

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS**



**“MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTO DE HOJAS DE
GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)”**

Presentada por:

OSCAR BENJAMIN JORDAN SUAREZ

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

Lima – Peru

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

**“MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTO DE HOJAS DE
GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
*Doctoris Philosophiae***

Presentada por:

OSCAR BENJAMÍN JORDÁN SUÁREZ

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Luis Condezo Hoyos

PRESIDENTE

Ph.D. Patricia Glorio Paulet

ASESORA

Ph.D. Ritva Repo Carrasco

MIEMBRO

Ph.D. Luis Fernando Vargas Delgado

MIEMBRO

Dr. Wilson Castro Silupu

MIEMBRO EXTERNO

Dra. Leslie Vidal Jiménez

CO-ASESORA

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a quienes han sacrificado momentos de su vida en pos de la investigación.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser el artífice de mi vida.

A mi familia, por su apoyo permanente y la confianza depositada en mí.

Al programa doctoral de Ciencia de Alimentos y el programa de Becas de Doctorado del MINEDU administrado por FONDECYT por el financiamiento de mis estudios bajo el convenio de subvención 179-2015-FONDECYT.

Al Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) de la UNALM.

A los laboratorios de Microbiología de Alimentos, Fisicoquímica, Investigación e Ingeniería de la Facultad de Industrias Alimentarias de la UNALM.

Al programa de becas de intercambio Alianza del Pacífico por facilitar una estancia de investigación en la Universidad de Concepción - Chile.

Al Centro de Espectroscopía y Microscopía (CESMI) y el laboratorio de *Screening* de Compuestos Bioactivos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UdeC.

A mi asesora Dra. Patricia Glorio, y mi Co-Asesora Dra. Leslie Vidal, por compartir sus conocimientos y aportes para con este trabajo.

A las instituciones que me facilitaron apoyo logístico y humano, y a las personas que colaboraron con actividades complementarias durante todo este proceso.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	Guanábana	3
2.1.1	Usos tradicionales	4
2.1.2	Propiedades terapéuticas	5
2.1.3	Efectos adversos	6
2.1.4	Fitoquímicos bioactivos	7
2.2	Extracción de compuestos bioactivos	10
2.3	Microencapsulación	11
2.3.1	Efecto tecnológico	12
2.3.2	Microencapsulación por atomización	13
2.3.3	Microencapsulación por liofilización	14
2.3.4	Agentes encapsulantes	14
2.3.5	Microcápsulas	15
2.4	Actividades biológicas	17
2.4.1	Actividad anticancerígena	17
2.4.2	Actividad neurotóxica	18
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1	Lugar de ejecución	19
3.2	Material vegetal	19
3.3	Reactivos	20
3.4	Métodos de caracterización	20
3.4.1	Microestructura	20
3.4.2	Eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos	21
3.4.3	Capacidad antioxidante	22

3.4.4	Determinación de Anonacina por HPLC	22
3.4.5	Identificación y cuantificación de Anonacina por HPTLC	23
3.4.6	Análisis proximal de las hojas	24
3.4.7	Identificación de minerales en las hojas	25
3.4.8	Color del extracto hidroalcohólico de guanábana	25
3.4.9	Humedad de las microcápsulas	25
3.4.10	Solubilidad	25
3.4.11	Tamaño de partícula.....	26
3.4.12	Esfericidad.....	26
3.4.13	Porcentaje de partículas rugosas.....	26
3.4.14	Espectroscopia FTIR.....	27
3.4.15	Cultivos celulares PC12.....	27
3.4.16	Ensayo de viabilidad celular por MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol]	27
3.4.17	Cultivo de neuronas corticales	28
3.4.18	Análisis fluorométrico de Ca ²⁺ citosólico	28
3.5	Etapas metodológicas.....	29
3.5.1	Determinación de parámetros de extracción	31
3.5.2	Selección de la técnica de microencapsulación.....	32
3.5.3	Optimización de la técnica de microencapsulación seleccionada	33
3.5.4	Evaluación de actividades biológicas del extracto microencapsulado final ..	34
3.6	Análisis estadístico	35
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1	Determinación de parámetros de extracción	36
4.1.1	Caracterización de la materia prima	36
4.1.2	Parámetros de extracción	39
4.2	Selección de la técnica de encapsulación.....	43

4.2.1	Caracterización morfológica de los insumos	43
4.2.2	Caracterización morfológica de las micropartículas.....	44
4.2.3	Formación de partículas defectuosas durante el secado por atomización.....	46
4.2.4	Eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos.....	53
4.2.5	Extracto microencapsulado vía liofilización	54
4.2.6	Comprobación de la microencapsulación vía FTIR	56
4.2.7	Selección de la técnica de microencapsulación.....	58
4.3	Optimización de la técnica seleccionada: Secado por atomización.....	59
4.3.1	Parámetros óptimos.....	59
4.3.2	Efecto de la temperatura y el flujo de alimentación	62
4.3.3	Caracterización del tratamiento óptimo	64
4.4	Evaluación del efecto tóxico	67
4.4.1	Ensayo de citotoxicidad	67
4.4.2	Actividad neuronal.....	69
V.	CONCLUSIONES	73
VI.	RECOMENDACIONES	74
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
VIII.	ANEXOS.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades terapéuticas de <i>Annona muricata</i> según estudios científicos.....	6
Tabla 2. Algunos fitoquímicos identificados en las hojas de guanábana.....	7
Tabla 3. Condiciones de alimentación de la fase móvil.....	23
Tabla 4. Composición químico-proximal de las hojas secas de guanábana (b.h.)	37
Tabla 5. Resultados del diseño experimental para optimizar la extracción	40
Tabla 6. Condiciones de extracción optimizadas	41
Tabla 7. Características del extracto hidroalcohólico de las hojas	42
Tabla 8. Diámetro promedio en volumen y tamaño de micropartículas	49
Tabla 9. Valores de eficiencia de encapsulación, y solubilidad.	53
Tabla 10. Contenido de Anonacina en las diferentes muestras (b.h.).....	54
Tabla 11. Valores de eficiencia de encapsulación, y solubilidad	56
Tabla 12. Valores de E.E. de acuerdo a la técnica de microencapsulación	58
Tabla 13. Caracterización fisicoquímica de los tratamientos del diseño	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de la guanábana.....	3
Figura 2. Fracciones botánicas de la guanábana con presencia de fitoquímicos.....	4
Figura 3. Presentaciones comerciales de las hojas de guanábana en Perú.....	5
Figura 4. Estructura química de metabolitos secundarios encontrados en las hojas	10
Figura 5. Perfil del secado de una gota durante el secado por atomización.....	13
Figura 6. Representación esquemática de tipos de microcápsulas	15
Figura 7. Mecanismos de liberación en un sistema reservorio (A) y monolítico (B).....	17
Figura 8. Zona de procedencia de las hojas de <i>Annona muricata</i> L.....	19
Figura 9. Diseño experimental.....	30
Figura 10. Ciclo biológico de las hojas de guanábana.	36
Figura 11. Imagen SEM de las hojas secas pulverizadas y composición elemental (%).....	38
Figura 12. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad.....	40
Figura 13. Micrografías de los insumos empleados	43
Figura 14. Microcápsulas de extracto hidroalcohólico de hojas de guanábana obtenidas mediante atomización.....	44
Figura 15. Partículas defectuosas identificadas en el análisis de imágenes	46
Figura 16. Microcápsulas empleando 5 % de encapsulante.....	48
Figura 17. Distribución de frecuencias de diámetros de partículas (μm)	50
Figura 18. Espectro infrarrojo de los tratamientos y los insumos originales	52
Figura 19. Micropartículas de extracto de hojas de guanábana microencapsulado mediante liofilización.....	55
Figura 20. Espectro infrarrojo de los tratamientos liofilizados y los insumos originales en la región dactilográfica.....	57
Figura 21. Comparación de las características visuales de los polvos microencapsulados ..	59
Figura 22. Condiciones óptimas para la microencapsulación de extracto de hojas de guanábana mediante atomización.	61
Figura 23. Efecto de la temperatura.....	62
Figura 24. Efecto del flujo.....	63
Figura 25. Morfología de las micropartículas del tratamiento óptimo	65
Figura 26. Efecto de la concentración en la viabilidad celular.....	67

Figura 27. Efecto del tiempo de exposición de muestras a 10 $\mu\text{g/mL}$ en la viabilidad celular.....	69
Figura 28. Análisis fluorimétrico de calcio en neuronas corticales.....	70
Figura 29. Respuestas de frecuencia y amplitud a 10 $\mu\text{g/mL}$ de muestra.....	71
Figura 30. Respuestas de frecuencia y amplitud a 10 $\mu\text{g/mL}$ de muestra en relación al control (neuronas sin tratar).....	72

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Constancia de determinación taxonómica de la especie	97
Anexo 2. Preparación de las hojas en polvo.....	98
Anexo 3. Protocolo y curva estándar para determinación de compuestos fenólicos.....	99
Anexo 4. Protocolo y curva estándar para determinación de capacidad antioxidante por DPPH.....	100
Anexo 5. Protocolo y curva estándar para determinación de capacidad antioxidante por ABTS.....	101
Anexo 6. Especificaciones de estándar de anonacina	102
Anexo 7. Curva de calibración de anonacina vía HPLC.....	103
Anexo 8. Curva de calibración de anonacina vía HPTLC	104
Anexo 9. Informe 1 de ensayos fisicoquímicos.....	105
Anexo 10. Informe 2 de ensayos fisicoquímicos.....	106
Anexo 11. Acondicionamiento de muestras para ensayos biológicos	107
Anexo 12. Curva de calibración para determinación de compuestos fenólicos en la etapa de extracción.....	108
Anexo 13. Ficha técnica de goma arábica.....	109
Anexo 14. Ficha técnica de Maltodextrina 1.....	110
Anexo 15. Ficha técnica de Maltodextrina 2.....	111
Anexo 16. Espectro de absorción del estándar de anonacina.....	112
Anexo 17. Informe de ensayo de determinación de alcaloides totales	113
Anexo 18. Extracto microencapsulado en polvo	114
Anexo 19. Análisis estadístico de muestras microencapsuladas por liofilización	115
Anexo 20. Microencapsulación del extracto por atomización	116
Anexo 21. Análisis estadístico para optimización de la solubilidad.....	117
Anexo 22. Análisis estadístico para optimización de la humedad	118
Anexo 23. Análisis estadístico para optimización de la eficiencia de encapsulación	119
Anexo 24. Análisis estadístico para optimización de respuestas múltiples	120
Anexo 25. Fluorómetro empleado para análisis de Ca ⁺	121

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABS:	Absorbancia
ABTS:	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
ACG:	Acetogenina
ATZ:	Atomizado
ALK:	Alcaloides
CFI:	Contenido de compuestos fenólicos en el interior
CFT:	Compuestos fenólicos totales
DE:	Dextrosa equivalente
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EDS:	Espectroscopia de energía dispersiva, del inglés <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
EE:	Eficiencia de encapsulación
EXT:	Extracto de hojas
EUA:	Estados Unidos de América
FDM:	Extracto Microencapsulado por Liofilización, del inglés <i>Freeze-dried microcapsules</i>
FIAL:	Facultad de Industrias Alimentarias
FTIR:	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
GA:	Goma arábica
GRAS:	Generalmente reconocido como seguro, del inglés <i>Generally Recognized as Safe</i>
HPTLC:	Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución, del inglés <i>High Performance Thin-Layer Chromatography</i> .
IR:	Infrarrojo
LFE:	Extracto fresco de hojas, del inglés <i>Leaf fresh extract</i>
LZD:	Liofilizado
MD:	Maltodextrina
MP:	Materia prima
MTT:	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol
PC12:	Feocromocitoma adrenal de rata
PHC:	Compuestos fenólicos
RPM:	Revoluciones por minuto
SBD:	Solubilidad

SEM: Microscopia electrónica de barrido, del inglés *Scanning Electron Microscopy*.
SDM: Extracto Microencapsulado por Atomización, del inglés *Spray-dried microcapsules*
SPC: Contenido de compuestos fenólicos en la superficie
STD: Estándar de anonacina, del inglés *Standard*
THF: Tetrahidrofurano
THP: Tetrahidropirano
UNALM: Universidad Nacional Agraria La Molina
UNMSM: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

Las hojas de *Annona muricata* contienen compuestos bioactivos que pueden ser aprovechados mediante procesos tecnológicos adecuados para la producción de nutraceúticos y alimentos funcionales. Se estudió el efecto de las condiciones de microencapsulación en las propiedades tecnofuncionales y biológicas de extracto microencapsulado de hojas de guanábana. La extracción se efectuó a 70 °C durante 30 min mezclando las hojas molidas con un solvente hidroalcohólico (1:36), estas condiciones fueron estandarizadas previamente mediante un diseño factorial multinivel para maximizar la eficiencia de extracción. El extracto fue microencapsulado empleando maltodextrina y goma arábiga al 5 y 10% vía secado por atomización y liofilización. Los tratamientos resultantes fueron caracterizados mediante ensayos de solubilidad, eficiencia de encapsulación, microestructura y espectroscopia IR, y se seleccionó el secado por atomización utilizando maltodextrina (10%) por conservar mejor el extracto comparado con la liofilización. El polvo resultante presentó 72.12% de eficiencia de encapsulación, partículas esféricas de tamaño heterogéneo y alta solubilidad. Para mejorar las características del polvo (minimizando la humedad y maximizando la solubilidad y eficiencia de encapsulación), la técnica seleccionada fue optimizada en función al flujo de alimentación y temperatura, fijando los parámetros de 7 mL/min y 140 °C. El extracto microencapsulado en condiciones óptimas fue caracterizado fisicoquímicamente y se probó su efecto en células cromafines PC12 y neuronas corticales para descartar neurotoxicidad. Se encontró que la anonacina presente en los polvos microencapsulados reduce la viabilidad celular y altera los impulsos neuronales de calcio, pero este efecto disminuye según la concentración y por la existencia de otros fitoquímicos. El extracto microencapsulado contiene sustancias originalmente presentes en las hojas que conservan un efecto funcional dependiente de la concentración en la que estén presentes.

Palabras claves: microencapsulación, *Annona muricata*, optimización, polímeros encapsulantes, anonacina, atomización, liofilización.

ABSTRACT

Annona muricata leaves present bioactive compounds that can be extracted and protected by suitable technological processes for functional foods and nutraceuticals production. The effect of technological conditions for microencapsulating *Annona muricata* leaves extract on the functionality of the resulting powders were studied. Phytochemical extraction from soursop leaves was performed at 70 °C for 30 min mixing the grinded leaves with a hydroalcoholic solvent (1:36), those conditions were previously established by using a multilevel factorial design in order to maximize extraction efficiency. The extract was microencapsulated via spray drying and freeze-drying using Maltodextrin and Gum Arabic at 5 and 10 %. The resulting treatments were physicochemically characterized through solubility, encapsulation efficiency, microstructure and IR spectrum, in order to select the most suitable microencapsulation technique, the type and the percentage of encapsulant. The treatment with maltodextrin at 10 % using spray drying microencapsulation, was selected due to its highest encapsulation efficiency (72.12 %). The resulting powder was comprised of spherical particles heterogeneous in size with a hollow center. In order to enhance the technofunctional characteristics of the resulting powder, the rate of feeding and temperature were fixed by optimization at 7 mL/min and 140 °C. The cytotoxic activity of the optimum treatment on PC12 cells was tested at different concentrations and times of exposure founding that there is a toxic effect on PC12 cells attributed to the presence of annonacin; elsewhere, It was observed an alteration on calcium signal of cortical neurons as a consequence of a depletion of energy supply into neurons, this effect was decreased in extracts due the presence of other phytochemicals. The results confirm that bioactivity of phytochemicals originally present in the leaves are still active, but their effect depends on the concentration in which they are present.

Keywords: microencapsulation, *Annona muricata*, optimization, encapsulant polymers, annonacin, spray drying, freeze drying.

I. INTRODUCCIÓN

La industria de nutraceuticos se encuentra en constante investigación del potencial de compuestos bioactivos procedentes de fuentes vegetales, para lo cual acude a recursos empleados ancestralmente como medicina alternativa por grupos étnicos. Lo anterior involucra un manejo adecuado del proceso productivo desde la siembra, recolección, extracción, el procesamiento y conservación. Por su parte, la industria alimentaria adopta y contribuye en la reinención de las tecnologías actuales de suministro de compuestos bioactivos en busca de asegurar la disponibilidad y funcionalidad de estos agentes promotores de la salud.

Una fuente de compuestos benéficos para la salud es la guanábana (*Annona muricata*), planta tropical que presenta múltiples aplicaciones, y se utiliza integralmente en medicina tradicional, agronomía, farmacia, entre otros. En los últimos años se ha extendido el consumo de las hojas por sus propiedades terapéuticas, atribuidas a fitoquímicos como acetogeninas, alcaloides y compuestos fenólicos; sin embargo, debido a la sensibilidad de estos compuestos a condiciones externas, deben ser protegidos de su degradación post extracción.

Como alternativa tecnológica para la de conservación de compuestos bioactivos figura la microencapsulación, la cual es ampliamente utilizada para situar fitoquímicos a disposición del consumidor minimizando su degradación. La microencapsulación consiste en el atrapamiento de un compuesto de interés dentro de un microenvase; como resultado, se producen pequeñas partículas conteniendo al principio activo, el cual se circunscribe por una cobertura, o se incrusta en una matriz, con el objetivo de disponer de sus propiedades cuando se produzca la liberación (Gharsallaoui *et al.* 2007); asimismo, es una herramienta útil para optimizar la distribución de moléculas bioactivas y células vivas hacia alimentos (Nedovic *et al.* 2011).

La atomización y liofilización son técnicas comúnmente usadas para la obtención de microencapsulados, la atomización se emplea en la industria farmacéutica y alimentaria para microencapsular extractos de frutas, emulsiones, fármacos, entre otros; asimismo, se emplea la liofilización porque ofrece la ventaja de no aplicar calor, sin embargo involucra un mayor costo (Saikia *et al.* 2015), a pesar del tiempo necesario para la liofilización, esta técnica es simple y adecuada para la microencapsulación de componentes bioactivos solubles en agua y termosensibles (Jafari *et al.* 2016); finalmente, la selección de la técnica dependerá del propósito que se dará al polvo obtenido.

Sin embargo, independiente de la técnica, las condiciones tecnológicas de la microencapsulación pueden originar partículas de tamaño y forma irregular, que conducen a la conservación deficiente de los compuestos de interés. Por ejemplo, la técnica de encapsulación, el tipo y concentración del agente encapsulante empleado, ejercen un efecto directo en la estructura de las micropartículas, y esto a su vez determina las propiedades tecnofuncionales de los polvos como el color, la solubilidad, redispersibilidad, liberación, entre otras (Cano-Chauca *et al.* 2005, Chranioti y Tzia 2014).

Con el propósito de preservar la actividad del compuesto de interés, es prioritario comprender el proceso de formación de la superficie de las microcápsulas (Porrás-Saavedra *et al.* 2015), para lo cual resulta conveniente realizar ajustes de los parámetros tecnológicos del proceso de microencapsulado acorde con el fin previsto del polvo (Mondragón *et al.* 2013). Considerando que la tendencia futura es la aplicación en el ser humano, se debiera priorizar las implicancias para la salud del consumidor, en función de una caracterización tecnofuncional y biológica para determinar la utilidad y afinidad para su uso posterior.

Por lo expuesto anteriormente, se estudió el efecto de las condiciones de microencapsulación en las propiedades tecnofuncionales y biológicas de extracto de hojas de guanábana en proyección a la elaboración de una bebida instantánea de consumo humano directo, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las condiciones de obtención del extracto de hojas de guanábana.
- Seleccionar la técnica de microencapsulación del extracto de hojas de guanábana.
- Optimizar la técnica de microencapsulación seleccionada.
- Evaluar la actividad biológica del extracto optimizado.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Guanábana

La guanábana o graviola (*Annona muricata* L.) es una fruta tropical que crece en Centro y Sudamérica, zonas tropicales de Asia y Oceanía, y países subsaharianos (Machado de Moraes *et al.* 2016, Gavamukulya *et al.* 2014, Badrie y Schauss 2010). Se desconoce el lugar exacto de origen, pero posiblemente sea nativa de Centro América, las Antillas y la zona septentrional de América del Sur (Florez Londoño y Martínez Muñoz 2010, Lim 2012). En el Perú se cultiva en la alta Amazonía, costa y valles interandinos (Gutsche 2008). Pertenecer a la familia Annonaceae (Morton 1966), la cual incluye 130 géneros con 2300 especies, caracterizados por la presencia de metabolitos con actividades biológicas importantes, entre las que destacan las Acetogeninas (Florez Londoño y Martínez Muñoz 2010, Solís-Fuentes *et al.* 2011). En la Figura 1 se esquematiza la clasificación taxonómica de la planta de acuerdo a Florez y Martínez (2010).

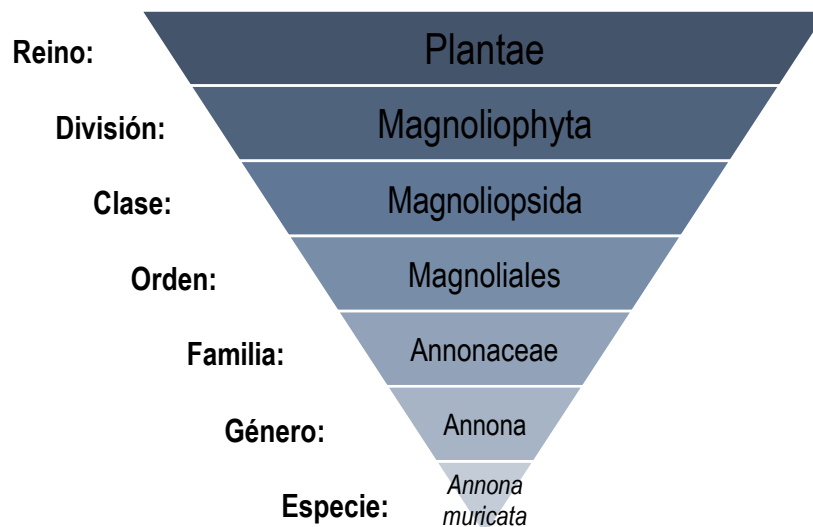


Figura 1. Clasificación taxonómica de la guanábana

2.1.1 Usos tradicionales

La fruta no solo se aprecia como alimento (Coria-Téllez *et al.* 2016); sino además en la medicina tradicional de los trópicos se sabe que la corteza, raíz, hojas, fruto y semillas de *Annona muricata* presentan varias aplicaciones médicas (Solís-Fuentes *et al.* 2011), e incluso como biopesticidas, bioinsecticidas y repelente de insectos (Coria-Téllez *et al.* 2016). Las partes de la planta en donde se encuentran distribuidos los fitoquímicos se esquematizan en la Figura 2.

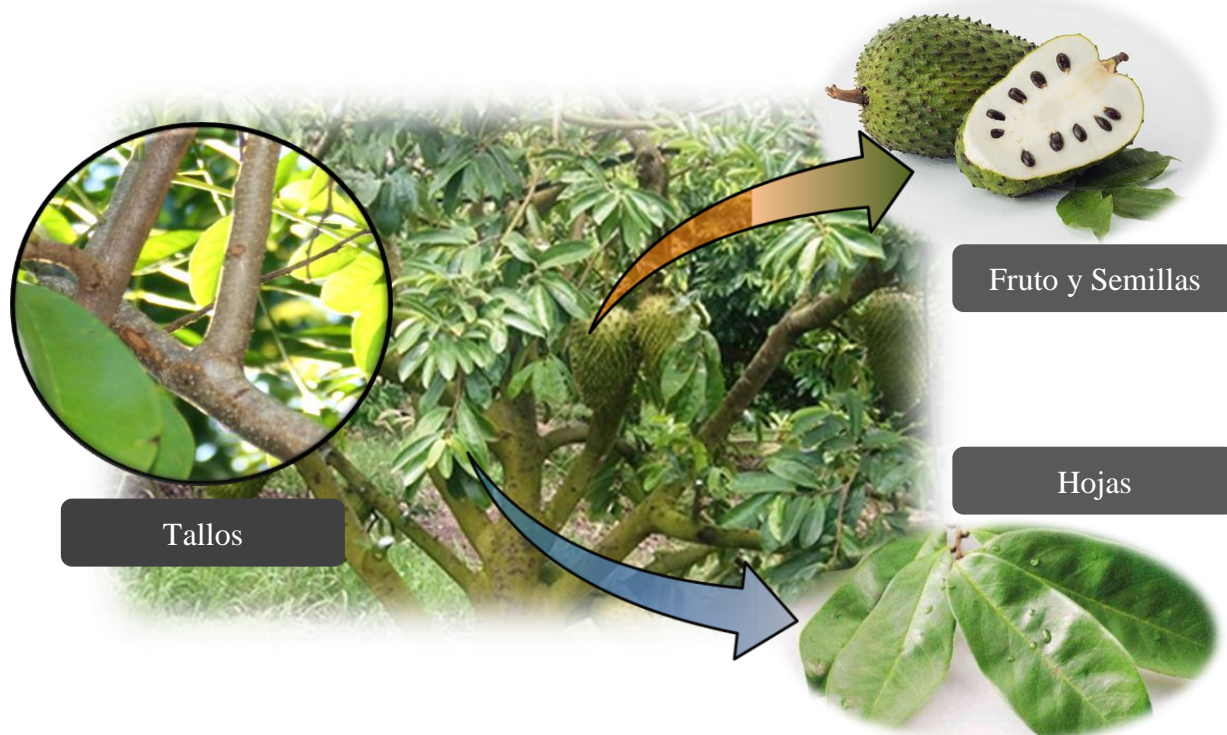


Figura 2. Fracciones botánicas de la guanábana con presencia de fitoquímicos

Popularmente el jugo del fruto se emplea como un *lactagogo*, para tratar diarrea, y enfermedades del corazón e hígado; mientras que las hojas son usadas para tratar enfermedades cutáneas y dolores localizados (Coria-Téllez *et al.* 2016).

La ingestión de la decocción de las hojas es empleada como analgésico (Quilez *et al.* 2018); asimismo, las hojas son usadas para tratar malestares respiratorios como la gripe y el asma (Kossouh *et al.* 2007); también las hojas actúan como antiparasitario a nivel intestinal y cutáneo (Badrie y Schauss 2010), incluso se aplican para tratar la Malaria en países tropicales (Boyom *et al.* 2011). Las hojas pueden emplearse para hacer té, o ser consumidas enteras como suplemento dietario en cápsulas con alegaciones de salud (Machado de Moraes *et al.*

2016); llegando incluso a ser usadas como tratamiento alternativo de cáncer, hipertensión y diabetes (Gavamukulya *et al.* 2014, Coria-Téllez *et al.* 2016). En el Perú se comercializan con distintos grados de procesamiento con fines medicinales (Figura 3).



Figura 3. Presentaciones comerciales de las hojas de guanábana en Perú

Frescas a granel (A); deshidratadas envasadas (B); pulverizadas en cápsulas (C), foto extraída de Inkanat (2016)

2.1.2 Propiedades terapéuticas

Estudios recientes a nivel *in vivo* e *in vitro* han demostrado sus propiedades antihiper glucémica, antihiperlipidémica, antimalarica, antiparasitaria, insecticida, molusquicida, antiviral, anticancerígena (Gavamukulya *et al.* 2014), antiprotozoaria, antioxidante, larvicida, ansiolítica, anti estrés, antiulcerosa, hepatoprotectora, hipotensiva, antidiabética y cicatrizante (Coria-Téllez *et al.* 2016).

Investigaciones empleando esta planta señalan que el extracto etanólico de las hojas y compuestos aislados a partir de ellas, presentan actividad citotóxica contra células de cáncer de mamas (Rachmani *et al.* 2012), células de cáncer pulmonar (Quispe *et al.* 2006), y cáncer de colon (Liu *et al.* 2016), atribuido a inducción de la apoptosis. Asimismo, en estudios clínicos empleando pacientes diabéticos a quienes se les administró extracto de hojas de guanábana (en cápsulas), se pudo observar disminución del nivel de glicemia y a medida que aumentó la dosis, se intensificó el efecto (Arroyo *et al.* 2009), dejando en evidencia la propiedad hipoglicemiante. Por el contrario, el consumo excesivo del fruto y derivados puede causar una forma atípica del mal de Parkinson, debido a las neurotoxinas anonacina y escuamocina (Machado de Moraes *et al.* 2016), ver Tabla 1. En tanto, las hojas y las semillas

son los órganos más estudiados, probablemente debido que son de uso más tradicional (Coria-Téllez *et al.* 2016).

Tabla 1. Propiedades terapéuticas de *Annona muricata* según estudios científicos

Bioactividad		Tipo de estudio	Parte	Referencia
Anticancerígeno	Pulmón	<i>In vitro</i>	Hojas	Quispe <i>et al.</i> (2006)
Anticancerígeno	Próstata	<i>In vivo / in vitro</i>	Hojas/Tallo	Torres <i>et al.</i> (2012)
Anticancerígeno	Colon	<i>In vitro</i>	Hojas	Nik Mat Daud <i>et al.</i> (2016)
Anticancerígeno	Hígado	<i>In vitro</i>	Hojas	Liu <i>et al.</i> (2016)
Anticancerígeno	Mamas	<i>In vitro / in vitro</i>	Hojas	Syed Najmuddin <i>et al.</i> (2016)
Antiulceroso	Úlcera péptica	<i>In vivo</i>	Hojas	Bento <i>et al.</i> (2016)
Antidiabético		<i>In vivo</i>	Hojas	Florence <i>et al.</i> (2013)
Antidiabético		Clínico	Hojas	Arroyo <i>et al.</i> (2009)
Antiinflamatorio		<i>In vivo</i>	Hojas	Foong y Hamid (2012)
Hipotensivo	S. Cardiovascular	<i>In vivo</i>	Hojas	Nwokocha <i>et al.</i> (2012)
Neurotóxico		Clínico	-	Lannuzel <i>et al.</i> (2007)

2.1.3 Efectos adversos

El consumo excesivo de graviola y productos elaborados de partir de ésta, podría haber causado una forma atípica del mal de Parkinson en la isla caribeña de Guadalupe y la isla de Guam en el pacífico (Machado de Moraes *et al.* 2016); estudios en ratas asocian esta enfermedad neurodegenerativa a la Anonacina (Solís-Fuentes *et al.* 2011). Sin embargo, la mayor exposición a estas toxinas ocurre al consumir frutos de la familia Annonaceae y derivados, en lugar de las preparaciones con fines medicinales (Bonneau *et al.* 2016).

La dosis de acetogeninas neurotóxicas que se consume dependerá mayoritariamente de la forma en que la guanábana se ingiera. Si se consumen las hojas en forma de té, la dosis de acetogeninas sería relativamente baja debido a que presentan muy poca solubilidad en agua; por el contrario, si se consumieran las hojas enteras, la dosis esperada superaría a la del té (Machado de Moraes *et al.* 2016). Coria-Téllez *et al.* (2016) indican que la dosis letal media de un extracto acuoso de las hojas excede el consumo esperado para un humano, el cual es alrededor de 211 mg/kg por día, considerando que una persona promedio consume una taza

de infusión tres veces al día, se requeriría consumir más de 71 tazas de infusión al día para alcanzar una dosis letal en humanos.

2.1.4 Fitoquímicos bioactivos

Los compuestos bioactivos son constituyentes no nutricionales que comúnmente se encuentran presentes en pequeñas cantidades en los alimentos; estos compuestos presentan estructuras químicas y funciones características intrínsecas, a partir de las cuales se han clasificado (Kris-etherton *et al.* 2002). En la Tabla 2 se incluyen algunos de los metabolitos encontrados para los principales grupos de fitoquímicos en esta especie.

Tabla 2. Algunos fitoquímicos identificados en las hojas de guanábana

Acetogeninas (ACG)	Alcaloides (ALK)	Compuestos fenólicos (PHC)
Anonacina	Anonaina	Ácido clorogénico
Anomontacina	Anonamina	Ácido cinámico
Anomuricina	Asimilobina	Ácido cafeico
Bullatacina	Coclaurina	Acido gálico
Montanacina	Coreximina	Catequina
Muricatalina	Isoboldina	Epicatequina
Muricin	Muricina	Galocatequina
Solamina	Reticulina	Kaempferol
Squamocina	Xylopina	Quercetina

Fuente: Adaptado de Coria-Téllez *et al.* (2016)

Los géneros de la familia Annonaceae en su mayoría se caracterizan por la presencia de metabolitos secundarios con actividades biológicas importantes (Solís-Fuentes *et al.* 2011). Coria-Téllez *et al.* (2016), señalan que han sido reportados más de doscientos compuestos bioactivos que se encuentran en *Annona muricata*, entre los cuales figuran alcaloides, acetogeninas, compuestos fenólicos, ciclopéptidos, entre otros (Hamizah *et al.* 2012, Solís-Fuentes *et al.* 2011). Asimismo, se conoce la existencia de terpenoides, cumarinas y lactonas, antraquinonas, taninos, fitosteroles y saponinas, estos metabolitos fueron revelados mediante un *screening* fitoquímico, con lo cual se confirma que los extractos foliares contienen moléculas conocidas ampliamente por sus aplicaciones médicas (Gavamukulya *et al.* 2014).

- **Acetogeninas**

Las acetogeninas (ACGs) son compuestos lipofílicos encontrados en la familia Annonaceae provenientes de la ruta de los policétidos, poseen entre 32 a 37 carbonos, y se sugiere que los anillos tetrahidrofurano (THF), tetrahidropirano (THP) y epóxidos presentes a lo largo de su estructura se producen mediante la epoxidación y ciclación de dobles enlaces (Bonneau *et al.* 2016, Schlie-Guzmán *et al.* 2009, Spurr y Brown 2010, Lock y Rojas 2003).

Se han identificado más de 400 acetogeninas, 120 de las cuales en el género *Annona*; en las hojas se han identificado 46 (Wahab *et al.* 2018), siendo la Anonacina la más representativa, véase su estructura química en la Figura 4A.

La actividad citotóxica y anticancerígena se atribuye a su particular estructura molecular. El mecanismo bioquímico es clave para explicar estas propiedades y está en proceso de profundización. Kojima y Tanaka (2009) exponen un efecto sobre el complejo mitocondrial 1 (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), lo que produce una depleción del abastecimiento de energía a las células cancerígenas, las cuales poseen una alta demanda de energía, y como consecuencia se desencadena una necrosis celular. Coria-Téllez *et al.* (2016) suponen un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, que genera liberación de proteínas pro-apoptóticas que conducen a la formación del apoptosoma y posterior generación de caspasas, provocando una apoptosis.

Höllerhage *et al.* (2015) manifiestan que es necesario comprobar si el efecto citotóxico de las acetogeninas es selectivo o específico para células cancerígenas; sin embargo, algunos estudios *in vitro* sugieren que existe selectividad en líneas celulares específicas (Quispe *et al.* 2006).

- **Alcaloides**

Luego de las ACGs, los alcaloides (ALKs) son los metabolitos secundarios más importantes de la especie *Annona muricata* (Edwards *et al.* 2015). Los alcaloides son bases nitrogenadas orgánicas habitualmente presentes en plantas, a menudo con un enlace heterocíclico de nitrógeno, el cual deriva del metabolismo de aminoácidos (Fester 2010). En las plantas los alcaloides están presentes en forma de sales, estos pueden ser extraídos de la célula con agua acidificada o alcohol, o alternativamente solubilizados en solventes orgánicos (ej.: cloroformo) cuando la planta es alcalina (Woolley 2001).

Se han identificado más de 500 alcaloides en la familia Annonaceae, siendo esta diversidad un indicador de una ventaja evolutiva, dado que la constante biosíntesis de estos compuestos apuntan a que cumplen roles fisiológicos, ecológicos, entre otros, que resultan importantes para la supervivencia de la planta (González-Esquinca *et al.* 2014). En las hojas se han identificado alrededor de 22 alcaloides, algunos de ellos del tipo isoquinolínicos, derivados de aporfina, y protoberberina (Wahab *et al.* 2018).

A estos se le atribuye un efecto tóxico, siendo la anonaina (Figura 4B) uno de los más representativos (Egydio-Brandão *et al.* 2017). Además de su efecto tóxico, los alcaloides extraídos de las hojas han mostrado un efecto anticorrosivo en el acero (Vergara *et al.* 2018), e incluso son empleados como antídoto en situaciones de envenenamiento (Cremones *et al.* 2016).

- **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos están presentes en todas las plantas y constituyen uno de los grupos de fitoquímicos más abundantes; poseen un anillo aromático que contiene uno o más grupos hidroxilo y presentan estructuras que van desde moléculas simples hasta moléculas de alto peso molecular (Jiménez *et al.* 2014, Kris-etherton *et al.* 2002). Dentro de estos se incluye la subcategoría de Flavonoides, los cuales han sido estudiados por su efecto terapéutico contra el cáncer; sin embargo existen otros estudios que no han probado este tipo de asociación (Kris-etherton *et al.* 2002).

De las hojas de guanábana se han aislado 34 compuestos fenólicos (Wahab *et al.* 2018), entre los más abundantes se encuentran la rutina, catequina, catequina galato, quercetina, ácido p-cumárico, ácido cafeico y epicatequina (Nam *et al.* 2017, Justino *et al.* 2018), los cuales son responsables de su propiedad antioxidante (Coria-Téllez *et al.* 2016).

