	10,58±0,22	28,21±0,47	-
	CG	256	60	6,7	14,28±0,07	20,68±0,09	67±0,13	-

*Nota.* Los datos experimentales se dan como la media ± DE (n = 3).

\*CCC: Cáscara de camu camu, SCC: Semilla de camu camu, CG: Cáscara de guayaba

\*\* A: Velocidad de agitación (rpm), B: Relación volumen-masa (ml/g), C: Tiempo de agitación (h)

La tabla 7 indica los factores óptimos para el proceso de extracción de compuestos mediante AM. Para extraer compuestos de extracto a base de cáscara *M. dubia* y *P.* se requiere poco tiempo de agitación (2 h), alto contenido de solvente (50ml/g) y moderada velocidad de agitación (172,24 rpm). Por otro lado, para extractos de semilla de *M. dubia* y cáscara de *P. guajava*, se necesita agitación prolongada (6,39 y 7,72 h respectivamente), alto contenido de solvente (60 ml/g) y velocidad de agitación alta (250 y 256 rpm respectivamente).

En este estudio, los modelos optimizados para el método AM permite mejores resultados que EAU, en las 3 fuentes vegetales; sin embargo, el método EAU permite mejores resultados para CA determinado por DPPH de cáscara de *P. guajava*, CFT de cáscara de *M. dubia* y CA determinado por FRAP de semilla de *M. dubia*. Con ello se podría decir que el tipo de fuente vegetal, método de extracción y la técnica de determinación de compuestos, influyen en los valores encontrados y son exclusivos para extraer determinados compuestos.

### **3.3. Microencapsulación de los extractos**

#### **3.3.1. Estabilidad de color**

En la figura 6 se muestra la estabilidad de color durante el almacenamiento de microcápsulas de extractos obtenidos mediante EAU y AM, donde se observa que las microcápsulas con almidón de plátano son los más oscuros según los valores de la diferencia de color total.

Las figuras 6A y 6D muestran la estabilidad del color de los encapsulados con MD de extractos obtenidos mediante EAU y AM respectivamente. Las microcápsulas de extractos de CCC obtenidos mediante EAU presentaron un aumento de  $\Delta E$ , mientras que, los obtenidos mediante AM presentaron un leve aumento y disminución a partir del día 30 de almacenamiento. La  $\Delta E$  de las microcápsulas de extractos de SCC obtenidos mediante las dos técnicas de extracción disminuyó, pero, desde el día 30 de almacenamiento aumentó levemente. Por otro lado, las microcápsulas de extractos de CG obtenidos por ambas técnicas presentaron aumento de  $\Delta E$ .

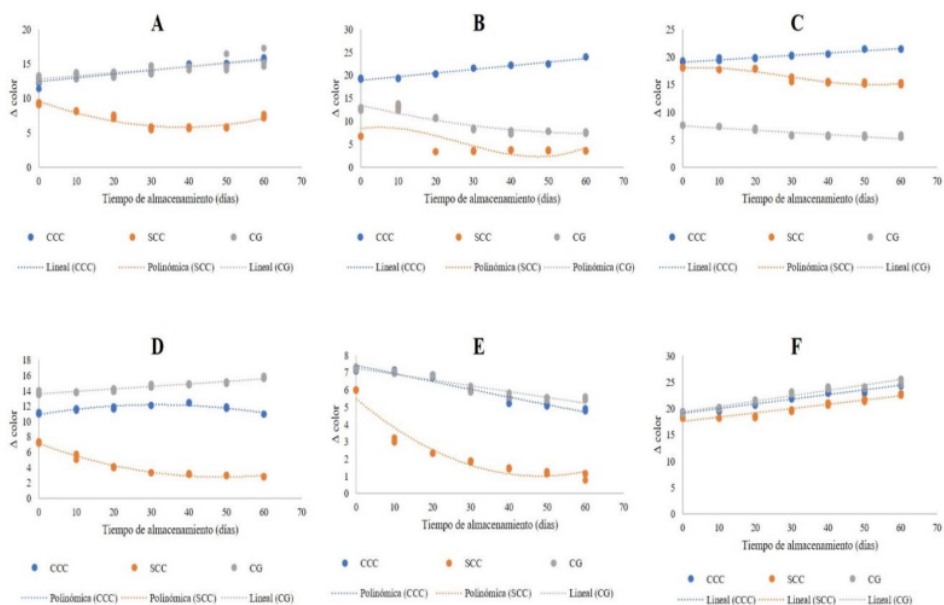
Las figuras 6B y 7E muestran la estabilidad de color de los encapsulados con AY de extractos obtenidos mediante EAU y AM respectivamente. La  $\Delta E$  de las microcápsulas de extractos de CCC obtenidos mediante EAU aumentó, mientras que, de los obtenidos mediante AM presentaron disminuyó durante su almacenamiento. Además, la  $\Delta E$  de las microcápsulas de extractos de SCC obtenidos mediante las dos técnicas de extracción presentaron una función polinómica (disminución y aumento). Por otro lado, la  $\Delta E$  de las microcápsulas de extractos de CG obtenidos por EAU presentó una función polinómica (aumento y disminución), sin embargo, de los obtenidos mediante AM presentó una disminución.

La figura 6C muestra la estabilidad de color de microcápsulas con AP de extractos obtenidos mediante EAU; donde, la  $\Delta E$  de las microcápsulas de extractos de CCC tuvo un aumento, de extractos de SCC presentó una función polinómica (leve aumento y disminución a partir del día 20) y de extractos de CG presentó disminución. Sin embargo, la  $\Delta E$  de las microcápsulas de extractos obtenido mediante AM aumentó.



**Figura 6**

*Diferencia de color de microcápsulas durante su almacenamiento.*



*Nota.* Valores medios (n=3) y desviación estándar. **A:** Encapsulados con maltodextrina de bioactivos extraídos mediante extracción asistida por ultrasonido; **B:** Encapsulados con almidón de yuca de bioactivos extraídos mediante extracción asistida por ultrasonido; **C:** Encapsulados con almidón de plátano de bioactivos extraídos mediante extracción asistida por ultrasonido; **D:** Encapsulados con maltodextrina de bioactivos extraídos mediante agitación mecánica; **E:** Encapsulados con almidón de yuca de bioactivos extraídos mediante agitación mecánica; **F:** Encapsulados con almidón de plátano de bioactivos extraídos mediante agitación mecánica. **CCC:** Cáscara de camu camu; **SCC:** Semilla de camu camu; **CG:** Cáscara de guayaba.

