

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**Departamento Académico de Ciencia, Tecnología e Ingeniería de  
Alimentos**



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PULPA  
CONCENTRADA DE CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) EN  
DOS ESTADOS DE MADUREZ EN TINGO MARÍA”**

**TESIS**

**Para optar el título de:**

**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**HELMUT LEONID CALVAY VERASTEGUI**

**Promoción 2006 - II**

**Tingo María – Perú**

**2009**



F60

C18

Calvay Verástegui, Helmut L.

Evaluación de la Actividad Antioxidante en Pulpa Concentrada de Camu Camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) en dos Estados de Madurez en Tingo María. Tingo María, 2009

123 h.; 27 cuadros; 37 fgrs.; 65 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Industrias Alimentarias) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María ( Perú ). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

MYRCIARIA DUBIA H.B.K. MC VAUGH / ANTIOXIDANTES / ACIDO  
ASCORBICO / RADICALES LIBRES / ALMACENAMIENTO / TINGO  
MARIA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUANUCO / PERU.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA  
Tingo María

FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156

Apart. Postal 156 Tingo María E.mail; fia@unas.edu.pe

---

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 21 de Abril de 2009, a horas 7:00 p.m. en la Sala de Audiovisuales de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, Provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por el Bach. CALVAY VERASTEGUI, Helmut Leonid, titulado:

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA PULPA CONCENTRADA DE CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh) EN DOS ESTADOS DE MADUREZ EN TINGO MARÍA ”**

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de MUY BUENO, en consecuencia el Bachiller, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51° y 52° del Estatuto Actualizado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 21 de Abril de 2009

Ing. Mg. Jorge E. Castro Gracey  
Presidente

Ing. MSc. Pedro P. Peláez Sánchez  
Miembro

Ing. MSc. José A. Blás Matienzo  
Miembro

Ing. Jhony W. Vargas Solórzano  
Asesor

## DEDICATORIA

A Dios Todo poderoso que mora en las alturas, por darme la vida, la salud y por iluminar mi camino y guiarme en cada instante de mi existencia.

A mis Padres, **Emiliano y Mercedes**, con todo el amor del mundo, por su apoyo incondicional, esfuerzo, sacrificio y por sus consejos que fueron los pilares para la culminación de mi carrera profesional.

A mis hermanos: Elmer, Henry, Diana, Olivia y Yada; por su cariño, amor y comprensión en todo momento, y que nuestra unidad sea para toda la vida.

## **AGRADECIMIENTO**

- Al Dr. Manuel Sandoval Chacón, Co-Asesor, por aceptarme y poder realizar mi tesis en el CIPNA – UNAS, brindándome todas las facilidades para la ejecución de esta investigación, por la paciencia de haber tenido conmigo en compartir su filosofía de hacer investigación de una manera muy humilde.
- Al Ing. Jhony W. Vargas Solórzano, Asesor, por sus orientaciones, enseñanzas durante la conducción de mi tesis y su apoyo para lograr mis sueños.
- Al personal de laboratorio de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por las facilidades brindadas en los análisis fisicoquímicos, de minerales y microbiológicos de la presente investigación.
- A mis padres, Emiliano y Mercedes, por haberme dado la mejor herencia “Mi profesión” y por sus oraciones constantes hacia Dios pidiendo por mi, y ahora se que esas oraciones tuvieron mucho poder.
- A mis hermanos Elmer, Henry, Diana, Olivia y Yada, por su amor, comprensión y apoyo, fueron ellos los que hacían producir en mí ser la motivación para seguir adelante.
- A mis tíos que con sus consejos sabios me orientaron hacia el camino del bien, a todos mis primos que compartieron momentos agradables conmigo, a mi primo Franz que compartió conmigo la misma habitación del internado.
- A mis amigos, Gilmer, Evil, Jabin, Jorge, Ronald, Gedeón, Melisa, Paquita, Ana, Litman, Corali, Elizabeth, Yasmin, Betzabé, Michelle, Sra. Erika, Sra. Maximina, Pr. Roling y a muchos más que los llevo en mi corazón.

## INDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Camu camu.....	3
2.1.1. Aspectos Generales.....	3
2.1.2. Aspectos Botánicos.....	3
2.1.2.1. Morfología.....	3
2.1.2.2. Taxonomía.....	4
2.1.3. El Fruto .....	4
2.1.4. Composición química del camu camu.....	5
2.2. Concentrado de alimentos.....	9
2.3. Envasado de alimentos.....	11
2.4. Radicales libres.....	11
2.5. Antioxidantes.....	13
2.5.1. Antioxidantes endógenos.....	13
2.5.2. Antioxidantes exógenos.....	13
2.6. Cromatografía líquida de alta performance.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. Lugar de ejecución.....	20
3.2. Materia prima y reactivos.....	20
3.2.1. Materia prima.....	20
3.2.2. Reactivos.....	21
3.2.3. Materiales y equipos.....	21

3.3. Métodos de análisis.....	23
3.3.1. Análisis fisicoquímico y micronutrientes.....	23
3.3.2. Cuantificación de ácido ascórbico.....	24
3.3.3. Cuantificación de polifenoles totales.....	24
3.3.4. Cuantificación de catequina.....	25
3.3.5. Evaluación de la actividad antioxidante.....	25
3.3.5.1. Radical 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH)....	25
3.3.5.2. Radical peroxilo.....	26
3.3.6. Análisis microbiológico.....	27
3.4. Metodología.....	27
3.4.1. Proceso para la obtención de pulpa concentrada de camu camu.....	27
3.4.2. Caracterización fisicoquímica y micronutrientes.....	31
3.4.2.1. Análisis fisicoquímico.....	31
3.4.2.2. Determinación de micronutrientes.....	31
3.4.3. Cuantificación de ácido ascórbico en pulpa concentrada de camu camu.....	34
3.4.3.1. Determinación de la curva patrón.....	34
3.4.3.2. Cuantificación de ácido ascórbico.....	34
3.4.4. Cuantificación de polifenoles totales en pulpa concentrada de camu camu.....	35
3.4.4.1. Determinación de la curva patrón.....	35
3.4.4.2. Cuantificación de polifenoles totales.....	36