- **Otros**

Los complejos minerales como sales de ácido fítico están presentes en la planta y distribuidos a través de ella (Szkudelski 2017); a estos se les atribuye actividad preventiva ante el desarrollo de células cancerígenas, en proporciones y frecuencias adecuadas de consumo (Shamsuddin 2002, Eaton y Graf 1993), también ha sido reportada la presencia de megastigmanos, pero su efecto aun es desconocido (Wahab *et al.* 2018).

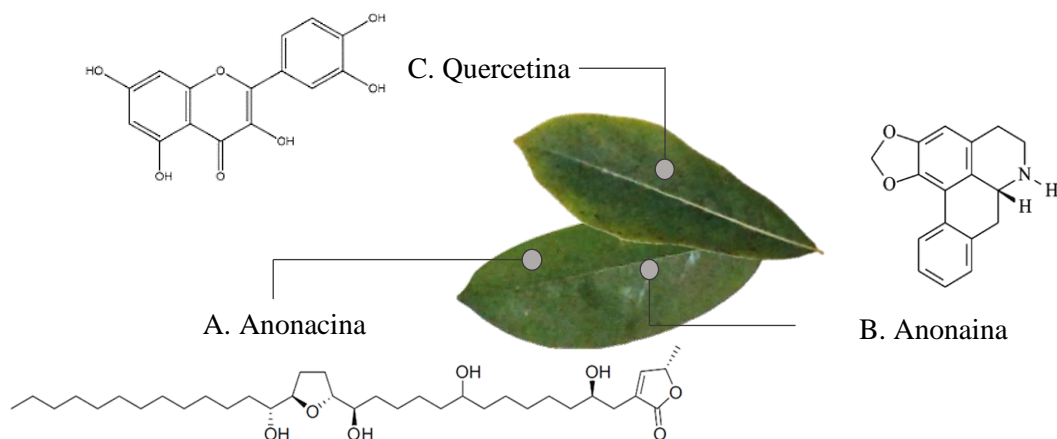


Figura 4. Estructura química de metabolitos secundarios encontrados en las hojas

Fuente: Adaptado de Liaw *et al.* (2016), Chen *et al.* (2011) y Justino *et al.* (2018)

2.2 Extracción de compuestos bioactivos

La extracción de compuestos bioactivos se realiza con fines de investigación e industrialización, en ello intervienen factores como el método de extracción, la naturaleza química del compuesto de interés, y como consecuencia implica la búsqueda de solventes a fin a este, con el objeto de optimizar la extracción (Saikia *et al.* 2015).

Generalmente para desarrollar alimentos funcionales a partir de frutas y sus derivados, los fitoquímicos son extraídos usando la técnica de extracción por solventes, pudiendo ser líquido-líquido o sólido-líquido. Un ejemplo de este último es la lixiviación, método de extracción comúnmente usado en la industria alimentaria que consiste en la separación de uno o varios solutos contenidos en una matriz sólida mediante el contacto con un líquido que los disuelve selectivamente (Saikia *et al.* 2015). Para aislar acetogeninas de Annonaceae se utiliza este método puesto que son fácilmente solubles en la gran mayoría de los solventes orgánicos (Florez Londoño y Martínez Muñoz 2010).

Martins *et al.* (2015) sostienen que la lixiviación recibe denominaciones diferentes dependiendo de la naturaleza del solvente empleado; es así que se originan extractos hidroalcohólicos, si se empleó una mixtura de alcohol y agua, o extractos acuosos al usar exclusivamente agua, estos últimos adquieren el título de decocción o infusión si la extracción incluye una etapa de ebullición, o si se añade agua hirviente y se deja reposar.

El desempeño de una extracción se expresa a través de la eficiencia de extracción, la cual relaciona el contenido de un metabolito de referencia, entre la cantidad inicial de soluto que fue empleado (Liu *et al.* 2013). Entre los factores que determinan la eficiencia de la extracción figura la temperatura, esta juega un rol importante puesto que en muchos casos acelera el proceso de extracción (Bustos-Hipólito *et al.* 2012); sin embargo, debido a la existencia de compuestos termosensibles, no siempre es recomendable aplicar temperaturas elevadas, lo cual conduce al empleo de técnicas alternativas como ultrasonido, microondas, entre otras (Pérez-Loredo *et al.* 2017). Otro factor determinante en este proceso es el tiempo, dado que durante la permanencia pueden ocurrir reacciones que forman componentes indeseables para los fines posteriores (Casagrande *et al.* 2018).

Los compuestos bioactivos se caracterizan por ser susceptibles a una rápida inactivación o degradación una vez extraídos de su fuente original (de Vos *et al.* 2010). En consecuencia, es necesario algún tipo de procesamiento o sistema de entrega para asegurar la efectividad de los fitoquímicos en el cumplimiento de las funciones destinadas. Esto se debe a que los fitoquímicos son propensos a destrucción y oxidación debido a factores ambientales tales como luz y oxígeno; la técnica empleada para prevenir su exposición a condiciones ambientales adversas es la microencapsulación (Saikia *et al.*, 2015).

2.3 Microencapsulación

La microencapsulación es una alternativa tecnológica para estabilizar y proteger un principio activo atrapándolo con un material que lo aísla de condiciones ambientales como luz, aire y humedad (Matioli y Rodriguez-Amaya 2003, Saikia *et al.* 2015). A través de este proceso se producen partículas a escala micrométrica que en su interior contienen fármacos, compuestos bioactivos, aditivos alimentarios, nutrimentos, entre otros (Jafari *et al.* 2016, Guevara-Bretón y Jiménez-Munguía 2008); estos compuestos se preservan dentro de matrices que prolongan su periodo de vida y funcionalidad permitiendo posteriormente la liberación controlada del componente encapsulado (Vidal *et al.* 2013).

El método de encapsulación se elige de acuerdo a la aplicación requerida, el tamaño de cápsula deseado, el elemento a encapsular, el costo y las propiedades físicas y químicas del recubrimiento. Las investigaciones en torno a este tema se centran en la búsqueda y

aplicación de nuevos materiales de recubrimiento y técnicas novedosas de encapsulación (Fadini *et al.* 2018).

Jafari *et al.* (2016), señalan que existe una variedad de agentes de recubrimiento que se seleccionan dependiendo del tipo y naturaleza de los materiales de núcleo, el destino de los ingredientes microencapsulados, así como el tipo de técnica de microencapsulación. Completada la etapa anterior, el agente encapsulante en solución es mezclado con el material a encapsular; posteriormente esta mezcla es deshidratada mediante técnicas de atomización o liofilización (Chranioti y Tzia 2014); como consecuencia se obtiene un polvo que puede ser fácilmente usado como fármaco, nutracéutico e insumo para la industria alimentaria (Nalawade y Gajjar 2016).

2.3.1 Efecto tecnológico

Dentro de las consideraciones tecnológicas que intervienen en el proceso de microencapsulación se incluyen el tipo de encapsulante, la combinación de encapsulantes, la concentración de sólidos, temperatura, entre otros; en tanto, este impacto es evaluado a través de indicadores como la Eficiencia de Encapsulación (E.E.) en función a un metabolito de interés (López 2010).

De acuerdo a la técnica de microencapsulación empleada se pueden obtener partículas de tamaño y forma heterogéneas que conducen a la conservación deficiente de los compuestos de interés (Roy *et al.* 2018). Tanto el tamaño, forma y estructura superficial de las micropartículas dependen de los encapsulantes y métodos utilizados para su preparación (Sheu y Rosenberg 1998, Tonon *et al.* 2009, Gharsallaoui *et al.* 2007).

La estructura de las micropartículas determina las propiedades tecnofuncionales de los polvos (Cano-Chauca *et al.* 2005); en tal sentido, es prioritario comprender el proceso de formación de la superficie de las microcápsulas en términos de composición para mejorar condiciones durante el proceso de secado por atomización (Porrás-Saavedra *et al.* 2015), puesto que de ello dependerá su solubilidad, liberación, estandarización, entre otras.

2.3.2 Microencapsulación por atomización

El secado por atomización o aspersion es una operación unitaria mediante la cual un producto líquido se atomiza en una corriente de aire caliente para producir instantáneamente un polvo, que luego es separado del flujo de corriente usando un filtro o un ciclón (Walters *et al.* 2014); es utilizado ampliamente para producir alimentos como proteína de suero de leche, café instantáneo, leche, etc. (Gómez y Jiménez 2014).

Este método es ampliamente usado para encapsular sabores, ingredientes alimenticios, y compuestos bioactivos como vitaminas y aceites esenciales (Gómez y Jiménez, 2014); además de ser el más económico y de su simplicidad de operación, una de las grandes ventajas que ofrece, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, puesto que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (Salazar-González *et al.* 2009).

El tiempo en que la partícula se forma depende del tamaño inicial de la gota, la composición de esta, y la tasa de evaporación; esta última es dependiente a su vez de la transferencia de calor y masa del sistema. En la Figura 5 se esquematiza el proceso gradual de formación de la partícula durante el secado. La velocidad de formación de la partícula es crucial en la determinación del tiempo de residencia, y por ende la escala del equipamiento y parámetros de procesamiento requeridos para producir el tamaño de partícula adecuado a un ritmo de producción constante (Walters *et al.* 2014).

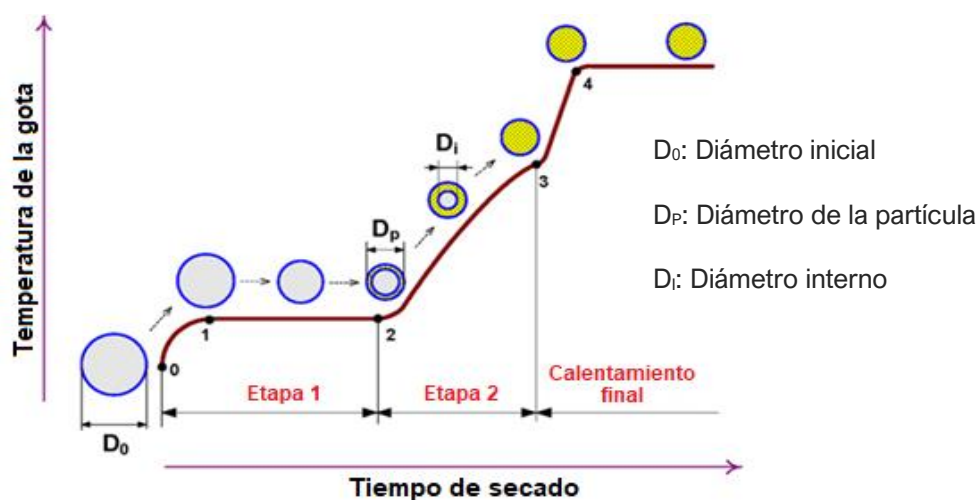


Figura 5. Perfil del secado de una gota durante el secado por atomización.

Fuente: Adaptado de Mezhericher *et al.* (2010).

2.3.3 Microencapsulación por liofilización

La liofilización es la técnica más adecuada para la deshidratación de todos los materiales sensibles al calor, y también para microencapsulación. Es una operación de múltiples etapas de estabilización de materiales a través de cuatro operaciones principales como el congelamiento, sublimación, desorción, y finalmente almacenamiento (Ezhilarasi *et al.* 2013).

Según Jafari *et al.* (2016), en la microencapsulación mediante liofilización, las mezclas de los materiales de núcleo y cobertura son homogenizados y luego liofilizados para producir ingredientes microencapsulados con propiedades favorables. Algunos investigadores han introducido el método de la liofilización como una manera eficiente para proteger compuestos termosensibles como las antocianinas (Yamashita *et al.* 2017).

2.3.4 Agentes encapsulantes

Existen actualmente una gran variedad de materiales que se emplean como agente acarreador o encapsulante, entre los cuales figuran proteínas y carbohidratos como almidón, maltodextrina, pectina, gomas, entre otros polímeros (Saikia *et al.* 2015). El encapsulante ideal debería ser capaz de formar películas, emulsificar, biodegradarse, resistir las condiciones del tracto intestinal, ofrecer baja viscosidad y alto contenido de sólidos, presentar poca higroscopicidad y un costo bajo (Rocha-Parra *et al.* 2016)

Luna-Guevara *et al.* (2016) señalan que es importante seleccionar correctamente el material encapsulante, dado que de ello depende la eficiencia de encapsulación y la estabilidad de la microcápsula; asimismo, el encapsulante debe ser compatible con la naturaleza del compuesto activo (peso molecular, funcionalidad química, polaridad y volatilidad relativa). Lo anterior, sumado a los parámetros del proceso de encapsulación, determinan las propiedades funcionales de la microcápsula y la forma en que puede ser utilizada (Guevara-Bretón y Jiménez-Munguía 2008).

Los materiales de encapsulación más eficaces para aplicaciones alimentarias son los polisacáridos (Nedovic *et al.* 2011), dentro de los cuales destacan goma arábiga (GA) y maltodextrina (MD) con diferentes equivalentes de dextrosa (Jafari *et al.* 2016). Ambos son ampliamente empleados en microencapsulación mediante secado por atomización por sus

propiedades tecnológicas (Jafari *et al.* 2016, Cano-Chauca *et al.* 2005), además son reconocidos como ingredientes GRAS (Generally Recognized As Safe). Tanto la goma arábica como las maltodextrinas son incoloras, ofrecen alta solubilidad en agua, baja viscosidad en solución, tienen un costo relativamente bajo, y aseguran una protección adecuada de compuestos sensibles a oxidación (Cano-Chauca *et al.* 2005, Carneiro *et al.* 2013, Ramírez *et al.* 2015, Jafari *et al.* 2016, Akhavan Mahdavi *et al.* 2016).

La goma arábica debido a sus características específicas, como alta solubilidad en agua, baja viscosidad y propiedades emulsificantes es ampliamente usada en microencapsulación (Jafari *et al.* 2016); de igual forma, las maltodextrinas debido a su bajo costo y gran capacidad de recubrimiento resultan materiales de cobertura adecuados (Kuck y Noreña 2016).

2.3.5 Microcápsulas

Como resultado de un proceso de encapsulación se originan partículas dentro de las cuales se encuentran contenidos uno o varios compuestos que han sido retenidos por un material encapsulante en diversas formas, las más usuales se presentan en la Figura 6.

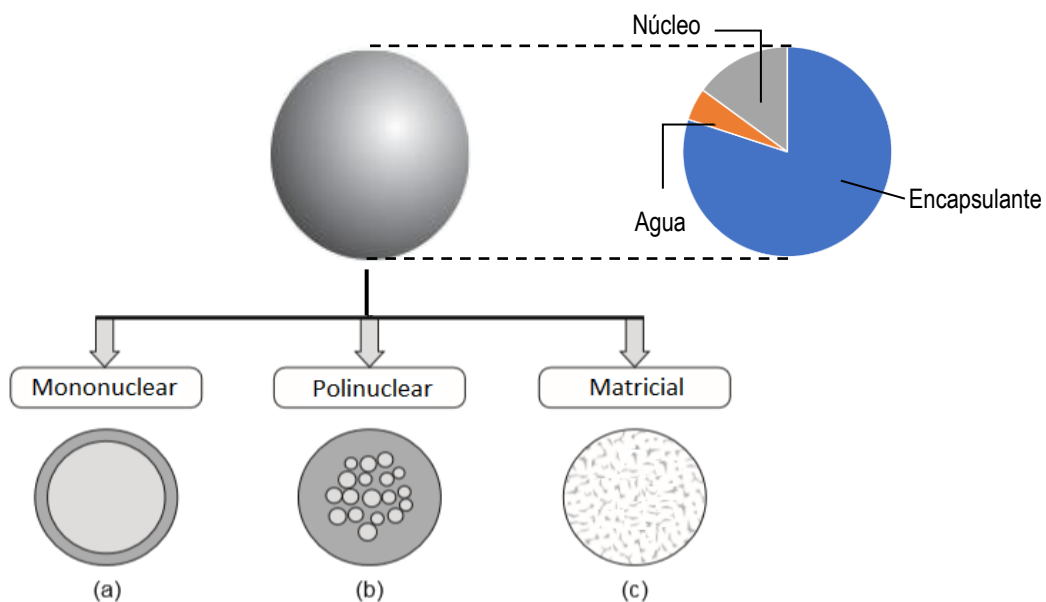


Figura 6. Representación esquemática de tipos de microcápsulas

Fuente: Al Shannaq y Farid (2015).

Según el tamaño, las cápsulas pueden clasificarse en nanocápsulas ($<2 \mu\text{m}$), microcápsulas (0.2 a $5000 \mu\text{m}$), y macrocápsulas ($>5000 \mu\text{m}$) (Silva *et al.* 2014). Una microcápsula es por

lo tanto una micropartícula, cuya morfología puede tipificarse en función a cómo el material de núcleo se ha depositado en su interior (Al Shannaq y Farid 2015). Independientemente de la distribución, una microcápsula se encuentra compuesta por tres elementos, el núcleo, la matriz y el agua contenida; la proporción en la que están presentes cada uno de estos elementos depende de factores tecnológicos como la técnica de encapsulación empleada, la afinidad de la matriz con el solvente, el tipo de solvente, entre otros (Krishnaiah *et al.* 2012).

El objetivo de microencapsular algo es mantenerlo a salvo por un periodo de tiempo hasta antes de producirse su liberación; en alimentos, las microcápsulas son vehículo de compuestos, y el encapsulante sirve de soporte hasta el momento en que ellos son liberados y posteriormente absorbidos por la pared intestinal (Gharsallaoui *et al.* 2007); esto último no ocurre si la dimensión de las partículas está en escala nanométrica, puesto que debido al tamaño, las nanopartículas atraviesan la pared intestinal sin impedimento alguno, y alcanzan el torrente sanguíneo con facilidad (Yusoff y Salimi 2018). La nanocápsulas tienen la ventaja de ser administradas vía intravenosa, y de esta manera alcanzar el objetivo para que el componente que contiene sea liberado (Kothamasu *et al.* 2012).

2.3.5.1 Proceso de liberación

Existen mecanismos de naturaleza química y física a través de los cuales el núcleo es liberado de la matriz entre los que figuran la difusión, disolución, y ruptura (Hu *et al.* 2017); la forma en que ocurre la liberación según el sistema de encapsulación se esquematiza en la Figura 7. Durante este proceso se ven involucrados principios de intercambio de masa regulados por el espesor, el índice de agujeros, grado de deformación de la membrana, y aspectos concernientes al núcleo como la solubilidad, difusividad, y coeficiente de partición (Hu *et al.* 2017).

La liberación del principio activo ocurre de manera dinámica a una tasa de liberación variable, la cual inicialmente es más rápida, y con el paso del tiempo se vuelve constante; asimismo, la forma como ocurre no se atribuye únicamente a un mecanismo en particular, sino a una combinación de los mismos (Martins *et al.* 2011).

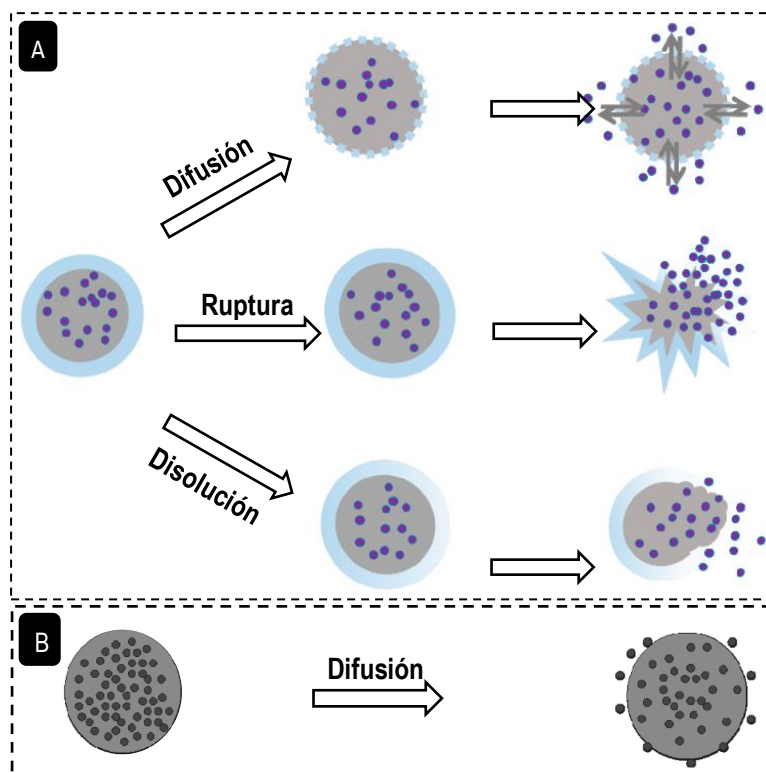


Figura 7. Mecanismos de liberación en un sistema reservorio (A) y monolítico (B)

Fuente: Adaptado de Hu *et al.* (2017) y Martins *et al.* (2011).

2.4 Actividades biológicas

Para estudiar el efecto biológico de tratamientos importados de la medicina tradicional a base de extractos de plantas, se realizan ensayos *in vitro* e *in vivo*, usualmente empleando modelos animales como ratones y ratas (Santos-Sánchez *et al.* 2018), y líneas celulares aisladas (Medini *et al.* 2015). Entre las actividades biológicas más estudiadas figuran la actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, antimicrobiana, hipolipidémica y neuroprotectora (Radojković *et al.* 2016, Weli *et al.* 2018).

2.4.1 Actividad anticancerígena

La actividad anticancerígena se puede estudiar a través de ensayos de citotoxicidad, entre los que figura el ensayo MTT [bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)]. Este ensayo es usado como un indicador de la viabilidad de células neoplásicas post exposición a un agente citotóxico. Posteriormente se incorpora el reactivo MTT, el cual es inicialmente amarillo, y como resultado de la actividad celular es reducido a Formazán, de color violeta, el cual es cuantificable espectrofotométricamente y se relaciona de forma directa a la cantidad de células vivas respecto a un control (sin MTT) (Kuetze *et al.* 2017).

Para atribuir un efecto anticancerígeno, los ensayos deben revelar una viabilidad celular reducida, puesto que la población objetivo es perjudicial; por el contrario, valores altos de viabilidad, denotarían una incapacidad del componente evaluado para matar células cancerígenas (Meenakshisundaram *et al.* 2019). Para estudiar el efecto de compuestos contenidos en materiales vegetales, estos son extraídos usando solventes de naturaleza variada; sin embargo, dado que muchos de ellos son citotóxicos, el solvente es posteriormente removido, y el extracto seco es resuspendido en una solución inofensiva para las células y así es inoculado junto con ellas (Rady *et al.* 2018, Medini *et al.* 2015).

2.4.2 Actividad neurotóxica

La neurotoxicidad es una de las principales causas de desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer y el Parkinson (Mohammad Ahmadi Soleimani *et al.* 2016). Para evaluar este efecto se emplean tejidos cerebrales (*ex vivo*), modelos biológicos (*in vivo*), o líneas celulares (*in vitro*); en este último caso se evalúan cambios morfológicos, muerte celular, disfunciones mitocondriales, entre otros (Bortolussi y Muro 2019), mediante el empleo de técnicas de inmunofluorescencia, microscopía de barrido electrónico y electrofisiología (Fuentealba *et al.* 2012).

Usualmente en estudios *in vitro* se emplean células cerebrales de roedores, las cuales son extraídas y cultivadas en medios adecuados para su crecimiento; una vez alcanzado el tamaño y número requerido son expuestas al compuesto del cual se desea conocer su toxicidad (Heusinkveld y Westerink 2017). Al respecto, estos ensayos deben contar con la aprobación de un comité de ética o alinearse a reglamentaciones que regulen la crianza y método de sacrificio de los animales de donde se extraerán las muestras celulares (Zhang *et al.* 2019); finalmente, los resultados encontrados son luego extrapolados al ser humano bajo estándares establecidos (Croom *et al.* 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El estudio fue realizado en los laboratorios de Microbiología de Alimentos, Fisicoquímica, Investigación e Ingeniería de la FIAL, y el Instituto IBBM de la Universidad Nacional Agraria La Molina. También se usaron instalaciones de las facultades de Ingeniería Agrícola y de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción (Chile) y se requirió servicios en los laboratorios La Molina Calidad Total, y Cenprofarma de la UNMSM.

3.2 Material vegetal

Las hojas fueron recolectadas en diciembre de 2016 y 2017 en una finca ubicada en Pisco, Ica, Perú (Latitud: 13° 44.817' S, Longitud: 76° 9.897' O) (Figura 8), las cuales fueron previamente certificadas como especie *Annona muricata* L. por el herbario Augusto Weberbauer (MOL) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Anexo 1).

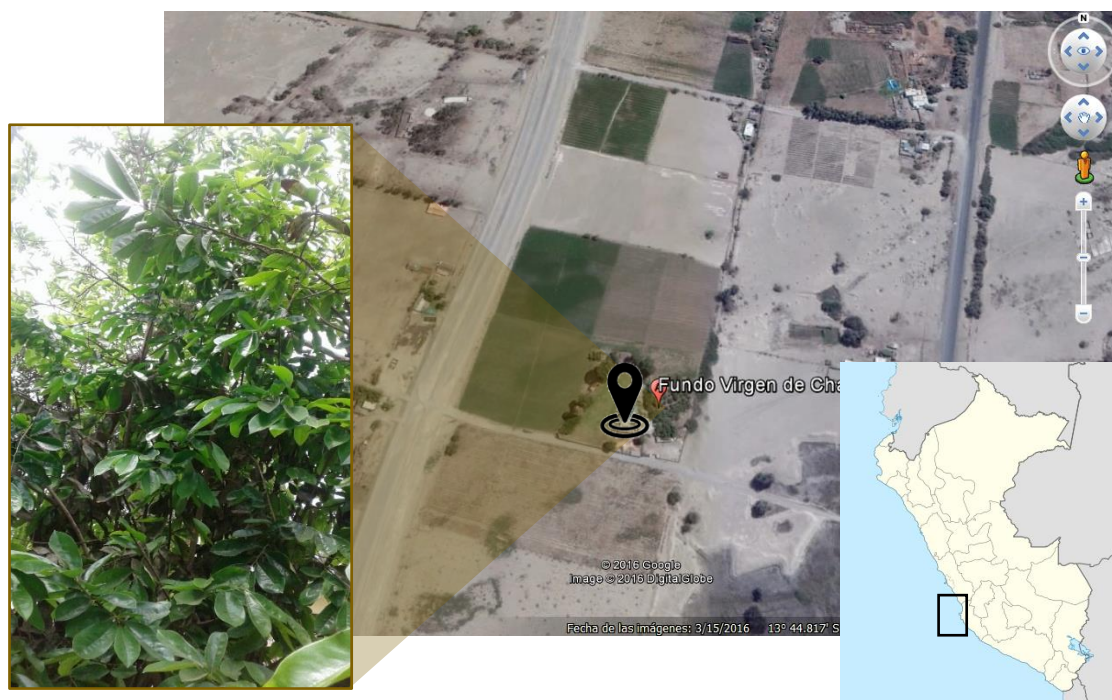


Figura 8. Zona de procedencia de las hojas de *Annona muricata* L.

Se seleccionaron al azar hojas frescas (≈ 300) en estado íntegro de 5 ejemplares (Huang *et al.* 2019), que fueron lavadas con agua potable y se secaron en ausencia de luz solar durante 10 días (Humedad final = 12%), previo a la molienda fueron deshidratadas en estufa (Memmert UM400, Alemania) a 50 °C hasta 10% de humedad. Luego, las hojas fueron molidas empleando un molino Thomas Scientific (3383-L30) aplicando un tamiz metálico de malla N° 20 (Tyler) y se almacenaron herméticamente en bolsas de polietileno hasta su uso. Ver Anexo 2.

3.3 Reactivos

Como agentes encapsulantes se empleó Goma arábica (Nexira food), Maltodextrina DE= 15-20 (Lihua Starch, China) y Maltodextrina DE= 10-12 (Frutarom), los cuales fueron seleccionados en ensayos preliminares debido a su tolerancia al alcohol, para la preparación de los extractos foliares se empleó Etanol 99.9 % (Merck, Alemania). Como estándares analíticos se empleó Ácido gálico (Sigma-Aldrich, EUA), Anonacina 94 % (JMC, EUA) y Trolox (Merck, Alemania). Los principales reactivos utilizados en los ensayos fueron Ácido acético (Merck, Alemania), Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania), Carbonato de sodio (Merck, Alemania), Metanol (Merck, Alemania), Diclorometano (Merck, Alemania), Tolueno (J.T. Baker, EUA), Acetonitrilo (J.T. Baker, EUA), ABTS (Sigma-Aldrich, EUA), Trolox (Sigma-Aldrich, EUA), DPPH (Sigma-Aldrich, EUA), *Buffer* Fosfato Salino (PBS) (Gibco™), Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Fluo-4 AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

3.4 Métodos de caracterización

3.4.1 Microestructura

Se evaluó la morfología del extracto seco, los encapsulantes puros y los extractos microencapsulados mediante microscopía de barrido electrónico (JSM-6380LV, JEOL) de acuerdo con Vidal *et al.* (2013). Las muestras en polvo fueron colocadas en la superficie superior de piezas cilíndricas metálicas cubiertas con una cinta adhesiva de doble cara e inmovilizadas al vacío empleando un recubrimiento de oro (S150, Edwards). Las imágenes fueron obtenidas mediante el *software* Jeol Scanning Electron Microscope con un aumento creciente de 1200 a 20000x.

Las hojas pulverizadas y los polvos microencapsulados vía liofilización fueron analizados empleando un microscopio SEM con detector de energía dispersiva (EDS) Quanta 200 (FEI company, EUA) sin tratamiento previo de la muestra con aumentos de 500 a 6000x, las microfotografías fueron analizadas empleando el *software* EDAX Genesis acoplado al equipo (Chávez-Rivas *et al.* 2014).

3.4.2 Eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos

Se identificó el grado de encapsulación mediante un análisis de eficiencia en función al contenido total de compuestos fenólicos (CFT) de cada tratamiento, el CFT fue usado como indicador de la cantidad de fitoquímicos funcionales presente en los polvos.

El contenido de compuestos fenólicos en el interior (CFI) y la superficie (CFS) de las micropartículas fue determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu, adaptado de Alhamad *et al.* (2017). Para la extracción de la muestra se empleó el método de Saikia *et al.* (2015). Para el CFI y el CFS se tomaron 100 mg de extracto en polvo y se mezcló con 1 ml de las mezclas (a) etanol, ácido acético y agua (50:8:42) y (b) etanol-metanol (1:1), respectivamente; luego la mezcla fue agitada en un vortex a 1200 rpm (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc.) durante 1 min y posteriormente filtrada a través de un filtro de 0.45 μm . Se tomó 100 μL de sobrenadante y fue combinado con 100 μL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido en agua (1:10, v/v), se dejó reaccionar durante 5 min, luego se adicionó 100 μL de solución acuosa de Na_2CO_3 (100 g l^{-1}) y se enrasó con agua destilada hasta 1200 μL , se dejó reaccionar por 30 min y se midió la absorbancia a 726 nm en un espectrofotómetro de micropozos (PowerWave XS2, Biotek, EUA) empleando como blanco agua destilada. El contenido total de compuestos fenólicos se calculó mediante una curva estándar de solución de ácido gálico (1 a 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$), véase Anexo 3. La eficiencia de encapsulación (EE) fue calculada empleando la siguiente ecuación (1).

$$EE (\%) = \left(\frac{CFI - CFS}{CFI} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde EE es la eficiencia de encapsulación, CFI y CFS es el contenido de compuestos fenólicos al interior y en la superficie de las microcápsulas, respectivamente.

3.4.3 Capacidad antioxidante

- **Método del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)**

Este protocolo de análisis fue adaptado según describen Jing *et al.* (2015) y Kim *et al.* (2017). El polvo microencapsulado (50 mg) se mezcló con 1000 μL de metanol (80%) en tubos Eppendorf, luego fueron agitados en una mesa orbital a 200 rpm por 6 h, y se centrifugaron a 9000 rpm por 15 min. Se tomó 100 μL del sobrenadante, se añadió 500 μL de solución DPPH (0.4 mg/mL), y se completó con 700 μL de solución metanólica (80%). Se agitó en vortex por 15 s a 1200 rpm, se dejó reaccionar en oscuridad por 25 min, y se leyó la absorbancia de 130 μL de muestra en un lector de micropozos a 517 nm. La capacidad antioxidante fue expresada en Trolox a partir de una curva estándar (Anexo 4).

- **Método del radical ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)**

Este análisis fue desarrollado según Chirinos *et al.* (2013), con modificaciones. La solución ABTS madre se preparó mezclando una solución acuosa de ABTS (7.4 mM) con una solución de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2,6 mM) en una relación 1:1 (v/v), y se dejó reaccionar en ausencia de luz por 12 h a temperatura ambiente. 1 mL de esta solución fue diluido con 22 mL de metanol (80 %) hasta ajustar la absorbancia a 1.1 ± 0.02 . Se mezcló 150 μL de extracto con 1350 μL de la solución diluida de ABTS, se agitó en vortex durante 10 s a 1200 rpm y se dejó reaccionar en oscuridad durante 6 min. Se tomó una alícuota de 150 μL y se leyó la absorbancia a 734 nm en un lector de micropozos, usando metanol como control. La actividad antioxidante fue calculada en μMol trolox por gramo a partir de una curva estándar de Trolox (0.1 – 0.7 $\mu\text{Mol/mL}$), véase Anexo 5.

3.4.4 Determinación de Anonacina por HPLC

La Anonacina contenida en las hojas y en los polvos microencapsulados se determinó por el método descrito por Bonneau *et al.* (2017), con modificaciones.

A. Preparación de las muestras y soluciones estándar

Se pesó las hojas previamente deshidratadas (3 g) y los extractos microencapsulados (2 g), y se mezcló con diclorometano (10% m/v) en tubos falcon de 50 ml, se hicieron 3 extracciones consecutivas de 3 h c/u mediante agitación en una mesa orbital a 200 rpm, se centrifugó por 15 min a 4000 rpm y se filtró el sobrenadante empleando filtros de jeringa de 0.45 μm , el líquido recolectado fue evaporado a baja presión (45 °C) hasta sequedad. El

material colectado fue reconstituido con 2 ml de etanol y sonificado por 5 min hasta su disolución; posteriormente las muestras fueron filtradas (0.45 µm) y colectadas en tubos eppendorf de 2 ml, y se almacenaron en congelación (-18 °C) hasta su empleo. Para la elaboración de la curva estándar se prepararon soluciones metanólicas de estándar de anonacina (Anexo 6) a 0.003, 0.006, 0.03, 0.06, 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL.

B. Cuantificación

La cuantificación se desarrolló empleando HPLC-UV (Hitachi LaChrom Elite, MERCK) a $\lambda=210$ nm. El equipo HPLC estaba compuesto de un organizador Modelo L – 2000 series, bomba de desgasificación Modelo L – 2100/2130, inyector automático modelo L – 2200, horno de columna Modelo L – 2300 y Detector UV Modelo L – 2400.

La separación se realizó en una columna C18 (250 mm x 0.4 mm ID, 5µm) empleando una fase móvil compuesta por Agua (A)/Acetonitrilo (B) con flujo tipo gradiente (Tabla 3). La inyección de la muestra (10 µL) se aplicó a un flujo de alimentación de 1 mL/min y 40 °C.

Tabla 3. Condiciones de alimentación de la fase móvil

Solvente	Tiempo (min)			
	0	25	40	43
A: Agua (%)	60	0	0	60
B: Acetonitrilo (%)	40	100	100	40

En cuanto a la cuantificación de las muestras, se empleó la pendiente de la curva de calibración mostrada en el Anexo 7, empleando la ecuación (2).

$$Anonacina (mg * L^{-1}) = \frac{\text{Área Total}}{\text{pendiente de la recta}} \quad (2)$$

3.4.5 Identificación y cuantificación de Anonacina por HPTLC

El análisis se realizó mediante adaptación del método de Gupta *et al.* (2012), como se detalla a continuación.

A. Preparación de muestras

Para la identificación de Anonacina en las hojas frescas y hojas secas se realizó una extracción con tolueno (1 g x 60 mL), debido a su capacidad de extracción de metabolitos (Samrot *et al.* 2016) y en sustitución del diclorometano; posteriormente se evaporó el solvente, y se suspendieron los sólidos en 2 mL de metanol, la mezcla fue filtrada empleando un filtro de jeringa de 0.45 μm y conservada en refrigeración hasta su uso. Para los extractos microencapsulados, se mezcló 300 mg del polvo con 1 mL de la solución CFI, se agitó durante 15 min en una mesa orbital (200 rpm), y se filtró (0.45 μm).

B. Siembra y Desarrollo

Para la elaboración de la curva de calibración se aplicaron volúmenes crecientes (2 a 15 μL) de una solución metanólica de estándar de Anonacina (0.9 mg/mL), para la identificación de Anonacina en las hojas frescas y secas, se inyectó 3 μL de muestra, y para cuantificación de Anonacina en los extractos microencapsulados, se tomó 4 μL de muestra. La siembra se realizó a un flujo constante de 150 nL/s con un ancho de banda de 6 mm, y 14 mm de distancia entre carriles sobre una placa de HPTLC usando un sembrador automático (Linomat V, CAMAG). Las placas fueron desarrolladas en una cámara de doble canal (20x10 cm) hasta una distancia de 7 cm usando como solvente de saturación y fase móvil una mezcla de cloroformo/ciclohexano/dietilamina (5:2.5:2.5 v/v) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 40% de humedad relativa.