### 3.3.2. Eficiencia de encapsulación

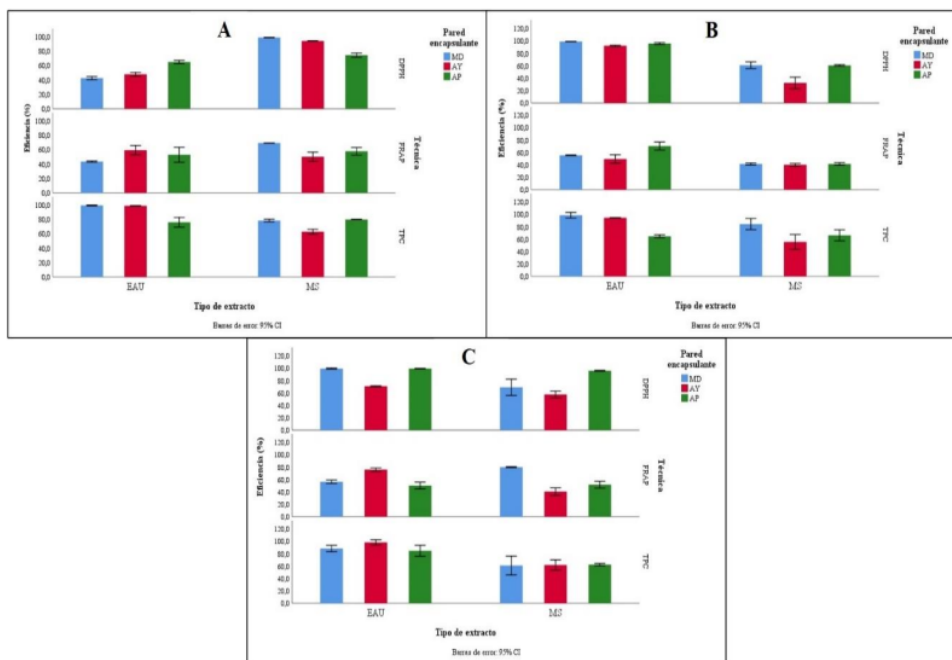
La figura 7 muestra la eficiencia de microencapsulación de compuestos; se obtuvieron valores entre  $32,22 \pm 3,78$  y  $99,29 \pm 0,38$  %. La figura 7A muestra la eficiencia de microencapsulación de extractos de CCC.

Cuando se emplea la técnica DPPH, se observa mayor eficiencia de encapsulación en los extractos obtenidos por AM que por EAU y los encapsulantes MD y AP permitieron

obtener más eficiencia que AY (medidos por FRAP) en los extractos obtenidos por AM. caso contrario a las microcápsulas con AY. Además, al determinar el CFT, la eficiencia de encapsulación de los extractos obtenidos por EAU fue mayor que por AM.

**Figura 7**

*Eficiencia de encapsulación de microcápsulas.*



*Nota.* Valores medidos (n=3) y desviación estándar. **A:** Extracto de cáscara de *M. dubia*; **B:** extracto de semilla de *M. dubia*; **C:** Extracto de cáscara de *P. guajava*; **MD:** Maltodextrina; **AY:** Almidón de yuca; **AP:** Almidón de plátano.

En la figura 7B se puede observar que, al determinar el CFT y la CA medido por DPPH y FRAP, la eficiencia de encapsulación de extractos de SCC obtenidos por EAU fue mayor que por AM. Mientras que, las microcápsulas de extractos obtenidos por EAU con pared encapsulante MD mostraron la eficiencia más alta de CFT y CA medido por DPPH ( $98,42 \pm 1,85$  y  $98,95 \pm 0,11$  % respectivamente), mientras que, la eficiencia más baja fue de las microcápsulas de extractos obtenidos por AM con pared encapsulante AY ( $55,42 \pm 4,81$  y  $32,22 \pm 3,78$  % respectivamente). Por otro lado, la eficiencia más alta de CA medido por la técnica FRAP fue de las microcápsulas de extractos obtenidos por EAU con pared

encapsulante AP ( $70,34 \pm 2,62$  %), mientras que, las microcápsulas de extractos obtenidos por AM con pared encapsulante AY mostraron eficiencia más baja ( $40,06 \pm 0,89$  %)

Del mismo modo, la figura 7C muestra que la eficiencia de CFT y CA medido por DPPH y FRAP de microcápsulas de extractos de CG obtenidos de por EAU fue mayor que AM, excepto de la eficiencia de CA medido por FRAP de las microcápsulas con almidón de yuca, que demuestran lo contrario. Las microcápsulas de extractos obtenidos por EAU con pared encapsulante MD mostraron la eficiencia más alta de CA medido por DPPH ( $99,29 \pm 0,38$  y  $98,42 \pm 1,85$  %), mientras que, la eficiencia más baja fue de las microcápsulas de extractos obtenidos por AM con pared encapsulante AY ( $57,57 \pm 2,13$  %). La eficiencia más alta de CFT fue de las microcápsulas de extractos obtenidos por EAU con pared encapsulante AY ( $98,15 \pm 1,64$  %), mientras que, las microcápsulas de extractos obtenidos por AM con pared encapsulante MD mostraron eficiencia más baja ( $60,85 \pm 6,14$  %).

Aunque en el presente estudio se encontraron bajas concentraciones de CA y CFT en algunas microcápsulas producidas con MD, se obtuvo altos valores de eficiencia en durante el proceso de secado.

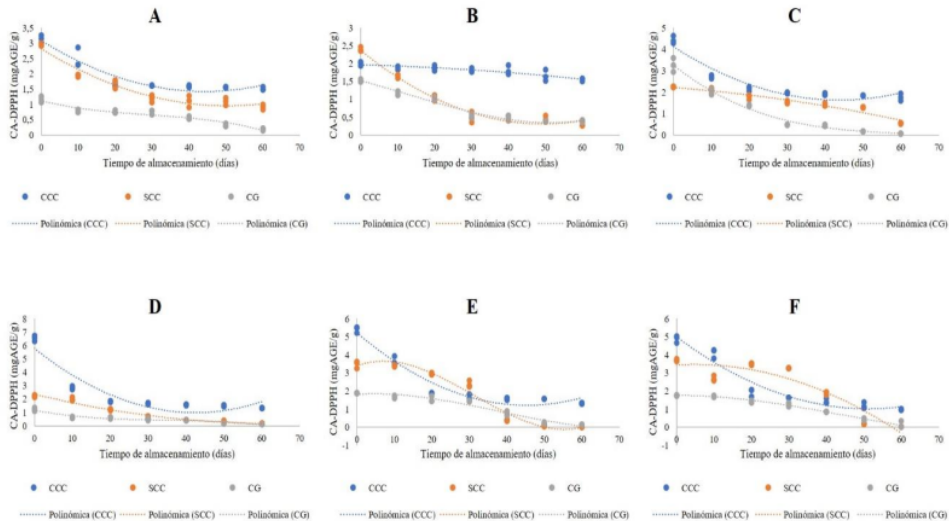
### **3.3.3. Estabilidad de microcápsulas**

El contenido fenólico total, la capacidad antioxidante medido por DPPH y FRAP de las microcápsulas, disminuyen en función del tiempo de almacenamiento tal como se muestran en las figuras 8, 9 y 10.