3.4.5. Cuantificación de catequina en pulpa concentrada de camu camu.....	36
3.4.5.1. Determinación de la curva patrón.....	36
3.4.5.2. Cuantificación de catequina.....	37
3.4.6. Determinación de la actividad antioxidante en pulpa concentrada de camu camu.....	37
3.4.6.1. Radical 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH)....	37
3.4.6.2. Radical peroxilo.....	40
3.4.7. Análisis microbiológico.....	43
3.5. Diseño experimental.....	44
3.6. Análisis estadístico.....	45
IV. RESULTADOS.....	47
4.1. Proceso para la obtención de pulpa concentrada de camu camu; rendimiento y características sensoriales.....	47
4.2. Caracterización fisicoquímica y micronutrientes de pulpa concentrada de camu camu.....	49
4.3. Cuantificación de ácido ascórbico en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre -15 a -10°C.....	51
4.4. Cuantificación de polifenoles totales en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre -15 a -10°C.....	56
4.5. Cuantificación de catequina en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre -15 a -10°C.....	60
4.6. Evaluación de la actividad antioxidante en pulpa concentrada de camu camu almacenado entre -15 a -10°C.....	65



4.6.1. Radical 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH).....	65
4.6.2. Radical peroxilo.....	69
4.7. Análisis microbiológico.....	72
V. DISCUSIÓN.....	73
5.1. Proceso para la obtención de pulpa concentrada de camu camu; rendimiento y características sensoriales.....	73
5.2. Caracterización fisicoquímica y micronutrientes.....	74
5.3. Cuantificación de ácido ascórbico en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre -15 a -10°C.....	84
5.4. Cuantificación de polifenoles totales en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre -15 a -10°C.....	92
5.5. Cuantificación de catequina en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre -15 a -10°C.....	96
5.6. Evaluación de la actividad antioxidante en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre -15 a -10°C.....	100
5.6.1. Radical 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH).....	100
5.6.2. Radical peroxilo.....	104
5.7. Análisis microbiológico.....	108
VI. CONCLUSIONES.....	110
VII. RECOMENDACIONES.....	112
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	114
IX. ANEXO.....	123

## INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Análisis químico en pulpa de camu camu.....	7
2. Análisis de aminoácidos en pulpa de camu camu.....	8
3. Análisis de micronutrientes en pulpa de camu camu.....	9
4. Concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ preparadas a partir de los estándares de Zn, Fe, Mn y Cu, que tienen 1 000 $\mu\text{g/ml}$ .....	32
5. Preparación de los estándares de (+)-catequina.....	35
6. Preparación de las reacciones de pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez frente al DPPH.....	38
7. Preparación de las reacciones de pulpa concentrada de camu camu maduro y pintón frente al radical peroxilo.....	49
8. Rendimiento y características sensoriales de pulpa concentrada de camu camu obtenida en dos estados de madurez.....	47
9. Composición fisicoquímica de la pulpa concentrada de camu camu...	49
10. Contenido de minerales en la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.....	50
11. Eficiencia del proceso de concentrado de pulpa de camu camu en el contenido de ácido ascórbico.....	52
12. Contenido de ácido ascórbico en mgAA/100g de pulpa concentrada, por estado de madurez en almacenamiento.....	53
13. Contenido de ácido ascórbico de pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.....	54
14. Contenido de ácido ascórbico por tratamientos.....	55

15. Contenido de polifenoles totales en mgCAT/g de pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento.....	57
16. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.....	58
17. Contenido de polifenoles por tratamientos.....	59
18. Contenido de catequina en mgCAT/g de pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento.....	61
19. Contenido de catequina en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.....	63
20. Contenido de catequina por tratamientos.....	64
21. Actividad antioxidante en IC <sub>50</sub> (µg/ml) en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento, frente al radical DPPH.....	65
22. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado, frente al radical DPPH.....	67
23. Actividad antioxidante por tratamientos, frente al radical DPPH.....	68
24. Actividad antioxidante en IC <sub>50</sub> (µg/ml) en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento, frente al radical peroxilo.....	69
25. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado, frente al radical peroxilo.....	70
26. Actividad antioxidante por tratamientos, frente al radical peroxilo.....	71
27. Análisis microbiológico en pulpa concentrada de camu camu a los 6 meses de almacenamiento.....	72

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Camu camu ( <i>Myrciaria dubia</i> H.B.K. Mc Vaugh), cultivada en Tingo Maria.....	5
2. Estructura química del ácido ascórbico.....	15
3. Estructura de la catequina.....	16
4. Flujograma de proceso para la obtención de pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.....	30
5. Metodología para determinar el contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales, catequina y la actividad antioxidante de pulpa concentrada de camu camu.....	33
6. Metodología empleada para evaluar la actividad antioxidante de la pulpa concentrada de camu camu por el método del radical DPPH...	39
7. Metodología empleada para evaluar la actividad antioxidante de la pulpa concentrada de camu camu por el método del radical peroxilo...	42
8. Diseño experimental empleado para evaluar la actividad antioxidante en pulpa concentrada de camu camu.....	44
9. Flujograma y balance de materia para la obtención de pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.....	48
10. Contenido de micronutrientes en pulpa concentrada de camu camu.	50
11. Curva estándar de ácido ascórbico.....	51
12. Cromatograma HPLC del estándar de ácido ascórbico a 50 µg/ml, vol. 20µl. Muestra representativa de n=3.....	52

13. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento.....	53
14. Cromatograma HPLC de las pulpas concentradas de camu camu 1) Estado pintón y 2) Estado maduro a FD (factor de dilución) = 1 000, vol. 20µl. Muestra representativa de n=3.....	54
15. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.....	55
16. Contenido de ácido ascórbico por tratamientos.....	56
17. Curva estándar de catequina (CAT), para polifenoles totales.....	56
18. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento.....	57
19. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.....	58
20. Contenido de polifenoles por tratamientos.....	59
21. Curva estándar de catequina (CAT) por HPLC.....	60
22. Cromatograma HPLC del estándar de catequina a 500 µM, vol. 20µl. Muestra representativa de n=3.....	61
23. Contenido de catequina en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento.....	62
24. Cromatograma HPLC de pulpa concentrada de camu camu pintón a FD (factor de dilución) = 5, vol. 20µl. Muestra representativa de n=3.....	62

25. Cromatograma HPLC de pulpa concentrada de camu camu maduro a FD (factor de dilución) = 6, vol. 20µl. Muestra representativa de n=3.....	63
26. Contenido de catequinas en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.....	64
27. Contenido de catequina por tratamientos.....	65
28. Actividad antioxidante (IC <sub>50</sub> ) en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento, frente al radical DPPH.....	66
29. Actividad antioxidante (IC <sub>50</sub> ) en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado, frente al radical DPPH.....	67
30. Actividad antioxidante (IC <sub>50</sub> ) por tratamientos frente al radical DPPH...	68
31. Actividad antioxidante (IC <sub>50</sub> ) en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento, frente al radical peroxilo.....	69
32. Actividad antioxidante (IC <sub>50</sub> ) en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado, frente al radical Peroxilo.....	70
33. Actividad antioxidante (IC <sub>50</sub> ) por tratamientos frente al radical peroxilo.	71
34. Inhibición del radical DPPH para la pulpa concentrada de camu camu pintón.....	139
35. Inhibición del radical DPPH para la pulpa concentrada de camu camu maduro.....	139
36. Inhibición del radical peroxilo para la pulpa concentrada de camu camu pintón.....	140
37. Inhibición del radical peroxilo para la pulpa concentrada de camu camu maduro.....	140

## RESUMEN

El presente estudio fue conducido en la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), en el Laboratorio de Biotecnología y en el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA – UNAS), Tingo María, Perú de Junio del 2007 a Agosto del 2008. El propósito de este estudio fue determinar el contenido de ácido ascórbico (AA), polifenoles totales, catequina (CAT) y la actividad antioxidante frente al radical DPPH y peroxilo de dos concentrados de pulpa de camu camu pintón y maduro, durante 60 días.

El proceso para concentrar camu camu consistió de las siguientes operaciones: 1) Recepción, 2) Clasificado, 3) Lavado, 4) Pulpeado, 5) Concentrado, 6) Envasado y 7) Almacenado. La operación de concentrado fue dado por la eliminación de agua, el 40% p/p de la pulpa, a una temperatura y presión de vacío de 50°C y 24 pulg–Hg, respectivamente. Para evaluar la actividad antioxidante de los concentrados, se identificaron 6 tratamientos: T1 (pintón – día 0), T2 (pintón – día 30), T3 (pintón – día 60), T4 (maduro – día 0) T5 (maduro – día 30) y T6 (maduro – día 60). La determinación de ácido ascórbico y catequina fue realizada por el método de HPLC en fase reversa a 254 nm y 270 nm, respectivamente. El volumen de inyección fue de 20 µl para los estándares y los concentrados de camu camu. El contenido de polifenoles totales se determinó por el método de Folin-ciocalteu a 700 nm. La actividad antioxidante fue determinada por la inhibición del DPPH usando un espectrofotómetro a 515 nm; las reacciones fueron realizadas con 25 µl de muestra a diferentes concentraciones con 975 µl de DPPH (100 µM). Similarmente, la prueba de peroxilo fue evaluada a 414 nm, usando 10 µl de

muestra con 990  $\mu$ l de la solución de radical peroxilo. Las absorbancias para cada método fueron tomadas cada 15 segundos durante 5 minutos. Al finalizar el tiempo de almacenamiento, se realizaron las caracterizaciones fisicoquímicas y microbiológicas de los productos concentrados.

Los resultados de rendimiento para los concentrados de pintón y maduro fueron de 34,93% y de 37,36%, respectivamente. El concentrado obtenido de camu camu maduro fue superior en contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales, catequina y actividad antioxidante que el estado pintón ( $p < 0,05$ ). El mas alto contenido de ácido ascórbico fue para T5 con 2950,56 mg/100g, para polifenoles totales, T4 presentó alto contenido 50,23 mgCAT/g, para el contenido de catequina, T5 tuvo el mayor valor 0,46 mgCAT/g. Los tratamientos con mayor actividad antioxidante  $IC_{50}$  fueron T6 con 5,85  $\mu$ g/ml en la prueba de DPPH y T4 con 1,75  $\mu$ g/ml para el radical peroxilo. Ambos estados de madurez presentaron apreciables cantidades de proteína, grasa, carbohidratos, fibra y ceniza. Los resultados microbiológicos para coliformes y *E. coli* fueron cantidades  $< 0,3$  u.f.c /g. En conclusión, ambos estados de madurez del camu camu presentaron alta eficiencia para inhibir los radicales DPPH y peroxilo; sin embargo, el concentrado de camu camu maduro presentó mayor contenido de ácido ascórbico y actividad antioxidante que el estado maduro. También, las condiciones de este estudio permitió la conservación de la actividad antioxidante y la calidad microbiológica de ambos concentrados. Colectivamente, nuestros resultados demostraron que la fruta de camu camu en sus dos estados pintón y maduro, pueden ser usados para la fabricación de concentrados para las bebidas y la industria de nutraceuticos.