C. Lectura y Cuantificación

Luego del desarrollo las placas fueron secadas y escaneadas a 210 nm (TLC scanner IV, CAMAG) operado en modo de reflectancia-absorbancia; la dimensión del *slit* se mantuvo en 5x0.45 mm y la velocidad de escaneo empleada fue 20 mm s⁻¹. El área bajo la curva de absorbancia de cada carril fue analizada con el *software* WinCATS (V1.2.1). La concentración en las muestras incógnita se estimó a partir de la recta de las distintas cantidades de estándar versus las áreas de los picos respectivos (Anexo 8).

3.4.6 Análisis proximal de las hojas

Las hojas deshidratadas fueron caracterizadas en cuanto al contenido de humedad para alimentos secos (AOAC 2005), grasa mediante AOAC 922.06 (Anexo 9), proteínas mediante AOAC 978.04A y 984.13A (Anexo 10) y ceniza (AOAC 2005).

3.4.7 Identificación de minerales en las hojas

Las hojas deshidratadas fueron analizadas con un microscopio SEM-EDS (Quanta 200, FEI) y se identificó de manera cualitativa la presencia de minerales (Kumar y Birru 2017). Este método se basa en la medición de radiación reflejada post exposición de la materia a una fuente de rayos X y que es característica para cada elemento. El porcentaje de cada elemento se expresó como el promedio de mediciones realizadas en tres secciones distintas de la microfotografía, considerando la suma de todos ellos como 100 % (Abhimanyu y Ravindra 2018).

3.4.8 Color del extracto hidroalcohólico de guanábana

El análisis de color se realizó según Islam *et al.* (2016), con modificaciones. Se empleó un colorímetro CR-410 (Konica-Minolta, Japón) para determinar parámetros de color del sistema CIELab, incluyendo la Luminosidad (L^*), las coordenadas a^* y b^* , la cromaticidad (C^*) y el tono (H^*). El extracto fue colocado en una cubeta para líquidos (22 °C) y se midió los valores por triplicado previa calibración del instrumento con una placa blanca de cerámica.

3.4.9 Humedad de las microcápsulas

La humedad de los extractos microencapsulados fue determinada de acuerdo al método de Rocha-Selmi *et al.* (2013) a partir de 1 g de muestra, empleando una balanza de humedad (AND MX-50, Japón).

3.4.10 Solubilidad

La solubilidad de los extractos microencapsulados se determinó de acuerdo con el método adaptado de De Souza *et al.* (2015), como se describe a continuación. En un tubo falcon se mezcló 0,5 g de muestra con 50 mL de agua destilada y se agitó en una mesa orbital (MRC, TOS-40BOFD) a 100 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 15 min (Rotofix 32, Hettich). Se tomó una alícuota de 25 mL de sobrenadante y se colocó en un *beaker* de 50 mL previamente pesado y se desecó en estufa a 105 °C hasta peso constante. La solubilidad fue calculada por la diferencia de masa posterior a la evaporación ($M_f - M_i$), correspondiente a los sólidos solubilizados en los 25 mL de muestra, y expresada en porcentaje mediante la ecuación (3).

$$SBD = \left(\frac{M_f - M_i}{W_m} \right) \times 10000 \quad (3)$$

Donde M_f es la masa del vaso más sólidos (g), M_i equivale a la masa del vaso vacío (g), y W_m a la masa de la alícuota de 25 mL (g).

3.4.11 Tamaño de partícula

El tamaño fue expresado en términos del diámetro medio ponderado en volumen ($D[4,3]$), determinado mediante la estimación de los diámetros de más de 650 partículas empleando el *software* Axio Vision Rel. 4.8 a partir de fotografías panorámicas obtenidas con microscopía SEM. De acuerdo a Jinapong *et al.* (2008), el diámetro medio en volumen fue calculado empleando la ecuación (4).

$$D[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (4)$$

Donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i .

3.4.12 Esfericidad

La esfericidad en los mejores tratamientos microencapsulados por atomización y liofilización fue determinada según Liu *et al.* (2015), mediante análisis de imágenes SEM empleando el programa ImageJ a través de la relación del área y el perímetro de partículas independientes usando la ecuación (5).

$$Esfericidad (\Phi) = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (5)$$

Donde, A es el área de la partícula, y P es el perímetro.

3.4.13 Porcentaje de partículas rugosas

El porcentaje de partículas rugosas del extracto microencapsulado pre y post optimizado se realizó mediante análisis de imágenes adecuando el método de Paramita *et al.* (2010).

3.4.14 Espectroscopia FTIR

Para verificar el proceso de encapsulado, el extracto atomizado, los encapsulantes puros y los extractos microencapsulados fueron analizados mediante Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) de acuerdo con Krishnaiah *et al.* (2012). Los espectros IR fueron obtenidos empleando un espectrómetro TruDefender FT (Ahura Scientific, EUA) punta de diamante con una resolución de 3 cm^{-1} desde 4000 a 650 cm^{-1} . Antes de colocar las muestras (en polvo) se realizó una corrección de aire del entorno. Las gráficas se elaboraron con el *software* Resolutions pro 4.0 Varian.

3.4.15 Cultivos celulares PC12

Líneas celulares PC12 fueron cultivadas en un medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con suero fetal bovino (5 %), penicilina (1 %), estreptomycin (1 %) y 2mM L-glutamina. Una vez que se logró un 80 % de confluencia, las células fueron tratadas con 1 mL de tripsina durante 4 min, fueron lavadas, y resuspendidas en HyQ DMEM/High-Glucose (Hyclone, Logan, UT, EUA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Hyclone), 2mM de L-glutamina (Gibco), y 1% de penicilina-estreptomycin (Gibco). Las células fueron luego centrifugadas (3000 g durante 3 min), resuspendidas, y posteriormente colocadas en placas a una concentración de 50 000 células/pozo. 100 μL de solución fueron sembrados en placas de 96 pozos y se mantuvieron en incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 5 % de CO_2 , luego de 48 h las placas fueron usadas (Fuentealba *et al.* 2012).

3.4.16 Ensayo de viabilidad celular por MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol]

Las hojas pulverizadas y los polvos microencapsulados fueron mezclados con DMSO (100 mg/mL), luego la mezcla fue sonicada por 5 min y se centrifugó a 8000 rpm por 10 min, al término, el sobrenadante fue filtrado ($0.45\text{ }\mu\text{m}$). En tanto, el estándar de anonacina y el extracto seco fueron reconstituidos con DMSO a razón de 100 mg/mL y se homogenizó la mezcla a 1200 rpm en vortex. A partir de los cinco extractos (hojas pulverizadas, extractos microencapsulados por atomización y liofilización, el estándar de anonacina y el extracto crudo seco), se prepararon diluciones seriadas con PBS ($1 - 10^4\text{ }\mu\text{g/mL}$), ver Anexo 11.

Se evaluó la supervivencia celular a las muestras usando el ensayo MTT adaptado de Fuentealba *et al.* (2012). Se pipeteó 1 μL de cada muestra a distintas concentraciones (1, 10, 100, 1000 y 1000 $\mu\text{g/mL}$), y fue adicionado en cada pozo de placas previamente inoculadas con células tumorales de médula suprarrenal de ratas (PC12). Las placas fueron incubadas por 24 h a 37 °C y 5% de CO_2 . Luego se retiró el medio y los pozos fueron sembrados con 100 μL de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) en solución de PBS (1 mg/mL), y se dejó reaccionar durante 30 min a las mismas condiciones de incubación anteriormente descritas. El medio fue reemplazado con 100 μL de isopropanol y luego las placas se incubaron por 15 min. Se leyó la absorbancia a 570 nm (30 °C) empleando un lector de micropozos (NOVOStar, BMG Labtech) a concentraciones finales de 0.1 a 100 $\mu\text{g/mL}$. El valor de absorbancia para cada muestra fue normalizado al valor promedio del cultivo respectivo no tratado - considerado como 100% de viabilidad celular - empleando el *software* GraphPad Prism 6. Se aplicó el mismo procedimiento para evaluar el efecto del tiempo luego de 48 h de exposición a las muestras de 10^4 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.17 Cultivo de neuronas corticales

Neuronas corticales de embriones de ratón criados de acuerdo a las regulaciones de NIH (National Institutes of Health, EUA) y el Comité de ética de la Universidad de Concepción, fueron sembradas a razón de 200 000 células/mL en placas previamente tratadas con polylisina. El medio externo estuvo compuesto por DMEM suplementado con suero de caballo (10%), DNasa (4 $\mu\text{g/mL}$) y L-Glutamina (2mM). Luego de 24 h, el medio fue cambiado por MEM (Minimum Essential Medium) suplementado con suero de caballo (2%), suero bovino fetal (2%) N3 (0.5%), albúmina de suero bovino (1mg/mL), apotransferrina (20 mg/mL), putrescina (4mg/mL), insulina (1.25 mg/mL), selenito de sodio (1 $\mu\text{g/mL}$), TH# (2 $\mu\text{g/mL}$), progesterona (1.25 $\mu\text{g/mL}$) y corticosterona (4 $\mu\text{g/mL}$). Los experimentos se desarrollaron luego de 9 días de incubación a 37 °C con 5% de CO_2 , previa visualización de la viabilidad celular al microscopio (Fuentealba *et al.* 2012).

3.4.18 Análisis fluorométrico de Ca^{2+} citosólico

Se midieron niveles de Ca^{2+} en cultivos corticales recientemente inoculados con las soluciones de 10^4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente hasta concentraciones finales de 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Previo al análisis, el medio fue removido y se añadió 5 μL de Fluo-4 AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) disuelto en DMSO (dimetilsulfoxido), se dejó reaccionar por 20

minutos a 37 °C en ausencia de luz. Posteriormente, el medio fue removido y fue lavado con DPBS para eliminar el Fluo 4 AM remanente (durante 20 min); luego se realizaron dos lavados consecutivos usando 2 mL de SEN (Normalized external solution). Las lecturas de Ca²⁺ citosólico se realizaron usando un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon TE-2000-U, Japón) acoplado a una cámara EM-CCD ixon+ de 16 bit (Andor, Belfast, North Irlanda) por 200 s con intervalos de 1 s. Los resultados fueron analizados usando el *software* ImagingWorkbench 6.0 (INDEC Biosystems, Santa Clara, CA, EUA) (Sáez-Orellana *et al.* 2015).

3.5 Etapas metodológicas

La primera fase de la investigación consistió en la determinación de parámetros de extracción; posteriormente, se realizó la selección de la técnica de microencapsulación en función a características tecnofuncionales de los polvos. La técnica seleccionada fue luego optimizada en cuanto a parámetros tecnológicos del proceso de microencapsulación, y finalmente se evaluaron propiedades biológicas del extracto microencapsulado sobre líneas celulares PC12 y cultivos neuronales. El procedimiento experimental se esquematiza a continuación en la Figura 9.

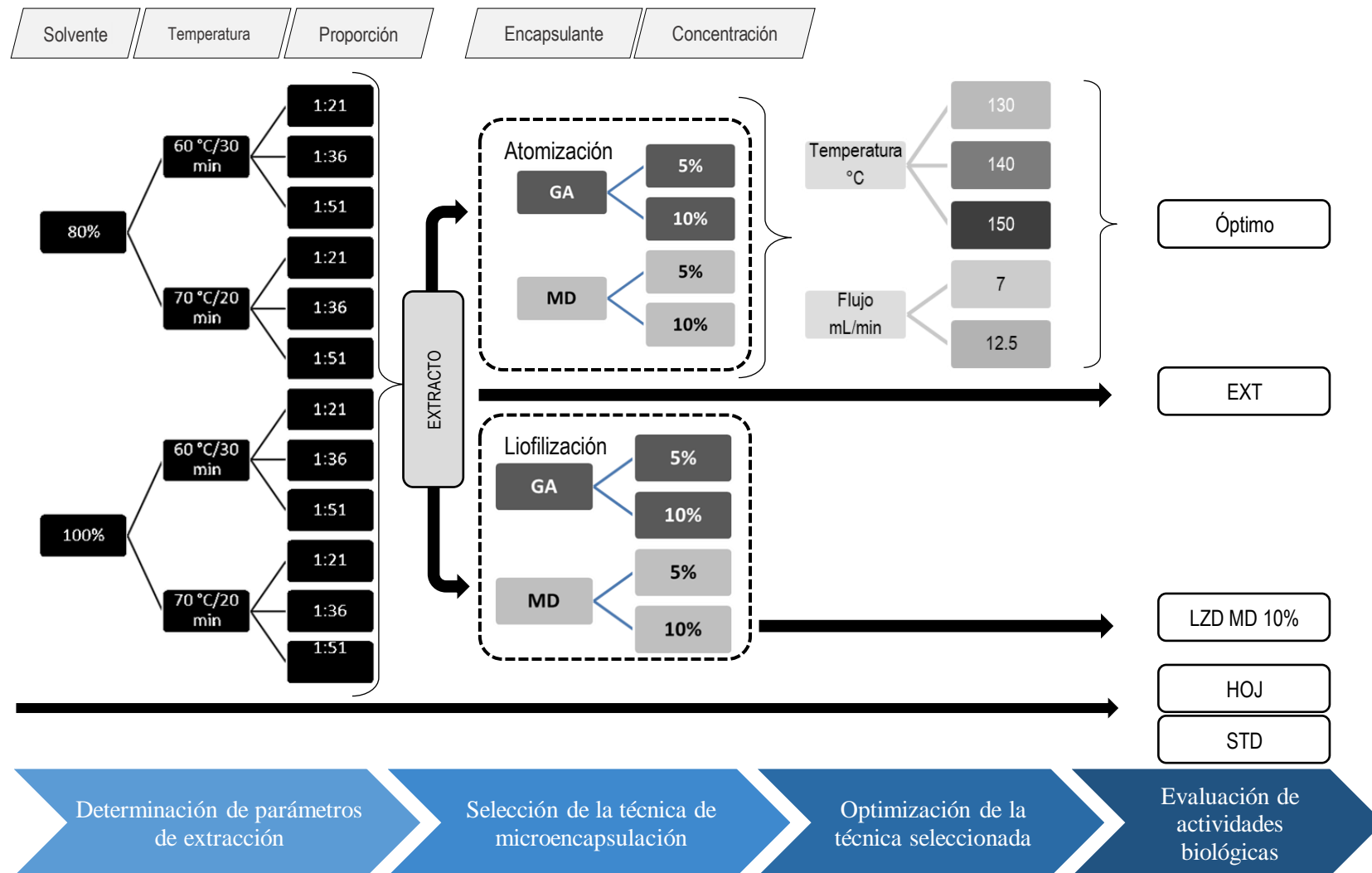


Figura 9. Diseño experimental

GA: Goma arábica, MD: Maltodextrina, Solvente: Mezcla hidroalcohólica, Proporción: Relación materia prima con el solvente.

3.5.1 Determinación de parámetros de extracción

Para fijar los parámetros de extracción se generó un diseño multifactorial (Tabla 5) a partir de factores y sus niveles previamente definidos en ensayos preliminares; el diseño corresponde a un arreglo multinivel factorial con tres variables independientes (Solvente, Relación Materia Prima – Solvente, y Temperatura/Tiempo), considerando como variables respuesta la (1) Absorbancia a la $\lambda_{\text{máx}}=230$ nm, asociada a absorción de radiación por Acetogeninas (Prayitno *et al.* 2016) y (2) la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos, como indicador de la cantidad de fitoquímicos deseables. El solvente se dividió en dos niveles, siendo el nivel mínimo 80% de agua más 20% de etanol, y el nivel superior sólo agua (100%); el segundo factor correspondiente a la dilución tuvo tres niveles, y el factor Temperatura/Tiempo dos niveles.

A. Elaboración de los extractos

Todos los tratamientos de extracción se realizaron en un baño ultrasónico (Lab Companion UCS-05, EUA) a una intensidad media constante (120 W), a las condiciones prescritas según el diseño experimental, posteriormente se realizó un enfriamiento con hielo y el extracto fue filtrado empleando una fibra de Nylon para ser centrifugado a 4000 rpm durante 30 min (adaptado de Locanawan, 2015).

B. Caracterización de los extractos

La absorbancia (ABS) de los 12 tratamientos fue medida a 230 nm previa dilución con agua destilada (1 a 120). El contenido de compuestos fenólicos fue determinado de acuerdo al método descrito previamente, empleando la curva de calibración presentada en el Anexo 12. La eficiencia de extracción fue hallada dividiendo los compuestos fenólicos totales (CFT) entre la cantidad de muestra inicial (g), expresado en porcentaje mediante la ecuación (6).

$$E. E. = \frac{CFT}{Muestra (g)} \times 100 \quad (6)$$

Donde E.E. es eficiencia de extracción, y CFT el contenido total de compuestos fenólicos.

C. Optimización

Para la determinación de las condiciones de extracción se realizó una optimización (criterio “mayor es mejor”) mediante la metodología de superficie de respuesta utilizando el *Software*

STATGRAPHICS Centurion XVI.I. Se aplicó un análisis multirespuesta (ABS_{230nm} y Eficiencia de extracción), considerando que existe una relación directa de las respuestas independientes sobre la respuesta global, y R^2 superior a 0.8.

3.5.2 Selección de la técnica de microencapsulación

El extracto preparado a condiciones estándares fue microencapsulado mediante secado por atomización y liofilización, el polvo resultante fue caracterizado y se ponderó con el análisis del indicador (Eficiencia de Encapsulación) para definir una técnica. Este proceso se realizó como se describe a continuación:

3.5.2.1 Extracción

a. Para atomización

Las hojas previamente pulverizadas fueron pesadas en matraces Erlenmeyer y mezcladas con una solución hidroalcohólica (20 % Etanol) en una relación 1:36 (masa:volumen); los matraces fueron colocados en un baño María (LAUDA Aqualine AL 25) a 70 °C durante 30 minutos. Seguidamente, se aplicó una inversión térmica en un baño con hielo con la finalidad de detener la extracción y se filtró el extracto empleado una fibra de nylon. El líquido filtrado fue centrifugado a 2 500 rpm (Damon IEC HN-SII) durante 30 min.

El sobrenadante recuperado durante la extracción fue mezclado con los encapsulantes goma arábica (Anexo 13) y maltodextrina (Anexo 14) para obtener soluciones al 5 y 10 % en masa. La mezcla fue homogenizada (IKA® T18 Ultra-Turrax®) gradualmente a 10 000 y 15 000 rpm durante 5 minutos y permaneció en refrigeración hasta su secado.

b. Para liofilización

Para la extracción, las hojas pulverizadas se mezclaron con una solución hidroalcohólica (20 % etanol) dentro de matraces Erlenmeyer en una relación de 1 a 36 (masa:volumen), que fueron colocados en un baño maría (VWR™, Modelo 1150S) a 70 °C durante 30 minutos, luego se aplicó un enfriamiento rápido en un baño con hielo y se filtró el extracto empleado una fibra de nylon. El líquido filtrado fue centrifugado a 4 000 rpm (modelo Neofuge 18R, Heal Force,) durante 30 min y se recuperó el sobrenadante.

Para la microencapsulación, el sobrenadante fue mezclado con goma arábiga y maltodextrina en dos concentraciones (5 y 10%); la mezcla fue homogenizada (modelo OV5, Velp Scientifica) a 10 000 y luego a 14 000 rpm durante 5 minutos.

3.5.2.2 Microencapsulación vía secado por atomización

La encapsulación fue realizada según la metodología descrita por Kuck y Noreña (2016), con modificaciones. Se empleó un atomizador de laboratorio (B-290, Büchi) operado a una temperatura de 140 °C con una boquilla de 1 mm de diámetro; la mezcla fue inyectada con una bomba peristáltica a un flujo de alimentación de 10 mL/min y 10 %, con flujo de aire comprimido de 32.5 m³/h.

3.5.2.3 Microencapsulación vía liofilización

Esta operación se realizó mediante la adaptación del método de Kuck y Noreña (2016). Las mezclas de extracto con los encapsulantes fueron congeladas a – 80 °C durante 24 h y luego deshidratadas en un liofilizador de mesa (VirTis Sentry™, SP Industries) a - 60°C y 100 mTorr (0.133 mBar) de presión de vacío por 96 h. Luego del liofilizado las muestras fueron homogenizadas con ayuda de un mortero y pilón. Seguidamente las muestras fueron conservadas herméticamente en frascos oscuros de vidrio para su posterior caracterización.

3.5.3 Optimización de la técnica de microencapsulación seleccionada

En la etapa previa se seleccionó el secado por atomización como la técnica de microencapsulación más adecuada para encapsular al extracto de *Annona muricata* debido a una mayor EE; consecuentemente, se procedió a optimizar dos condiciones de importancia tecnológica en esta técnica. La humedad, solubilidad y eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos fueron empleadas como variables respuesta.

El estudio fue desarrollado en etapas (Figura 9). Para esta etapa se generó un diseño experimental que arrojó 6 tratamientos, resultado de la combinación de 3 niveles de temperatura (°C), y 2 niveles del flujo de alimentación (mL/min), los polvos resultantes fueron caracterizados fisicoquímicamente, y a partir de los datos obtenidos se analizó estadísticamente el diseño para obtener el tratamiento óptimo. El análisis de datos se realizó empleando el *software* STATGRAPHICS Centurion XVI.I.

Con el fin de reducir el número de tratamientos y permitir un ahorro de recursos, en esta etapa sólo se emplearon dos variables independientes, considerando el hecho que previamente se habían estandarizado factores como el tipo y concentración de encapsulante. Se seleccionaron la temperatura y el flujo de alimentación al ser dos parámetros de procesamiento comúnmente empleados para la optimización del secado por atomización (Fernandes de Barros *et al.* 2013).

- **Microencapsulación**

Se preparó un extracto de las hojas pulverizadas empleando como solvente una solución hidroalcohólica (20% de etanol) en la relación 1:36. La mezcla fue hecha en matraces Erlenmeyer que fueron colocados en baño María por 30 min a 70 °C. Pasado el tiempo se realizó una inmersión con hielo para detener la extracción, se filtró el extracto empleando una fibra de nylon, y el líquido recuperado fue centrifugado por 30 min a 3000 rpm. Se separó el sobrenadante y se mezcló con 10% de Maltodextrina (Anexo 15) empleando un homogeneizador (Velp Scientific, OV5) a 10000 y 14000 rpm durante 5 min, progresivamente. La dispersión obtenida fue inyectada al *spray dryer* (SD-BASIC, LabPlant) a las condiciones establecidas en el diseño experimental, y el polvo recolectado fue conservado en envases oscuros de vidrio para su posterior caracterización.

- **Caracterización de los tratamientos**

Los tratamientos fueron caracterizados en cuanto a la eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos, solubilidad y humedad. Posteriormente, se realizó una caracterización del tratamiento óptimo en cuanto a su morfología, capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) y cuantitativamente mediante HPTLC (ver 3.4.5).

3.5.4 Evaluación de actividades biológicas del extracto microencapsulado final

Para evaluar el efecto anticancerígeno y neurotóxico del extracto microencapsulado se realizaron pruebas biológicas con cultivos celulares PC12 y neuronas corticales de ratón. A su vez se evaluó el efecto del estándar de anonacina, un extracto fresco de hojas, extracto deshidratado de hojas, y un extracto microencapsulado por liofilización, originando 5 tratamientos. Las células PC12 se emplearon para un ensayo de viabilidad mediante el método MTT, los cultivos neuronales se emplearon para analizar señales de Ca²⁺ citosólico;

el primer ensayo es usualmente empleado como indicador de muerte celular y el segundo para explicar incidencia de enfermedades neurodegenerativas.

3.6 Análisis estadístico

Todos los datos fueron expresados como promedio \pm la desviación estándar (D.S.) de al menos tres réplicas. La significancia de las diferencias fue evaluada mediante análisis de varianza (ANOVA). El análisis estadístico fue realizado empleando el *software* Excel.

Para las pruebas biológicas, los datos fueron analizados empleando el programa Prism a través de un ANOVA unilateral seguido a una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer's. Para indicar diferencia significativa se emplearon valores de p inferiores a 0.05. Los experimentos se realizaron por triplicado \pm el error estándar de la media (SEM).

La optimización de los parámetros de extracción y de la microencapsulación vía secado por atomización se realizó mediante STATGRAPHICS Centurion (versión de prueba).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de parámetros de extracción

4.1.1 Caracterización de la materia prima

Con el objetivo de estandarizar la obtención del extracto, se emplearon hojas de una única procedencia, y tiempo de cosecha. La planta de guanábana no deja de tener hojas; sin embargo, estas presentan un ciclo semestral de renovación; el proceso de renovación de hojas se realizó de manera natural (sin poda). Los ejemplares de este estudio se renovaban de mayo – octubre, y noviembre - abril (Figura 10).

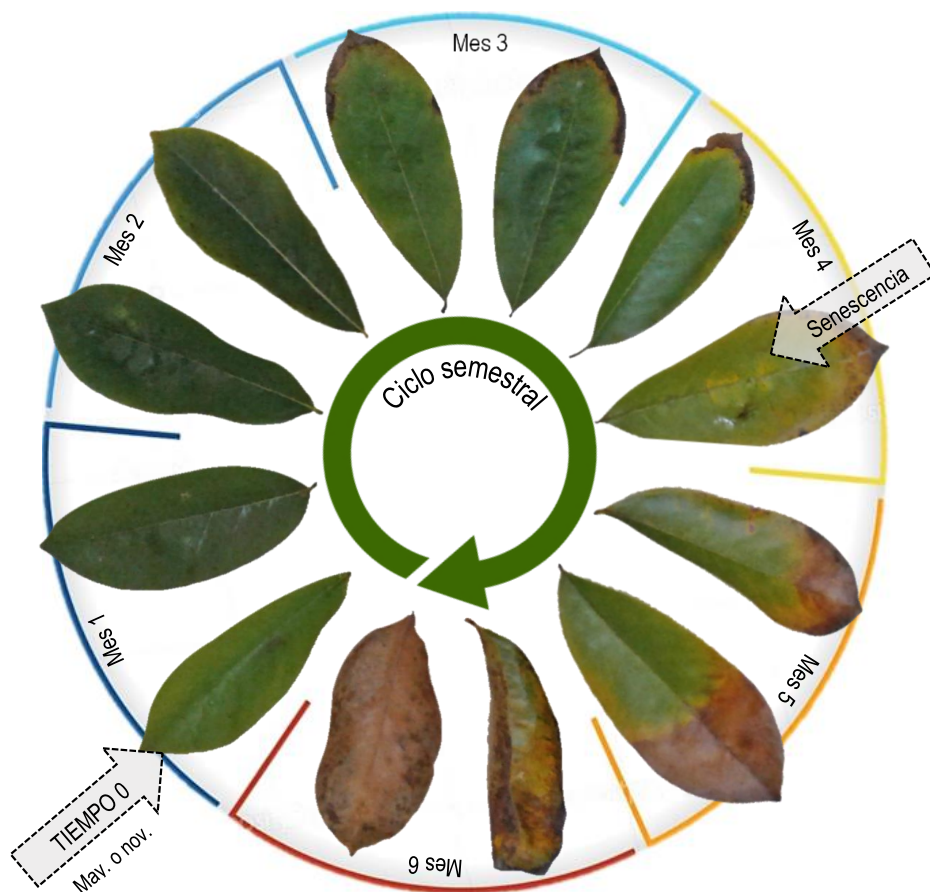


Figura 10. Ciclo biológico de las hojas de guanábana.

La planta de guanábana presenta dos ciclos de renovación foliar al año, pero solo da fruto una vez (en verano - otoño); inmediatamente después de la fructificación, se inicia un proceso de senescencia natural.

Un factor que influye en la composición química de las hojas es el momento de recolección, dado que la cantidad de metabolitos es dependiente de los estadios biológicos de la planta (De Souza *et al.* 2018). Para los estudios de extracción, las hojas de guanábana fueron recolectadas en diciembre de 2016; mientras que, para el estudio de optimización del secado por atomización, en diciembre de 2017.

Las hojas recolectadas fueron caracterizadas en términos de composición químico-proximal (Tabla 4) como patrón de referencia para interpretación de resultados; en estudios similares, la composición de las hojas secas es distinta, y esto es atribuido a factores como la zona geográfica, momento de recolección, edad de la planta, patrones de siembra, entre otros (Thang *et al.* 2013).

Tabla 4. Composición químico-proximal de las hojas secas de guanábana (b.h.)

Compuesto	Patricia <i>et al.</i> (2014)	Este estudio
Humedad (g/100 g)	9.87 ± 0.01	12.12 ± 0.09
Proteínas (g/100 g)	13.92 ± 0.20	10.77 ± 0.18
Grasa (g/100 g)	2.94 ± 0.20	2.86
Carbohidratos (g/100 g)	-	-
Ceniza (g/100 g)	7.17 ± 0.01	10.28 ± 0.09
Anonacina (µg/g)	-	302.55 ± 7.10

El contenido de anonacina en las hojas (302.55 µg/g) se encuentra próximo a lo reportado por Machado de Moraes *et al.* (2016), 305.6 ± 28.3 µg/g, empleando UPLC–QTOF–MS.

Las hojas de guanábana fueron analizadas con un microscopio SEM encontrando la presencia de algunos minerales, los mismos que se encuentran distribuidos de manera heterogénea en toda la hoja. La naturaleza de esta planta precisa principalmente de elementos

como nitrógeno, potasio, fósforo (MINAGRI 2010), calcio, sodio y magnesio (Yamarte Chirinos *et al.* 2009). En la sección izquierda de la Figura 11 se presenta la composición promedio de los elementos encontrados en el tejido vegetal.

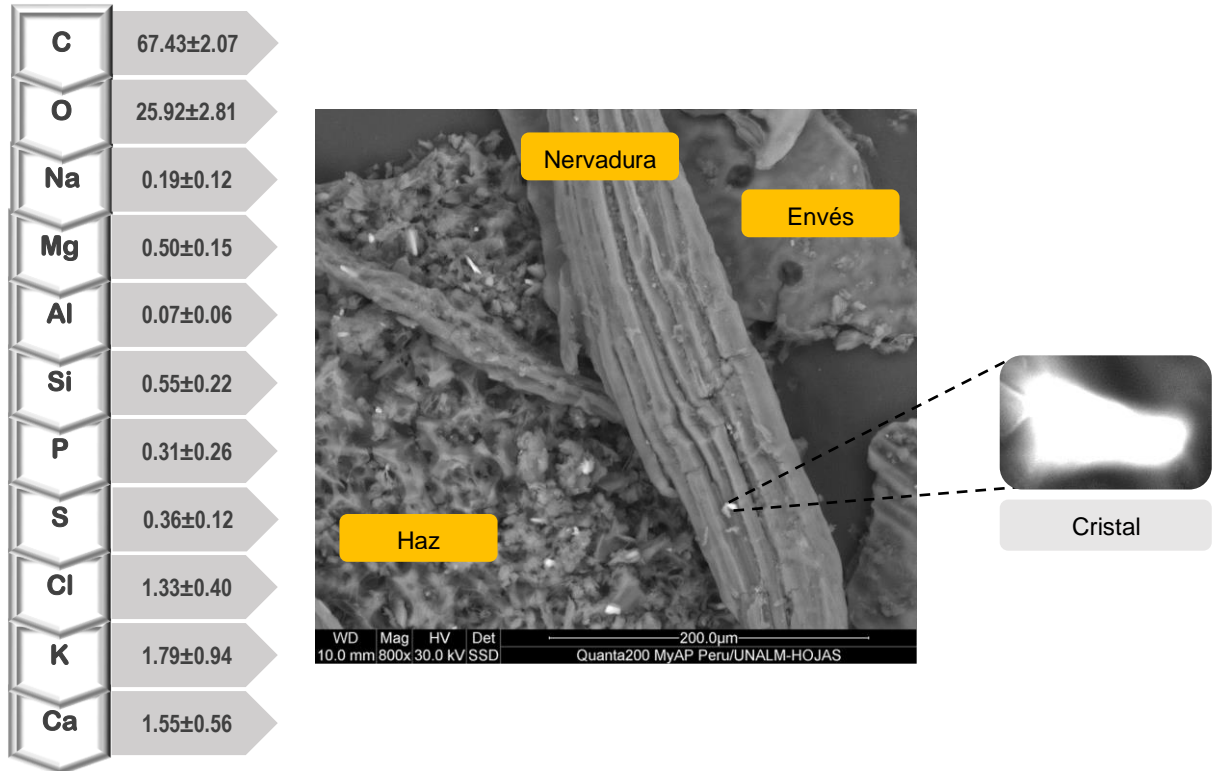


Figura 11. Imagen SEM de las hojas secas pulverizadas y composición elemental (%)

Porcentaje calculado sobre el total de minerales identificados por microscopía semicuantitativa

Se observan elementos predominantes de moléculas orgánicas como el C y el O, así como bioelementos (P, S); similarmente, se observa una cantidad importante de Ca, lo que supone la presencia de sales de Calcio, entre las que figura el Oxalato de calcio, cuyo consumo regular podría estar asociado a la formación de cálculos renales (Sá *et al.* 2019). De acuerdo a Vidal Hernández *et al.* (2014), el contenido de macro y micro elementos en las hojas de guanábana incluye N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn durante la época seca, y aparición de boro (B) en época de lluvia, incluyendo variación en el porcentaje de los demás componentes; además de factores medioambientales, existen factores intrínsecos al vegetal que inducen a que la demanda de micronutrientes varíe durante su desarrollo fisiológico, y de lo cual depende su estado nutricional (Avilán R. 1975).

Annona muricata presenta K, Ca, P en la forma de fitatos, Mg, y Na (Olawale 2007); cabe señalar que los fitatos juegan un rol importante en la prevención de cáncer (Vucenik y Shamsuddin 2006), esto contribuye a las propiedades anticancerígenas de las hojas de guanábana, e induce a pensar que sus propiedades terapéuticas son el resultado de una interacción de fitoquímicos.

Por la naturaleza del ensayo, la composición de átomos es referencial; sin embargo, su carácter cualitativo podría tomarse como punto de referencia para rastrear qué minerales pasan a formar parte del extracto y posteriormente a ser microencapsulados también. De acuerdo a Wang *et al.* (2017) esto permite identificar en qué partes del proceso pudo haberse generado una contaminación; asimismo, determinar el origen de compuestos presentes en el producto final luego de una caracterización de la composición mineral de todos los insumos involucrados en su elaboración. Es escasa la información sobre la composición mineral de las hojas de guanábana, pero se sabe que esta puede ser sujeta a variación de acuerdo a las condiciones agronómicas en las que se desarrolló la planta, entre ellas: altitud, prácticas agrícolas, zona geográfica, entre otras (García-Soto *et al.* 2011)

4.1.2 Parámetros de extracción

Las condiciones de extracción se estandarizaron en función de la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos y la absorbancia ($\lambda=230$ nm) a partir de doce tratamientos generados a través de un diseño multinivel factorial (Tabla 5).

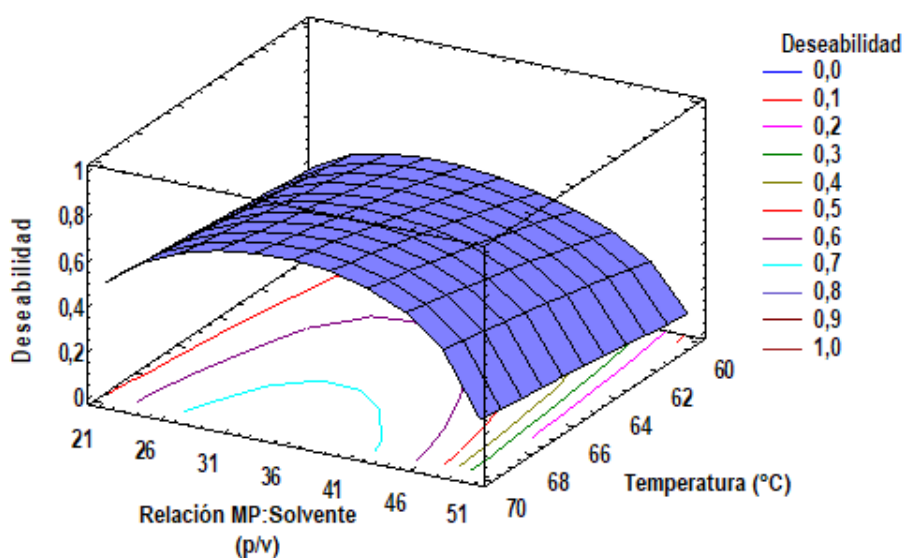
Se empleó la absorción de radiación a 230 nm dada su relación con la presencia de acetogeninas (Prayitno *et al.* 2016), lo cual fue confirmado mediante el espectro de absorción del estándar de Anonacina en solución (Anexo 16); de igual forma, como indicador del desempeño de la extracción se empleó la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos (Liu *et al.* 2013). Ambos indicadores son los principales responsables de las propiedades terapéuticas de las hojas y mantienen un efecto sinérgico entre sí (Yang *et al.* 2015).

Tabla 5. Resultados del diseño experimental para optimizar la extracción

Tratamientos	Variables independientes			Variables dependientes	
	Solvente (%)	Relación (MP:Solvente)	°T/t (°C/min)	Absorbancia* (230 nm)	Eficiencia de extracción (%)
1	80	1:21	60/30	0.582	104.92
2	80	1:21	70/20	0.602	125.71
3	80	1:36	60/30	0.709	116.79
4	80	1:36	70/20	0.673	138.77
5	80	1:51	60/30	0.490	106.25
6	80	1:51	70/20	0.498	130.91
7	100	1:21	60/30	0.531	96.37
8	100	1:21	70/20	0.531	127.01
9	100	1:36	60/30	0.613	74.22
10	100	1:36	70/20	0.661	95.85
11	100	1:51	60/30	0.501	56.94
12	100	1:51	70/20	0.511	148.12

*Absorbancia del tetrahidrofurano de acetogeninas (Prayitno *et al.* 2016).