En la figura 8, se muestra la estabilidad de CA medido por DPPH. Para microcápsulas de extractos de CCC y CG obtenidos por EAU, en primera instancia el uso del AP fue el que presentó mayor retención de dichos compuestos; sin embargo, el AY fue el más eficiente en la retención durante los 60 días de almacenamiento y el uso de MD fue el menos eficiente. Por otro lado, el uso de MD, AY y AP fueron los que presentaron mayor retención de compuestos de los extractos obtenidos por AM de CCC, CG y SCC respectivamente; no obstante, el AP fue el más eficiente durante el almacenamiento y MD fue el menos eficiente.

**Figura 8**

*Estabilidad encapsulante sobre la capacidad antioxidante determinado por el método DPPH.*

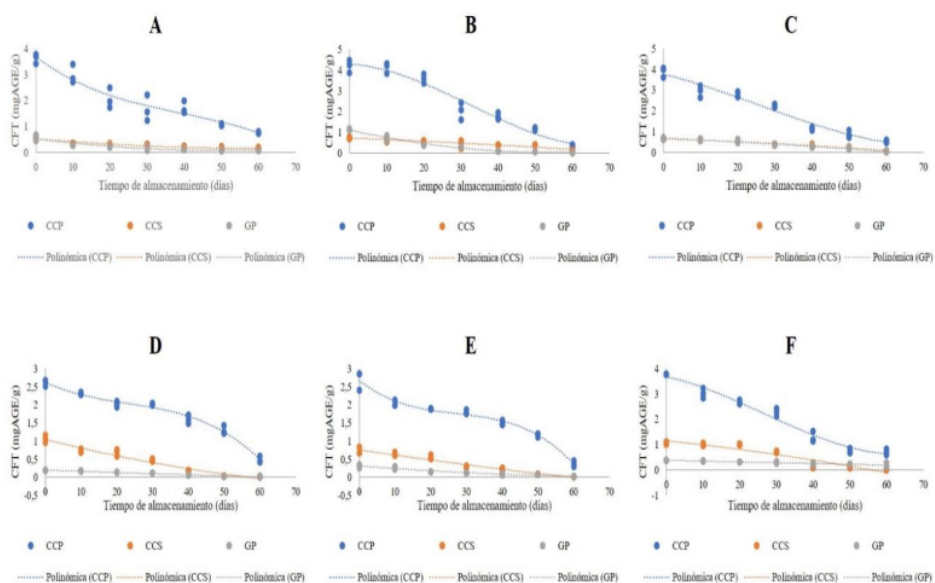


*Nota. A:* Microcápsulas con MD de extractos extraídos mediante EAU; *B:* Microcápsulas con AY de extractos extraídos mediante EAU; *C:* Microcápsulas con AP de extractos extraídos mediante EAU; *D:* Microcápsulas con MD de extractos extraídos por AM; *E:* Microcápsulas con AY de extractos extraídos por AM; *F:* Microcápsulas con AP de extractos extraídos por AM.

Considerando el contenido fenólico total (figura 9), el AY y AP fueron los que tuvieron mayor retención de compuestos en extractos obtenido por EAU y AM respectivamente; mientras que, la menor retención fue expresada por la MD para extractos obtenidos por EAU y extracto de CG obtenido por AM. Así mismo, para extractos de CCC y SCC, el AY fue el menos eficiente en la retención de CFT. Además, el uso de AP logró retener mejor los compuestos a lo largo del almacenamiento y el menos eficiente fue MD

**Figura 9**

*Estabilidad encapsulante sobre el contenido fenólico total.*

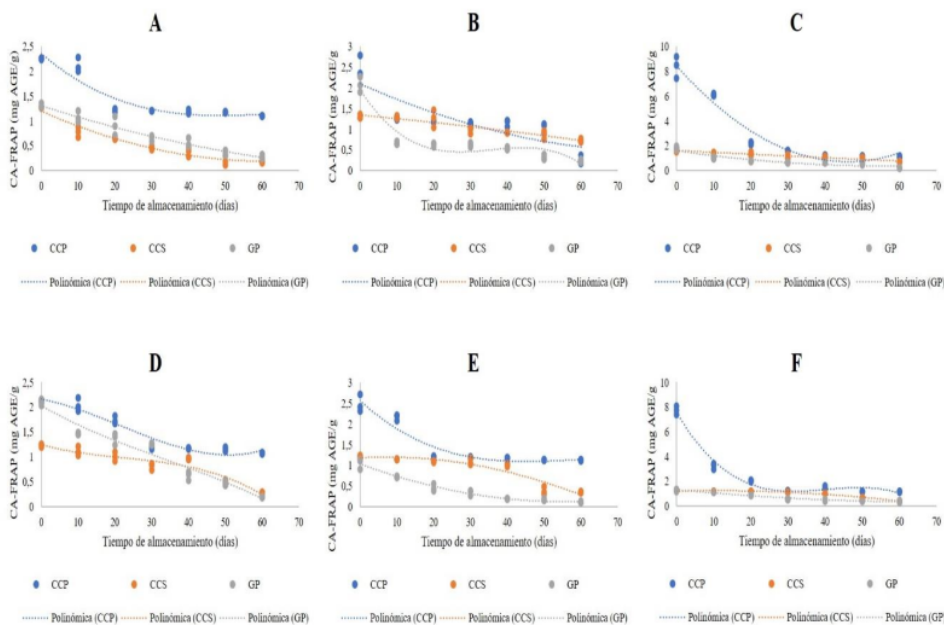


**Nota A:** Microcápsulas con maltodextrina de extractos extraídos mediante EAU; **B:** Microcápsulas con almidón de yuca de extractos extraídos mediante EAU; **C:** Microcápsulas con almidón de plátano de extractos extraídos mediante EAU; **D:** Microcápsulas con maltodextrina de extractos extraídos por AM; **E:** Microcápsulas con almidón de yuca de extractos extraídos por AM; **F:** Microcápsulas con almidón de plátano de extractos extraídos por AM.

El tipo de pared encapsulante tuvo influencia en la CA medida mediante FRAP (Figura 10). Las microcápsulas con AP presentaron mayor reducción de hierro, mientras que, con MD presentaron valores más bajos. Además, durante el tiempo de almacenamiento, el uso de AP en la microencapsulación de extractos obtenidos mediante AM y extractos de CCC extraídos por EAU, expresó mayor estabilidad. Del mismo modo, el AY tuvo mayor estabilidad microencapsulante en extractos de SCC y CG extraídos por EAU. Por otro lado, para microcápsulas de extractos obtenidos mediante AM y extractos de SCC y CG extraídos por EAU, la pared que presentó la estabilidad más baja durante el almacenamiento fue la MD; sin embargo, para microcápsulas de extractos de CCC extraídos por EAU fue el AY.