## SUMMARY

The present study was conducted at Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), Laboratory of Biotechnology, Center for Research on Amazonian Natural Products (CIPNA - UNAS), Tingo Maria, Peru from June of 2007 to August of 2008. The purpose of this study was to determine the amount of ascorbic acid (AA), total polyphenols, catequina (CAT) and the antioxidant activity against DPPH and peroxy radicals of two camu camu pulp concentrates, mid-ripe and ripe fruits, during 60 days.

The process for concentrating camu camu included the following operations: 1) Reception, 2) Classification, 3) Washing, 4) Pulping, 5) Concentration, 6) Packaging and 7) Storage. The concentration process was stopped after eliminating 40% water, 40% w/w, at temperature and vacuum pressure of 50°C and 24 inch Hg, respectively. To evaluate the antioxidant activity of the concentrate during storage, 6 treatments were identified: T1 (mid-ripe – day 0), T2 (mid-ripe – day 30), T3 (mid-ripe – day 60), T4 (ripe – day 0), T5 (ripe – day 30) and T6 (ripe – day 60). The quantification of ascorbic acid and catechin was carried out by reversed-phase HPLC at 254 nm and 270 nm, respectively. The injection volume was 20 µl for the standards and camu camu concentrates. Total polyphenols was determined by Folin-Ciocalteu method at 700 nm. The antioxidant activity was assessed by the inhibition of DPPH using a spectrophotometer at 515 nm; reactions were conducted with 25 µl of sample at different concentrations with 975 µl of DPPH (100 µM). Similarly, the peroxy assay was evaluated at 414 nm, using 10 µl of sample of different concentrations with 990 µl of peroxy radical solution. The absorbance for each

method was recorded every 15 seconds during 5 minutes. At the end of storage time, physicochemical and microbiological characterizations were performed in the concentrated products.

The yield results for mid-ripe and ripe concentrates were 34,93% and 37,36%, respectively. The concentrate obtained from ripe camu camu was superior in ascorbic acid, total polyphenols, catechin content and antioxidant activity than mid-ripe camu camu ( $p < 0.05$ ). The higher content of ascorbic acid was for T5 with 2950,56 mgAA/100g; for total polyphenols T4 showed high content 50,23 mgCAT/g; for catechin content, T5 had the highest value 0,46 mgCAT/g. Treatments with major antioxidant activity  $IC_{50}$  were T6 with 5,85  $\mu\text{g/ml}$  in the DPPH assay and T4 with 1,75 for peroxy radical. Both stages of maturity presented appreciable protein, fat, carbohydrates, fiber and ash quantities. Microbiological results for coliforms and *E. coli* quantities were  $< 0,3$  u.f.c/g. In conclusion, both stages of camu camu maturity showed high ability to inhibit DPPH and peroxy; however, the concentrate of ripe camu camu contained more ascorbic acid and antioxidant activity than the mid-ripe stage. Also, the experimental conditions of this study allowed the preservation of the antioxidant activity and the microbiology quality of both concentrates. Collectively, our results demonstrated that the fruit of camu camu at either ripe or mid-ripe stage can be used for manufacturing concentrates for the beverage and nutraceutical industries.

## I. INTRODUCCIÓN

La Amazonía peruana posee una gran diversidad biológica, cuya riqueza florística es abundante; esta abundancia incluye de manera importante a los frutales nativos, pues constituye una fuente importante en la dieta de la población y también como materia prima para la agroindustria regional (GONZÁLES, 2 007). El camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh), tiene como hábitad natural al bosque aluvial inundable, puede quedar totalmente sumergido en el agua durante cuatro o cinco meses, sin embargo se adapta bien a suelos con buen drenaje y regímenes hídricos con sequías hasta dos meses (SALVADOR, 1 997). Se caracteriza por su alto contenido de ácido ascórbico presentando 2 780 mg/100g (VILLACHICA, 1 996), convirtiéndose así en un poderoso antioxidante que a despertado el interés del mercado exterior para ser utilizado en la agroindustria, la farmacia, en el diseño de alimentos benéficos para la salud como alimentos funcionales y nutraceuticos.

Para satisfacer el mercado exterior y la agroindustria del país, además del camu camu que se produce en selva baja (<250 m.s.n.m.), es necesario incentivar el cultivo de esta fruta en una zona donde haya mayor acceso, fácil transporte y recolección y donde las inundaciones no sean muy frecuentes. La selva alta del Perú (670 m.s.n.m.), es una zona tropical que presenta condiciones muy favorables para el crecimiento de esta fruta y que gracias su demanda del mercado, sería un cultivo alternativo que contribuiría

notablemente al desarrollo agroindustrial de Tingo Maria; en este sentido, es necesario tener datos científicos que demuestren la actividad antioxidante de esta fruta. Los frutos de camu camu de ambos estados fueron pulpeados y concentrados hasta eliminar agua un 40% p/p de la pulpa, luego fue envasada al vacío en bolsas de polietileno y seguidamente congelada a una temperatura entre -15 a -10°C.