En la Figura 12 se presenta la respuesta múltiple (ambos factores) bajo la función de deseabilidad; en donde se observa que existe una región que maximiza la extracción en función a los criterios de optimización analizados.

**Figura 12. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad**

Las condiciones que maximizan la extracción de acuerdo con el análisis del diseño experimental se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de extracción optimizadas

Factor	Óptimo
Temperatura/Tiempo	70 °C / 20
MP : Solvente	1 : 36
Solvente	80 %

* Parámetros calculados a 120 W de potencia de sonificado

Los resultados demuestran que a mayor temperatura/tiempo (70 °C y 20 min) se maximiza la extracción empleando un ratio de 1:36 (p/v) para la relación de la materia prima (g) con el solvente (mL), siendo este último mayoritariamente agua (80 %). En un estudio para optimizar el contenido de quercetina procedente de *Dendrobium officinale* empleando variables independientes similares, se fijó como temperatura y tiempo de extracción 60 °C y 30 min, siendo la proporción de solido-líquido 1 a 41 (Zhu *et al.* 2019); la investigación de referencia además incorpora el efecto de la potencia de sonificado y hace uso de concentraciones de etanol más elevadas. En contraparte, durante la presente investigación se emplearon como variables respuesta dos metabolitos de distintos grados de hidrofiliidad, por tanto, los resultados son consecuencia de un efecto múltiple.

El análisis privilegió el empleo del solvente compuesto por 80 % de agua y 20 % de etanol; al respecto, Casagrande *et al.* (2018) indican que la mezcla de agua y solventes como el etanol ocasionan ahorros productivos aumentando la eficiencia de extracción de metabolitos. Cabe señalar que, debido a la afinidad de ciertos compuestos por un determinado solvente, el empleo de mezclas eleva la diversidad de metabolitos presentes en el extracto resultante. En extractos foliares de *Annona muricata* originaria de Uganda elaborados empleando dos solventes (agua y etanol), se identificaron compuestos en común pero en distintas proporciones, entre los que figuraban: alcaloides, flavonoides, terpenoides, cumarinas y lactonas, antraquinonas, taninos, glicósidos cardíacos, fenoles, fitoesteroles y saponinas (Gavamukulya *et al.* 2014); lo anterior desdibuja la idea que el extracto contiene moléculas reconocidas por su efecto farmacológico.

Se procedió a extender el tiempo de extracción en 10 min con fines de adaptación a condiciones prácticas de trabajo en laboratorio y extraer una mayor cantidad de metabolitos en compensación al sonicado, tomando como base las condiciones halladas (Tabla 6). Los parámetros de extracción se fijaron en 30 minutos de lixiviación a 70 °C (sin ultrasonido) empleando como solvente una solución etanólica al 80 % con un ratio de 1:36 (p/v) en relación a las hojas secas pulverizadas. En la Tabla 7 se especifican las características del extracto obtenido a las condiciones establecidas.

Tabla 7. Características del extracto hidroalcohólico de las hojas

Atributo	Valor
Sólidos totales (SS.TT.) (g/mL)	0.00685 ± 0.00001
pH	5.70 ± 0.04
Color	
L*	69.85 ± 0.27
a*	11.91 ± 0.09
b*	64.17 ± 0.03
Alcaloides totales	1.06 % ^a
Anonacina (mg/mL)	0.00146 ± 0.43
Fenoles totales (mg AG/mL)	1.362 ± 0.041

^aExtraído de informe de ensayo (Anexo 17)

Al expresar el contenido de compuestos fenólicos extraídos en función a la masa inicial empleada, se obtuvo 49.03 mg AG/g de hojas; este valor es superior al máximo hallado (44.39 mg AG/g) durante la optimización de la extracción de CFT procedentes de hojas de *Sideritis scardica* a 100 °C durante 20 min empleando agua como solvente (Irakli *et al.* 2018). Dicho estudio revela la existencia de una relación directamente proporcional entre la temperatura y la cantidad de CFT extraídos; asimismo, la combinación de bajas temperaturas y tiempos prolongados ocasionan una menor extracción de compuestos fenólicos en comparación al empleo de altas temperaturas y tiempos cortos. Por otro lado, el contenido de Anonacina extraído de acuerdo a la cantidad de hojas sería 0.05 mg/g, por debajo del contenido reportado (0.299 a 15.05 mg/g) en extractos con fines analíticos y cuantificados por diversas técnicas (Coria-Téllez *et al.* 2016).

4.2 Selección de la técnica de encapsulación

4.2.1 Caracterización morfológica de los insumos

En este estudio, la microestructura del extracto atomizado sin encapsular (Figura 13A) y la estructura original de los encapsulantes en condiciones comerciales (Figura 13B y 13C) se emplearon como controles para explicar la morfología del extracto microencapsulado. Cada componente presentó una microestructura característica inherente a su naturaleza química y como consecuencia del proceso tecnológico experimentado durante su fabricación.

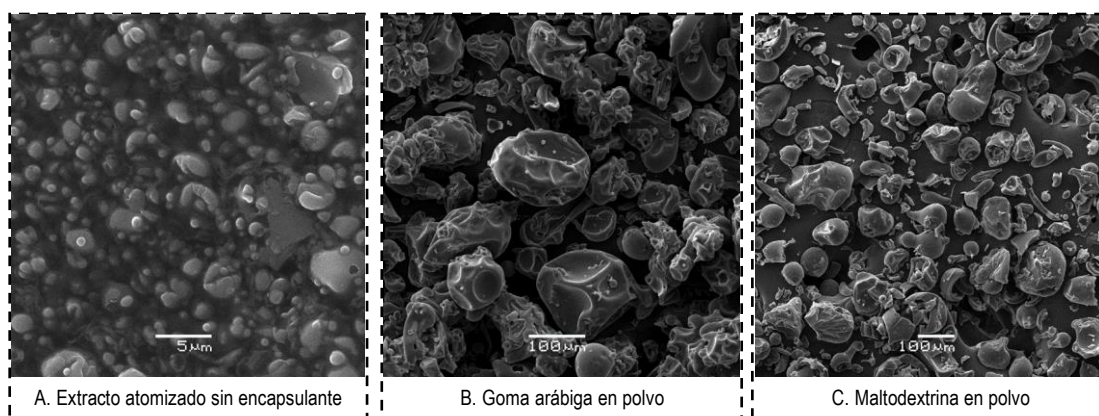


Figura 13. Micrografías de los insumos empleados

Tanto para la manufactura de MD como de GA participan operaciones de secado que condicionan las propiedades del producto (Sulieman 2018, Zhang *et al.* 2018). Durante este proceso se desarrollan mecanismos de transferencia de materia y energía que originan cambios físicos, químicos y estructurales (Sabarez 2012, 2017), lo cual determina las características finales del polvo, como el color, aspecto, propiedades texturales y estructurales, propiedades sensoriales como el aroma y sabor, así como las propiedades nutricionales y funcionales (Karam *et al.* 2016); por este motivo, cada vez se realizan más estudios para obtener características óptimas de los polvos procedentes de frutas y sus subproductos. En tanto, resulta imperativo usar encapsulantes de calidad estructural conocida para comprender el mecanismo que implica la transformación de extractos líquidos en partículas sólidas dada la inexistencia de patrones de referencia de los encapsulantes al momento de adquirirlos para visualizar su pureza. El aspecto del producto resultante puede ser visualizado en el Anexo 18, con notables diferencias respecto de los insumos que le dieron origen.

4.2.2 Caracterización morfológica de las micropartículas

El análisis visual permitió entender como la morfología de los insumos resultó alterada como consecuencia del proceso de atomización, en la Figura 14 se presentan conformaciones diferentes a las registradas originalmente para los insumos, conduciendo a la idea que estos se fusionaron y por tanto el extracto fue atrapado por los encapsulantes.

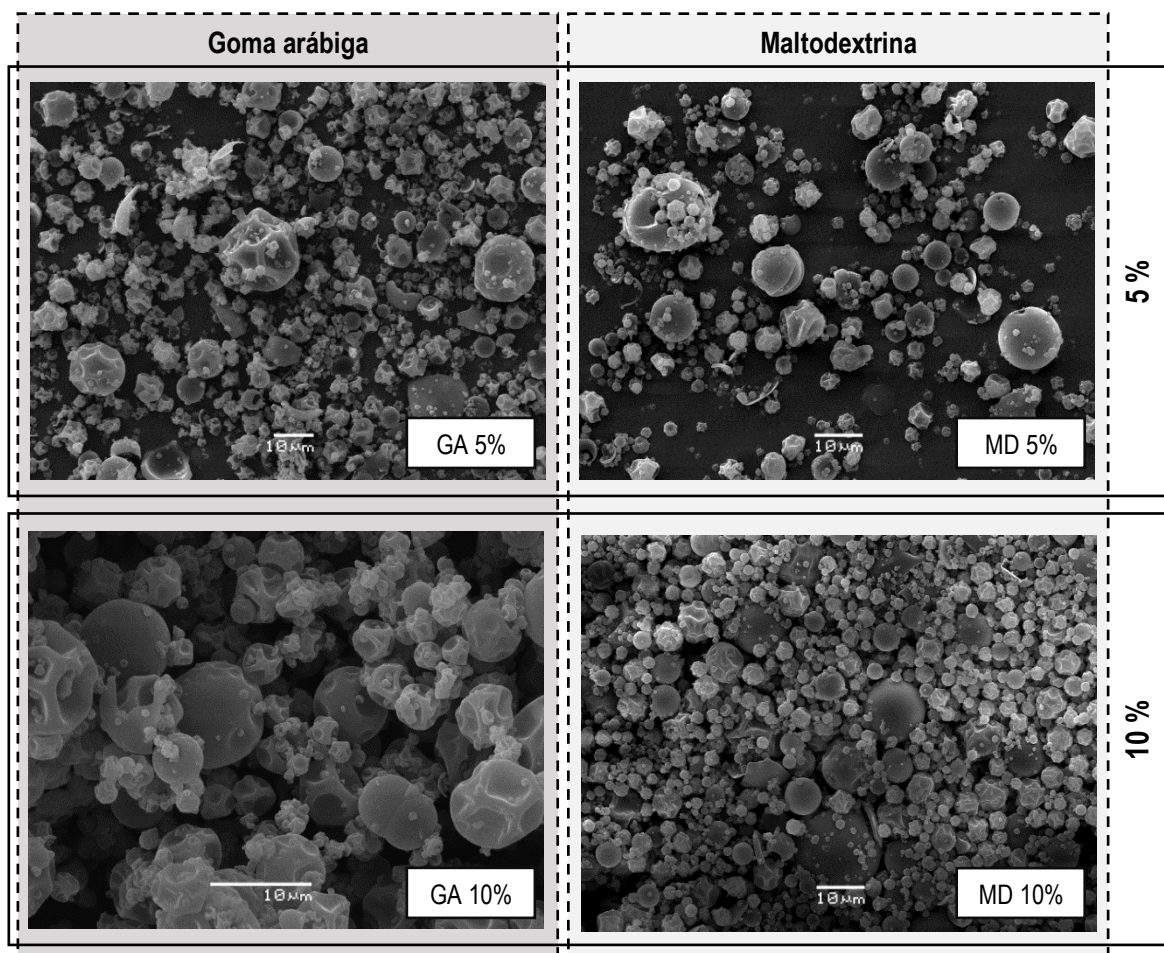


Figura 14. Microcápsulas de extracto hidroalcohólico de hojas de guanábana obtenidas mediante atomización.

En general la forma de las micropartículas fue esférica y presentaron un tamaño heterogéneo; la esfericidad y la heterogeneidad de tamaño es característico del proceso de atomizado (Tonon *et al.* 2009, Li *et al.* 2015), pero a su vez dependientes del tipo y concentración del encapsulante empleado (Corrigan 1995, Ramírez *et al.* 2015).

Las partículas con MD fueron más esféricas que aquellas empleando GA, que resultaron morfológicamente más irregulares. Este mismo comportamiento ha sido reportado por

Simon-Brown *et al.* (2016), quienes señalan que la microencapsulación con MD origina partículas con formas más uniformes y esféricas que aquellas muestras empleando GA; según Fernandes *et al.* (2014) y Janiszewska (2014), este comportamiento se atribuye a la elasticidad que otorga la MD durante el proceso de secado; por otro lado, Dib Taxi *et al.* (2003) indican que los extractos encapsulados con GA tienden a adquirir una conformación similar a la de GA pura.

Con ambos encapsulantes se observa mayor proporción de partículas turgentes al usar una mayor concentración de encapsulante (10 %), revelando una relación directamente proporcional con la esfericidad de las partículas, principalmente aquellas con MD; en forma similar, Simon-Brown *et al.* (2016) reportaron mayor incidencia de partículas esféricas en extractos de *Zingiber officinale* microencapsulados con MD, asimismo Li *et al.* (2015) mencionan que el grado de encogimiento (*shrinkage*) de microcápsulas de aceite de pescado disminuye al aumentar la concentración del encapsulante.

Desde el punto de vista tecnofuncional, las partículas con superficies rugosas son más sensibles a reacciones de oxidación comparadas con aquellas de superficie lisa debido a sus mayores áreas superficiales (Tolun *et al.* 2016). Asimismo, una superficie lisa disminuye la permeabilidad de gases, aumentando la protección y retención del núcleo (Li *et al.* 2015, Santana *et al.* 2016, Simon-Brown *et al.* 2016); adicionalmente, la obtención de microcápsulas con una superficie lisa contribuye a mejorar las características de flujo del material (Tonon *et al.* 2009).

La temperatura de secado es determinante puesto que influye significativamente en la conservación de compuestos bioactivos termosensibles (Ramírez *et al.* 2015), así como en el tamaño, forma y superficie de las partículas (Alamilla-Beltrán *et al.* 2005). Cabe señalar que una elevada rugosidad es característica de partículas producidas por atomización a bajas temperaturas (Lacerda *et al.* 2016, Alamilla-Beltrán *et al.* 2005); por el contrario, las temperaturas altas, favorecen la obtención de partículas con superficie lisa, y con un diámetro medio mayor (Rosenberg y Young 1993, Alamilla-Beltrán *et al.* 2005, Tonon *et al.* 2009). Sin embargo, el haber considerado previamente la misma temperatura de secado para todos los tratamientos, permitió detectar las diferencias encontradas en función exclusivamente del tipo y concentración del encapsulante.

4.2.3 Formación de partículas defectuosas durante el secado por atomización

El proceso de transformación de la gota en partícula y los fenómenos posteriores desencadenados durante el secado por atomización son compilados en la Figura 15, en concordancia a lo propuesto por Nandiyanto y Okuyama (2011), y Walton (2000).

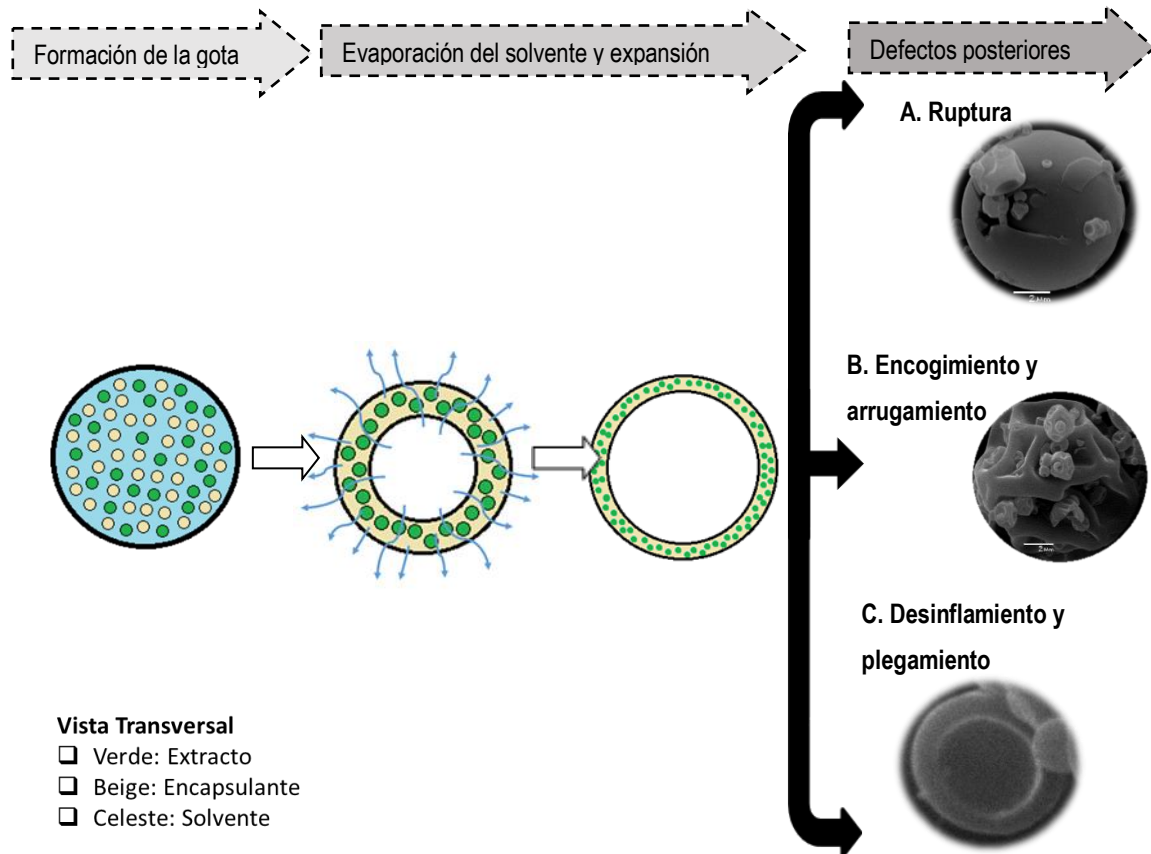


Figura 15. Partículas defectuosas identificadas en el análisis de imágenes

Durante la formación de la partícula, se necesita cierto espesor de la superficie sólida (*Shell*) para estabilizarla mecánicamente (Elversson y Millqvist-Fureby 2005), el cual se logra por la concentración del encapsulante y las condiciones de proceso; una porosidad elevada y naturaleza permeable de la estructura de la partícula, permite el flujo de agua, vapor de agua y posiblemente gases disueltos desde el interior hacia la superficie con mínima resistencia, minimizando así la presión interna y la distensión de las partículas (inflación) (Walton 2000), de lo contrario si la presión interna fuese superior ocurriría una expansión y una explosión.

La fragmentación de partículas fue un defecto recurrente en todos los tratamientos, pero evidentemente menor a mayor concentración de encapsulante (Figura 15A); la ruptura y

formación de agujeros superficiales se asocia entre otras cosas a temperaturas de secado elevadas, que producen una excesiva evaporación del agua y una rápida expansión de la partícula (Rosenberg y Young 1993, Alamilla-Beltrán *et al.* 2005); además está relacionado a la naturaleza del material encapsulante.

Las micropartículas con GA al 5 % evidencian haber experimentado una fase de “ballooning”, con una tendencia a la ruptura tras haber extralimitado su extensión, observándose además la presencia de restos de partículas post ruptura; este fenómeno fue visualmente menor en las partículas al 10 %. La incidencia de ruptura es un indicador de la eficiencia del proceso de microencapsulación (Trindade y Grosso 2000), siendo ambos inversamente proporcionales.

El arrugamiento se presentó principalmente en micropartículas con GA (Figura 15B), que muestran una superficie predominantemente rugosa, a causa de un mayor grado de encogimiento; las estructuras abolladas pueden ocurrir debido a una rápida pérdida de humedad durante las primeras etapas del proceso de secado y un enfriamiento posterior inmediato, ocasionando una contracción de las gotas (Tolun *et al.* 2016, Rosenberg *et al.* 1985). En consecuencia, el arrugamiento superficial de las partículas reduce las propiedades de flujo de las microcápsulas (Li *et al.* 2018).

En las microfotografías de las microcápsulas con 10 % de GA se aprecian partículas tipo sombrero de hongo (Figura 15C); similarmente, Janiszewska y Włodarczyk (2013) reportaron microfotografías de pigmento de betarraga encapsulado con MD mediante secado por atomización, donde se aprecia distintos estadios de lo que ocurriría durante la formación de estas partículas, lo cual sugiere que provienen de partículas que han logrado expandirse (sin llegar a romperse) y que pierden presión interna, produciéndose un desinflamiento, y posterior plegamiento a la mitad.

En la Figura 16 se presentan microfotografías de los tratamientos con ambos encapsulantes a la concentración más baja (5 %) en donde se aprecia el defecto de ruptura.

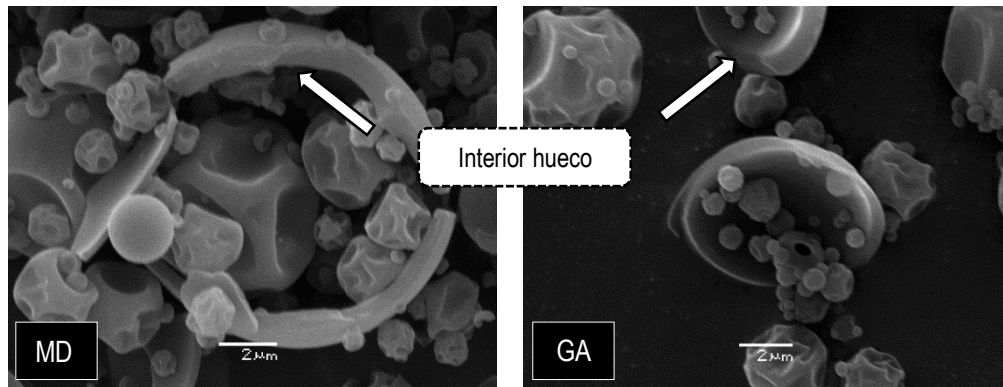


Figura 16. Microcápsulas empleando 5 % de encapsulante

No es evidente la existencia de un núcleo independiente, sugiriendo que el extracto se ha fusionado con la matriz, formando una pared externa con un centro hueco, el cual es mayor mientras más esférica sea la partícula (Figura 16); esto mismo ha sido observado en micropartículas de antocianina encapsulada empleando GA/MD, las cuales se catalogan como estructura de núcleo múltiple (Akhavan Mahdavi *et al.* 2016) o tipo matriz, en las cuales el núcleo se encuentra distribuido homogéneamente a través del material de pared (Rocha *et al.* 2012); de forma similar Kim y Morr (1996) reportaron partículas esféricas huecas rodeadas por paredes porosas y con hendiduras superficiales al usar GA como encapsulante.

De acuerdo a Nandiyanto y Okuyama (2011), las partículas huecas resultan como efecto de una rápida tasa de evaporación. Otro factor que influye en la morfología de las micropartículas es el solvente (Sadeghi *et al.* 2013), en este caso se empleó una fase binaria (etanol – agua). Walton (2000) señala que, si la evaporación del solvente (volátil) excede la velocidad de difusión del líquido a través de la estructura de la partícula, se produce una partícula hueca con una burbuja interna.

Una de las propiedades primordiales de polvos encapsulados destinados a consumo humano directo es su fácil reconstitución, lo que dependerá del tamaño de partícula, densidad, porosidad, carga superficial, área superficial, y la presencia de sustancias anfipáticas (Domian y Wąsak 2008). Además del criterio tecnológico, en un enfoque más amplio, es necesario que las cápsulas protejan a los compuestos bioactivos de las condiciones adversas del tracto gastrointestinal de tal manera que se logre su liberación en un sitio específico (de Vos *et al.* 2010). Lo anterior involucra exponer las micropartículas a condiciones similares

a las del sistema digestivo (orofaríngeo, estómago, intestino delgado e intestino grueso), y evaluar qué tan efectivo resulta el encapsulante para tal fin, dicha efectividad está asociada al tipo de partícula, diámetro de la partícula, espesor de la pared, a la afinidad por el medio externo, entre otros (Solanki *et al.* 2013).

Adicionalmente, es necesario optimizar las condiciones de microencapsulación en función al uso previsto del producto, que para el caso específico de atomización son: el tipo de encapsulante, concentración del encapsulante, tipo de *spray*, temperatura de entrada, flujo de alimentación, velocidad de aire, entre otras; teniendo en cuenta aquellas variables con efecto significativo, lo cual se logra mediante un *screening* previo.

- **Tamaño de partícula**

El rango y tamaño promedio de las partículas es presentando en la Tabla 8. De acuerdo con los tamaños hallados (0,25 a 13,87 μm), las partículas se encuentran comprendidas en el segmento de microcápsulas (0.2 a 5000 μm) señalado por Silva *et al.* (2014), la variabilidad de tamaño presentada es una característica de partículas producidas mediante secado por atomización (Carneiro *et al.* 2013). Con ambos encapsulantes se evidencia un incremento en el diámetro de la partícula al aumentar la concentración de encapsulante, este mismo efecto ha sido observado empleando GA (Simon-Brown *et al.* 2016); adicionalmente, en comparación a usar MD, las partículas con GA tienden a presentar un tamaño ligeramente mayor, como ha sido reportado en estudios similares (Fernandes *et al.* 2014, Simon-Brown *et al.* 2016).

Tabla 8. Diámetro promedio en volumen y tamaño de micropartículas

Tratamiento	D [4,3] (μm)	Intervalo de tamaño (μm)
EXT GA 5%	6.97	0.28 - 13.87
EXT GA 10%	7.51	0.25 - 11.21
EXT MD 5%	7.05	0.29 - 12.86
EXT MD 10%	7.36	0.30 - 13.43

El tamaño relativamente pequeño de las partículas podría estar relacionado a la naturaleza del solvente empleado, puesto que el etanol reduciría la tensión superficial de la solución y contribuiría a la formación de gotas pequeñas durante la aspersión (Sadeghi *et al.* 2013).

En la Figura 17 se presenta una distribución de frecuencias de los diámetros (μm) para cada tratamiento.

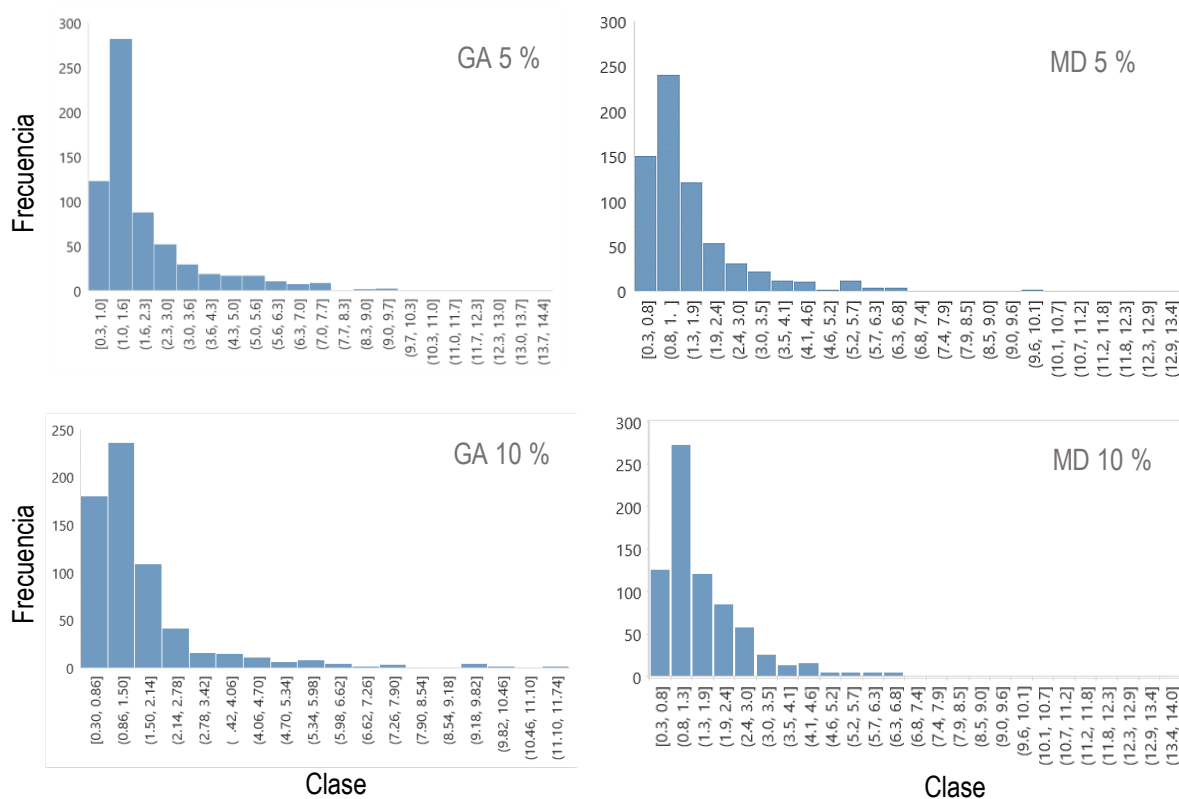


Figura 17. Distribución de frecuencias de diámetros de partículas (μm)

- **Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)**

El espectro infrarrojo de los materiales encapsulantes, el extracto puro atomizado y los extractos microencapsulados se presentan en la Figura 18, el cual revela los tipos de moléculas que los constituyen.

Todos los espectros presentaron una banda de absorción en común a la longitud de onda de 3300 cm^{-1} (Figura 18), lo cual es característico de los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) y un indicador del contenido de agua de las muestras, de igual forma todos los espectros tienen un pico en común alrededor de 900 cm^{-1} . El espectro del extracto puro presenta bandas de absorción típicas (*molecular fingerprint*) en el rango de 1700 a 1400 cm^{-1} ; estas bandas prácticamente desaparecen en los extractos microencapsulados, lo cual es indicador de un buen proceso de encapsulación (Medina-Torres *et al.* 2016).

La región comprendida entre 1630 a 1590 cm^{-1} es característica de compuestos fenólicos y alcaloides (Türker-Kaya y Huck 2017). Ambos encapsulantes redujeron la intensidad de banda característica del extracto (picos a 1585 y 1507 cm^{-1}); por otro lado, la GA presenta un pico (alrededor de 1600 cm^{-1}) ubicado muy cerca a los picos característicos del extracto, el cual también ha sido identificado para este encapsulante (Bouaziz *et al.* 2016), y está relacionado a enlaces amida de naturaleza proteica (Mohamed *et al.* 2017). Estos resultados confirman la presencia de compuestos bioactivos dentro de las micropartículas.

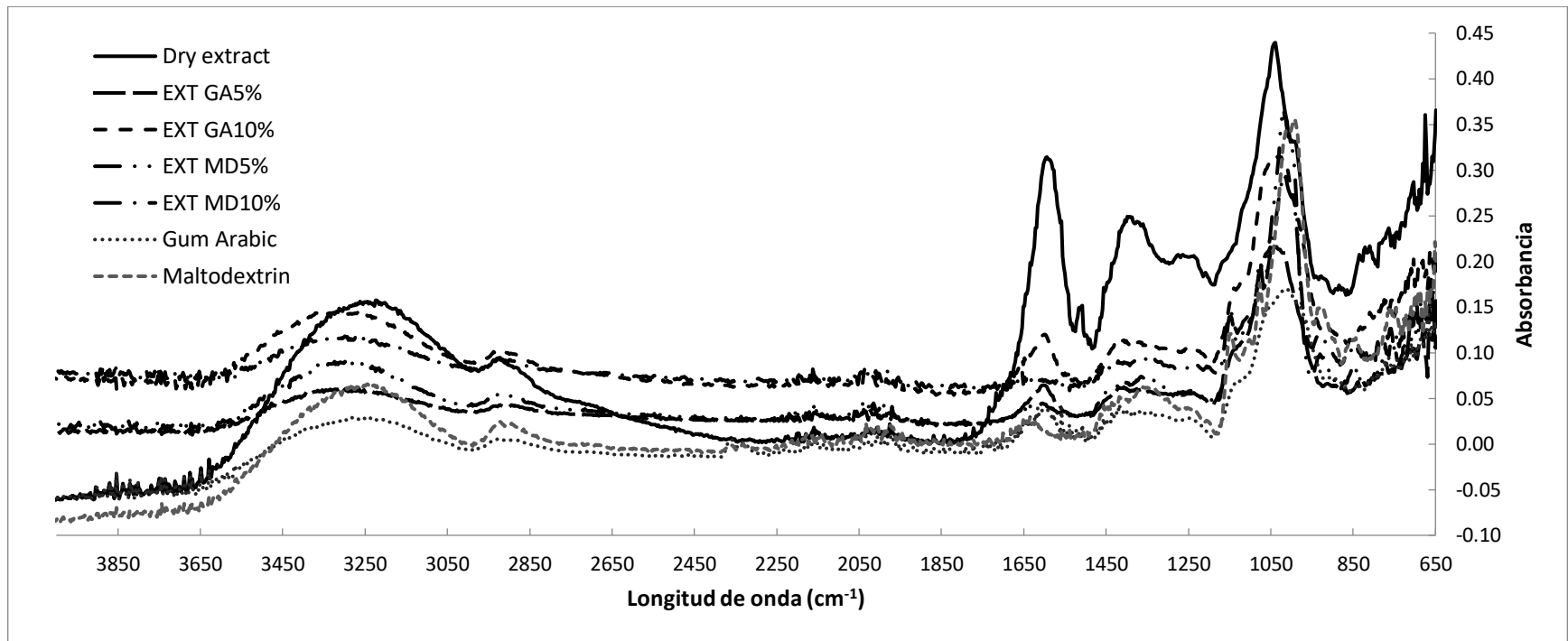


Figura 18. Espectro infrarrojo de los tratamientos y los insumos originales

4.2.4 Eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos

Los resultados de este ensayo evidencian diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Tabla 9), demostrando que los compuestos fenólicos fueron encapsulados en distintos grados en la matriz a las condiciones de estudio.

Tabla 9. Valores de eficiencia de encapsulación, y solubilidad.

Muestras	E.E. (%)	Solubilidad
EXT GA 5 %	53.46 ± 1.93 ^{1a}	93.23 ± 0.99 ^{1a}
EXT GA 10 %	64.76 ± 1.46 ^{1b}	88.49 ± 0.73 ^{1b}
EXT MD 5 %	54.10 ± 0.99 ^{2a}	98.15 ± 0.63 ^{2c}
EXT MD 10 %	72.12 ± 1.10 ^{2c}	97.38 ± 0.99 ^{2c}

*Promedios con números y letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre bloques y niveles respectivamente.

En este estudio se registraron porcentajes de E.E. desde 53.46 a 72.12 %; se observa que los valores de eficiencia aumentan al incrementar la concentración de encapsulante, y es mayor en las muestras con MD, tendencia similar al estudio de Saikia *et al.* (2015), quienes además reportan valores de 63 a 79 % empleando MD; asimismo, se observa que el valor encontrado para el tratamiento con GA al 5 % llega a ser equivalente al tratamiento con MD al 5 %, y aumenta significativamente con MD al 10 %.

Considerando que el extracto es una mezcla de compuestos con propiedades únicas, esta variabilidad entre valores de E.E. es explicada parcialmente debido a la naturaleza del metabolito y su afinidad con la matriz (Robert *et al.* 2010); así como también atribuible a la susceptibilidad que presentan los compuestos fenólicos durante el proceso de secado por atomización (Da Rosa *et al.* 2014, Saikia *et al.* 2015, Kuck y Noreña 2016).

- Solubilidad

Se calcularon valores de solubilidad en el rango de 88.5 a 98.2 % (Tabla 9), encontrándose diferencias significativas con relación al tipo y concentración de encapsulante, siendo mayor la solubilidad al emplear maltodextrina. Por el contrario, dependiendo del tipo de material encapsulante empleado puede ocurrir que no existan diferencias significativas entre ellos,

según reportan Kuck y Noreña (2016), quienes utilizaron GA, PHGG (goma guar parcialmente hidrolizada) y PD (polidextrosa). Asimismo, se evidenció que la solubilidad disminuyó a medida que incrementó la concentración; este comportamiento en la solubilidad estaría asociado al tamaño de partícula, dado que, a menor tamaño, mayor será la superficie disponible para hidratación (Kuck y Noreña 2016); coincidentemente los tratamientos con mayor solubilidad (5 % de encapsulante) fueron los que presentaron menor tamaño de partícula.

- Contenido de Anonacina en los polvos microencapsulados vía Atomización

Se analizaron concentraciones de Anonacina estándar entre 3 y 900 mg/L. Al contrastar los cromatogramas del estándar contra los de la fase móvil se identificó que los picos de los minutos 24.1 (1) y 24.8 (2) corresponden al estándar, mientras que el pico perteneciente al minuto 30.6 corresponde a la fase móvil. En base a este comportamiento, para la cuantificación de Anonacina se consideró la suma de las áreas de los picos 1 y 2 (tiempos de retención 24.1 y 24.8 respectivamente); el contenido de anonacina encontrando en los tratamientos se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Contenido de Anonacina en las diferentes muestras (b.h.)