**Figura 10**

*Estabilidad encapsulante sobre la capacidad antioxidante determinado por el método FRAP.*



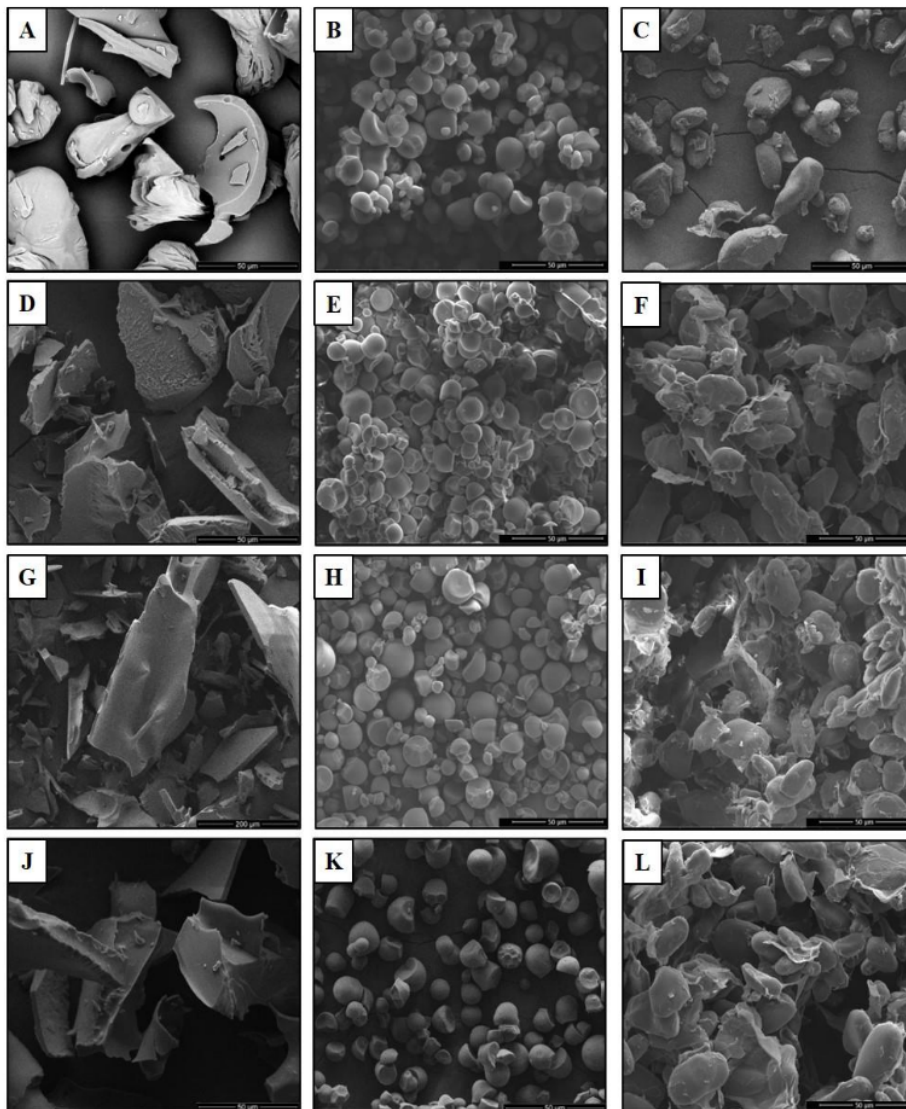
Nota **A**: Microcápsulas con maltodextrina de extractos extraídos mediante EAU; **B**: Microcápsulas con almidón de yuca de extractos extraídos mediante EAU; **C**: Microcápsulas con almidón de plátano de extractos extraídos mediante EAU; **D**: Microcápsulas con maltodextrina de extractos extraídos por AM; **E**: Microcápsulas con almidón de yuca de extractos extraídos por AM; **F**: Microcápsulas con almidón de plátano de extractos extraídos por AM.

### 3.3.4. Morfología y microestructura

29 En la figura 11 se muestran imágenes de SEM de microcápsulas con diferentes tipos de pared encapsulante; claramente se puede observar una diferencia significativa en las características morfológicas según el tipo de material encapsulante utilizado. Se observa que, la MD sin extracto presentó partículas rotas, forma y tamaño irregular (figura 11A); mientras que, las microcápsulas de extractos con dicha pared presentaron partículas mucho más más irregulares, fracturadas, amorfas y astilladas (figuras 3D, 12G y 12J).

**Figura 11**

*Micrografías de microscopía electrónica de barrido que representan la morfología de paredes encapsulantes y microcápsulas con niveles de aumento de 2000X.*



*Nota. A:* Maltodextrina; *B:* Almidón de yuca; *C:* Almidón de plátano; *D, E y F:* Maltodextrina, almidón de yuca y almidón de plátano con extractos de cáscara de camu camu respectivamente; *G, H y I:* Maltodextrina, almidón de yuca y almidón de plátano con extracto de semilla de camu camu; *J, K y L:* Maltodextrina, almidón de yuca y almidón de plátano con extracto de cáscara de guayaba.

Por otro lado, las imágenes microscópicas de microcápsulas producidas con AY y AP mostraron que la microencapsulación de extractos bioactivos fue exitosa, puesto que, tanto las muestras controles como las microcápsulas presentaron paredes lisas, continuas, distribución unimodal y ausencia de grietas.

Además, en las imágenes de microcápsulas con AY (figuras 3E, 12H y 12K), se observó que en su mayoría son partículas de forma esférica y tamaño homogéneo, rara vez apareció recubrimiento colapsado, huecas, roto y arrugado. Así mismo, la aplicación de AP como pared encapsulante produjo predominantemente partículas ovaladas con tamaño uniforme sin colapsos, en escasas ocasiones se observa partículas irregulares (figuras 3F, 12I y 12L). Las propiedades descritas aseguran una mayor protección a los compuestos encapsulados y permite un aumento en su estabilidad.



#### IV. DISCUSIONES

El contenido de humedad de cáscara y semilla de *M. dubia* fueron similares a los reportados por Santos et al. (2022) para polvo de *M. dubia* (7,94 a 13,95%); mientras que, de la cáscara de *P. guajava* fue próximo al valor reportado por Muniz et al. (2020) (13,78 %).

El pH de cáscara de *M. dubia* fue muy cercano a los reportados por Luiza Grigio et al. (2017) y Rodrigues et al. (2020) (3,24 y 3,09) en *M. dubia*; además mencionan que la semilla tiene pH superior a la pulpa y cáscara. La cáscara de *P. guajava* tuvo un pH idéntico al reportado por Muniz et al. (2020) (3,55). Niveles bajos de pH ayudan a prevenir la degradación de los compuestos fenólicos (Santos da Silveira et al., 2019).

Los materiales con valores de IH por debajo de 1,25 son considerados como poco cohesivos; la cohesión determina la consistencia y propiedades de fluidez, es decir cuanto menor sea la cohesión, la fluidez será mejor (Domian y Poszytek, 2005; Geldart et al., 1984; Santhalakshmy et al., 2015). Los valores de los materiales vegetales estudiados en esta investigación tuvieron valores de IH mayores a 1,35; por lo tanto, dichos materiales tienen cohesividad alta y fluidez baja.

Los valores bajos de solubilidad de los materiales estudiados podrían indicar que se usó una temperatura baja para su secado (Phoungchandang y Sertwasana, 2010; Santhalakshmy et al., 2015).