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron:

- Cuantificar el contenido de ácido ascórbico en la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez, en un periodo de almacenamiento de 60 días.

- Cuantificar el contenido de polifenoles totales en la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez, en un periodo de almacenamiento de 60 días.

- Cuantificar el contenido de catequina en la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez, en un periodo de almacenamiento de 60 días.

- Evaluar la actividad antioxidante de la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez, empleando dos modelos in vitro: DPPH y Peroxilo, en un periodo de almacenamiento de 60 días.

- Caracterización fisicoquímica, de micronutrientes y microbiológica del producto concentrado al término del periodo de almacenamiento.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Camu camu

#### 2.1.1. Aspectos generales

El camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) es un arbusto nativo de la selva amazónica, su fruto ofrece un alto contenido de vitamina C (ZAPATA y DUFOUR, 1 993; ZANATTA *et al.*, 2 005), en sus diferentes estados de madurez, variando de 8,45 a 9,39 g/kg (ZAPATA y DUFOUR, 1 993).

Esta fruta produce naturalmente en áreas de inundación, alrededor del recorrido de los ríos y lagos (RODRIGUES *et al.*, 2 004); en el Perú, la principal fuente de esta fruta son las poblaciones naturales ubicadas en las orillas de los ríos Ucayali y Amazonas, así como varios de sus afluentes, sin embargo se adapta a suelos con buen drenaje y regímenes hídricos con sequías hasta dos meses (VILLACHICA, 1 996; SALVADOR, 1 997).

#### 2.1.2. Aspectos botánicos

##### 2.1.2.1. Morfología

El camu camu es un arbusto que alcanza hasta 4 m de altura; se ramifica desde la base formando varios tallos secundarios que a su vez ramifican en forma de vaso abierto. El tallo y las ramas son cilíndricos, lisos, de

color marrón claro o rojizo y con corteza que se desprende de forma natural (VILLACHICA, 1996).

### 2.1.2.2. Taxonomía

El camu camu pertenece a la familia botánica Myrtaceae (VILLACHICA, 1996; ZANATTA *et al.*, 2005), identificado por Mc Vaughn (1958) inicialmente como *Myrciaria paraensis* Berg, pero cambiado por él mismo en 1963 como *Myrciaria dubia* H.B.K. (VILLACHICA, 1996). Según RIVA y GONZALES, 1996), el camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.), presenta la siguiente información taxonómica:

División	: Fanerógamas
Sub-división	: Angiospermas
Clase	: Dicotiledóneas
Orden	: Myrtales
Familia	: Myrtaceae
Género	: <i>Myrciaria</i>
Especie	: <i>dubia</i> H.B.K

### 2.1.3. El fruto

Los frutos de camu camu identificados como (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaughn), se muestran en la figura 1, tienen en promedio 2.5 cm de diámetro (ZANATTA *et al.*, 2005), con un fuerte sabor a ácido (ZAPATA y

DUFOUR, 1 993). La fenología reproductiva del camu camu transcurre en 77 días. Estos son divisibles en dos periodos: El primer periodo comprende el desarrollo de la flor y tiene cuatro fases, el segundo periodo comprende el desarrollo del fruto y tiene ocho fases. El fruto, en su totalidad, es de color rojo vino y tiene un peso promedio de 10 g (INGA *et al.*, 2 001).



Figura 1. Camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh), cultivada en Tingo Maria.

#### **2.1.4. Composición química del camu camu**

El principal componente en la pulpa de camu camu, es el ácido ascórbico, con un promedio de 2 780 mg/100g de pulpa (GONZALES, 2 007; VILLACHICA, 1 996), y una pequeña cantidad de ácido dehidroascórbico, representando solo un 4 % del total de vitamina C (ZAPATA y DUFOUR, 1 993). Las proteínas representan el 0,5 %, mientras que los otros

constituyentes se encuentran en cantidades similares a otras frutas tropicales (VILLACHICA, 1 996),

Muchos frutales amazónicos forman parte de la dieta del poblador urbano y rural; el consumo de estas frutas al natural o transformado aporta cantidades considerables de calorías, proteínas, lípidos, carbohidratos, fibra, ceniza, calcio, fósforo, potasio, sodio, magnesio, hierro, retinol (vitamina A), tiamina (vitamina B1), riboflavina (Vitamina B2), niacina (vitamina B5), ácido ascórbico (vitamina C), entre otros (GONZALES, 2 007).

ZAPATA y DUFOUR, (1 993), realizaron un estudio de la composición química de la pulpa fresca en tres estados de madurez (cuadro 1, 2 y 3), encontrando los siguientes componentes:



Cuadro 1. Análisis químico en pulpa de camu camu.

Parámetros	Verde	Pintón	Maduro
Ácido ascórbico (g/kg)	8,45	9,39	9,39
Ácido dehidroascórbico (g/kg)	0,19	0,25	0,31
Glucosa (g/kg)	2,24	3,61	8,16
Fructuosa (g/kg)	3,70	5,07	9,51
Ácido cítrico (g/kg)	29,82	22,93	19,18
Ácido málico (g/kg)	2,80	4,88	5,98
Acidez (ácido cítrico) (%)	3,55	3,07	3,08
pH	2,44	2,53	2,56
Densidad relativa (20/20 °C) (g/kg)	1,026	1,025	1,030
°Brix (%)	5,6	5,5	6,8
Sólidos totales (g/kg)	69,8	67,7	81,0
°Brix / Acidez (relación)	1,6	1,8	2,2
Nitrógeno total (g/kg)	0,568	0,624	0,735

**Fuente:** ZAPATA y DUFOUR (1 993).

Cuadro 2. Análisis de aminoácidos en pulpa de camu camu.