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/g}$)
Hojas secas de guanábana (HOJ)	302.55 \pm 7.10
Extracto con goma arábica al 5 % (GA5)	315.09 \pm 4.32
Extracto con goma arábica al 10 % (GA10)	238.53 \pm 0.79
Extracto con maltodextrina al 5 % (MD5)	347.10 \pm 17.15
Extracto con maltodextrina al 10 % (MD10)	222.04 \pm 2.64

4.2.5 Extracto microencapsulado vía liofilización

El extracto de guanábana fue encapsulado vía liofilización empleando los mismos tipos y concentraciones de encapsulantes que en el secado por atomización, para evaluar el efecto de la técnica. La morfología adquirida por los tratamientos se presenta en la Figura 19.

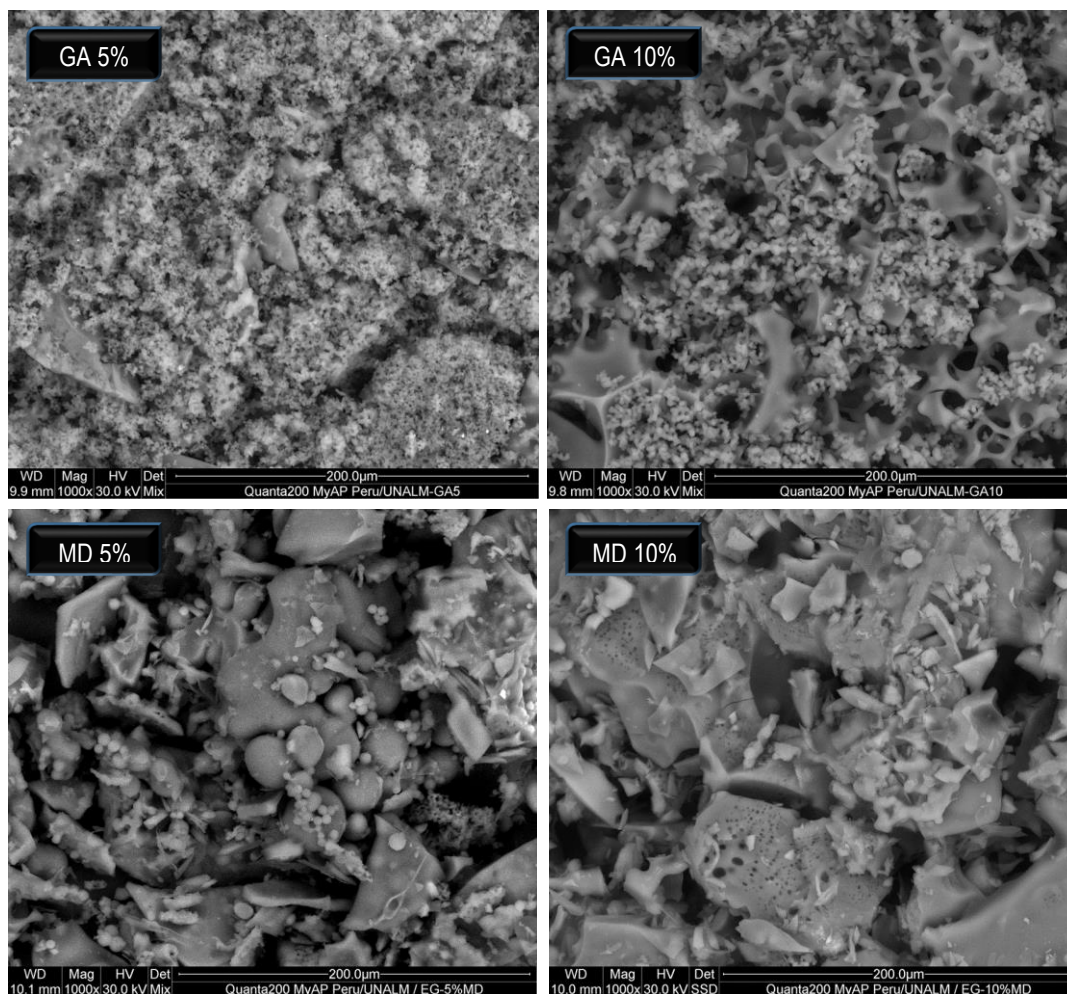


Figura 19. Micropartículas de extracto de hojas de guanábana microencapsulado mediante liofilización.

Goma arábica (GA) y maltodextrina (MD) al 5 y 10 %

Las imágenes SEM revelaron que la morfología de los extractos liofilizados difiere de la de los extractos atomizados. En el liofilizado, el agua congelada sirve como estructura de soporte, y una vez que es removida por sublimación, el encapsulante aparece como una estructura porosa (Ezhilarasi *et al.* 2013); en consecuencia, se obtiene un polvo formado por partículas tipo cristales o escamas, de tamaño heterogéneo, sin núcleo definido, en las que el extracto – y sus compuestos bioactivos – se encuentran incrustados en la matriz. De acuerdo con Che Man *et al.* (1999), la morfología de microcápsulas procedentes de liofilización se origina debido a las condiciones de presión y temperatura, que inducen a un “planchado” de estas.

- Solubilidad

Los valores de solubilidad estuvieron en el rango de 94.96 y 95.82 (Tabla 11); de acuerdo con Murali *et al.* (2015), la encapsulación (vía liofilización) con MD ofrece mayor solubilidad que la GA; sin embargo, en este caso no se encontraron diferencias significativas asociadas al tipo de encapsulante. Respecto a lo anterior, se sabe que el DE influye en la capacidad de formar enlaces con el agua; por lo tanto, la solubilidad se verá afectada en función al grado de hidrólisis de la molécula (Saavedra-Leos *et al.* 2015).

Tabla 11. Valores de eficiencia de encapsulación, y solubilidad

Muestras	E.E. (%)	Solubilidad
EXT GA 5 %	15.04 ± 0.78 ^{1a}	95.75 ± 1.18 ^{1a}
EXT GA 10 %	25.37 ± 1.57 ^{1b}	96.72 ± 1.59 ^{1a}
EXT MD 5 %	40.75 ± 0.62 ^{2c}	95.82 ± 1.21 ^{1a}
EXT MD 10 %	64.08 ± 1.99 ^{2d}	94.96 ± 1.23 ^{1a}

*Promedios con números y letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el tipo de encapsulante y la concentración, respectivamente.

4.2.6 Comprobación de la microencapsulación vía FTIR

El espectro de los extractos microencapsulados por liofilización se presenta en la Figura 20, donde se comprueba una atenuación de las señales correspondientes a la región dactilográfica (*fingerprint*) del extracto crudo seco; sin embargo, en comparación con los espectros IR de tratamientos procedentes de atomización (Figura 18), existen picos diferenciados posiblemente atribuidos a cambios moleculares originados durante la fase de congelamiento y sublimación (Chi *et al.* 2019).

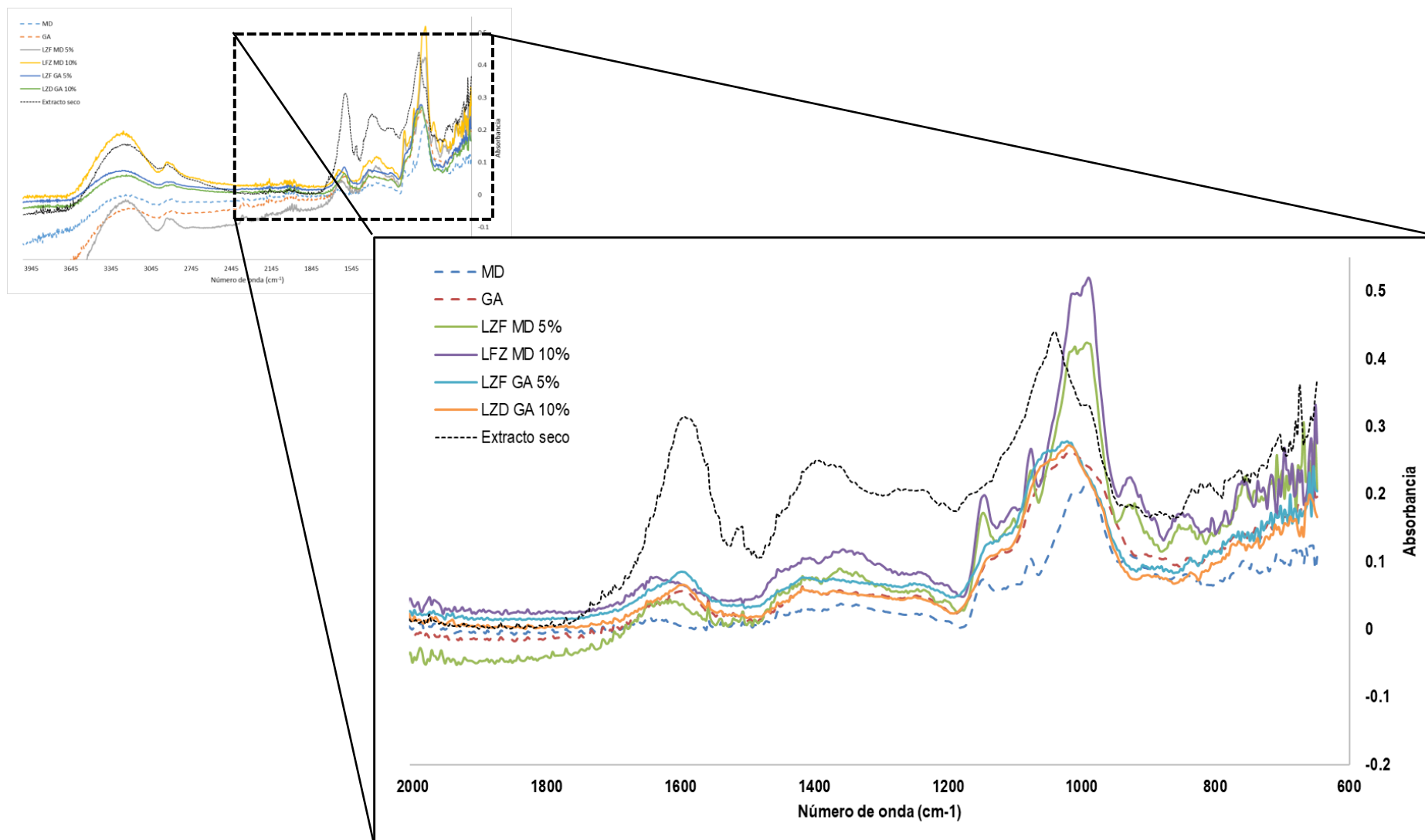


Figura 20. Espectro infrarrojo de los tratamientos liofilizados y los insumos originales en la región dactilográfica

4.2.7 Selección de la técnica de microencapsulación

Los tratamientos encapsulados vía liofilización presentaron los valores más bajos de eficiencia de encapsulación (Tabla 12); sin embargo, estudios (Ezhilarasi *et al.* 2013) reportan valores de E.E. superiores a 90 % para ácido hidroxycítrico procedente de un extracto de *Garcinia cowa* microencapsulado vía liofilización; no obstante, el método empleado para su determinación fue distinto. Las publicaciones en cuanto al cálculo de la eficiencia de encapsulación difieren unas de otras en la forma como se determina; en consecuencia, se evidencian variabilidad en los resultados.

Tabla 12. Valores de E.E. de acuerdo a la técnica de microencapsulación

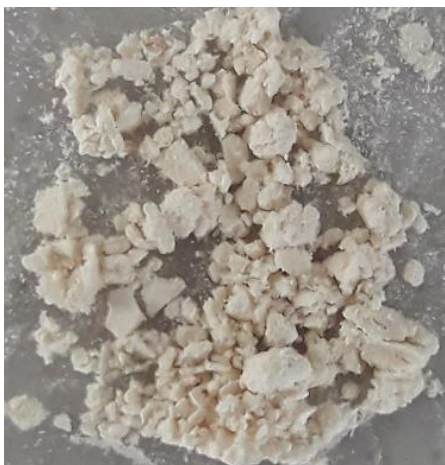
Técnica	Encapsulante	Concentración	Eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos (%)
ATZ	GA	5	53.46 ± 1.93 ^a
ATZ	GA	10	64.76 ± 1.46 ^b
ATZ	MD	5	54.10 ± 0.99 ^a
ATZ	MD	10	72.12 ± 1.10 ^c
LZD	GA	5	15.04 ± 0.78 ^d
LZD	GA	10	25.37 ± 1.57 ^e
LZD	MD	5	40.75 ± 0.62 ^f
LZD	MD	10	64.08 ± 1.99 ^b

Nota: Superíndices distintos indican diferencias significativas (p-valor<0.05) entre los tratamientos.

Los tratamientos producto del secado por atomización presentaron mayores valores de eficiencia de encapsulación en comparación a los polvos liofilizados (Anexo 19). En tanto, el encapsulante que presentó mayor aptitud de encapsulación en ambas técnicas fue la maltodextrina aplicada al 10 %.

En la Figura 21 se realiza una comparación de las características visuales del extracto microencapsulado por ambas técnicas. Las partículas provenientes de liofilización evidencian un color amarillento debido a que el extracto no ha logrado ser encapsulado completamente. Esta tonalidad se atribuye a carotenoides (Pelden y Meesawat 2019), y la diferencia de color es un indicador cualitativo del grado de encapsulación.

A. Secado por atomización



- Partículas esféricas de tamaño heterogéneo ($\Phi_{MD10}=0.90$).
- Micropartículas independientes con centro hueco.
- Es necesario aplicar agitación durante un tiempo para facilitar su disolución.
- Polvo amarillo pálido, tipo harina con grumos.

B. Liofilización



- Partículas en forma de gránulos o escamas de tamaño heterogéneo ($\Phi_{MD10}=0.62$).
- Micropartículas aglomeradas sin núcleo.
- Rápida disolución en agua.
- Polvo amarillento, de textura áspera altamente higroscópico. Denso.

Figura 21. Comparación de las características visuales de los polvos microencapsulados

De acuerdo a García-Cárdenas *et al.* (2015), una vez encontrado un encapsulante adecuado, se requieren condiciones óptimas del secado por atomización para obtener una buena eficiencia de encapsulación. En la siguiente etapa de la investigación se procedió a optimizar la técnica seleccionada (atomización) teniendo como parámetros fijos el tipo y concentración de encapsulante.

4.3 Optimización de la técnica seleccionada: Secado por atomización

4.3.1 Parámetros óptimos

Los tratamientos generados de acuerdo al diseño experimental (factorial multinivel) para la optimización de los parámetros de proceso, fueron caracterizados fisicoquímicamente en cuanto al contenido de humedad, solubilidad y E.E. de compuestos fenólicos (Tabla 13).

Tabla 13. Caracterización fisicoquímica de los tratamientos del diseño

Tratamiento	Variables independientes		Variables dependientes		
	Temperatura (°C)	Flujo (mL/min)	Humedad (%)	Solubilidad (%)	Eficiencia de encapsulación (%)
1	130	7.0	7.82 ± 0.28	93.22 ± 0.62	78.76 ± 1.20
2	140	7.0	5.80 ± 0.70	94.56 ± 0.44	77.68 ± 0.62
3	150	7.0	5.50 ± 0.43	95.24 ± 0.79	71.48 ± 1.01
4	130	12.5	8.79 ± 0.60	91.50 ± 0.90	82.73 ± 0.78
5	140	12.5	7.01 ± 0.81	92.64 ± 0.67	81.35 ± 0.90
6	150	12.5	6.80 ± 0.36	93.84 ± 0.96	74.87 ± 0.75

Una vez completada la caracterización, se analizó el efecto de cada variable respuesta bajo el criterio de minimizar la humedad, y maximizar la solubilidad y la eficiencia de encapsulación. Una imagen del proceso operativo se muestra en el Anexo 20. Para efecto de optimización, la influencia de las tres variables fue evaluada de manera globalizada mediante el factor Deseabilidad (Anexos 21 - 24), arrojando como condiciones óptimas los datos mostrados en la Figura 22. Cabe señalar de la falta de ajuste para todos los factores evaluados resultó no significativa ($p > 0.05$), y sus modelos respectivos presentaron R^2 superiores a 0.8.

La humedad, solubilidad y eficiencia de encapsulación son variables usualmente empleadas con fines de optimización (Tan *et al.* 2015, García-Cárdenas *et al.* 2015). Ello debido a que un valor elevado de eficiencia de encapsulación se traduce en una mejor protección de los agentes encapsulantes (Chranioti y Tzia 2014); asimismo, la obtención de polvos de baja humedad evita el apelmazamiento; por otro lado, se prefiere polvos de elevada solubilidad en vista que el fin previsto de este producto es ser un insumo en la preparación de una bebida instantánea.

La concentración y el tipo de encapsulante, al igual que el diámetro de boquilla se mantuvieron constantes; estos parámetros fueron estandarizados con anterioridad en una fase previa.

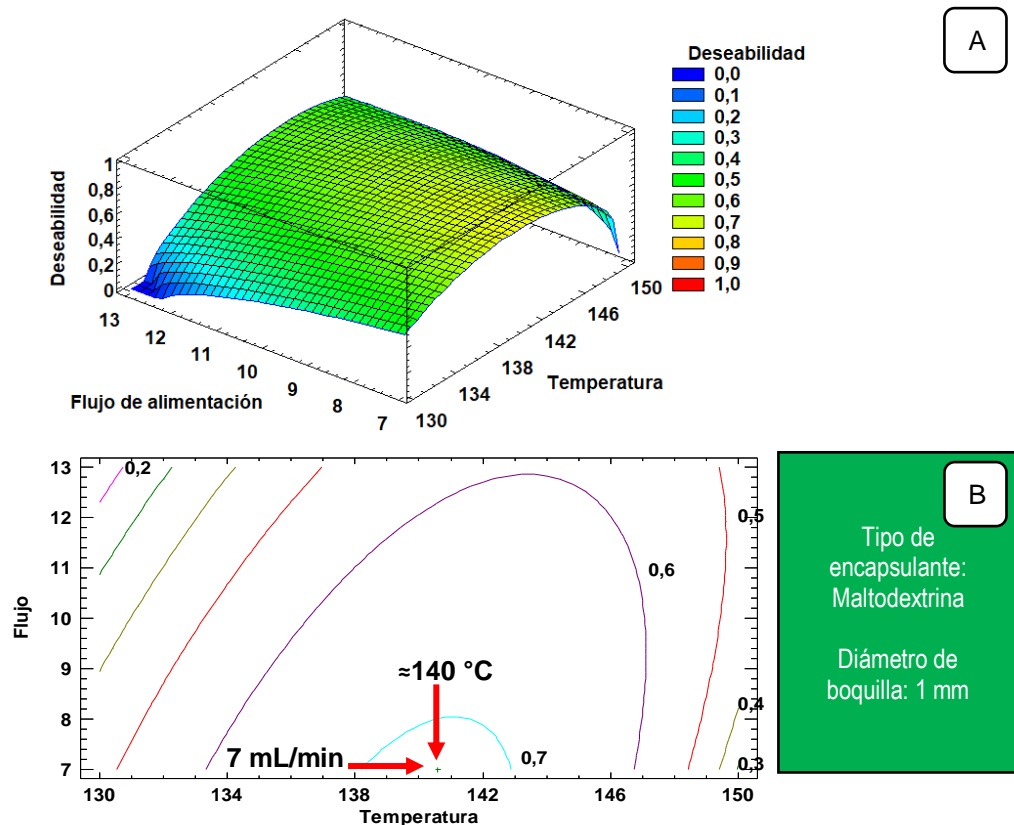


Figura 22. Condiciones óptimas para la microencapsulación de extracto de hojas de guanábana mediante atomización.

A: Superficie de respuesta y B: Gráfico de contornos.

Se encontró que existe un área que maximiza la respuesta de deseabilidad a las condiciones estudiadas (Fig. 22A), ello es igualmente verificable en el gráfico 2D correspondiente a los contornos (Fig. 22B); el valor de deseabilidad hallado (0.71) indica un buen ajuste de los valores experimentales (Correâ-Filho *et al.* 2019).

Se fijaron como condiciones óptimas 140 °C y 7 mL/min, para la temperatura de la cámara y el flujo de alimentación, respectivamente, ambos valores se encuentran dentro de los rangos de 132 - 160 °C y 5 - 10 mL/min propuestos por Aliakbarian *et al.* (2018) para la optimización de compuestos fenólicos microencapsulados; asimismo, los valores óptimos encontrados podrían variar si el análisis fuese realizado en función a otras variables respuesta, lo cual estará íntimamente vinculado al fin previsto del polvo resultante. Para efecto de réplica, adaptación y escalamiento, estas condiciones deben ser sujetas a una validación previa.

4.3.2 Efecto de la temperatura y el flujo de alimentación

Se emplearon sólo dos factores de importancia tecnológica para la optimización del proceso de microencapsulación con el fin de reducir el número de tratamientos y permitir un ahorro de recursos, otros factores como el tamaño de boquilla, tipo y concentración de encapsulante fueron considerados constantes por su desempeño en la etapa anterior; a continuación, se explica de manera individual el efecto de cada variable independiente sobre los indicadores fisicoquímicos analizados.

- **Efecto de la Temperatura**

En la Figura 23 se observa que existe una relación inversamente proporcional de la temperatura con la humedad y la eficiencia de encapsulación; este comportamiento deja en evidencia la sensibilidad de los compuestos fenólicos a medida que se incrementa la temperatura, así como la obtención de polvos más secos resultado de un aumento en la velocidad con la que se pierde humedad, a pesar del relativo corto tiempo de exposición que ofrece esta técnica.

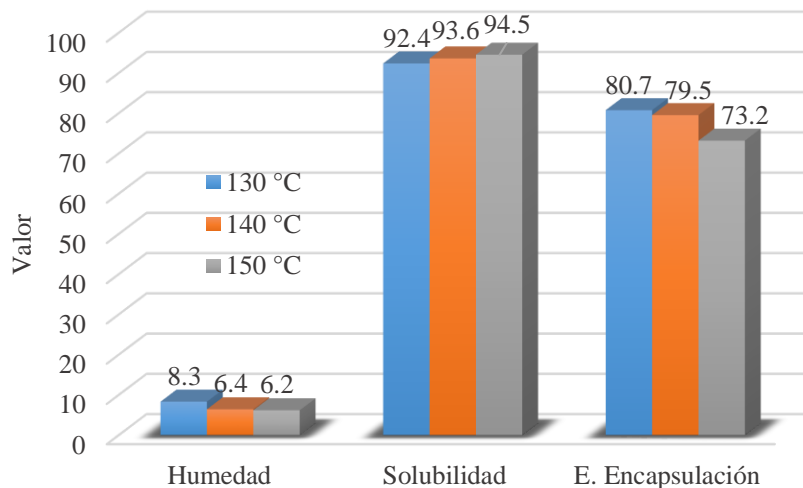


Figura 23. Efecto de la temperatura

Por otro lado, a medida que aumenta la temperatura, también se incrementa la solubilidad de los polvos microencapsulados, este comportamiento está relacionado al menor grado de agregación o aglomeración que experimentan las partículas (por efecto de la baja humedad), lo que permite que su dispersión y subsiguiente disolución se realice con mayor facilidad. De acuerdo a Chranioti y Tzia (2014), durante el proceso de atomización se reduce la

actividad de agua en más de 75 % respecto del valor inicial, ocasionando un aumento en la temperatura de transición vítrea de la matriz que compone el polvo (Walzel y Furuta 2011).

En secado por atomización, la variable que ejerce mayor influencia en la humedad de las microcápsulas es la temperatura del aire, ésta en combinación con la velocidad de alimentación, provocan que la humedad aumente o disminuya independientemente de la cantidad de encapsulante empleado debido al tiempo de permanencia de la gota en la cámara (Fernandes de Barros *et al.* 2013).

- **Efecto del flujo de alimentación**

En la Figura 24 se esquematiza el efecto de la velocidad del flujo de alimentación sobre las variables estudiadas. Se aprecia que a medida que el flujo aumenta, mayor es la humedad y la eficiencia de encapsulación; sin embargo, se observa una ligera disminución de la solubilidad.

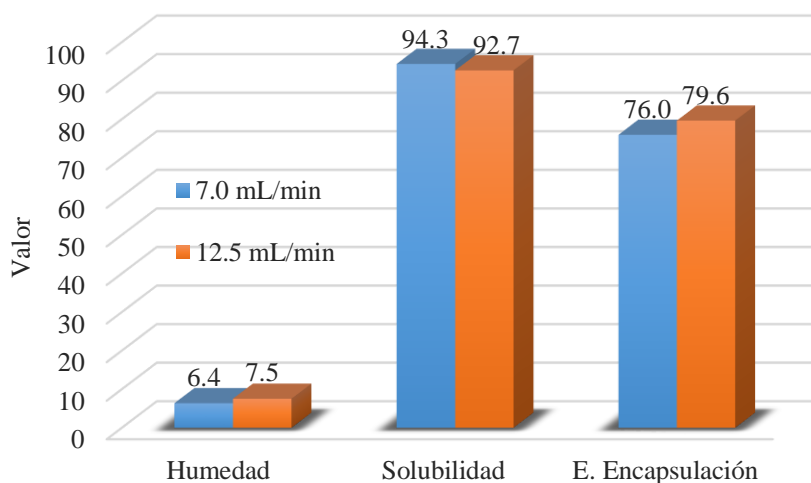


Figura 24. Efecto del flujo

El aumento en la humedad a mayores velocidades de flujo, se debe a una evaporación incompleta producto de la rapidez con que se alimenta el líquido al aspersor, ocasionando que las gotas no tengan el tiempo suficiente para terminar de perder humedad (Mezhericher *et al.* 2010) y junto a ello aumentando la adhesión de partículas en la cámara de secado (Gharsallaoui *et al.* 2007); en consecuencia, las partículas del polvo resultante se encuentran más aglomeradas, lo que dificulta su dispersión, razón por la cual la solubilidad es más baja.

Por otro lado, la eficiencia de encapsulación se ve aumentada por una menor degradación de compuestos fenólicos, puesto que estos son protegidos tanto por la humedad, como por la aglomeración (Reineccius 2004).

4.3.3 Caracterización del tratamiento óptimo

- **Capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante del extracto microencapsulado en condiciones óptimas fue determinada mediante dos métodos, obteniendo 17.88 ± 0.86 ($\mu\text{mol ET/g}$) y 90.59 ± 1.19 ($\mu\text{mol ET/g}$) por DPPH y ABTS, respectivamente.

El valor determinado mediante DPPH expresado en mg TE/g es de 4.48 ± 0.22 ; este dato es comparable con valores hallados (2.69 a 8.52 mg TE/g) para extracto de hojas de moringa microencapsulado por atomización (Airouyuwa y Kaewmanee 2019), la amplitud del rango en el estudio de referencia se atribuye a que se probaron distintas condiciones tecnológicas.

El extracto es una mixtura de compuestos de naturaleza diversa a distintas concentraciones; la capacidad antioxidante resultante es atribuida a una serie de compuestos presentes en el extracto, y no exclusivamente a los compuestos fenólicos. Adicionalmente, el solvente usado para el acondicionamiento de la muestra en ambos métodos es distinto, por ende, los valores de capacidad antioxidante no se correlacionan a los de compuestos fenólicos. De acuerdo con los análisis de HPTLC, el contenido de Anonacina en el extracto microencapsulado fue de 0.904 ± 0.054 mg/g. Este valor es considerablemente mayor al del extracto original (0.015 ± 0.43 mg/mL). El incremento experimentado se explica en parte a la evaporación del solvente, con un subsiguiente aumento en la concentración; así como a que otras acetogeninas estarían agrupadas formando la banda correspondiente al R_f del estándar.

- **Microestructura de la formulación óptima**

El polvo resultante del tratamiento óptimo fue caracterizado morfológicamente para correlacionar la microestructura de las partículas con los parámetros estudiados. En la Figura 25 se presenta una fotografía panorámica de las micropartículas y otra con un acercamiento de 6000x. Se aprecia que predominan partículas de forma esférica con superficies heterogéneas (rugosas y lisas). Desde el punto de vista tecno funcional, es recomendable que las microcápsulas presenten superficies lisas, puesto que las superficies rugosas ofrecen

mayores áreas de contacto para interactuar con el oxígeno, lo que induce a reacciones de oxidación del compuesto de interés; asimismo la rugosidad conduce a formación de aglomerados que dificultan la dispersión del polvo al ser reconstituido en un solvente. La formación de partículas rugosas se asocia a bajas temperaturas de secado; sin embargo, este defecto puede ser superado si se emplean temperaturas más altas (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005); no obstante, esto dependerá de la sensibilidad del compuesto que se está preservando; cabe señalar que en este estudio no era conveniente incrementar mucho la temperatura puesto que los compuestos fenólicos se ven afectados, como se demuestra más adelante.

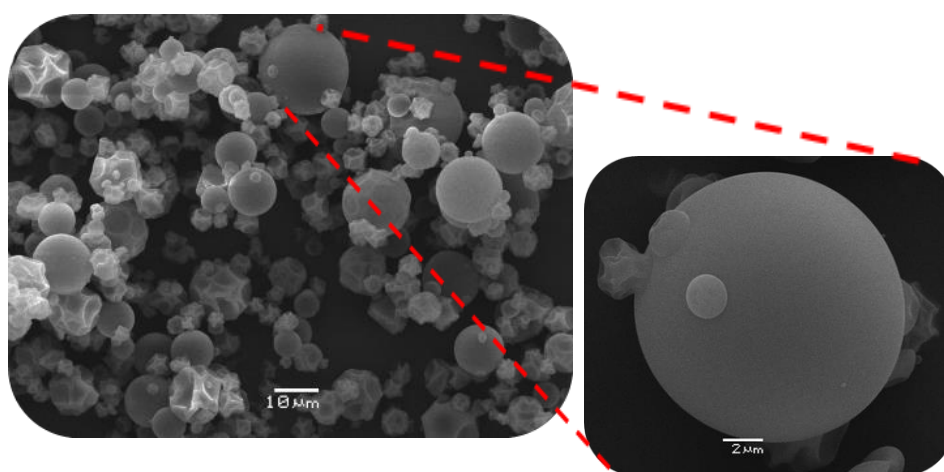


Figura 25. Morfología de las micropartículas del tratamiento óptimo

Mediante el análisis de microscopía se determinó que los defectos de plegamiento (5 %) y fragmentación (2.5 %) encontrados en la etapa de selección de la técnica para el tratamiento equivalente (ATZ MD_{10%}), se redujeron a 0 %; sin embargo, la rugosidad se mantuvo, encontrando un 68 % de partículas con este defecto, porcentaje incluso mayor al registrado durante la selección de la técnica (59 %).

La heterogeneidad en la microestructura de las partículas sugiere que a pesar de haber optimizado el secado empleando tres indicadores (solubilidad, humedad y eficiencia), el objetivo de lograr partículas más lisas sería aún materia de estudio; recientemente, se ha demostrado que los equivalentes de dextrosa (D.E.) de la maltodextrina influyen significativamente en la topografía de las partículas (Ezhilarasi *et al.* 2013), siendo más lisas a medida que el D.E. es mayor (Abd Ghani *et al.* 2017). En este experimento se empleó una MD con un D.E. de 10-12; este efecto puede superarse igualmente mediante la combinación con otros agentes encapsulantes, lo que involucra un estudio adicional.

La microencapsulación al constituirse como una tecnología de conservación precisa de análisis posteriores para evaluar la estabilidad de aquello que haya sido encapsulado. En esta investigación se priorizó realizar ensayos biológicos dado que es preferible estudiar la toxicidad del extracto microencapsulado previo a su aplicación con fines alimentarios (Fabrice *et al.* 2017). Para evaluar la estabilidad de los compuestos microencapsulados deben asignarse condiciones de almacenamiento como por ejemplo el tipo de envase, la temperatura de almacenamiento, humedad exterior, presencia de oxígeno, luz, etc.; esto, aunado a otros agentes incorporados ya sea durante la microencapsulación o el envasado, condicionarán la estabilidad de los compuestos.

Al respecto, la incorporación de antiapelmazantes en jugo de guanábana atomizado envasado en bolsas, amortigua la absorción de humedad durante el almacenamiento en comparación a su no uso (Chang *et al.* 2018). Por otro lado, la retención de los compuestos microencapsulados puede aumentarse controlando el tipo de encapsulante empleado en la manufactura, en combinación con temperaturas de almacenamiento bajas y en ausencia de luz (Cai *et al.* 2019, Ramakrishnan *et al.* 2018); sin embargo, la velocidad a la que se produzca la degradación dependerá de la naturaleza del compuesto retenido (hidro- o liposoluble).

En casos en los que el extracto microencapsulado es un insumo para elaborar otros productos, la estabilidad estará regulada por el diseño del producto y los procesos experimentados para su elaboración. El extracto de hojas de guanábana ha sido empleado como antioxidante en aceites de fritura dada su abundancia en compuestos fenólicos, demostrando que evitan de manera eficiente la degradación de ácidos grasos insaturados (Fabrice *et al.* 2017); debido a la inexistencia de estudios respecto a la estabilidad de compuestos bioactivos microencapsulados procedentes de hojas de guanábana, se abre un interesante campo de estudio en esta área.

4.4 Evaluación del efecto tóxico

4.4.1 Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad fue evaluada empleando distintos extractos a partir de las hojas secas, el extracto liofilizado, los extractos microencapsulados (por ATZ y LFZ) y el estándar; asimismo, se evaluó el efecto del tiempo en la viabilidad celular a las 24 y 48 h.

- **Efecto de la naturaleza del extracto en la viabilidad celular**

Posterior a 24 h de incubar las células PC-12 con diferentes concentraciones del estándar, los extractos de hojas, y los extractos microencapsulados, la viabilidad celular disminuyó con el incremento de la concentración en todos los tratamientos (Figura 26). Las muestras con el extracto microencapsulado mostraron la mayor disminución (alrededor de 60%) a 100 $\mu\text{g/mL}$. El estándar de Anonacina evidenció diferencia significativa a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$ en comparación al control; asimismo, el extracto seco y el extracto fresco de hojas tuvieron el mismo efecto, pero a 100 $\mu\text{g/mL}$.

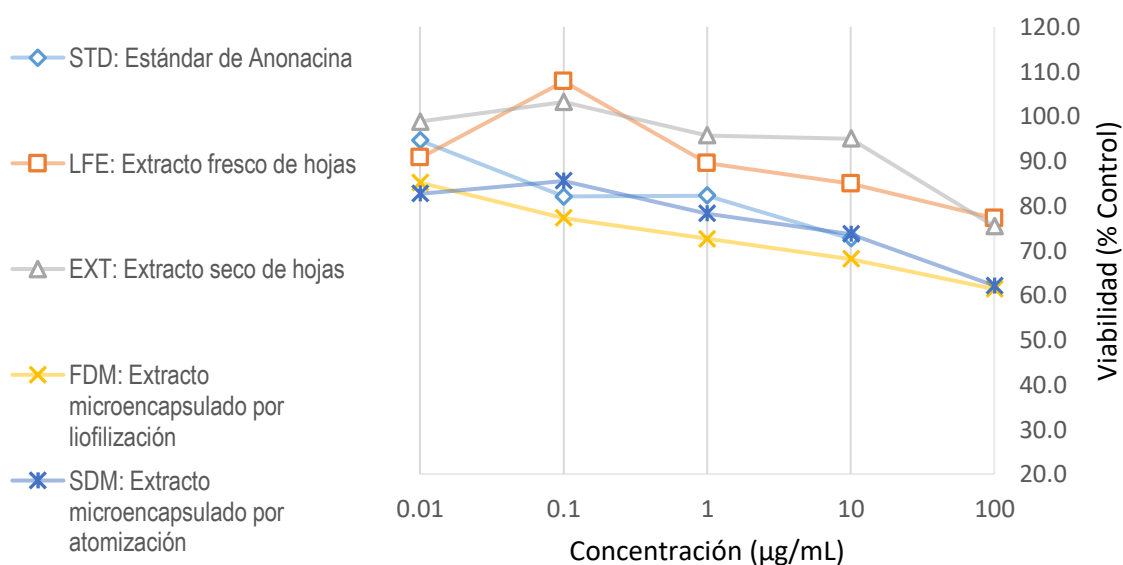


Figura 26. Efecto de la concentración en la viabilidad celular

La viabilidad celular es demostrada a partir de un cambio de color proporcional a la concentración de la muestra analizada. Las células que están muertas están disueltas en el agua y permanecen amarillas porque la mitocondria de las células que mueren no pueden

realizar respiración, entonces el anillo tetrazolio se pierde y no puede absorber el reactivo MTT (Prayitno *et al.* 2016).

A pesar de que se observa una relación inversa entre la viabilidad celular y el incremento de la concentración en todos los tratamientos (Figura 26); la intensidad es distinta dependiendo de la naturaleza de la muestra, siendo LFE y EXT las de menor efecto; este comportamiento se atribuye a una menor concentración de anonacina en el extracto seco (EXT) y el extracto fresco de hojas secas (LFE) en comparación con el estándar (STD). A pesar de la incompatibilidad del analito (Anonacina) con la naturaleza del solvente usado para la preparación del extracto original, principalmente compuesto de agua (80%) y etanol, cierta cantidad de Anonacina es solubilizada en el extracto resultante debido a su bajo punto de fusión (65 °C) (Ranisaharivony *et al.* 2015).

Torres *et al.* (2012), demostraron que el extracto de graviola reduce la viabilidad de células PC y tumores por inducción de necrosis y detención del ciclo celular, y por inhibición de la movilidad celular (ejemplo: recomposición del citoesqueleto), migración y metabolismo. Cabe señalar que presumiblemente en los extractos microencapsulados la concentración de anonacina es mayor que en los extractos frescos; asimismo, los resultados sugieren que la disminución de la viabilidad celular no sólo podría atribuirse a su presencia, sino a la naturaleza del sustrato sobre el cual actúa. Si bien las células PC12 se emplean como modelos neuronales, estas tienen un origen neoplásico, y el comportamiento observado con las oscilaciones de Ca^{2+} difieren de estos.