La baja actividad de agua en los materiales lleva a una mayor vida útil y disminuye la tendencia al deterioro causado por reacciones microbiológicas (Bonazzi y Dumoulin, 2011). Por lo tanto, todos los materiales estudiados tuvieron una actividad de agua por debajo de 0,6 lo cual indica que, estos pueden considerarse bioquímica o microbiológicamente estables.

La morfología de cáscara de *M. dubia* podría deberse a los componentes que contiene, como los derivados de la quercetina, ácido elagico, miricitina (Fracassetti, Costa, et al., 2013). La semilla de *M. dubia* se podría considerar como una dicotiledónea, puesto que, contienen estructuras organizadas y orgánulos subcelulares circundantes como cuerpos proteicos y oleosos (Wood et al., 2011). La forma de la cáscara de *P. guajava* puede deberse

a los compuestos polares, <sup>3</sup> compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el material (Musa et al., 2015; Rojas-Garbanzo et al., 2017).

En ambos métodos de extracción la extracción, la relación volumen-masa fue el factor más importante para <sup>3</sup> la extracción de compuestos a partir de muestras vegetales puesto que el rendimiento aumenta a medida <sup>54</sup> que aumenta la cantidad del disolvente, lo dicho puede corroborar con los estudios realizado por Jovanović et al. (2023) y Koyu y Demir, (2024). Además, lo afirmado puede deberse al aumento de la viscosidad en una solución con alta concentración de sólido lo cual impide la acción del disolvente y no logre extraer todos los compuestos del material (Ali y Ahmed, 2023; Jovanović et al., 2017; Mali y Kumar, 2023; <sup>9</sup> Pinelo et al., 2006; Wong Paz et al., 2015).

En la extracción asistida por ultrasonido, la eficiencia <sup>2</sup> de extracción de compuestos fenólicos depende del tiempo de agitación y de sonicación. Usualmente los compuestos fenólicos están unidos a trazas de pectina, <sup>52</sup> celulosa, hemicelulosa y lignina de la pared celular y, la sonicación aumenta su liberación a través del colapso de las partículas (Cheng et al., 2007; Mason et al., 1996). Además, <sup>3</sup> los trabajos de Jovanović et al. (2017) y Nayak et al. (2015) demostraron también que el tiempo de extracción es fundamental en la extracción de CFT, lo cual podría redundar en las propiedades bioactivas del extracto (Dubey y Tripathy, 2024). No obstante, un tiempo prolongado de sonicación, afecta negativamente la capacidad antioxidante al ser medida con la técnica FRAP; bien es cierto que, la sonicación provoca ruptura de la membrana celular dando lugar, a mayor disponibilidad de compuestos bioactivos del medio vegetal, sin embargo, un tiempo prolongado de sonicación podría causar el incremento de radicales libres, por consiguiente, los compuestos antioxidantes se oxidan <sup>27</sup> (Aguilar et al., 2017; Del Socorro Cruz-Cansino et al., 2015; do Amaral Souza et al., 2019; Rojas et al., 2016).

La aplicación de sonicación y agitación, permitió la reducción inicial de la actividad antioxidante medida mediante el método FRAP, para luego experimentar un incremento. Durante la primera etapa de extracción, los compuestos como las antocianinas tienen resistencia a la difusión, lo que sería propicio para su extracción (Xue et al., 2020).

En la extracción <sup>18</sup> mediante agitación mecánica, el tiempo y velocidad de agitación también son factores que cumplen un papel importante en la extracción de compuestos. Mayor

tiempo y velocidad de agitación incrementan el rendimiento de compuestos, ello se debe a la alta transferencia de masa convectiva (Muhamad et al., 2014; Tagliacruzchi et al., 2010; Zainol et al., 2023). Además, la agitación, favorece la rotura de la pared celular aumentando la superficie de contacto entre el disolvente y el material vegetal, lo cual provoca una mayor extracción (Ali y Ahmed, 2023; Mali y Kumar, 2023; Younas et al., 2021); aunque, los tiempos prolongados no necesariamente mejoran la extracción de los compuestos e incluso pueden provocar su degradación. La velocidad de agitación también afecta la transferencia de masa entre el material y el solvente, debido a que existe alteración de las paredes celulares, facilitando la introducción del solvente en el material y extracción de compuestos (Ali y Ahmed, 2023; Sampath, 2013). En el presente estudio se determinó que el tiempo de agitación, velocidad de agitación y la interacción de ambos, favorecen la capacidad antioxidante evaluado por FRAP. Estos resultados obtenidos corroboran los reportados por Ali y Ahmed (2023).

Las propiedades ópticas y la diferencia de color de las microcápsulas son relevantes para su aplicación, puesto que, dicha propiedad es el impacto directo de los productos a aplicar (Laureanti et al., 2023). En este estudio, las microcápsulas con AP son más oscuras, gracias al tipo de pared utilizado y al proceso de liofilización que altera la estructura de los poros después de la sublimación del agua (Kuck y Noreña, 2016). El cambio de color de las microcápsulas durante su almacenamiento podría ser por el efecto encapsulante de los agentes portadores, la degradación y liberación de los compuestos (De Souza et al., 2015).

La eficiencia de encapsulación de compuestos bioactivos, es un factor primordial para la evaluación del éxito de la microencapsulación y de la calidad de protección de los agentes portadores (Laureanti et al., 2023). La baja retención de compuestos bioactivos, posiblemente es resultado de las condiciones del proceso de microencapsulación, como la naturaleza de la pared y la técnica utilizada (Saikia et al., 2015); las cuales no lograrían retener por completo los compuestos dentro de las microcápsulas. No obstante, durante el secado por liofilización, la sublimación puede provocar poros en las microcápsulas seguidamente la liberación prematura de los compuestos microencapsulados y su degradación (Rezende et al., 2018). Los diferentes valores de eficiencia de microencapsulación de compuestos bioactivos reportados por Dag et al. (2017) (77,03-84,44%), Rezende et al. (2018) (17,25-69,75%), Saikia et al. (2015) (78-97%), en relación

con este estudio dependen de factores como las condiciones de microencapsulación, material portador y su concentración.

Al igual que los resultados reportados por Andrade et al. (2023); en el presente estudio existen diferencias de degradación del CFT y CA de las microcápsulas durante su almacenamiento, esto puede deberse al uso de diferentes paredes encapsulantes, presencia de oxígeno en los polvos o posibles cambios en el perfil de los compuestos (Ramakrishnan et al., 2018; da Silva Júnior et al., 2023). Así mismo, Abrahão et al. (2019) reportaron disminución del CFT de las microcápsulas durante los 42 días de almacenamiento. Por otro lado, según Fracassetti et al. (2013) la inestabilidad de los componentes puede ser gracias a la formación de productos de degradación. Además, las microcápsulas producidas con baja cantidad de agente encapsulante son más higroscópicas, facilitando la absorción de agua y reacciones de degradación Souza et al. (2014). No obstante, en la mayoría de microcápsulas el uso de AP fue el que otorgó más estabilidad al CFT y CA, sin embargo, la MD también tiene un efecto estabilizador debido a su capacidad para reducir la movilidad de los reactivos (Estupiñan et al., 2011). Por otro lado, Laine et al. (2008) informaron que las microcápsulas producidas mediante el proceso de liofilización eran estables durante el almacenamiento a comparación de otros procesos.