Aminoácidos (mg/kg)	Verde	Pintón	Maduro
Serina	299	371	637
Valina	99	168	316
Leucina	90	132	289
Glutamato	88	100	119
4-aminobutanato	71	93	108
Prolina	43	53	82
Fenilalanina	17	22	43
Treonina	20	28	36
Alanina	17	28	34

**Fuente:** ZAPATA y DUFOUR (1 993).

Cuadro 3. Análisis de micronutrientes en pulpa de camu camu.

Micronutrientes (mg/kg)	Verde	Pintón	Maduro
K	532	600	711
Ca	66	62	65
Mg	47	47	51
Na	49	44	27
PO <sub>4</sub>	245	256	295
SO <sub>4</sub>	219	163	132
Al	3,1	3,0	2,1
B	0,4	0,5	0,5
Cu	0,5	0,7	0,8
Fe	1,3	1,8	1,8
Mn	1,4	1,4	2,1
Zn	1,3	1,2	1,3
Cl	77	66	116

**Fuente:** ZAPATA y DUFOUR (1 993).

## 2.2. Concentrado de alimentos

El proceso de concentrado ayuda a preservar mejor el potencial nutricional de este tipo de productos. Este proceso está basado en la reducción de la actividad de agua, así de este modo prolongar la vida útil de los jugos de fruta (GOMES *et al.*, 2 005). El proceso de concentrado tiene un papel fundamental en la calidad de los alimentos. Los jugos de fruta contienen más del 75 a 95 % de agua, su retiro reduce los costos de empaque,

almacenamiento y transporte, prolongando la vida útil del jugo de fruta (BRASIL *et al.*, 2 008; GOMES *et al.*, 2 005).

Durante el procesamiento clásico de jugos, tal como pasteurización térmica y concentración por evaporación, pueden ocurrir pérdidas de compuestos nutricionales termosensibles tales como la vitamina C. Nuevos procesos tienen que ser investigados como alternativas al tratamiento térmico convencional (RODRIGUES *et al.*, 2 004). Para ello el proceso concentración por evaporación al vacío es una técnica que permite concentrar jugos o pulpas como las del camu camu con menores pérdidas de sus nutrientes. Existe otros procesos para concentración de alimentos líquidos, como el proceso de membrana que es ventajoso en comparación con la evaporación clásica, debido a la posibilidad de operar bajo condiciones suaves, sin afectar la termosensibilidad de algunas sustancias como las vitaminas (RODRIGUES *et al.*, 2 004).

Según el CODEX ALIMENTARIO (2 005), se entiende por zumo o jugo concentrado de fruta el producto al que se ha eliminado físicamente el agua en una cantidad suficiente para elevar el nivel de grados Brix al menos en un 50% más que el valor Brix establecido para el zumo o jugo reconstituido de la misma fruta. En la producción de zumo o jugo destinado a la elaboración de concentrados se utilizarán procedimientos adecuados, que podrán combinarse con la difusión simultánea con agua de pulpa y células y/o el orujo de fruta, siempre que los sólidos solubles de fruta extraídos con agua se añadan al jugo primario en la línea de producción antes de proceder a la concentración. Los

concentrados de zumos o jugos de fruta podrán contener componentes restablecidos de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles, elementos todos ellos que deberán obtenerse por procedimientos físicos adecuados y que deberán proceder del mismo tipo de fruta.

### **2.3. Envasado de alimentos**

El congelamiento de la pulpa refinada o no entre menos de 5 y 10°C permite conservarla por periodos prolongados. La comercialización del camu camu en pulpa y concentrado, podría hacerse en bolsas de polietileno, llenadas al vacío y congeladas (VILLACHICA, 1 996).

Según el CODEX ALIMENTARIO (1 993), el material deberá ser apropiado para el producto que ha de envasarse y para las condiciones previstas de almacenamiento, y no deberá transmitir al producto sustancias objetables en medida que se excedan los límites aceptables para el organismo oficial competente. El material de envasado deberá ser resistente y ofrecer una protección apropiada contra la contaminación. Los envases de los productos deberán ser lo suficientemente durables como para resistir todos los esfuerzos mecánicos, químicos y térmicos que puedan sufrirse durante la distribución normal. Tal vez será necesario que los envases flexibles y semirrígidos lleven una envoltura exterior.

### **2.4. Radicales libres**

Son átomos o moléculas orgánicas e inorgánicas que contienen uno o más electrones desapareados (RUSCUKLI, 2 005; BIANCHI y ANTUNES, 1 999), siendo extremadamente reactivas e inestables (PINEDA,

2 005). Enérgicamente, los electrones tienen la tendencia a ocurrir en pares. Algunas veces uno de los pares pueden ser perdidos o un único electrón puede ser ganado por un no radical. Tienden a reaccionar con otros componentes a fin de restablecer su normalidad de unión (RUSCUKLI, 2 005). Son altamente reactivos que al contacto con sustancias orgánicas e inorgánicas, afectan las propiedades químicas y funcionales de las sustancias a su alrededor, en especial moléculas que se encuentran en la membrana celular, los ácidos grasos insaturados, proteínas y ácidos nucleicos (PINEDA, 2 005).

La principal fuente biológica o endógena de radicales libres lo constituye la mitocondria, ya que durante el proceso de fosforilación oxidativa se genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar ATP, el aceptor final de electrones es el oxígeno, en esta transferencia de electrones se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación, cediendo uno o dos electrones al oxígeno produciendo intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres (PINEDA, 2 005). Otros lugares de formación de radicales libres lo constituyen algunas organelas, que poseen pequeñas vacuolas llamadas peroxisomas (PINEDA, 2 005) y los leucocitos polimorfonucleares (MAVI *et al.*, 2 004; PINEDA, 2 005). Las fuentes exógenas de radicales libres incluyen el humo de tabaco, las radiaciones ionizantes, solventes orgánicos y las pesticidas (MAVI *et al.*, 2 004).