- **Efecto del tiempo de exposición sobre la viabilidad celular**

Se evaluó el efecto de las muestras (10 μ g/mL) y el tiempo en la viabilidad celular luego de 24 y 48 h de exposición. Se observa (Figura 27) que con el pasar del tiempo la viabilidad disminuyó con la misma tendencia que a las 24 h, siendo el estándar de Anonacina el que presentó el mayor efecto tóxico dado que la viabilidad bajó casi 50 %.

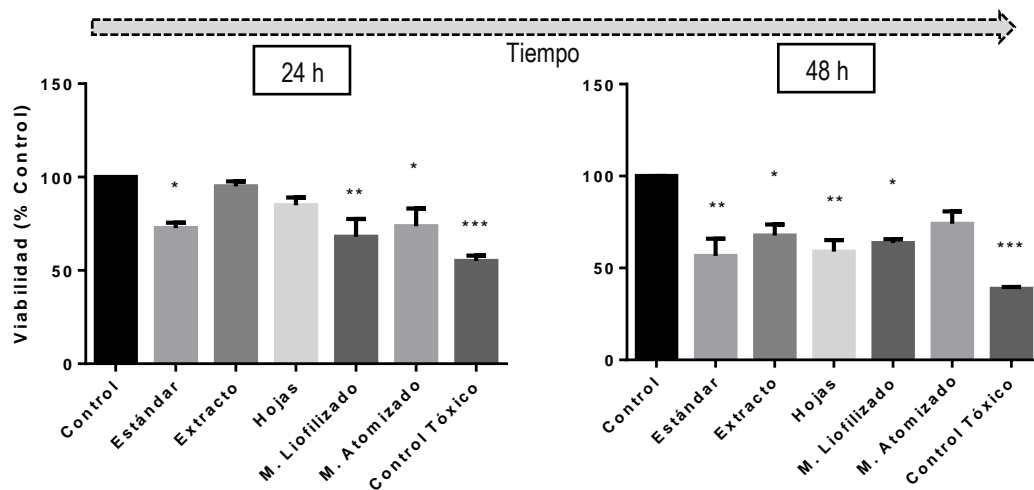


Figura 27. Efecto del tiempo de exposición de muestras a 10 µg/mL en la viabilidad celular.

*, **, *** indica diferencia significativa del tratamiento vs el control ($\alpha= 0.05, 0.01, 0.001$)

4.4.2 Actividad neuronal

Existen estudios que han demostrado que los extractos de suplementos dietarios a base de guanábana son tóxicos para células neuronales (Lannuzel *et al.*, 2003). El análisis fluorimétrico de calcio citosólico en neuronas corticales (Figura 28) permitió hacer las siguientes interpretaciones:

- **Oscilaciones de Calcio**

Las señales de calcio fueron empleadas como indicador de la actividad neuronal post exposición a los extractos evaluados, el equipo empleado para este ensayo se muestra en el Anexo 25. Los resultados más relevantes revelan un aumento de la amplitud y una reducción de la frecuencia, interpretado como una menor comunicación entre las neuronas, pero con mayor intensidad; este comportamiento deja en evidencia una alteración en la homeostasis celular que posiblemente conduzca a la apoptosis. Al respecto han sido reportados casos de muerte de cultivos neuronales inducida por anonacina (Escobar-Khondiker *et al.* 2007), sugiriendo la ocurrencia de un mecanismo de inhibición del complejo mitocondrial I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) y NADH oxidasa, lo que origina una reducción de los niveles de ATP, conduciendo a una necrosis celular.

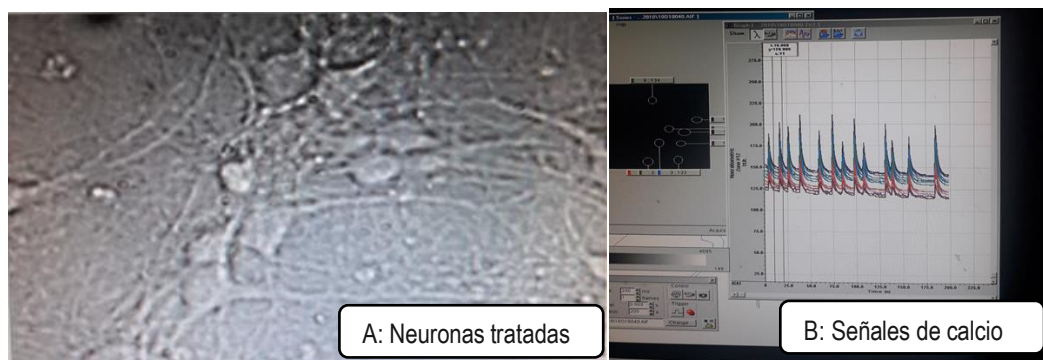


Figura 28. Análisis fluorimétrico de calcio en neuronas corticales.

Además de la evidencia existente que el efecto neurotóxico de las acetogeninas (*in vitro*) se debe a la inhibición del complejo I, se plantean mecanismos alternos como un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que genera liberación de proteínas pro-apoptóticas resultando en la formación del apoptosoma y posterior generación de caspasas, conducentes a la apoptosis (Coria-Téllez *et al.* 2016). Lo anterior toma importancia debido a la naturaleza lipofílica de las acetogeninas, condición que les permite atravesar fácilmente membranas biológicas (Zolkipli-Cunningham y Falk 2017, Degli Esposti 1998).

Como se muestra en la Figura 29, la frecuencia de las oscilaciones de calcio para STD, LFE y EXT disminuyó mientras la amplitud incrementó; asimismo, para los extractos microencapsulados (SDM y FDM), la frecuencia no varió significativamente, pero se observó una disminución en la amplitud. Lo anterior se traduce en un efecto ansiolítico o incluso sedante, atribuido principalmente a la presencia de alcaloides (Oviedo *et al.* 2009, D'Onofrio *et al.* 2016).

De manera particular, se puede notar que los extractos microencapsulados no presentan una influencia en la frecuencia, independientemente de la técnica empleada (atomización o liofilización); este comportamiento podría deberse al grado de atrapamiento, el cual no ha permitido una liberación completa de las sustancias durante su suspensión con DMSO; como consecuencia, los componentes responsables del comportamiento presentado en los otros tres tratamientos aún están en la matriz de las microcápsulas; en consecuencia, la concentración a la que están presentes los fitoquímicos responsables de neurotoxicidad, no llega a ocasionar ese efecto.

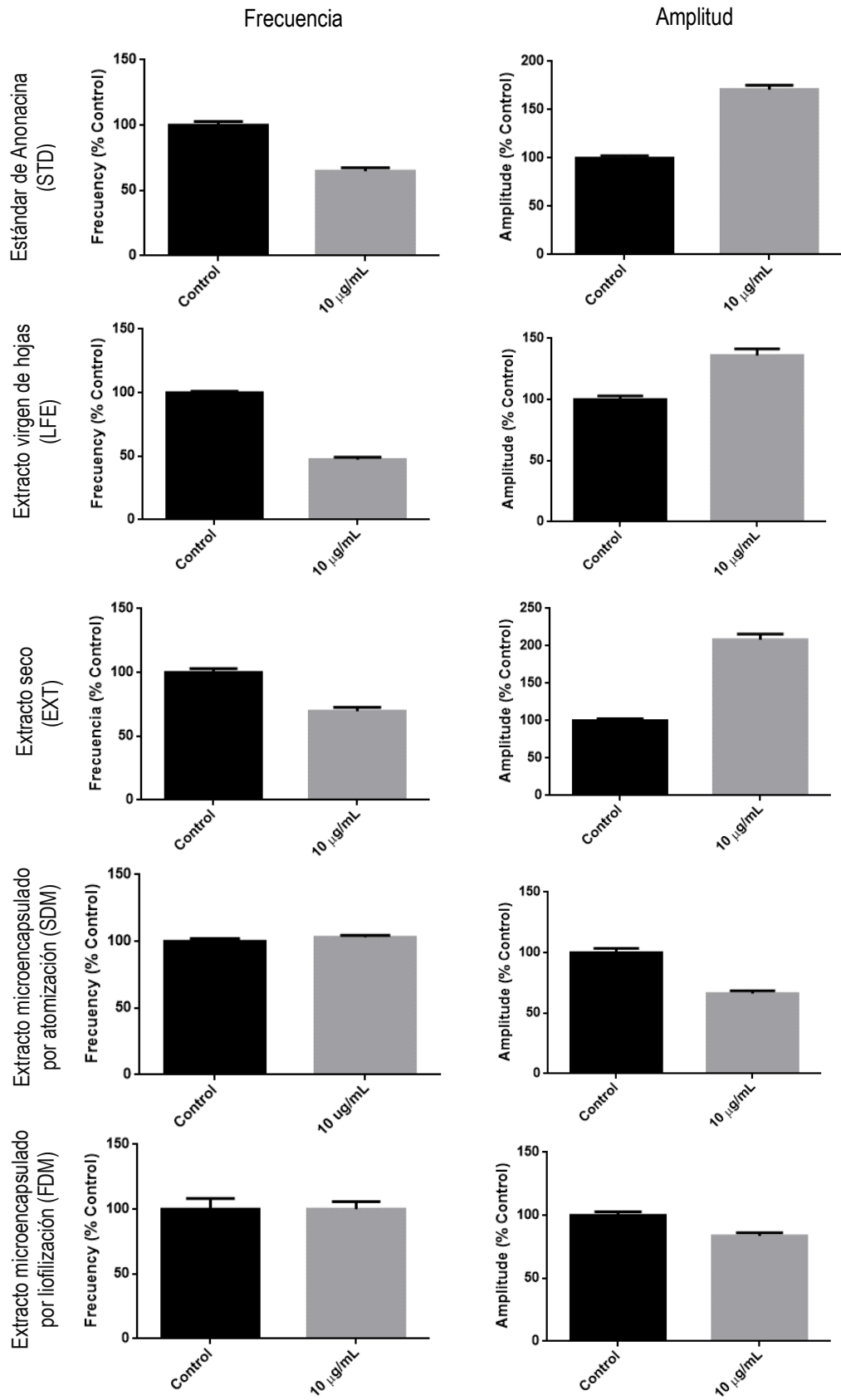


Figura 29. Respuestas de frecuencia y amplitud a 10 µg/mL de muestra

Por otro lado, al analizar los tratamientos (LFE y EXT) en donde la frecuencia se redujo y la amplitud aumentó (Figura 30), se observa que comparten la tendencia de la anonacina aislada (STD), coincidiendo con el hecho de que la diversidad de fitoquímicos es mayor y no han pasado por un proceso selectivo de atrapamiento. De acuerdo a Lannuzel *et al.* (2003), la anonacina tiene la capacidad de matar neuronas dopaminérgicas a 20 nM después de 24 h de exposición, lo cual está asociado a procesos degenerativos como Alzheimer o Parkinson.

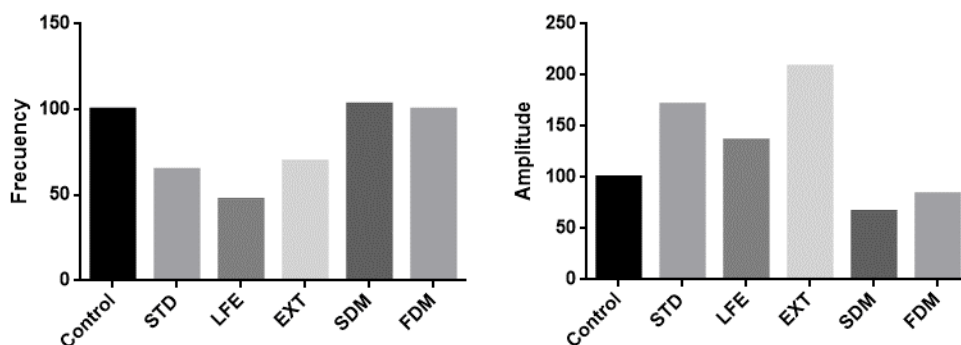


Figura 30. Respuestas de frecuencia y amplitud a 10 µg/mL de muestra en relación al control (neuronas sin tratar)

STD: estándar de anonacina, LFE: extracto virgen de hojas, EXT: extracto seco, SDM: extracto microencapsulado por atomización, FDM: extracto microencapsulado por liofilización.

Cabe señalar que la naturaleza de la muestra juega un rol importante en estos resultados; por ejemplo, la muestra LFE presentó una reducción notable en la frecuencia. Dado que el extracto fresco de hojas es “virgen” (sin purificaciones posteriores), es abundante en fitoquímicos que podrían potenciar la actividad de anonacina. De forma alternativa, la presencia de otros compuestos bioactivos en las hojas de guanábana podría contrarrestar o minimizar el impacto de la anonacina por sí sola, actuando como agentes neuroprotectores. En efecto, los antioxidantes ejercen una conducta protectora frente a la muerte neuronal provocada por dopamina en neuronas corticales (Rosenberg 1988).

El efecto de las condiciones de microencapsulación de compuestos bioactivos procedentes de guanábana no ha sido suficientemente investigado, dejando abierto un importante campo de estudio; asimismo, la caracterización del extracto microencapsulado es un punto de partida en búsqueda de su aplicación en matrices alimentarias.

V. CONCLUSIONES

1. Las condiciones de extracción establecidas en función a la absorbancia de acetogeninas ($\lambda=230$ nm) y la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos a las condiciones de estudio son 70 °C durante 30 min, empleando una relación M.P. - Solvente de 1 a 36 (p/v), siendo el solvente una solución hidroalcohólica al 20% (EtOH).
2. Se seleccionó la microencapsulación por atomización empleando maltodextrina al 10% por la ventaja de otorgar mayor conservación de compuestos fenólicos frente al liofilizado, la goma arábiga y el 5% de encapsulante. El extracto microencapsulado bajo estas condiciones presentó micropartículas de forma esférica y tamaño heterogéneo, y elevada solubilidad. La encapsulación del extracto fue confirmada a través de los análisis de espectroscopia FTIR dada la atenuación de regiones espectrales características del extracto puro.
3. Los parámetros de temperatura y flujo de alimentación del atomizado se fijaron en 140 °C y 7 mL/min, evidenciando dependencia de los indicadores fisicoquímicos evaluados frente a ellos, puesto que a mayor temperatura disminuyó la eficiencia de encapsulación y la humedad, pero aumentó la solubilidad; por el contrario, la humedad y la eficiencia de encapsulación se incrementaron a mayor flujo de alimentación, mientras se observó disminución de la solubilidad.
4. El extracto microencapsulado evidencia tener un efecto tóxico sobre líneas celulares PC12, de origen cancerígeno; asimismo, este tratamiento no produce una alteración de la frecuencia en las oscilaciones de calcio intracelular de cultivos corticales neuronales, pero sí una disminución en la amplitud, asociado a un efecto sedante.

VI. RECOMENDACIONES

- Incluir otra variable respuesta de significancia estadística al realizar la optimización de la microencapsulación mediante secado por atomización, por ejemplo: Dextrosa equivalente.
- Es recomendable proseguir con estudios de liberación y biodisponibilidad según un diseño predeterminado de producto, dado el consumo inminente con fines terapéuticos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd Ghani, A; Adachi, S; Shiga, H; Loon Neoh, T; Adachi, S; Yoshii, H. 2017. Effect of different dextrose equivalents of maltodextrin on oxidation stability in encapsulated fish oil by spray drying (en línea). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 81(4):705-711. DOI: <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1281721>.
- Abhimanyu, K; Ravindra, S. 2018. Dataset on leaf surface and elemental study of four species of Bignoniaceae family by SEM-EDAX. *Data in Brief* 17:1188-1195. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.02.037>.
- Airouyuwa, JO; Kaewmanee, T. 2019. Microencapsulation of Moringa oleifera leaf extracts with vegetable protein as wall materials. *Food Science and Technology International* 0(0):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1177/1082013219842469>.
- Akhavan Mahdavi, S; Jafari, SM; Assadpoor, E; Dehnad, D. 2016. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin (en línea). *International Journal of Biological Macromolecules* 85:379-385. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>.
- Alamilla-Beltrán, L; Chanona-Pérez, JJ; Jiménez-Aparicio, AR; Gutiérrez-Lopez, GF. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* 67(1-2):179-184. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.063>.
- Alhamad, MN; Rababah, TM; Al-u'datt, M; Ereifej, K; Esoh, R; Feng, H; Yang, W. 2017. The physicochemical properties, total phenolic, antioxidant activities, and phenolic profile of fermented olive cake. *Arabian Journal of Chemistry* 10(1):136-140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.002>.
- Aliakbarian, B; Sampaio, FC; de Faria, JT; Pitangui, CG; Lovaglio, F; Casazza, AA; Converti, A; Perego, P. 2018. Optimization of spray drying microencapsulation of olive pomace polyphenols using Response Surface Methodology and Artificial Neural Network. *Lwt* 93:220-228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.048>.

- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18 ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists.
- Arroyo, J; Martínez, J; Ronceros, G; Palomino, R; Villarreal, A; Bonilla, P; Palomino, C; Quino, M. 2009. Efecto hipoglicemiante coadyuvante del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana), en pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento de glibenclamida. *Anales de la Facultad de medicina* 70(3):163-167. DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v70i3.934>.
- Avilán R., L. 1975. Efecto de la omisión de los macronutrientes en el desarrollo y composición química de la guanábana (*Annona muricata* L.) cultivada en soluciones nutritivas. *Agronomía Tropical* 25(1):73-79.
- Badrie, N; Schauss, AG. 2010. Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. In *Watson, RR; Preedy, VR (eds.)*. Oxford, Academic Press. p. 621-643 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374628-3.00039-6>.
- Bento, EB; Júnior, FE de B; de Oliveira, DR; Fernandes, CN; de Araújo Delmondes, G; Cesário, FRAS; Rodrigues, CK de S; Sales, V dos S; de Figueiredo, FRSDN; Lemos, ICS; Monteiro, ÁB; de Menezes, IRA; da Costa, JGM; Kerntopf, MR. 2016. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Annona muricata* Linnaeus in mice. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25(4):609-621. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.024>.
- Bonneau, N; Baloul, L; Bajin ba Ndob, I; Sénéjoux, F; Champy, P. 2017. The fruit of *Annona squamosa* L. as a source of environmental neurotoxins: From quantification of squamocin to annotation of Annonaceous acetogenins by LC-MS/MS analysis. *Food Chemistry* 226:32-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.042>.
- Bonneau, N; Schmitz-Afonso, I; Brunelle, A; Touboul, D; Champy, P. 2016. Quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat brain by UPLC-MS/MS (en línea). *Toxicon* 118:129-133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.015>.
- Bortolussi, G; Muro, AF. 2019. Experimental models assessing bilirubin neurotoxicity. *Pediatric Research* (July):1-9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0570-x>.
- Bouaziz, F; Koubaa, M; Barba, FJ; Roohinejad, S; Chaabouni, SE. 2016. Antioxidant Properties of Water-Soluble Gum from Flaxseed Hulls (en línea). *Antioxidants* 5(3):26. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox5030026>.
- Boyom, FF; Fokou, PVT; Yamthe, LRT; Mfopa, AN; Kemgne, EM; Mbacham, WF; Tsamo, E; Zollo, PHA; Gut, J; Rosenthal, PJ. 2011. Potent antiplasmodial extracts from

- Cameroonian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 134(3):717-724. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.020>.
- Bustos-Hipólito, E; Legorreta-Siañez, AV; Garfias, AL; González-González, LR; Arenas-Huerta, FJ; de Muñoz, F; Buenrostro-Zagal, JF. 2012. Efecto de la extracción de los compuestos antioxidantes de la cáscara de manzana con solventes , sobre la bioactividad y su capacidad antioxidante. *Revista Facultad de Ciencia y Tecnología* 11:123-130.
- Cai, X; Du, X; Cui, D; Wang, X; Yang, Z; Zhu, G. 2019. Improvement of stability of blueberry anthocyanins by carboxymethyl starch / xanthan gum combinations microencapsulation (en línea). *Food Hydrocolloids* 91(October 2018):238-245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.034>.
- Cano-Chauca, M; Stringheta, PC; Ramos, AM; Cal-Vidal, J. 2005. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6(4):420-428. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>.
- Carneiro, HC. F; Tonon, R V.; Grosso, CRF; Hubinger, MD. 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials (en línea). *Journal of Food Engineering* 115(4):443-451. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033>.
- Casagrande, M; Zanela, J; Wagner, A; Busso, C; Wouk, J; Iurkevich, G; Montanher, PF; Yamashita, F; Malfatti, CRM. 2018. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. *Industrial Crops and Products* 125:207-219. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.088>.
- Chang, LS; Karim, R; Abdulkarim, SM; Aniza, Y; Ghazali, HM. 2018. Storage stability , color kinetics and morphology of spray-dried soursop (*Annona muricata* L .) powder: effect of anticaking agents (en línea). *International Journal of Food Properties* 21(1):1937-1954. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1510836>.
- Chávez-Rivas, F; Rodríguez-Iznaga, I; Petranovskii, V. 2014. Caracterización por SEM, EDS y micro-Raman de la influencia de la relación molar SiO₂/ Al₂O₃ y temperatura de reducción sobre el sistema CuZSM5. *Revista Mexicana de Física* 60(October):340-349.

- Che Man, YB; Irwandi, J; Abdullah, WJW. 1999. Effect of different types of maltodextrin and drying methods on physico-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(8):1075-1080. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199906\)79:8<1075::AID-JSFA329>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199906)79:8<1075::AID-JSFA329>3.0.CO;2-Q).
- Chen, BH; Chang, HW; Huang, HM; Chong, IW; Chen, JS; Chen, CY; Wang, HM. 2011. (-)-anonaine induces DNA damage and inhibits growth and migration of human lung carcinoma H1299 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(6):2284-2290. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf103488j>.
- Chi, C; Li, X; Zhang, Y; Miao, S; Chen, L; Li, L; Liang, Y. 2019. Understanding the effect of freeze-drying on microstructures of starch hydrogels (en línea). *Food Hydrocolloids* :105509. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105509>.
- Chirinos, R; Pedreschi, R; Rogez, H; Larondelle, Y; Campos, D. 2013. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products* 47:145-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.025>.
- Chranioti, C; Tzia, C. 2014. Arabic Gum Mixtures as Encapsulating Agents of Freeze-Dried Fennel Oleoresin Products. *Food and Bioprocess Technology* 7(4):1057-1065. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1074-z>.
- Coria-Téllez, A V.; Montalvo-González, E; Yahia, EM; Obledo-Vázquez, EN. 2016. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry* . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>.
- Correia-Filho, LC; Lourenço, MM; Moldado-Martins, M; Alves, VD. 2019. Microencapsulation of β -Carotene by Spray Drying: Effect of Wall Material Concentration and Drying Inlet Temperature. *International Journal of Food Science* :12. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/8914852>.
- Corrigan, OI. 1995. Thermal analysis of spray dried products. *Thermochimica Acta* 248(2):245-258. DOI: [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)01891-J](https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)01891-J).
- Cremones, CM; Leite, FP; Bordon, K de CF; Cerni, FA; Cardoso, IA; Gregório, ZM de O; de Souza, RCG; de Souza, AM; Arantes, EC. 2016. Experimental *Lachesis muta rhombeata* envenomation and effects of soursop (*Annona muricata*) as natural antivenom (en línea). *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 22(12):1-12. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0067-6>.

- Croom, EL; Shafer, TJ; Evans, M V.; Mundy, WR; Eklund, CR; Johnstone, AFM; Mack, CM; Pegram, RA. 2015. Improving in vitro to in vivo extrapolation by incorporating toxicokinetic measurements: A case study of lindane-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 283(1):9-19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.11.006>.
- D'Onofrio, S; Urbano, FJ; Messias, E; Garcia-Rill, E. 2016. Lithium decreases the effects of neuronal calcium sensor protein 1 in pedunculopontine neurons. *Physiological Reports* 4(6):1-12. DOI: <https://doi.org/10.14814/phy2.12740>.
- Degli Esposti, M. 1998. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1364(2):222-235. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00029-2).
- Dib Taxi, CMA; De Menezes, HC; Santos, AB; Grosso, CRF. 2003. Study of the microencapsulation of camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice. *Journal of Microencapsulation* 20(4):443-448. DOI: <https://doi.org/10.1080/0265204021000060291>.
- Domian, E; Wąsak, I. 2008. Microencapsulation of rapeseed oil based on the spray drying method. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 58(4):477-483.
- Eaton, JW; Graf, E. 1993. Suppression of Colonic Cancer by Dietary Phytic Acid. *Nutrition and Cancer* 19(1):11-19. DOI: <https://doi.org/10.1080/01635589309514232>.
- Edwards, SE; Rocha, I da C; Williamson, EM; Heinrich, M. 2015. *Graviola Annona muricata* L. (en línea). s.l., John Wiley & Sons. p. 189-190 DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118543436>.
- Egydio-Brandão, APM; Novaes, P; Santos, DYAC dos. 2017. Alkaloids from *Annona*: Review from 2005 To 2017. *JSM Biochem Mol Biol* 4(3):1031.
- Elversson, J; Millqvist-Fureby, A. 2005. Particle size and density in spray drying - Effects of carbohydrate properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(9):2049-2060. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.20418>.
- Escobar-Khondiker, M; Hollerhage, M; Muriel, M-P; Champy, P; Bach, A; Depienne, C; Respondek, G; Yamada, ES; Lannuzel, A; Yagi, T; Hirsch, EC; Oertel, WH; Jacob, R; Michel, PP; Ruberg, M; Hoglinger, GU. 2007. Annonacin, a Natural Mitochondrial Complex I Inhibitor, Causes Tau Pathology in Cultured Neurons. *Journal of Neuroscience* 27(29):7827-7837. DOI: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1644-07.2007>.

- Ezhilarasi, PN; Indrani, D; Jena, BS; Anandharamakrishnan, C. 2013. Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality (en línea). *Journal of Food Engineering* 117(4):513-520. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.009>.
- Fabrice, TD; Macaire, WH; Marrapu, BK; Karuna, MSL; Prasad, RBN; Michel, L. 2017. Effects of Soursop flowers (*Annona muricata* L .) extract on chemical changes of refined palm olein stored at frying temperature (en línea). *Food Science and Human Wellness* 6(4):187-194. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.09.002>.
- Fadini, AL; Alvim, ID; Ribeiro, IP; Ruzene, LG; Silva, LB da; Queiroz, MB; Miguel, AMR de O; Chaves, FCM; Rodrigues, RAF. 2018. Innovative strategy based on combined microencapsulation technologies for food application and the influence of wall material composition. *LWT - Food Science and Technology* 91:345-352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.071>.
- Fernandes de Barros, RV; Borges Vilela, S; Botrel Alvarenga, D. 2013. Influence of spray drying operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 33(1):171-178.
- Fernandes, RVDB; Borges, SV; Botrel, DA. 2014. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil (en línea). *Carbohydrate Polymers* 101:524-532. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.083>.
- Fester, K. 2010. Plant Alkaloids. *Encyclopedia of life sciences* (March):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001914.pub2>.
- Florence, TN; Benoit, MZ; Jonas, K; Alexandra, T; Pierre, K; Désiré, DDP; Théophile, D. 2013. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 151:784-790. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.021>.
- Florez Londoño, Y; Martínez Muñoz, E. 2010. Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera. s.l., Universidad Tecnológica de Pereira. 87 p.
- Foong, CP; Hamid, RA. 2012. Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(6):1301-1307. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000096>.
- Fuentealba, J; Dibarrart, A; Saez-orellana, FJ; Fuentes-Fuentes, MC; Oyanedel, CN; Guzmán, JL; Perez, C; Becerra, J; Aguayo, LG. 2012. Synaptic Silencing and Plasma

- Membrane Dyshomeostasis Induced by Amyloid-B Peptide are Prevented by Aristotelia chilensis Enriched Extract. *Journal of Alzheimer's Disease* 31:879-889. DOI: <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120229>.
- García-Cárdenas, JA; Ciro-Velásquez, HJ; Largo-Ávila, E. 2015. Encapsulation of Mandarin Citrus Flavor Using Spray Drying Technology and Different Wall Materials (en línea). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 18(1):251-260. Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262015000100029&lng=en&nrm=iso&tlng=es%5Cnhttp://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v18n1/v18n1a29.pdf.
- García-Soto, A; Pérez-Pérez, E; Ettiene, G; Montilla, L; Añez, A; Sandoval, L. 2011. Propagación y fertilización del cultivo del guanábano (*Annona muricata* L.). I. Características físicas de frutos. *Rev Fac Agron* 28:174-184.
- Gavamukulya, Y; Abou-Ellella, F; Wamunyokoli, F; AEI-Shemy, H. 2014. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7(S1):S355-S363. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60258-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60258-3).
- Gharsallaoui, A; Roudaut, G; Chambin, O; Voilley, A; Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview (en línea). *Food Research International* 40(9):1107-1121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.
- Gómez, N; Jiménez, M. 2014. Metodos de secado de emulsiones en alimentarias. *Temas selectos de Ingeniería en alimentos* 8:23-33.
- González-Esquinca, AR; De-La-Cruz-Chacón, I; Castro-Moreno, M; Orozco-Castillo, JA; Riley-Saldaña, CA. 2014. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36(especial):01-16. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-29452014000500001>.
- Guevara-Bretón, NA; Jiménez-Munguía, MT. 2008. Materiales utilizados en la encapsulación. *temas selectos de ingeniería de alimentos* 2:22-27.
- Gupta, S; Shanker, K; Srivastava, SK. 2012. HPTLC method for the simultaneous determination of four indole alkaloids in *Rauwolfia tetraphylla*: A study of organic/green solvent and continuous/pulse sonication (en línea). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 66:33-39. DOI:

- <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.02.018>.
- Gutsche, A. 2008. Frutas Amazónicas. 1 ed. Lima, Wust Ediciones. 169 p.
- Hamizah, S; Roslida, AH; Fezah, O; Tan, KL; Tor, YS; Tan, CI. 2012. Chemopreventive potential of *Annona muricata* L leaves on chemically-induced skin papillomagenesis in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13(6):2533-2539. DOI: <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.6.2533>.
- Heusinkveld, HJ; Westerink, RHS. 2017. Comparison of different in vitro cell models for the assessment of pesticide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Toxicology in Vitro* 45(February):81-88. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.030>.
- Höllerhage, M; Rösler, TW; Berjas, M; Luo, R; Tran, K; Richards, KM; Sabaa-Srur, AU; Maia, JGS; de Moraes, MR; Godoy, HT; Höglinger, GU; Smith, RE. 2015. Neurotoxicity of Dietary Supplements from Annonaceae Species. *International Journal of Toxicology* 34(6):543-550. DOI: <https://doi.org/10.1177/1091581815602252>.
- Hu, M; Guo, J; Yu, Y; Cao, L; Xu, Y. 2017. Research advances of microencapsulation and its prospects in the petroleum industry. *Materials* 10(4):1-19. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma10040369>.
- Huang, W; Su, X; Ratkowsky, DA; Niklas, KJ; Gielis, J; Shi, P. 2019. The scaling relationships of leaf biomass vs. leaf surface area of 12 bamboo species. *Global Ecology and Conservation* 20:e00793. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00793>.
- Inkanat. 2016. Graviola o guanabana, información y propiedades.
- Irakli, M; Tsifodimou, K; Sarrou, E; Chatzopoulou, P. 2018. Optimization infusions conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Sideritis scardica* tea using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 8(November):67-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.001>.
- Islam, MZ; Kitamura, Y; Yamano, Y; Kitamura, M. 2016. Effect of vacuum spray drying on the physicochemical properties, water sorption and glass transition phenomenon of orange juice powder (en línea). *Journal of Food Engineering* 169:131-140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.08.024>.
- Jafari, SM; Mahdavi-Khazaei, K; Hemmati-Kakhki, A. 2016. Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying (en línea). *Carbohydrate Polymers* 140:20-25. DOI:

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.079>.
- Janiszewska, E. 2014. Microencapsulation of ginger (*Zingiber officinale*) extract by spray drying technology (en línea). *Powder Technology* 264:190-196. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.032>.
- Janiszewska, E; Włodarczyk, J. 2013. Influence of Spray Drying Conditions on Beetroot Pigments Retention After Microencapsulation Process. *Acta Agrophysica* 20(2):343-356.
- Jiménez, VM; Gruschwitz, M; Schweiggert, RM; Carle, R; Esquivel, P. 2014. Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection (en línea). *Food Research International* 65(A):42-46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.051>.
- Jinapong, N; Suphantharika, M; Jamnong, P. 2008. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration , spray drying and fluidized bed agglomeration. 84(2):194-205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.032>.
- Jing, L; Ma, H; Fan, P; Gao, R; Jia, Z. 2015. Antioxidant potential , total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells (en línea). *BMC Complementary and Alternative Medicine* :287. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0820-3>.
- Justino, AB; Miranda, NC; Franco, RR; Martins, MM; Silva, NM da; Espindola, FS. 2018. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 100(November 2017):83-92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.172>.
- Karam, MC; Petit, J; Zimmer, D; Djantou, EB; Scher, J. 2016. Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. *Journal of Food Engineering* 188:32-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.001>.
- Kim, SB; Hwang, SH; Suh, HW; Lim, SS. 2017. Phytochemical analysis of *Agrimonia pilosa* Ledeb, its antioxidant activity and aldose reductase inhibitory potential. *International Journal of Molecular Sciences* 18(2):122-136. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18020379>.
- Kim, YD; Morr, C V. 1996. Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Spray-Dried Orange Oil Emulsion Particles (en línea). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(5):1314-1320. DOI:

<https://doi.org/10.1021/jf9503927>.

- Kojima, N; Tanaka, T. 2009. Medicinal chemistry of annonaceous acetogenins: Design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues. *Molecules* 14:3621-3661. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules14093621>.
- Kossouh, C; Moudachirou, M; Adjakidje, V; Chalchat, JC; Figuérédo, G. 2007. Essential oil chemical composition of *annona muricata* L. leaves from Benin. *Journal of Essential Oil Research* 19(4):307-309. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699288>.
- Kothamasu, P; Kanumur, H; Ravur, N; Maddu, C; Parasuramrajam, R; Thangavel, S. 2012. Nanocapsules: The weapons for novel drug delivery systems. *BioImpacts* 2(2):71-81. DOI: <https://doi.org/10.5681/bi.2012.011>.
- Kris-ether-ton, PM; Hecker, KD; Bonanome, A; Coval, SM; Binkoski, AE; Hilpert, KF; Griel, AE; Ether-ton, TD. 2002. Bioactive Compounds in Foods : Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine* 113(9B):71S-88S.
- Krishnaiah, D; Sarbatly, R; Nithyanandam, R. 2012. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L . extract by spray-drying (en línea). *Chemical Engineering Research and Design* 90(5):622-632. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.09.003>.
- Kuck, LS; Noreña, CPZ. 2016. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents (en línea). *Food Chemistry* 194:569-576. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.066>.
- Kuete, V; Karaosmanoğlu, O; Sivas, H. 2017. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In *Kuete, V (ed.)*. s.l., Academic Press. p. 271-297 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>.
- Kumar, BP; Birru, AK. 2017. Microstructure and mechanical properties of aluminium metal matrix composites with addition of bamboo leaf ash by stir casting method (en línea). *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 27(12):2555-2572. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(17\)60284-X](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(17)60284-X).
- Lacerda, ECQ; Calado, VMDA; Monteiro, M; Finotelli, PV; Torres, AG; Perrone, D. 2016. Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles (en línea). *Carbohydrate Polymers* 151:500-510. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.093>.

- Lannuzel, A; Höglinger, GU; Verhaeghe, S; Gire, L; Belson, S; Escobar-Khondiker, M; Poullain, P; Oertel, WH; Hirsch, EC; Dubois, B; Ruberg, M. 2007. Atypical parkinsonism in Guadeloupe: A common risk factor for two closely related phenotypes? *Brain* 130(3):816-827. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awl347>.
- Li, J; Xiong, S; Wang, F; Regenstein, JM; Liu, R. 2015. Optimization of Microencapsulation of Fish Oil with Gum Arabic/Casein/Beta-Cyclodextrin Mixtures by Spray Drying. *Journal of Food Science* 80(7):C1445-C1452. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12928>.
- Li, Y; Tang, B; Chen, J; Lai, P. 2018. Microencapsulation of plum (*Prunus salicina* Lindl.) phenolics by spray drying technology and storage stability. *Food Science and Technology* 38(3):530-536. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-457x.09817>.
- Liaw, C; Liou, J-R; Wu, T-Y; Chang, F-R; Wu, Y-C. 2016. Acetogenins from Annonaceae (en línea). In *Kinghorn, AD; Falk, H; Gibbons, S; Kobayashi, J (eds.)*. s.l., Springer, vol.101. p. 115-230 DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-93506-5>.
- Lim, TK. 2012. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. s.l., Springer, vol.10. 835 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-90-481-8661-7>.
- Liu, EJ; Cashman, K V.; Rust, AC. 2015. Optimising shape analysis to quantify volcanic ash morphology. *GeoResJ* 8:14-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.grj.2015.09.001>.
- Liu, N; Yang, HL; Wang, P; Lu, YC; Yang, YJ; Wang, L; Lee, SC. 2016. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway (en línea). *Journal of Ethnopharmacology* 189:210-217. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.045>.
- Liu, Y; Wei, S; Liao, M. 2013. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology (en línea). *Industrial Crops and Products* 49:837-843. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.023>.
- Locanawan, JT. 2015. Characteristics of the aqueous extraction process of soursop leaves. s.l., Swiss German University. 82 p.
- Lock, O; Rojas, R. 2003. Química y Farmacología de *Annona muricata* Linn. («Graviola»). *Revista de Química* :23-28.
- López, O. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia* 44(3):381-389.