La determinación y evaluación de la estructura de las partículas de microcápsulas es relevante, puesto que el grado de protección de diferentes materiales portadores está relacionado con dicho aspecto (Laureanti et al., 2023). En esta investigación la morfología de las microcápsulas producidas con AY y AP, puede ser gracias a las temperaturas bajas utilizadas durante el proceso y a la ausencia de resistencia para alterar la superficie durante el secado (Rezende et al., 2018). Por otro lado, la MD generó microcápsulas con formas similares a los observados por (Cano-Higueta et al., 2015; Dag et al., 2017). Los almidones dieron los mejores resultados puesto que las microcápsulas con superficies lisas, uniformes, de forma esférica sin grietas ni colapsos, favorece la estabilidad de compuestos bioactivos tras impedir la entrada de oxígeno al interior de las microcápsulas (Tabio-García et al., 2023). Sin embargo, la falta de uniformidad de partículas de las microcápsulas producidas con MD, indica propiedades microencapsulantes pobres, puesto que, tienen mayor contacto con la superficie otorgando mayor sensibilidad a las reacciones de oxidación y facilitando la liberación del material encapsulado (Akhavan Mahdavi et al., 2016; Tolun et al., 2016)

## V. CONCLUSIONES

En extracción asistida por ultrasonido, los modelos optimizados: para extractos de cáscara de camu camu tuvo una relación volumen-masa de 50 ml/g y 15 min de sonicación; para extractos de cáscara de guayaba tuvo una relación volumen-masa de 60 ml/g y 15 min de sonicación; para semilla de camu camu una relación volumen-masa de 50 ml/g, 4,42 min de sonicación y 3 h de agitación para extracto de semilla de camu camu. Mientras que, en extracción mediante agitación mecánica, los modelos optimizados: para extractos de cáscara de camu camu tuvo una relación volumen-masa de 60 ml/g, 2 horas y 172,2 rpm de agitación; para extractos de cáscara de guayaba tuvo una relación volumen-masa de 60 ml/g, 6,39 horas y 250 rpm de agitación y para extracto de cáscara de guayaba tuvo una relación volumen-masa de 60 ml/g, 7,72 horas y 256,3 rpm de agitación. Bajo mencionadas condiciones, la mayoría de los extractos bioactivos obtenidos por agitación mecánica presentaron valores más altos de contenido fenólico total y capacidad antioxidante medido por DPPH y FRAP.

Por otro lado, se encontró que los diferentes materiales encapsulantes, la maltodextrina, el almidón de yuca y el almidón de plátano tienen efectos significativos sobre la estabilidad de color, morfología de micropartículas, eficiencia y estabilidad encapsulante de las microcápsulas. Los resultados obtenidos indicaron que el almidón de plátano proporcionó un color más oscuro a las microcápsulas, además, durante su almacenamiento el color iba tornándose más oscuro. Por el contrario, el almidón de yuca proporcionó un color más claro a las microcápsulas de extractos bioactivos obtenidos mediante agitación mecánica.

En general, la maltodextrina fue la pared que proporcionó baja estabilidad encapsulante de los bioactivos microencapsulados durante su almacenamiento, sin embargo, las microcápsulas producidas con almidón de yuca presentaron una mejor estabilidad. No obstante, la microencapsulación con almidón de plátano fue más eficiente sobre la capacidad antioxidante medida por DPPH. Mientras que, en la microencapsulación de extractos obtenidos por EAU, el almidón de yuca fue más eficiente sobre el contenido fenólico total y capacidad antioxidante medido por FRAP. Del mismo modo, la microencapsulación de extractos extraídos por agitación mecánica fue más eficiente al utilizar maltodextrina.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Tras demostrar que los materiales estudiados son una fuente prometedora de bioactivos, se recomienda aprovechar sus componentes como una estrategia eficiente y ecológica para reducir el impacto ambiental.

Así mismo, se recomienda aplicar más técnicas y modelos de optimización para la extracción de los compuestos bioactivos, así como realizar más evaluaciones sobre el contenido bioactivo de los materiales vegetales estudiados.

Ensayos de biodisponibilidad y toxicidad fortalecerán el conocimiento sobre el potencial industrial, alimentario y farmacéutico de los extractos de subproductos de camu camu y guayaba.

También, se recomienda evaluar la incorporación de los encapsulados en productos industriales, alimentarios y/o farmacéuticos.

## **VII. Referencias bibliográficas**

## VIII. <sup>1</sup> ANEXOS

**Figura 12**

*Recepción de muestras de camu camu*



**Figura 13**

*Recepción de muestras de guayaba*



**Figura 14**

*Cáscara de camu camu*





**Figura 14**

*Semilla de camu camu*



**Figura 15.**

*Cáscara de camu camu en polvo*



**Figura 16**

*Semilla de camu camu en polvo*



**Figura 17**

*Cáscara de guayaba en polvo*



**Figura 18**

*Extracción asistida por ultrasonido*



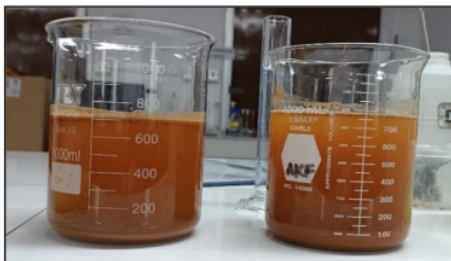
**Figura 19**

*Extracción mediante agitación mecánica*



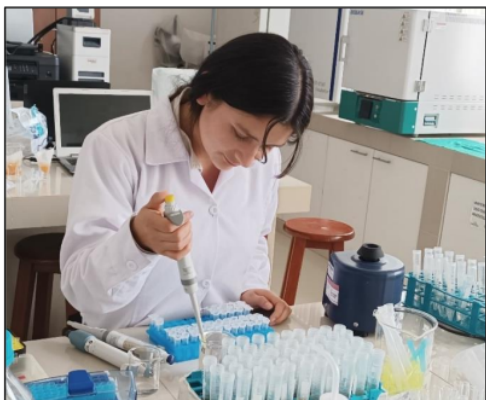
**Figura 20**

*Extractos bioactivos*



**Figura 21**

*Preparación de extractos para determinar contenido fenólico total y capacidad antioxidante*