Los radicales libres son especies reactivas de oxígeno (ROS) (PINEDA, 2 005; MAVI *et al.*, 2 004) y especies de nitrógeno reactivo (RNS) (MAVI *et al.*, 2 004), en la que participa el oxígeno y el nitrógeno para formar

radicales libres como el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) el radical hipoclorito y varios peróxidos de lípidos (RUSCUKLI, 2 005; PINEDA, 2 005; MAVI *et al.*, 2 004; BIANCHI y ANTUNES, 1 999).

## **2.5. Antioxidantes**

Los antioxidantes son sustancias químicas que inactivan los radicales libres o inhiben su producción, impidiendo así deterioro en las células. Los antioxidantes ceden un electrón al radical libre, oxidándose y transformándose en un radical libre débil que es inofensivo, en algunos casos puede llegar a regenerarse como en el caso de la vitamina E. Se dividen en dos categorías: antioxidantes endógenos (enzimáticos) y antioxidantes exógenos (no enzimáticos) (PINEDA, 2 005).

### **2.5.1. Antioxidantes endógenos**

Son los antioxidantes que se encuentran normalmente en el organismo se llaman endógenos y generalmente son sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa (mitocondrial, citoplasmática y extracelular), la catalasa y el complejo glutatión peroxidasa (PINEDA, 2 005).

### **2.5.2. Antioxidantes exógenos**

Los antioxidantes exógenos son los que se ingieren con la dieta encontrándose en diversos alimentos como las frutas y verduras (PINEDA, 2 005).

La vitamina C es una sustancia nutritiva, ampliamente distribuida en frutas y verduras, siendo la fuente principal en la mayor parte de la dieta humana (GOKMEN *et al.*, 2 000). Una baja ingesta causa una enfermedad, por deficiencia, conocida como escorbuto (GUTIÉRREZ *et al.*, 2 007). Está presente en su dos formas activas, ácido L-ascórbico y ácido dehidroascórbico (GOKMEN *et al.*, 2 000; POKORNY, 2 000), su formula química se muestra en la figura 2, el ácido ascórbico (forma reducida o AA) se encuentra en equilibrio con el ácido dehidroascórbico (forma oxidada o DHA), las dos formas son interconvertibles por vía enzimática en los organismos vivos; su suma constituye la vitamina C (ADRIAN, 2 000). Es fácilmente oxidable en una serie de sustancias desprovistas de actividad fisiológica (ácido dicetogulónico, etc.). Cualquier agente que provoca la oxidación (luz, UV, oxígeno, pro-oxidantes, etc.), o que la favorece (catalizadores como el hierro y el cobre), intensifica la destrucción de la vitamina C. Por el contrario, resulta protegida por la presencia de reductores orgánicos o minerales (taninos, glutatión, cisteína selenio, etc.) y por quelantes metálicos (EDTA, ácido cítrico) (ADRIAN, 2 000).

Su función como antioxidante de la vitamina C es controlar la rancidez oxidativa y/o evita el pardeamiento enzimático en manzanas, duraznos, refrescos y bebidas (MILLER, 2 001; POKORNY, 2 000). La vitamina C (ácido L-ascórbico) es importante como suplemento vitamínico en bebidas y como agente antioxidante para impedir la pérdida de color y aroma de alimentos envasados o para mantener la calidad nutritiva del alimento (LEE, 2 000; GUTIÉRREZ *et al.*, 2 007). La *Food and Drug Administration* (FDA, Dirección de Alimentos y Medicamentos), clasifica el ácido ascórbico sintético



como un aditivo alimenticio "generalmente reconocido como seguro". Se adiciona a una amplia variedad de alimentos, tanto por razones nutricionales como técnicas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2 007).

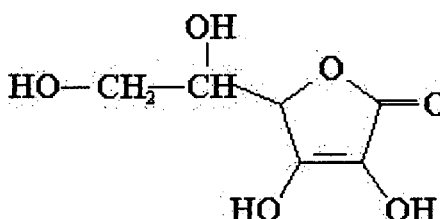


Figura 2. Estructura química del ácido ascórbico

Es una vitamina hidrosoluble, constituye uno de los agentes antioxidantes más poderosos que actúa en compartimientos celulares acuosos (PINEDA, 2 005). Su función como antioxidante se basa en su poder para suprimir el oxígeno simple reactivo, reacciona con el anión superóxido, estabiliza el radical hidroxilo y regenera la vitamina E.

Cuando se encuentra en solución, la vitamina C es fácilmente oxidable, de igual manera si es expuesta a pH alcalino, calor, oxígeno y metales como hierro y cobre (PINEDA, 2 005), el ión ascorbato fija los radicales libres al donar átomos de hidrogeno a otros radicales libres, como el radical tocoferol. Así el ascorbato actúa sinérgicamente con la vitamina E y otros antioxidantes fenólicos como BHA y BHT (MILLER, 2 001).

La absorción de la vitamina C ocurre en el duodeno, las cantidades que se ingieren en la dieta tienen una vida corta dentro del organismo, además es excretada por la orina en pequeñas cantidades, por ello debe ingerirse diariamente las dosis para llenar los requerimientos diarios, siendo esta de 60

mg para un adulto. Las frutas más ricas en vitamina C son la acerola y guayaba, aunque también se encuentra en naranja, mandarina, pomelo y vegetales como el tomate, brócoli, pimientos, espinaca y berro. La ingesta de una naranja mediana cubre casi el requerimiento diario de un adulto (PINEDA, 2 005).