- Luna Guevara, JJ; López Fuentes, JM; Jiménez González, O; Luna Guevara, L. 2016. Microencapsulación de algunos compuestos bioactivos mediante secado por aspersión. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias* 5(10). DOI: <https://doi.org/10.23913/ciba.v5i10.56>.
- Machado de Moraes, IV; Vasconcelos Ribeiro, PR; Schmidt, FL; Marques Canuto, K; Zocolo, GJ; Sousa de Brito, E; Luo, R; Richards, KM; Tran, K; Smith, RE. 2016. UPLC–QTOF–MS and NMR analyses of graviola (*Annona muricata*) leaves (en línea). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 26:174-179. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.12.001>.
- Martins, IM; Rodrigues, SN; Barreiro, MF; Rodrigues, AE. 2011. Release of thyme oil from polylactide microcapsules. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 50(24):13752-13761. DOI: <https://doi.org/10.1021/ie200791r>.
- Martins, N; Barros, L; Santos-Buelga, C; Silva, S; Henriques, M; Ferreira, ICFR. 2015. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. *Food Chemistry* 167:131-137. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.094>.
- Matioli, G; Rodriguez-Amaya, DB. 2003. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 23:102-105. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0101-20612003000400019>.
- Medina-Torres, L; Santiago-Adame, R; Calderas, F; Gallegos-Infante, JA; González-Laredo, RF; Rocha-Guzmán, NE; Núñez-Ramírez, DM; Bernad-Bernad, MJ; Manero, O. 2016. Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. *Industrial Crops and Products* 90:1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.009>.
- Medini, F; Bourgou, S; Lalancette, KG; Snoussi, M; Mkadmini, K; Coté, I; Abdelly, C; Legault, J; Ksouri, R. 2015. Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *South African Journal of Botany* 99:158-164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.04.007>.
- Meenakshisundaram, S; Krishnamoorthy, V; Jagadeesan, Y; Vilwanathan, R; Balaiah, A. 2019. *Annona muricata* assisted biogenic synthesis of silver nanoparticles regulates cell cycle arrest in NSCLC cell lines. *Bioorganic Chemistry* . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103451>.

- Mezhericher, M; Levy, A; Borde, I. 2010. Spray drying modelling based on advanced droplet drying kinetics (en línea). *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 49(11):1205-1213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2010.09.002>.
- MINAGRI. (2010). Perfil comercial guanábana. s.l., s.e.
- Mohamed, MA; Jaafar, J; Ismail, AF; Othman, MHD; Rahman, MA. 2017. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy (en línea). s.l., Elsevier B.V. p. 3-29 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2>.
- Mohammad Ahmadi Soleimani, S; Ekhtiari, H; Cadet, JL. 2016. Drug-induced neurotoxicity in addiction medicine: From prevention to harm reduction. s.l., Elsevier B.V., vol.223. p. 19-41 DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.07.004>.
- Mondragón, R; Julia, JE; Barba, A; Jarque, JC. 2013. El proceso de secado por atomización: Formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 52(4):159-168. DOI: <https://doi.org/10.3989/cyv.212013>.
- Morton, JF. 1966. the Soursop , or Guanabana (*Annona Muricata* Linn .). *Florida State Horticultural Society* 10(10):355-366.
- Murali, S; Kar, A; Mohapatra, D; Kalia, P. 2015. Encapsulation of black carrot juice using spray and freeze drying. *Food Science and Technology International* 21(8):604-612. DOI: <https://doi.org/10.1177/1082013214557843>.
- Nalawade, PB; Gajjar, AK. 2016. Microencapsulation of lutein extracted from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) using full factorial design (en línea). *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 33:75-87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.03.012>.
- Nam, JS; Park, SY; Jang, HL; Rhee, YH. 2017. Phenolic compounds in different parts of young *Annona muricata* cultivated in Korea and their antioxidant activity. *Applied Biological Chemistry* 60(5):535-543. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13765-017-0309-5>.
- Nandiyanto, ABD; Okuyama, K. 2011. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges (en línea). *Advanced Powder Technology* 22(1):1-19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apt.2010.09.011>.
- Nedovic, V; Kalusevic, A; Manojlovic, V; Levic, S; Bugarski, B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications Viktor (en línea). *Procedia Food Science* 1:1816-1815. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.266>.

- Nik Mat Daud, NNN; Ya'akob, H; Mohamad Rosdi, MN. 2016. Acetogenins of *Annona muricata* leaves: Characterization and potential anticancer study (en línea). *Integrative Cancer Science and Therapeutics* 3(4):543-551. DOI: <https://doi.org/10.15761/ICST.1000202>.
- Nwokocha, CR; Owu, DU; Gordon, A; Thaxter, K; Mccalla, G; Ozolua, RI; Young, L. 2012. Possible mechanisms of action of the hypotensive effect of *Annona muricata* (soursop) in normotensive SpragueDawley rats. *Pharmaceutical Biology* 50(11):1436-1441. DOI: <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.684690>.
- Olawale, F. 2007. Research journal of budo. (en línea). *Research Journal of Phytochemistry* 1(1):33-39. Disponible en <http://ci.nii.ac.jp/naid/130004573273/ja/>.
- Oviedo, V; García, M; Díaz, C; Marder, M; Costa, M; Sánchez, C; Guerrero, M. 2009. Extracto y fracción alcaloidal de *Annona muricata* con actividad de tipo ansiolítica en ratones. *Rev. Colomb. Cienc. Quím, Farm.* 38(1):105-120.
- Paramita, V; Iida, K; Yoshii, H; Furuta, T. 2010. Effect of additives on the morphology of spray-dried powder. *Drying Technology* 28(3):323-329. DOI: <https://doi.org/10.1080/07373931003627098>.
- Patricia, V; Santiago, B; Pérez-Pérez, EM. 2014. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PULPA, HOJA Y SEMILLA DE GUANÁBANA *Annona muricata* L. (en línea). *Interciencia* 39(5):350-353. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33930879008>.
- Pelden, D; Meesawat, U. 2019. Foliar idioblasts in different-aged leaves of a medicinal plant (*Annona muricata* L.). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 41(2):414-420.
- Pérez-Loredo, MG; Hernández-De Jesús, L; Barragán-Huerta, BE. 2017. Extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja (*Stenocereus stellatus*) aplicando pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimáticos. *Agrociencia* 51(2):135-151.
- Porras-Saavedra, J; Palacios-González, E; Lartundo-Rojas, L; Garibay-Febles, V; Yáñez-Fernández, J; Hernández-Sánchez, H; Gutiérrez-López, G; Alamilla-Beltrán, L. 2015. Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying (en línea). *Journal of Food Engineering* 152:105-112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.014>.
- Prayitno, A; Artanti, AN; Dewangga, VS; Abdullah, I; Hartati, M; Fitria, MS; Elmanda, AY; Astrin, OP. 2016. Tetrahydrofurane is a Component of *Annona muricata* Leaf will Induce Apoptosis Program in Cancer Cell because the Virus: A Proxy for Cancer

- Treatment. *Immunome Research* 12(2). DOI: <https://doi.org/10.4172/1745-7580.10000120>.
- Quilez, AM; Montserrat-de la Paz, S; Fernandez-Arche, A; De la Puerta, R; Garcia-Gimenez, MD. 2018. Diets supplemented with *Annona muricata* improve the symptoms of fibromyalgia. *PharmaNutrition* 6(3):81-84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2018.04.001>.
- Quispe, A; Zavala, D; Rojas, J; Posso, M; Vaisberg, A. 2006. Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón (en línea). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 23(4):265–269. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1726-46342012000300002>.
- Rachmani, EPN; Suhesti, TS; Widiastuti, R; Adityono, A. 2012. The breast of Anticancer from leaf extract of *Annona muricata* against cell line T47D. *International Journal of Applied Science and Technology* 2(1):157-164.
- Radojković, M; Zeković, Z; Mašković, P; Vidović, S; Mandić, A; Mišan, A; Đurović, S. 2016. Biological activities and chemical composition of *Morus* leaves extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids* 117:50-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.004>.
- Rady, I; Bloch, MB; Chamcheu, RCN; Banang Mbeumi, S; Anwar, MR; Mohamed, H; Babatunde, AS; Kuate, JR; Noubissi, FK; El Sayed, KA; Whitfield, GK; Chamcheu, JC. 2018. Anticancer Properties of *Graviola* (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* :39. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/1826170>.
- Ramakrishnan, Y; Adzahan, NM; Yusof, YA; Muhammad, K. 2018. Effect of wall materials on the spray drying efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in tamarillo juice microencapsulation (en línea). *Powder Technology* 328:406-414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.12.018>.
- Ramírez, MJ; Giraldo, GI; Orrego, CE. 2015. Modeling and stability of polyphenol in spray-dried and freeze-dried fruit encapsulates (en línea). *Powder Technology* 277:89-96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.02.060>.
- Ranisaharivony, BG; Ramanandraibe, V; Rasoanaivo, LH; Rakotovo, M; Lemaire, M. 2015. Separation and potential valorization of chemical constituents of soursop seeds. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4(2):161-171.
- Reineccius, GA. 2004. The spray drying of food flavors. *Drying Technology* 22(6):1289-1324. DOI: <https://doi.org/10.1081/DRT-120038731>.

- Robert, P; Gorena, T; Romero, N; Sepulveda, E; Chavez, J; Saenz, C. 2010. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology* 45(7):1386-1394. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x>.
- Rocha-Parra, DF; Lanari, MC; Zamora, MC; Chirife, J. 2016. Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine. *LWT - Food Science and Technology* 70:162-170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.038>.
- Rocha-selmi, GA; Bozza, FT; Thomazini, M; Bolini, HMA; Fávoro-trindade, CS. 2013. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness (en línea). *Food Chemistry* 139:72-78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.114>.
- Rocha, GA; Fávoro-Trindade, CS; Grosso, CRF. 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules (en línea). *Food and Bioproducts Processing* 90(1):37-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.001>.
- Da Rosa, CG; Borges, CD; Zambiasi, RC; Rutz, JK; da Luz, SR; Krumreich, FD; Benvenuti, EV; Nunes, MR. 2014. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*) (en línea). *LWT - Food Science and Technology* 58(2):527-533. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.042>.
- Rosenberg, M; Kopelman, IJ; Talmon, Y. 1985. A Scanning Electron Microscopy Study of Microencapsulation. *Journal of food science* 50(1):139-144. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13295.x>.
- Rosenberg, M; Young, SL. 1993. Food Structure Whey Proteins as Microencapsulating Agents. *Microencapsulation of Anhydrous Milkfat - Structure Evaluation* (en línea). *Food Structure* 12(1):31-41. Disponible en <http://digitalcommons.usu.edu/foodmicrostructure%0Ahttp://digitalcommons.usu.edu/foodmicrostructure/vol12/iss1/4>.
- Rosenberg, P. 1988. Catecholamine toxicity in cerebral cortex in dissociated cell culture. *The Journal of Neuroscience* 8(8):2887-2894. DOI: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-08-02887.1988>.
- Roy, JC; Giraud, S; Ferri, A; Mossotti, R; Guan, J; Salaün, F. 2018. Influence of process parameters on microcapsule formation from chitosan —Type B gelatin complex coacervates. *Carbohydrate Polymers* 198:281-293. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.042>.

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.087>.
- Sá, RD; Santana, ASC de O; Padilha, RJR; Alves, LC; Randau, KP. 2019. Oxalic acid content and pharmacobotany study of the leaf blades of two species of *Annona* (Annonaceae) (en línea). *Flora* 253(January):10-16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.02.011>.
- Saavedra-Leos, Z; Leyva-Porras, C; Araujo-Díaz, SB; Toxqui-Terán, A; Borrás-Enríquez, AJ. 2015. Technological application of maltodextrins according to the degree of polymerization. *Molecules* 20(12):21067-21081. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules201219746>.
- Sabarez, HT. 2012. Computational modelling of the transport phenomena occurring during convective drying of prunes (en línea). *Journal of Food Engineering* 111(2):279-288. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.021>.
- Sabarez, HT. 2017. Optimisation of industrial Food Drying Operation. *International Journal of Food and Biosystems Engineering* 2(1):1-8.
- Sadeghi, F; Torab, M; Khattab, M; Homayouni, A; Garekani, HA. 2013. Improvement of physico-mechanical properties of partially amorphous acetaminophen developed from hydroalcoholic solution using spray drying technique. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 16(10):1100-1108.
- Sáez-Orellana, F; Godoy, PA; Bastidas, CY; Silva-grecchi, T; Guzmán, L; Aguayo, LG; Fuentealba, J. 2015. ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble oligomers of b -amyloid peptide in hippocampal neurons. *Neuropharmacology* (April):1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.04.005>.
- Saikia, S; Mahnot, NK; Mahanta, CL. 2015. Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying (en línea). *Food Chemistry* 171:144-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.064>.
- Salazar-González, C; Vergara-Balderas, FT; Guerrero-Beltrán, JA. 2009. Evaluación de agentes antioxidantes de un extracto de flor de jamaica microencapsulado. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos* 3(2):14-25.
- Samrot, A V.; H., S; K., S; Rohan D., B; P., R. 2016. Evaluation of bioactivity of *Annona muricata*, *Piper betle* and *Mentha spicata*. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* 6(1):1-8. DOI: <https://doi.org/10.24896/eijppr.2016611>.

- Santana, AA; Cano-Higueta, DM; De Oliveira, RA; Telis, VRN. 2016. Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying (en línea). *Food Chemistry* 212:1-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.148>.
- Santos-Sánchez, N; Salas-Coronado, R; Hernández-Carlos, B; Pérez-Herrera, A; Rodríguez-Fernández, D. 2018. Biological activities of plants from genus *Annona*. *IntechOpen* 2:29-45. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.75299>.
- Schlie-Guzmán, MA; González-Esquinca, AR; Luna-Cazáres, LM. 2009. Las acetogeninas de *annonaceae*: Efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* 8(4):245-257.
- Shamsuddin, AM. 2002. Anti-cancer function of phytic acid. *International Journal of Food Science and Technology* 37(7):769-782. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00620.x>.
- Al Shannaq, R; Farid, MM. 2015. Microencapsulation of phase change materials (PCMs) for thermal energy storage systems. In *Cabeza, L (ed.)*. s.l., Woodhead Publishing Limited, vol.1. p. 247-284 DOI: <https://doi.org/10.1533/9781782420965.2.247>.
- Sheu, TY; Rosenberg, M. 1998. Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *Journal of Food Science* 63(3):491-494. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15770.x>.
- Silva, PT da; Fries, LLM; Menezes, CR de; Holkem, AT; Schwan, CL; Wigmann, ÉF; Bastos, J de O; Silva, C de B da. 2014. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology (en línea). *Ciência Rural* 44(7):1304-1311. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>.
- Simon-Brown, K; Solval, KM; Chotiko, A; Alfaro, L; Reyes, V; Liu, C; Dzandu, B; Kyereh, E; Barnaby, AG; Thompson, I; Xu, Z; Sathivel, S. 2016. Microencapsulation of ginger (*Zingiber officinale*) extract by spray drying technology (en línea). *LWT - Food Science and Technology* 70:119-125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.030>.
- Solanki, HK; Pawar, DD; Shah, DA; Prajapati, VD; Jani, GK; Mulla, AM; Thakar, PM. 2013. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed Research International* 2013:1-21. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/620719>.
- Solís-Fuentes, JA; Hernández-Medel, M del R; Durán-de-Bazúa, M del C. 2011. Soursop (*Annona muricata* L.) Seeds, Therapeutic and Possible Food Potential. In *Preedy*,

- VR; Watson, RR; Patel, VB (eds.). London, Academic Press. p. 1045-1052 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10124-0>.
- De Souza, SJO; Ferri, PH; Fiuza, TS; Borges, LL; Paula, JR. 2018. Chemical composition and seasonality variability of the *Spiranthera odoratissima* volatile oils leaves (en línea). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 28(1):16-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.10.010>.
- De Souza, VB; Thomazini, M; Balieiro, JCDC; Fávoro-Trindade, CS. 2015. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*) (en línea). *Food and Bioproducts Processing* 93:39-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.11.001>.
- Spurr, IB; Brown, RCD. 2010. Total synthesis of annonaceous acetogenins belonging to the non-adjacent bis-THF and non-adjacent THF-THP sub-classes. *Molecules* 15(1):460-501. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules15010460>.
- Sulieman, AMEH. 2018. Gum Arabic as Thickener and Stabilizing Agents in Dairy Products. s.l., Elsevier. p. 151-165 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812002-6.00013-0>.
- Syed Najmuddin, SUF; Romli, MF; Hamid, M; Alitheen, NB; Abd Rahman, NMAN. 2016. Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line (en línea). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16(1):1-20. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1290-y>.
- Szkudelski, T. 2017. Phytic acid - its influence on organism. *Journal of Animal and Feed Sciences* 6(4):427-438. DOI: <https://doi.org/10.22358/jafs/69556/1997>.
- Tan, SP; Kha, TC; Parks, SE; Stathopoulos, CE; Roach, PD. 2015. Effects of the spray-drying temperatures on the physiochemical properties of an encapsulated bitter melon aqueous extract powder (en línea). *Powder Technology* 281:65-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.04.074>.
- Thang, TD; Dai, DN; Hoi, TM; Ogunwande, IA. 2013. Study on the volatile oil contents of *Annona glabra* L., *Annona squamosa* L., *Annona muricata* L. and *Annona reticulata* L., from Vietnam. *Natural Product Research* 27(13):1232-1236. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.724413>.
- Tolun, A; Altintas, Z; Artik, N. 2016. Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization (en línea). *Journal of Biotechnology* 239:23-33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.001>.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.001>.


- Tonon, RV; Brabet, C; Hubinger, MD. 2009. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó (en línea). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29(2):444-450. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000200034>.
- Torres, MP; Rachagani, S; Purohit, V; Pandey, P; Joshi, S; Moore, ED; Johansson, SL; Singh, PK; Ganti, AK; Batra, SK. 2012. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. *Cancer Letters* 323(1):29-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.031>.
- Trindade, MA; Grosso, CRF. 2000. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum Arabic. *Journal of Microencapsulation* 17(2):169-176.
- Türker-Kaya, S; Huck, CW. 2017. A Review of Mid-Infrared and Near-Infrared Imaging: Principles, Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis (en línea). *Molecules* 22(1):168. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22010168>.
- Vergara, A; Páucar, K; Morales, C; Castro, O; Pizarro, P; Díaz, J. 2018. Obtención de extractos de *Annona muricata* L . inducidos por su efecto inhiidor de la corrosión. *Rev. Soc. Quím. Perú* 84(1):119-132.
- Vidal Hernández, L; Sánchez Viveros, G; Vidal Martínez, N; Castillo Rocha, DG; Chiquito Contreas, RG. 2014. Análisis De Suelo Y Foliar En Guanábano (*Annona muricata* L.) en Blanca Espuma Municipio de Alto Lucero, Veracruz. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36:157-165.
- Vidal, L; Avello, M; Loyola, C; Campos, J; Aqueveque, P; R. Dungan, S; Galotto, M; Guarda, A. 2013. Microencapsulation of maqui (*Aristotelia chilensis* Molina Stuntz) leaf extracts to preserve and control antioxidant properties. *Chilean journal of agricultural research* 73(1):17-23. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0718-58392013000100003>.
- de Vos, P; Faas, MM; Spasojevic, M; Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components (en línea). *International Dairy Journal* 20(4):292-302. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>.
- Vucenik, I; Shamsuddin, AM. 2006. Protection Against Cancer by Dietary IP 6 and Inositol. *55(2):109-125*. DOI: https://doi.org/10.1207/s15327914nc5502_1.


- Wahab, SMA; Jantan, I; Haque, MA; Arshad, L. 2018. Exploring the leaves of *Annona muricata* L. as a source of potential anti-inflammatory and anticancer agents. *Frontiers in Pharmacology* 9:1-20. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00661>.
- Walters, RH; Bhatnagar, B; Tchessalov, S; Izutsu, KI; Tsumoto, K; Ohtake, S. 2014. Next generation drying technologies for pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103(9):2673-2695. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.23998>.
- Walton, DE. 2000. The morphology of spray-dried particles a qualitative view. *Drying Technology* 18(9):1943-1986. DOI: <https://doi.org/10.1080/07373930008917822>.
- Walzel, P; Furuta, T. 2011. Morphology and Properties of spray-dried particles. In *Tsotsas, E; Mujumbar, A (eds.)*. Weinheim, Wiley-VCH. p. 423.
- Wang, Z-M; Wagner, J; Ghosal, S; Bedi, G; Wall, S. 2017. SEM/EDS and optical microscopy analyses of microplastics in ocean trawl and fish guts (en línea). *Science of The Total Environment* 603-604:616-626. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.047>.
- Weli, AM; Al-Salmi, S; Al Hoqani, H; Hossain, MA. 2018. Biological and phytochemical studies of different leaves extracts of *Pteropyrum scoparium*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 7(4):481-486. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.05.001>.
- Woolley, JG. 2001. Plant Alkaloids. *Encyclopedia of life sciences* :1-11. DOI: <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001914>.
- Yamarte Chirinos, M; Marín Larreal, M; Rendiles Ollarves, E. 2009. Contenido foliar de algunos macronutrientes en guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista UDO Agrícola* 9(2):343-346.
- Yamashita, C; Chung, MMS; dos Santos, C; Mayer, CRM; Moraes, ICF; Branco, IG. 2017. Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* spp.) by-product extract by freeze-drying. *LWT - Food Science and Technology* 84:256-262. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.063>.
- Yang, C; Gundala, SR; Mukkavilli, R; Vangala, S; Reid, MD; Aneja, R. 2015. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola* (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis* 36(6):656-665. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv046>.
- Yusoff, AHM; Salimi, MN. 2018. Superparamagnetic nanoparticles for drug delivery. s.l., Elsevier Inc. p. 843-859 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813741-3.00037-6>.

- Zhang, H; Haghani, A; Mousavi, AH; Cacciottolo, M; D'Agostino, C; Safi, N; Sowlat, MH; Sioutas, C; Morgan, TE; Finch, CE; Jay, FH. 2019. Cell-based assays that predict in vivo neurotoxicity of urban ambient nano-sized particulate matter. *Free Radical Biology and Medicine* 145(September):33-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.016>.
- Zhang, L; Zeng, X; Fu, N; Tang, X; Sun, Y; Lin, L. 2018. Maltodextrin: A consummate carrier for spray-drying of xylooligosaccharides. *Food Research International* 106:383-393. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.004>.
- Zhu, Y; Yu, J; Jiao, C; Tong, J; Zhang, L; Chang, Y; Sun, W; Jin, Q; Cai, Y. 2019. Optimization of quercetin extraction method in *Dendrobium officinale* by response surface methodology. *Heliyon* 5:8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02374>.
- Zolkipli-Cunningham, Z; Falk, MJ. 2017. Clinical effects of chemical exposures on mitochondrial function. *Toxicology* 391(November):90-99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.009>.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Constancia de determinación taxonómica de la especie

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**
TELÉFONO: 349 5669 FAX: 3493647 - APDO. 456 - LA MOLINA-LIMA-PERU



La Molina, 09 de septiembre de 2016

CONSTANCIA
12-2016-HM-UNALM


Mediante la presente se informa que las muestras de “guanábana” provenientes de Pisco Playa, distrito de Pisco y Pampa de Ocas, distrito de San Andrés, provincia de Pisco, Región Ica, remitidas por Óscar Benjamín Jordán Suárez, correspondiente al proyecto de investigación “MICROENCAPSULADO DE EXTRACTO DE HOJAS DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)”, han sido estudiadas en el Herbario del Dpto. de Biología (MOL) de la Universidad Nacional Agraria La Molina para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en dichos especímenes permiten concluir que los mismos corresponden a las siguientes especies:

Muestra 1 (Pisco Playa): *Annona montana* Macfad. vel aff.
Muestra 2 (Pampa de Ocas): *Annona muricata* L.

La sistemática de las especies según el sistema de clasificación de APG III (Angiosperm Phylogeny Group III)(2009) es la siguiente:

Clado : angiospermas
Clado : magnólicas
Orden : Magnoliales
Familia : Annonaceae
Género : *Annona*
Especie 1 : *Annona montana* Macfad.
Especie 2 : *Annona muricata* L.

Atentamente,

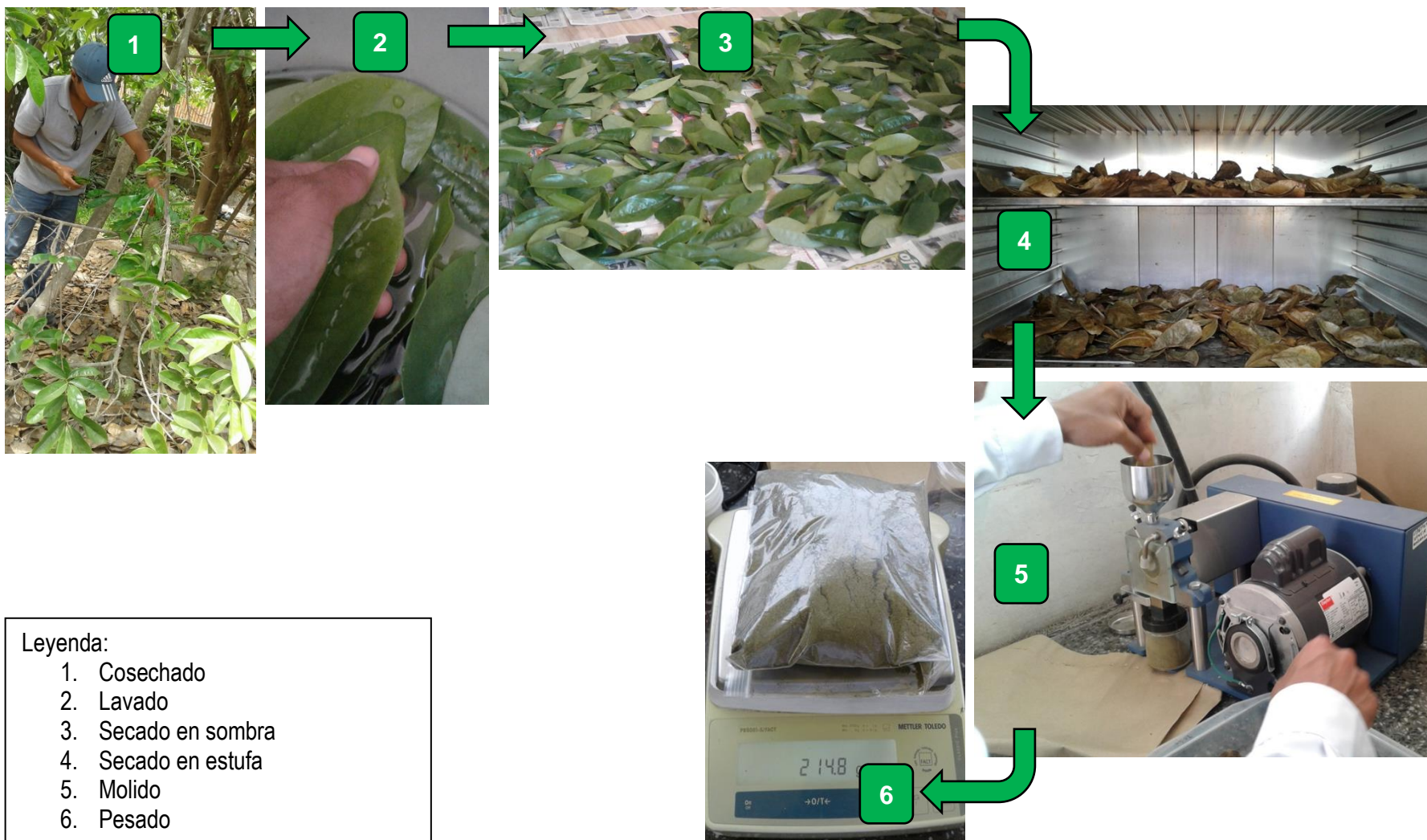


Mercedes Flores Pimentel
Jefe
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Agraria La Molina

Juan José Alegría Olivera
Investigador Adjunto
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Agraria La Molina

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO ACADEMICO DE BIOLOGIA
Anexo 271/273 - Fax: 3496015
e-mail: dptobiologia@lamolina.edu.pe

Anexo 2. Preparación de las hojas en polvo



Anexo 3. Protocolo y curva estándar para determinación de compuestos fenólicos

Preparación de Soluciones

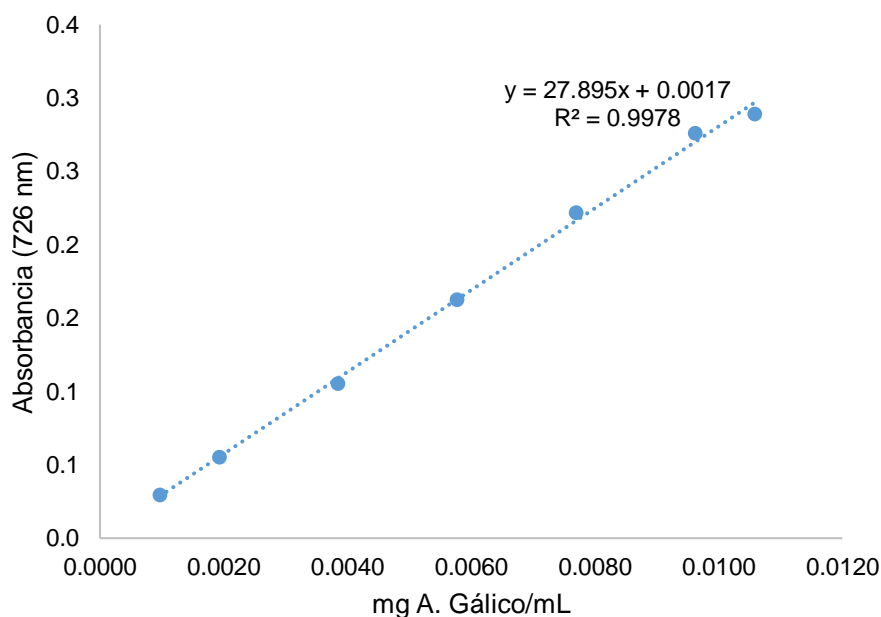
Solución de Folin (10%): Tomar 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu, y mezclar con agua destilada hasta un volumen final de 10 mL.

Solución de Na₂CO₃ (10%): Pesar 1 g de carbonato de sodio, diluir con agua tibia y enrasar a 10 mL con agua destilada.

Solución de ácido gálico: Pesar 25 mg de ácido gálico y diluir en 100 mL de agua destilada. Tomar 1 mL de solución y enrasar con agua destilada hasta 10 mL.

Procedimiento

- Tomar alícuotas de 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 µL de la solución de ácido gálico en tubos eppendorf de 2 mL.
- A cada tubo añadir 100 µL de la solución de Folin y dejar reaccionar por 5 min; posteriormente, añadir 100 µL de la solución de Na₂CO₃ y luego enrasar con agua destilada hasta 1200 µL. Emplear como blanco agua destilada.
- Agitar en vortex durante 12 s a 1000 rpm y dejar reaccionar en oscuridad por 30 min.
- Tomar 120 µL de cada tubo y aplicar por triplicado en una placa de micropozos.
- Leer la absorbancia en un lector de micropozos a 726 nm.



Anexo 4. Protocolo y curva estándar para determinación de capacidad antioxidante por DPPH

Preparación de Soluciones

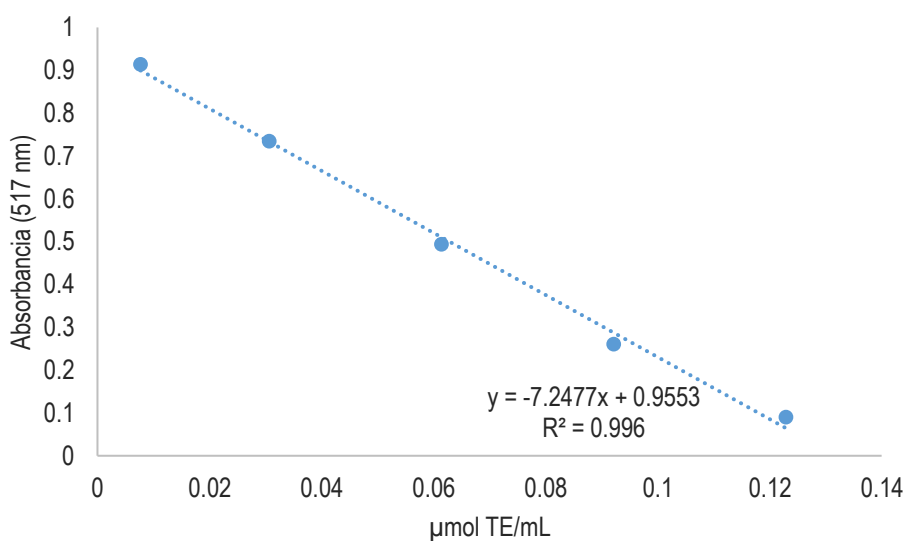
Solución de Metanol al 80%: Tomar 160 mL de metanol y mezclar con 40 mL de agua destilada.

Solución DPPH (0.4 mg/mL): Pesar 20 mg del reactivo DPPH y disolver con 50 mL de la solución metanólica.

Solución Trolox (0.5 mg/mL): Pesar 25 mg del reactivo Trolox y disolverlo en 50 mL de la solución metanólica.

Procedimiento

- Tomar alícuotas de 50, 200, 400, 600 y 800 μL de la solución de Trolox en tubos eppendorf, luego enrasar con la solución de metanol hasta 1000 μL , y posteriormente homogenizar en vortex.
- En 5 tubos eppendorf mezclar 100 μL de cada disolución de Trolox con 500 μL de la solución de DPPH y completar con 700 μL de la solución metanólica hasta un volumen final de 1300 μL .
- Tapar cada tubo, agitar y dejar reaccionar en oscuridad por 25 min.
- Tomar 130 μL de cada tubo y aplicar por triplicado en una placa de micropozos.
- Leer la absorbancia en un lector de micropozos a 517 nm.



Anexo 5. Protocolo y curva estándar para determinación de capacidad antioxidante por ABTS

Preparación de Soluciones

Solución de Metanol al 80%: Tomar 160 mL de metanol y mezclar con 40 mL de agua destilada.

Solución A: Pesar 78.4 mg de ABTS y diluir con agua destilada hasta 10 mL.

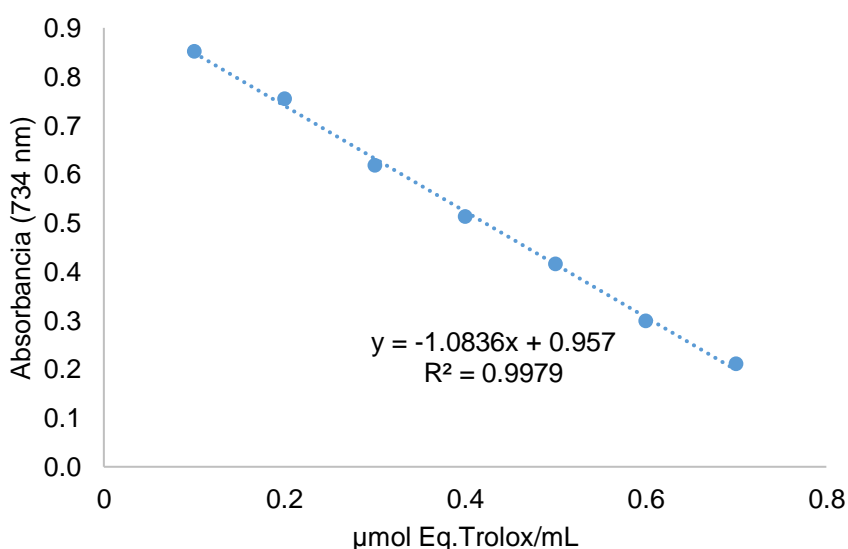
Solución B: Pesar 13,2 mg de persulfato de potasio y diluir hasta 10 mL con agua destilada.

Solución ABTS: Mezclar partes iguales de la solución A y B, y dejar reposar a temperatura ambiente 12 h previo a su uso. Posteriormente, tomar 1 mL de la mezcla y adicionar aproximadamente 22 mL de la solución metanólica para ajustar la absorbancia a 1.1 ± 0.02 a 734 nm.

Solución Trolox (0.25 mg/mL): Pesar 25 mg del reactivo Trolox y disolverlo en 100 mL de la solución metanólica.

Procedimiento

- Tomar alícuotas de 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 μL de la solución de Trolox en tubos eppendorf de 2 mL, luego enrasar con la solución de metanol hasta 1000 μL , y homogenizar en vortex.
- En 7 tubos eppendorf mezclar 150 μL de cada disolución de trolox con 1350 μL de la solución de ABTS (Volumen final: 1500 μL).
- Tapar cada tubo, agitar 10 s a 1200 rpm y dejar reaccionar durante 6 min.
- Aplicar 150 μL de cada tubo en una placa de micropozos.
- Leer la absorbancia en un lector de micropozos a 734 nm.