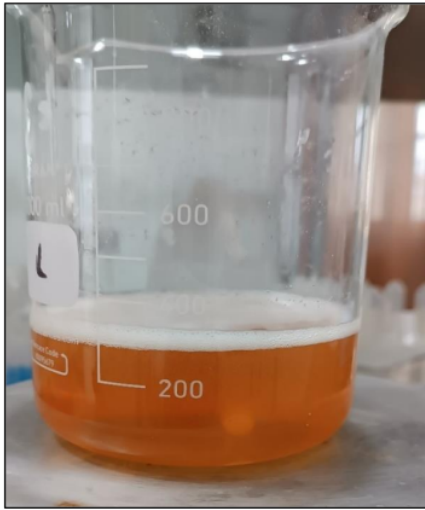
**Figura 22**

*Determinación de CFT y CA (DPPH y FRAP) en espectrofotómetro*



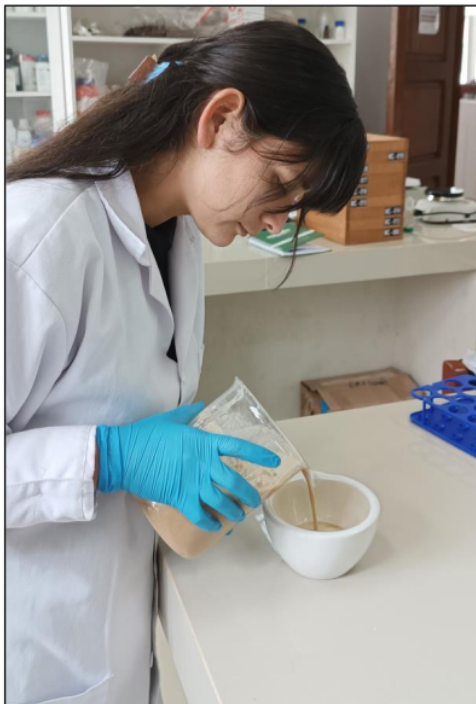
**Figura 23**

*Agitación del extracto con la matriz encapsulante*



**Figura 24**

*Congelamiento con nitrógeno líquido de las soluciones de extractos con matriz encapsulante*



**Figura 25**

*Microencapsulación mediante liofilización*



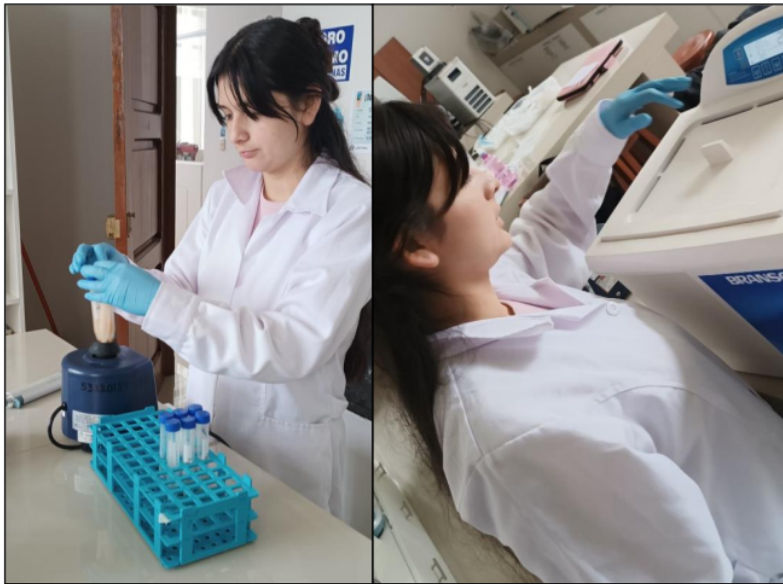
**Figura 26**

*Microcápsulas en polvo*



**Figura 27**

*Preparación de extractos bioactivos a partir de las microcápsulas*



**Figura 28**

*Acondicionamiento de extractos para medir eficiencia y estabilidad encapsulante.*



**Figura 29**

*Determinación de eficiencia y estabilidad encapsulante mediante fenoles totales y capacidad antioxidante*



**Figura 30**

*Toma de imágenes de microcápsulas en microscopía electrónica de barrido.*



# Tesis - Luz Clarita

## INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

9%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1 [repositorio.untrm.edu.pe](https://repositorio.untrm.edu.pe) Fuente de Internet 2%

2 [hdl.handle.net](https://hdl.handle.net) Fuente de Internet 2%

3 [es.scribd.com](https://es.scribd.com) Fuente de Internet 1%

4 Submitted to Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas Trabajo del estudiante 1%

5 Saúl Hernández-Rodríguez, Cinthya Nathaly Quiroz-Reyes, María Eugenia Ramírez-Ortiz, Elba Ronquillo-de Jesús et al. "Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de Justicia spicigera Schltl. mediante la metodología de superficie de respuesta", TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2020  
Publicación 1%



6	Fuente de Internet	<1 %
7	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	<1 %
8	patents.google.com Fuente de Internet	<1 %
9	"Propiedades Funcionales de hoy", Omnia Publisher SL, 2017 Publicación	<1 %
10	repositorioinstitucional.buap.mx Fuente de Internet	<1 %
11	Jose Velazquez Varela. "ESTUDIO DE LOS ESPECTROS DIELECTRICOS EN ALIMENTOS CON ESTRUCTURA COLOIDAL", Universitat Politecnica de Valencia, 2014 Publicación	<1 %
12	repositorio.ufsc.br Fuente de Internet	<1 %
13	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	<1 %
14	www.tandfonline.com Fuente de Internet	<1 %
15	D.J.M. Abreu, E.E.N. Carvalho, E.V.B. Vilas Boas, E.R. Asquieri, C. Damiani. "Ultrasound-	<1 %

assisted extraction of red mombin seed oil (Spondias purpurea L.): phenolic profile, fatty acid profile and chemical characterization of the cake, residue from the oil extraction", *Grasas y Aceites*, 2022

Publicación

---

16

Janaina Sánchez García. "Desarrollo y caracterización de nuevas harinas de lenteja y quinoa fermentadas con *Pleurotus ostreatus*", *Universitat Politecnica de Valencia*, 2023

Publicación

---

17

der Ohannesian, Martín. "Efecto de la Incorporación de Frutos Rojos Deshidratados con Alta Capacidad Antioxidante Sobre los Principales Atributos de Calidad de Pan", *Universidad Catolica de Cordoba (Argentina)*, 2023

Publicación

---

18

Rosas Baruren, Miluska Anthuannet. "Cuantificación de la erosión hídrica en el Perú y los costos ambientales asociados.", *Pontificia Universidad Católica del Perú - CENTRUM Católica (Perú)*, 2021

Publicación

---

19

Submitted to *Universidad Tecnológica del Perú*

Trabajo del estudiante

---

<1 %

<1 %

<1 %

<1 %

20 Ivone Lima Santos, Laiane Cristina Freire Miranda, Antonio Manoel da Cruz Rodrigues, Luiza Helena Meller da Silva et al. "Camucamu [*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh]: A review of properties and proposals of products for integral valorization of raw material", *Food Chemistry*, 2022  
Publicación <1 %

---

21 [biblioteca.itson.mx](http://biblioteca.itson.mx)  
Fuente de Internet <1 %

---

22 [pdfslide.tips](http://pdfslide.tips)  
Fuente de Internet <1 %

---

23 [prezi.com](http://prezi.com)  
Fuente de Internet <1 %

---

24 [1library.org](http://1library.org)  
Fuente de Internet <1 %

---

25 Aritza Wain-Martin, Roberto Campana, Aroa Morán-Ruiz, Aitor Larrañaga, María Isabel Arriortua. "Synthesis and processing of SOFC components for the fabrication and characterization of anode supported cells", *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 2020  
Publicación <1 %

---

26 Claudia Isabel Bas Bellver. "Desarrollo del proceso de obtención de polvos funcionales <1 %

de uso alimentario a partir de residuos de las líneas de confección de hortalizas, caracterización funcional y evaluación de su respuesta a la digestión simulada in vitro", Universitat Politecnica de Valencia, 2023

Publicación

---

27

Prakash Kumar Nayak, Chandra Mohan Chandrasekar, Shikharpiyom Gogoi, Radha krishnan Kesavan. "Impact of thermal and therosonation treatments of amora (Spondius pinnata) juice and prediction of quality changes using artificial neural networks", Biosystems Engineering, 2022

Publicación

---

<1 %

28

[dadun.unav.edu](http://dadun.unav.edu)

Fuente de Internet

---

<1 %

29

Morales, Elisabet Segredo. "Hidrogeles Bioactivos para la Regeneracion osea en Osteoporosis", Universidad de La Laguna (Canary Islands, Spain), 2022

Publicación

---

<1 %

30

[ar.scribd.com](http://ar.scribd.com)

Fuente de Internet

---

<1 %

31

[eprints.ucm.es](http://eprints.ucm.es)

Fuente de Internet

---

<1 %

32

[repo.unlpam.edu.ar](http://repo.unlpam.edu.ar)

Fuente de Internet

---

<1 %

33

Carmen Ortuño Cases. "Aplicación de ultrasonidos de potencia para la mejora de procesos de inactivación con fluidos supercríticos.", Universitat Politecnica de Valencia, 2014

Publicación

<1 %

34

F. Chenlo. "ISOTERMAS DE DESORCION DE PIMIENTOS DE PADRON (Capsicum annum L. Var. Longum) DESORPTION ISOTHERMS OF PADRON PEPPERS (Capsicum annum L. Var. Longum) ISOTERMAS DE DESORCION DE PEMENTOS DE PADRON (Capsicum annum L. Var. Longum)", CyTA - Journal of Food, 12/01/2005

Publicación

<1 %

35

Laura Settler Ramírez. "Envases activos portadores de microorganismos para la bioconservación de alimentos", Universitat Politecnica de Valencia, 2021

Publicación

<1 %

36

[dgsa.uaeh.edu.mx:8080](http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080)

Fuente de Internet

<1 %

37

[www.alice.cnptia.embrapa.br](http://www.alice.cnptia.embrapa.br)

Fuente de Internet

<1 %

38

[www.revistabionatura.com](http://www.revistabionatura.com)

Fuente de Internet

<1 %

[www.untrm.edu.pe](http://www.untrm.edu.pe)

39

Fuente de Internet

&lt;1 %

40

Juan C. Castro, J. Dylan Maddox, Marianela Cobos, Sixto A. Imán. "Chapter 5 Myrciaria dubia "Camu Camu" Fruit: Health-Promoting Phytochemicals and Functional Genomic Characteristics", IntechOpen, 2018

Publicación

&lt;1 %

41

Nelson P. Guerra, María Pernas, Lorenzo Pastrana, Ana Torrado et al. "Modelling the enzymatic activity of two lipases isoenzymes commonly used in the food industry Modelado de la actividad enzimática de dos isoenzimas lipasas comúnmente utilizadas en la industria alimentaria", CyTA - Journal of Food, 2011

Publicación

&lt;1 %

42

Rufino Moya, Pablo José. "Influencia del tipo de forraje y de la presencia de taninos condensados en la fermentación in vitro de las dietas de ovino en el área mediterránea. Uso de biomarcadores para la trazabilidad del sistema de alimentación", Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (Spain), 2023

Publicación

&lt;1 %

43

[cybertesis.unmsm.edu.pe](http://cybertesis.unmsm.edu.pe)

Fuente de Internet

&lt;1 %

44	<a href="http://doczz.es">doczz.es</a> Fuente de Internet	<1 %
45	<a href="http://iacobus.usc.es">iacobus.usc.es</a> Fuente de Internet	<1 %
46	<a href="http://repositorio.unal.edu.co">repositorio.unal.edu.co</a> Fuente de Internet	<1 %
47	<a href="http://repositorio.upct.es">repositorio.upct.es</a> Fuente de Internet	<1 %
48	<a href="http://revfitotecnia.mx">revfitotecnia.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
49	<a href="http://rinacional.tecnm.mx">rinacional.tecnm.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
50	<a href="http://www.aaep.org.ar">www.aaep.org.ar</a> Fuente de Internet	<1 %
51	<a href="http://www.cgap.org">www.cgap.org</a> Fuente de Internet	<1 %
52	<a href="http://www4.ulpgc.es">www4.ulpgc.es</a> Fuente de Internet	<1 %
53	J & E CONSULTORES GENERALES S.R.L.. "EIA-SD del Proyecto Instalación de la Línea de Transmisión en 60 kV Pongo de Caynarachi - Yurimaguas y Subestaciones-IGA0002612", R.D. N° 196-2017-MEM/DGAAE, 2020 Publicación	<1 %

Excluir citas      Activo

Excluir coincidencias < 5 words

Excluir bibliografía      Activo



# Tesis - Luz Clarita

---

INFORME DE GRADEMARK

---

NOTA FINAL

COMENTARIOS GENERALES

**/0**

---

PÁGINA 1

---

PÁGINA 2

---

PÁGINA 3

---

PÁGINA 4

---

PÁGINA 5

---

PÁGINA 6

---

PÁGINA 7

---

PÁGINA 8

---

PÁGINA 9

---

PÁGINA 10

---

PÁGINA 11

---

PÁGINA 12

---

PÁGINA 13

---

PÁGINA 14

---

PÁGINA 15

---

PÁGINA 16

---

PÁGINA 17

---

PÁGINA 18

---

PÁGINA 19

---

PÁGINA 20

---

PÁGINA 21

---

PÁGINA 22

---

PÁGINA 23

---

PÁGINA 24

---

PÁGINA 25

---

PÁGINA 26

---

PÁGINA 27

---

PÁGINA 28

---

PÁGINA 29

---

PÁGINA 30

---

PÁGINA 31

---

PÁGINA 32

---

PÁGINA 33

---

PÁGINA 34

---

PÁGINA 35

---

PÁGINA 36

---

PÁGINA 37

---

PÁGINA 38

---

PÁGINA 39

---

PÁGINA 40

---

PÁGINA 41

---

PÁGINA 42

---

PÁGINA 43

---

PÁGINA 44

---

PÁGINA 45

---

PÁGINA 46

---

PÁGINA 47

---

PÁGINA 48

---

PÁGINA 49

---

PÁGINA 50

---

PÁGINA 51

---

PÁGINA 52

---

PÁGINA 53

---

PÁGINA 54

---

PÁGINA 55

---

PÁGINA 56

---

PÁGINA 57

---

PÁGINA 58

---

PÁGINA 59

---

PÁGINA 60

---

PÁGINA 61

---

PÁGINA 62

---