Anexo 6. Especificaciones de estándar de anonacina



PGS PRODUCT SPECIFICATION SHEET

ANNONACIN

Annonacin

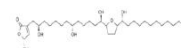
(5R)-3-[(2R,8R,13R)-13-{5-[(1R)-1-Hydroxydodecyl]tetrahydrofuran-2-yl}-2,8,13-trihydroxytridecyl]-5-hydroxy-4,5-dihydro-3H-furan-2-

CAS: 111035-65-5

MW: 596.86

MF: C₃₅H₆₄O₇

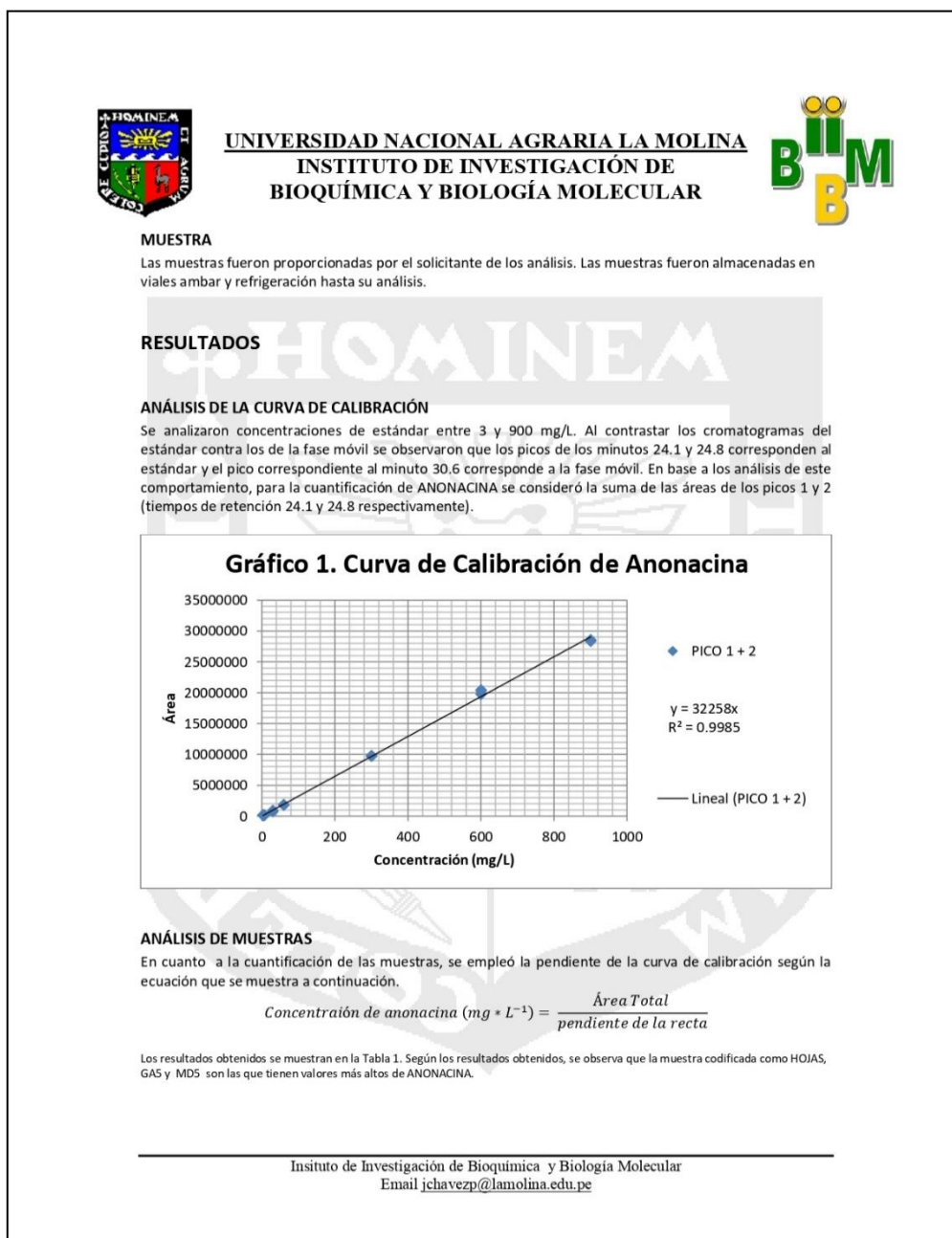
P15166



Anexo 7. Curva de calibración de anonacina vía HPLC

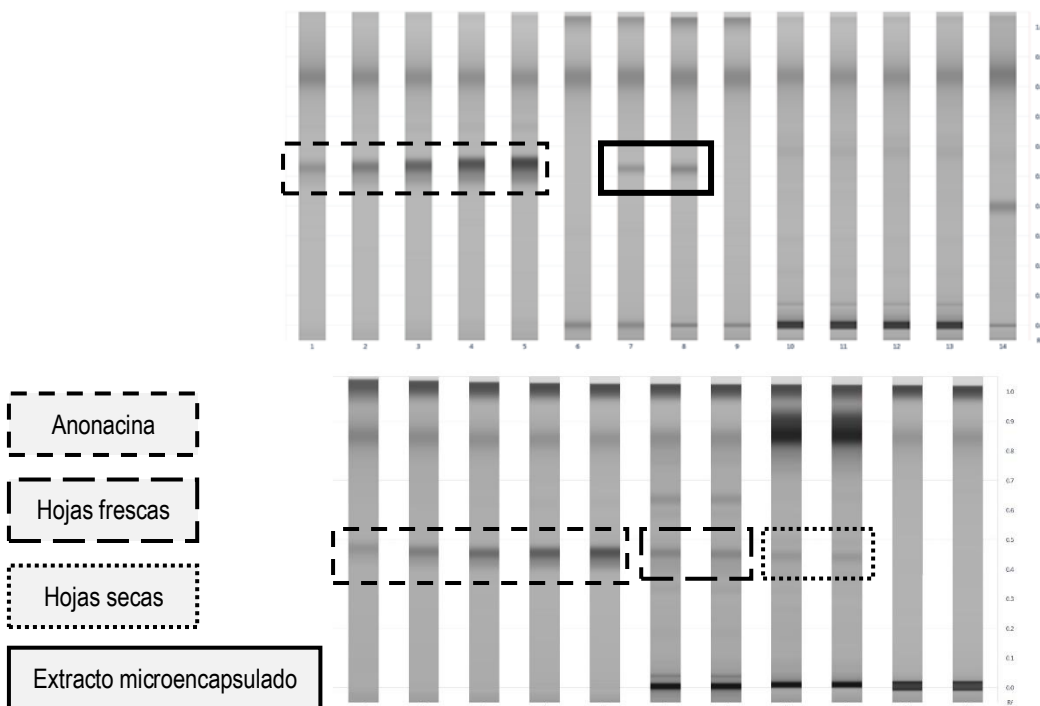
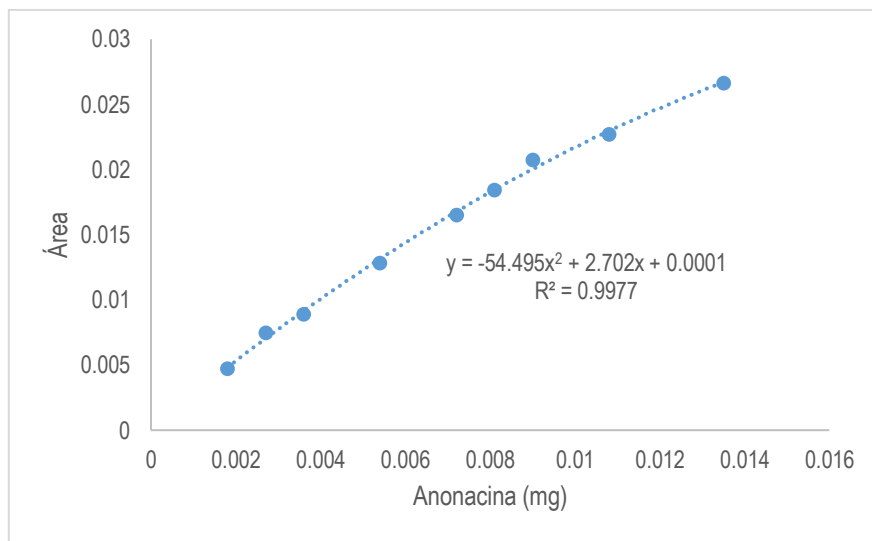
Preparación de la solución del estándar de Anonacina

15 mg de estándar de anonacina (94.1 % de pureza) fueron mezclados con 0.941 mL de metanol (grado HPLC), y la mezcla fue sonicada durante 10 min a intensidad intermedia. Se tomaron alícuotas de 60, 40, 20, 4, 2, 0.4 y 0.2 μL en viales, y se completaron con metanol hasta 1000 μL (1 mL). Las tres últimas diluciones se prepararon con la solución de 0.9 mg/mL.



Anexo 8. Curva de calibración de anonacina vía HPTLC

Para la elaboración de la curva se empleó el estándar de anonacina a 0.9 mg/mL; en una placa HPTLC se inyectó volúmenes crecientes de 2 a 14 μ L. Posteriormente se graficó la cantidad de anonacina en cada volumen aplicado versus el área bajo la curva de cada banda. Los datos se ajustaron a un modelo polinómico a partir del cual se calculó la cantidad de anonacina presente en las muestras de acuerdo con el volumen inyectado.



Anexo 9. Informe 1 de ensayos fisicoquímicos



LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos



INFORME DE ENSAYOS

N° 005400 - 2016

SOLICITANTE : OSCAR JORDAN SUAREZ
DIRECCIÓN LEGAL : JR. TRUJILLO 446 SAN MARTIN DE PORRES
: RUC: --- Teléfono: 995177522
PRODUCTO : HOJAS SECAS DE GUANÁBANA
NÚMERO DE MUESTRAS : Uno
IDENTIFICACIÓN/MTRA. : S.I
CANTIDAD RECIBIDA : 242,5 g (+envase) de muestra proporcionada por el solicitante.
MARCA(S) : S.M.
FORMA DE PRESENTACIÓN : Envasado, la muestra ingresa en bolsa cerrada.
SOLICITUD DE SERVICIO : S/S N°EN-003168 -2016
REFERENCIA : PERSONAL
FECHA DE RECEPCIÓN : 28/06/2016
ENSAYOS SOLICITADOS : FÍSICO/QUÍMICO
PERÍODO DE CUSTODIA : No aplica

RESULTADOS :

ENSAYOS FÍSICOS/QUÍMICOS :

ALCANCE : N.A.

ENSAYO	RESULTADO
1.- Proteína (g / 100 g de muestra original) (Factor: 6,25)	10,9
2.- Grasa (g / 100 g de muestra original)	0,5

MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO :

- 1.- AOAC 978.04(A) Cap. 3 Ed. 19 Pág. 28 2012
- 2.- AOAC 922.06 Ed. 19 Cap. 32 Pág. 5 2012

FECHA DE EJECUCION DE ENSAYOS: Del 28/06/2016 Al 06/07/2016.

ADVERTENCIA :

- 1.- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento y transporte de la muestra hasta su ingreso a La Molina Calidad Total - Laboratorios son de responsabilidad del Solicitante.
- 2.- Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente Informe sin la autorización de La Molina Calidad Total - Laboratorios.
- 3.- Válido sólo para la cantidad recibida. No es un Certificado de Conformidad ni Certificado del Sistema de Calidad de quien lo produce.
- 4.- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL-DA

La Molina, 6 de Julio de 2016



Pág 1/1

Ing. Mg. Sc. Cecilia Alegría Arnedo
DIRECTORA TÉCNICA
CIP. N° 185515

Av. La Molina S/N (frente a la puerta principal de la Universidad Agraria) - La Molina - Lima - Perú
Telf.: (511) 3495640 - 3492507 Fax: (511) 3495794
E-mail: mktg@lamolina.edu.pe - Página Web: www.lamolina.edu.pe/calidadtotal - la molina calidad total

Anexo 10. Informe 2 de ensayos fisicoquímicos



Sociedad de Asesoramiento Técnico S.A.C.

JR. ALMIRANTE GUISE N° 2580 - 2586 / LIMA 14 - PERÚ TELÉFONO: 206-9280
E-mail: satperu@satperu.com / Página web: www.satperu.com

INFORME DE ENSAYO N° DT-03165-01-2016

PRODUCTO : Hojas secas de guanabana
SOLICITADO POR : Jordan Suarez Oscar Benjamin
DIRECCIÓN : Mz. A Lote 9 Urb. Paracas - Paracas - Pisco - Ica - Ica
FECHA DE RECEPCIÓN : 2016-07-08
FECHA DE ANÁLISIS : 2016-07-09
FECHA DE INFORME : 2016-07-12
SOLICITUD N° : SDT-05785-2016

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA : Ninguna
ESTADO / CONDICIÓN : Producto hojas secas / Temperatura Ambiente
PRESENTACIÓN : Bolsa de polietileno transparente sellada, sin litografiar
CANTIDAD DE MUESTRA : 100 Gramos
CANTIDAD DE MUESTRA DIRIMIENTE : Ninguna (A solicitud del cliente)

Servicio	Vía / Resultado
(*) Grasa (g/100g)	2,86
(*) Proteína ((Nx6,25) g/100g)	10,64

(*) LOS METODOS INDICADOS NO HAN SIDO ACREDITADOS POR INDECOPI-SNA

MÉTODOS

(*) Grasa : AOAC 922.06, 19th, Ed. (2012). Fat in Flour. Acid Hydrolysis Method
(*) Proteína : AOAC 984.13A (2005) Cap. 32, Ed. XVIII, Pág. 14. AOAC 984.13 (2005) Cap. 4, Ed. XVIII, Pág. 31. Protein (crude) in animal feed. Protein (crude) in animal feed and pet food

- Informe de ensayo emitido en base a resultados obtenidos en nuestro laboratorio. Válido únicamente para la muestra proporcionada. Queda absolutamente prohibida toda reproducción parcial del presente informe sin la autorización escrita de SAT S.A.C. Este documento es válido solo en original.

QUIM. CLOTILDE HUÁPAYA HERREROS
JEFE DIVISIÓN TÉCNICA
C.Q.P.N° 296



Anexo 11. Acondicionamiento de muestras para ensayos biológicos

- Extracto fresco de hojas

Las hojas molidas se mezclaron con DMSO (100 mg/mL) en un tubo Eppendorf, la mezcla fue sonicada durante 5 min; luego la suspensión se centrifugó (8000 RPM por 10 min) y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0.45 μm . El líquido filtrado fue diluido con PBS a concentraciones de 1 a 10^4 $\mu\text{g/mL}$.

- Extracto seco y polvos microencapsulados

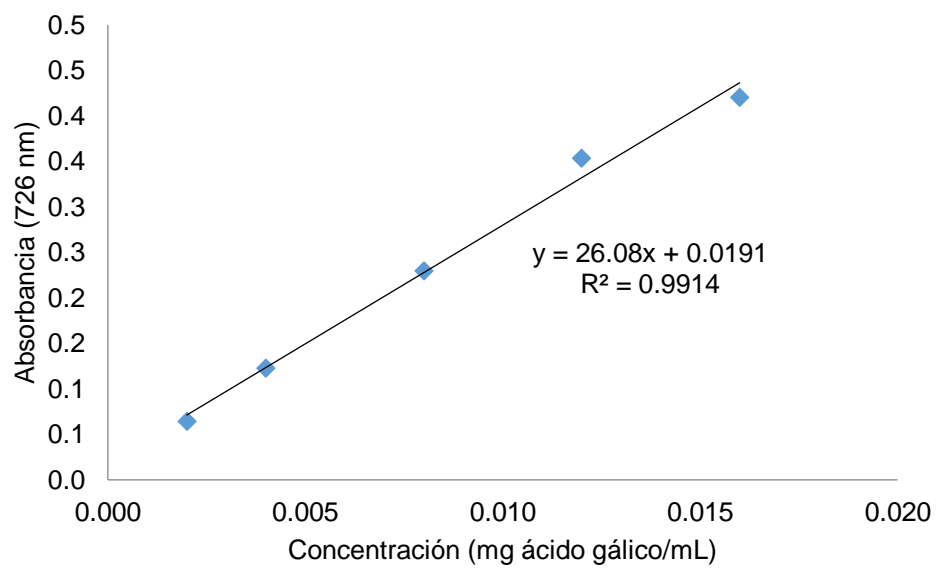
El extracto puro liofilizado (preparado a condiciones estandarizadas), y los tratamientos encapsulados vía secado por atomización y liofilización empleando 10% de maltodextrina (SDM y FDM) fueron mezclados con DMSO (100 mg con 1000 mL de DMSO) y sonicados durante 5 min. Luego se realizaron diluciones seriadas a partir de 100 μL de la solución inicial en 1000 μL de PBS hasta concentraciones en el rango de 1 a 10^4 $\mu\text{g/mL}$.

- Anonacina (94%)

1 mL de una solución metanólica conteniendo 1.5 mg de estándar de Anonacina fue evaporado bajo condiciones de vacío y suspendido en 150 μL de DMSO, esta solución fue diluida con PBS hasta llegar a concentraciones de 1 a 10^3 $\mu\text{g/mL}$.



Anexo 12. Curva de calibración para determinación de compuestos fenólicos en la etapa de extracción



Anexo 13. Ficha técnica de goma arábica

129, Chemin de Croisset
CS94151
76723 Rouen Cedex
France
Tel : +33 (0) 2 32 83 18 18
Fax : +33 (0) 2 32 83 19 19



Goma Arábica

Version : 8 Created on : 14/10/2005 Last update : 01/07/2015

Content : Acacia gum purified and instantised

Legal position : E414, Regulations 231/2012/EC and 1333/2008/EC, USP/NF, FCC, Eur.Ph.

Standard Packaging : Net 25kg paper bags with inner polyethylene liner

Maximum Storage : 3 years Storage Condition : Keep closed in cool and dry place

MATERIAL CHARACTERISTICS

Physical and chemical data

Analysis	Description	MINI	MAXI	UNIT	Test Method
Moisture	5h @ 105°C		10	%	USP <921> Method III
Colour @ 25%	Aqueous solution 25% - Lovibond AF900		15	-	-
Total Ashes @ 600°C	8h @ 600°C		4	%	Eur. Ph.
Acid insoluble ashes	Ashes + acid hydrolysis		0,5	%	USP<561>
Acid insoluble matters	Gravimetric determination after acid hydrolysis		0,15	%	-
pH	25% aqueous solution, @ 20°C	4,1	4,8	-	Eur. Ph. 2.2.3
Viscosity 25%	25%, Brookfield LVF 60 rpm @ 20°C	60	110	mPa.s	-
Mesh size powder through 63 µm	Vibro - sieving		15	%	-

Bacteriology


Analysis	Description	MINI	MAXI	UNIT	Test Method
Total Plate Count	72 h @ 30°C - PCA		1000	cfu/g	ISO 4833
E. coli (test for the presence of)	48 h @ 44°C - EP without indole + Kovacs reagent		abs/5g	-	ISO 7251
Salmonella (presence)	Pre-enrichment, 24 h @ 41°C		abs/25g	-	ISO 6579
Yeasts & Molds	5 days @ 25°C - YGC		100	cfu/g	ISO 7954

1/1

01/07/2015

The information contained in this bulletin is correct to the best of our knowledge. The recommendations or suggestions herein are made without guarantee or representation as to result, since the conditions of use are beyond our control. We suggest that you evaluate the recommendations contained in this bulletin in your own laboratory prior to use. No statement is to be construed as violating any copyright or patent. They are intended only as source of information. (Used date format : dd/mm/yyyy).

Anexo 14. Ficha técnica de Maltodextrina 1

	ESPECIFICACIONES TECNICAS	FICHA TÉCNICA
		CÓDIGO: FT-D&D-01
		REV.10/JULIO 2016

1. IDENTIFICACIÓN DE LA MATERIA PRIMA, INGREDIENTE Y MATERIAL DE CONTACTO

MALTODEXTRINA MARPI00027

2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, QUÍMICAS Y FÍSICAS PERTINENTES PARA LA INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

REQUISITOS FÍSICOS Y QUÍMICOS

Apariencia	Polvo
Color	Blanco
Olor	Inodoro
Sabor	Insípido
pH (sol. 10%)	4,5 – 6,5
Humedad (%)	< 10
% De Solubilidad	> 98
Cenizas (%)	< 0,6
Densidad (g/ml)	0,47 – 0,53
Dextrosa equivalente (%)	15-20
Test Yodo	No cambia a azul
Densidad Bulk (Gi)	470-530

INFORMACIÓN NUTRICIONAL

Por cada 100 g de producto	
Energía (Kcal)	380
Proteína (g)	0
Grasas total (g)	0
H. de Carbono disponibles (g)	95
Azúcares totales (g)	2
Sodio (mg)	0

REQUISITOS CONTAMINANTES/ADITIVOS

METALES PESADOS

Metales pesados	< 10 ppm
Plomo	≤ 0,5 ppm
Sulfitos	<10 ppm

PLAGUICIDAS/PESTICIDAS

El producto y las materias primas utilizadas cumplen con la regulación Chilena N° 581/1999, (EC) N 396/2005 y CODEX Alimentarius en cuando al contenido de residuos de Plaguicidas/pesticidas.

COPIA

Página 1 de 3

Anexo 15. Ficha técnica de Maltodextrina 2

meel
unie



Meelunie BV., Vifoly Tower, 18th floor, Claude Debussylaan 40 , 1082 MD Amsterdam
P.O. Box 10102, 1001 EC Amsterdam, The Netherlands, tel. +31 20 53 06 530 fax +31 20 53 06 555,
meelunie.com

PRODUCT DATA SHEET

MALTODEXTRIN 10-12 DE (code MA-84)

Appearance	: fine white powder
Flavour & odour	: mild sweet, odourless
Moisture	: max. 5 %
Dextrose Equivalent	: 10-12
Ash	: max. 0,3 %
pH	: 4,5 – 6,5
Higher sugars	: 76 – 89 %

Carbohydrate composition

Dextrose	: 3 %
Maltose	: 4 - 8 %
Triose	: 7 - 11 %

Microbiological

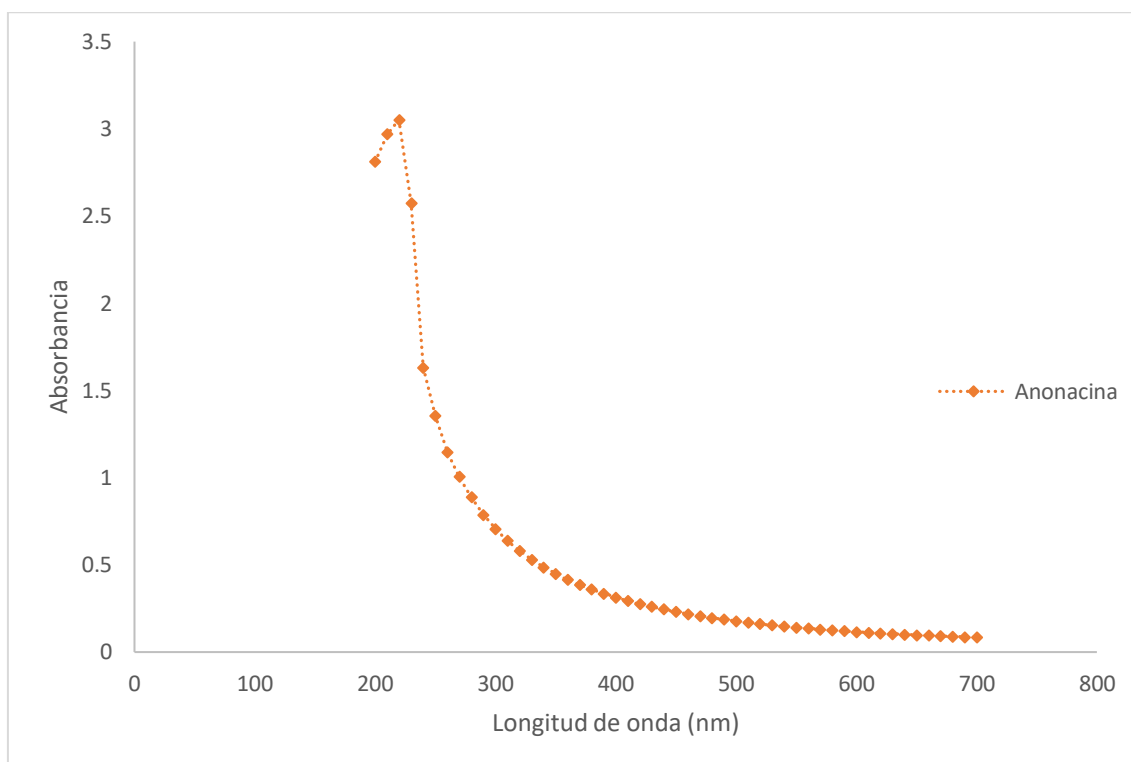
Total Bacteria	: max. 60 cfu per gram
Yeast & Moulds	: absent in 1 gram
Coliforms	: < 10 cfu per gram
E. coli	: absent in 1 gram
Salmonella	: absent in 25 gram

The information given is based on laboratory and field experience. It is set in good faith for guidance only. Our products are sold without any warranty whatsoever whether expressed or implied. Users should conduct their own tests in order to determine for themselves the suitability of our products for their particular purposes

ABN AMRO Bank, Amsterdam, IBAN/Accountno. EUR NL09ANBA041.10.21.117, USD NL84ABNA041.10.21.125
Rabobank, Utrecht, IBAN/Accountno. NL50RABO030.00.06.381, Chamber of Commerce 33037079, VAT-number
NL001417770B01

Anexo 16. Espectro de absorción del estándar de anonacina

Para la elaboración del espectro de absorción se tomó 100 μL de la solución de Anonacina (0.9 mg/mL) preparada para las pruebas de cromatografía, los cuales fueron colocados en una celda de micropozos y se completó con agua destilada hasta 1 mL; se homogenizó con micropipeta, y luego se leyó la absorbancia en el rango UV-VIS de 200 a 700 nm.



Anexo 17. Informe de ensayo de determinación de alcaloides totales



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00429-CPF-2018

ORDEN DE ANÁLISIS : 005066/2018
SOLICITADO POR : OSCAR JORDÁN SUÁREZ
MUESTRA : HOJAS DE GUANÁBANA
NÚMERO DE LOTE : --
CANTIDAD : 01 frasco
FECHA DE RECEPCIÓN : 18 de Setiembre del 2018
FECHA DE FABRICACIÓN : ---
FECHA DE VENCIMIENTO : ---

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	MÉTODO	RESULTADOS
CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES TOTALES	---	Volumétrico	1,06%

Lima, 27 de Setiembre del 2018



QF. Gustavo Guerra Brizuela
Director del Centro de Control Analítico

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



Anexo 18. Extracto microencapsulado en polvo



Aspecto visual del extracto microencapsulado por atomización

Anexo 19. Análisis estadístico de muestras microencapsuladas por liofilización

Análisis de Varianza para E.E. - Suma de Cuadrados Tipo III

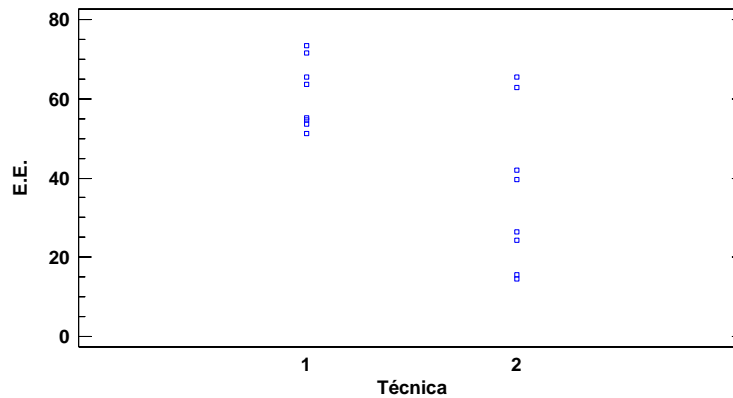
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Técnica	2447,6	1	2447,6	709,39	0,0000
B:Encapsulante	1364,25	1	1364,25	395,40	0,0000
C:Concentración	1001,61	1	1001,61	290,30	0,0000
INTERACCIONES					
AB	755,659	1	755,659	219,01	0,0000
AC	4,06728	1	4,06728	1,18	0,3058
BC	94,9407	1	94,9407	27,52	0,0005
RESIDUOS	31,0528	9	3,45031		
TOTAL (CORREGIDO)	5699,18	15			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de E.E. en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 5 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre E.E. con un 95,0% de nivel de confianza.

Dispersión por Código de Nivel



Anexo 20. Microencapsulación del extracto por atomización



Proceso de atomización del extracto en el equipo modelo SD-Basic, LabPlant

Anexo 21. Análisis estadístico para optimización de la solubilidad

Análisis de Varianza para Solubilidad

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	6,845	1	6,845	22,37	0,0032
B: Flujo de alimentación	6,3075	1	6,3075	20,62	0,0039
AA	1,79307	1	1,79307	5,86	0,0518
AB	0,0578	1	0,0578	0,19	0,6790
bloques	0,403333	1	0,403333	1,32	0,2946
Error total	1,83577	6	0,305961		
Total (corr.)	17,2425	11			

R-cuadrada = 89,3532 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 80,4809 por ciento

Error estándar del est. = 0,553138

Error absoluto medio = 0,363333

Estadístico Durbin-Watson = 2,82682 (P=0,7496)

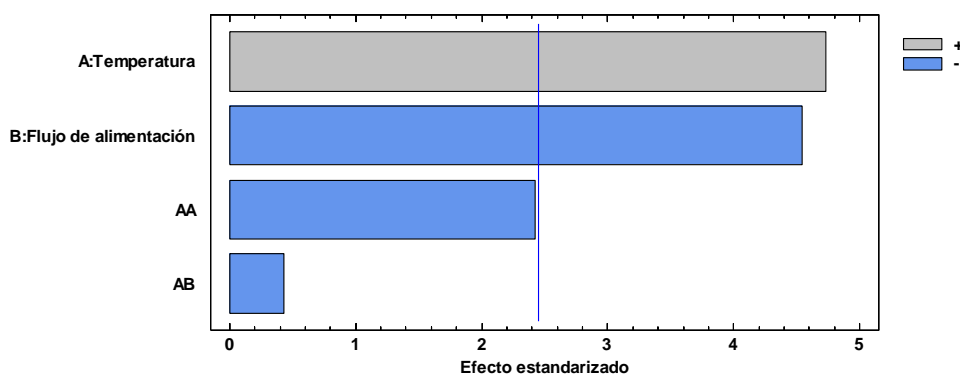
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,514095

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Solubilidad en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 89,3532% de la variabilidad en Solubilidad. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 80,4809%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,553138. El error medio absoluto (MAE) de 0,363333 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Solubilidad



La ecuación del modelo ajustado para Solubilidad es

$$\text{Solubilidad} = -81,0886 + 2,41864 * \text{Temperatura} + 0,169091 * \text{Flujo de alimentación} - 0,0082 * \text{Temperatura}^2 - 0,00309091 * \text{Temperatura} * \text{Flujo de alimentación}$$

Optimizar Respuesta

Meta: maximizar Solubilidad

Valor óptimo = 95,266

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	130,0	150,0	146,125
Flujo de alimentación	7,0	12,5	7,0

Anexo 22. Análisis estadístico para optimización de la humedad

Análisis de Varianza para Humedad

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	8,36405	1	8,36405	24,40	0,0026
B: Flujo de alimentación	2,07501	1	2,07501	6,05	0,0491
AA	0,0748167	1	0,0748167	0,22	0,6569
AB	0,07605	1	0,07605	0,22	0,6543
bloques	0,000408333	1	0,000408333	0,00	0,9736
Error total	2,05676	6	0,342793		
Total (corr.)	12,6471	11			

R-cuadrada = 83,7373 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 70,1851 por ciento

Error estándar del est. = 0,585485

Error absoluto medio = 0,375833

Estadístico Durbin-Watson = 2,80406 (P=0,7376)

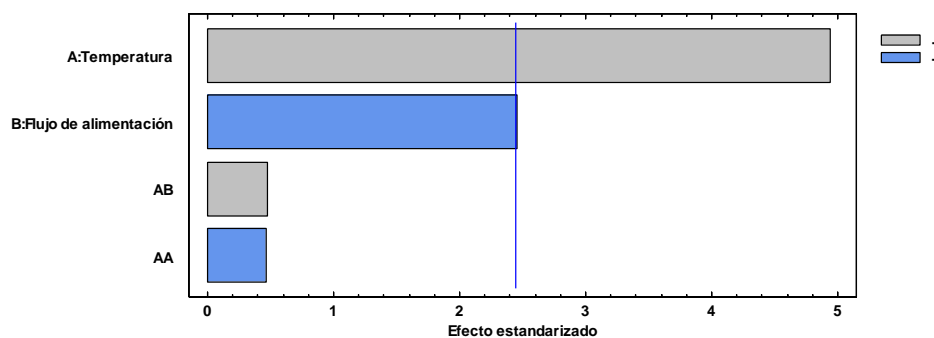
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,532195

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Humedad en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen una valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 83,7373% de la variabilidad en Humedad. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 70,1851%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,585485. El error medio absoluto (MAE) de 0,375833 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Humedad



La ecuación del modelo ajustado para Humedad es

$$\text{Humedad} = -47,6786 + 0,536682 * \text{Temperatura} - 0,647576 * \text{Flujo de alimentación} - 0,001675 * \text{Temperatura}^2 + 0,00354545 * \text{Temperatura} * \text{Flujo de alimentación}$$

Optimizar Respuesta

Meta: maximizar Humedad

Valor óptimo = -5,67417

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	130,0	150,0	150,0
Flujo de alimentación	7,0	12,5	7,0

Anexo 23. Análisis estadístico para optimización de la eficiencia de encapsulación

Análisis de Varianza para E. Encapsulación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	116,739	1	116,739	82,08	0,0001
B: Flujo de alimentación	29,6102	1	29,6102	20,82	0,0038
AA	16,968	1	16,968	11,93	0,0136
AB	0,08405	1	0,08405	0,06	0,8160
bloques	0,156408	1	0,156408	0,11	0,7515
Error total	8,53381	6	1,4223		
Total (corr.)	172,092	11			

R-cuadrada = 95,0411 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 90,9087 por ciento

Error estándar del est. = 1,1926

Error absoluto medio = 0,710556

Estadístico Durbin-Watson = 3,31185 (P=0,9418)

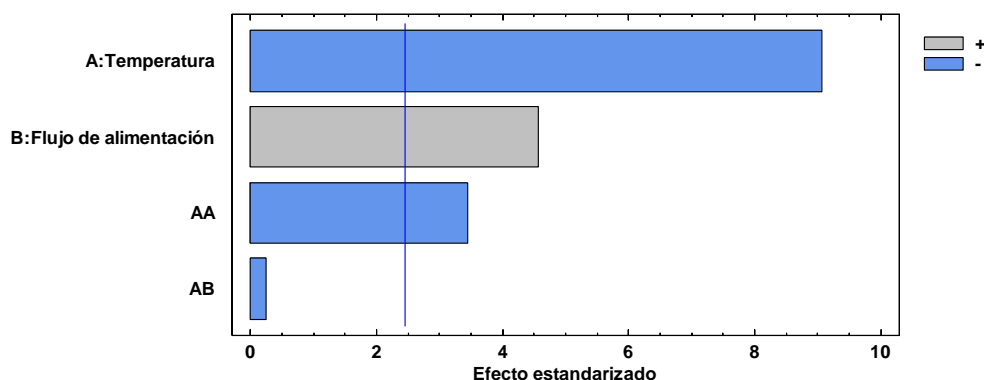
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,727703

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de E. Encapsulación en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 3 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 95,0411% de la variabilidad en E. Encapsulación. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 90,9087%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 1,1926. El error medio absoluto (MAE) de 0,710556 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Diagrama de Pareto Estandarizada para E. Encapsulación



La ecuación del modelo ajustado para E. Encapsulación es

$$E. \text{ Encapsulación} = -371,98 + 6,71734 * \text{Temperatura} + 1,09303 * \text{Flujo de alimentación} - 0,025225 * \text{Temperatura}^2 - 0,00372727 * \text{Temperatura} * \text{Flujo de alimentación}$$

Optimizar Respuesta

Meta: maximizar E. Encapsulación

Valor óptimo = 82,7032

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	130,0	150,0	132,224
Flujo de alimentación	7,0	12,5	12,5

Anexo 24. Análisis estadístico para optimización de respuestas múltiples

Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo = 0,713368

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	130,0	150,0	140,593
Flujo de alimentación	7,0	12,5	7,0

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo</i>
Solubilidad	95,0121
Humedad	-6,37736
E. Encapsulación	77,8072

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la combinación de niveles de factores que maximiza la función de 'deseabilidad' en la región indicada. También muestra la combinación de factores a la cual se alcanza el óptimo. Use el cuadro de diálogo de Opciones de Análisis para indicar la región sobre la cual se llevará a cabo la optimización.

Dado que el *software* interpreta por defecto valores mas altos como mejores, y considerando la humedad como un comportamiento inverso, los valores fueron introducidos en negativo; en consecuencia, la respuesta óptima para este factor esta expresada en negativo, puesto que se prefiere valores de humedad más bajos.

Anexo 25. Fluorómetro empleado para análisis de Ca^{2+}



Equipo perteneciente al Departamento de Fisiología de la Universidad de Concepción, Chile.