Los compuestos fenólicos o polifenólicos como la catequina que se muestra en la figura 3, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados como metabolitos secundarios de numerosas especies de plantas (VILLANUEVA, 2003), son producidos por el metabolismo secundario de algunos vegetales. Su estructura base es un núcleo aromático que contiene un grupo hidroxilo libre o sustituido (PINEDA, 2 005).

Entre las funciones de los compuestos fenólicos está la de proteger al organismo contra enzimas que participan en la inflamación, pueden atrapar hierro y cobre evitando su participación en la producción de radicales libres; donan iones H<sup>+</sup> o electrones y evitan la peroxidación lipídica protegiendo a la membrana celular (PINEDA, 2 005), la actividad anticancerígena de los compuestos fenólicos se ha relacionado con la inhibición de cáncer al colon, esófago, pulmón, hígado, mama y piel (MAZZA, 2 000).

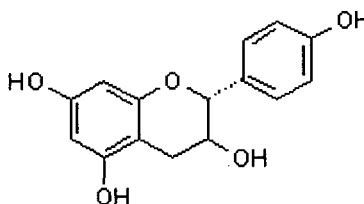


Figura 3. Estructura química de la catequina.

Otro antioxidante es el beta caroteno, precursor de la vitamina A y se halla presente sólo en los alimentos de origen vegetal como las frutas y verduras, amarillas y anaranjadas, como la naranja, el durazno, el melón, el pomelo, el mango, la zanahoria y la espinaca. Los carotenos son sensibles a la oxidación que se acelera por la presencia de luz y tienen un efecto favorable para el sistema inmunológico, protegen a la piel contra la radiación ultravioleta, poseen un efecto protector específico de los tejidos. Su función como antioxidante es detoxificar el oxígeno libre reactivo (PINEDA, 2 005).

La vitamina E, conocido también como tocoferol. En la naturaleza existen cuatro isómeros de este compuesto:  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol. La vitamina E es liposoluble, se encuentra en el interior de las membranas citoplasmáticas, actúa como bloqueador de las reacciones redox en cadena evitando la peroxidación lipídica. Se considera como factor de protección en la enfermedad cardiovascular, al evitar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Entre otras acciones la vitamina E también es capaz de neutralizar el oxígeno en singlete y peróxidos, capturar radicales hidroxilo y capturar el anión superóxido (PINEDA, 2 005)

(MAZZA, 2 000), menciona que la actividad antioxidante es uno de los modelos de acción más importantes para la prevención y retraso de la aparición de enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, incluyendo el cáncer, las enfermedades del corazón, las cataratas y las disfunciones cognitivas, también afirma que se han utilizado tradicionalmente para la

estabilización de los lípidos y podrían además aumentar la capacidad antioxidante del organismo.

## **2.6. Cromatografía líquida de alta performance**

La cromatografía es la ciencia de separar entre sí los compuestos de una sustancia (RUBINSON, K y RUBINSON, J, 2 001). La cromatografía líquida de alta performance (HPLC, de sus siglas en inglés) es la técnica de separación mas ampliamente utilizada en separaciones analíticas. Las razones de su popularidad de esta técnica es su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general (SKOOG y LEARY, 1 994). En alimentos, es utilizado como un método confirmatorio para la determinación de aditivos, contaminantes y compuestos naturales (BOVANOVA y BRANDSTETEROVÁ, 2000), además para separar, aislar, identificar y cuantificar compuestos desconocidos tales como vitaminas, proteínas y compuestos activos como flavonoides, alcaloides y esteroides en una muestra (HORIE y KOHATA, 2 000), también aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos y esteroides (SKOOG y LEARY, 1 994). Para la cuantificación de estos compuestos se utiliza estándares específicos para cada uno de ellos (HORIE y KOHATA, 2 000).

Según SKOOG y LEARY, (1994), un cromatógrafo de líquidos de alta performance, consta de los siguientes componentes fundamentales.

- Una bomba cuyo sistema sea muy riguroso, la generación de presiones deben ser por encima de 6 000 Psi, flujo libre de pulsaciones, un intervalo de caudales de 0,1 a 10 ml/min, el control y reproducibilidad del caudal mejor del 0,5% relativo y componentes resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o teflón).

- Un sistema de inyección o bucles (manual o automático) con alta precisión, que normalmente está integrado en el equipo cromatográfico y sirve para introducir la muestra en la columna.

- La columna cromatográfica, sirve para separar componentes diferentes de una sustancia, tienen una longitud entre 10 y 30 cm, diámetro interno de 4 a 10 mm y con partículas de rellenos que pueden ser de sílice, albúmina o una resina de intercambio iónico, con tamaños de 3, 5 y 10  $\mu\text{m}$ , aunque en la actualidad están fabricando columnas de menor tamaño y mayor resolución.

- Una precolumna para aumentar la vida de la columna analítica. Se coloca delante de la columna para eliminar la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes.

- Un detector, que permite detectar las especies absorbentes que eluyen de la columna, deben tener una adecuada sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad, alta fiabilidad y manejo sencillo.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se ejecutó en los laboratorios de Análisis de Alimentos y de Carnes, en el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) y en el Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM), de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en Tingo María, ubicado a 670 m.s.n.m, a 09° 17' 08" de latitud sur, a 75° 59' 52" de latitud oeste, con una temperatura y humedad relativa promedio de 24°C y 89% respectivamente, en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado y departamento de Huánuco.

#### **3.2. Materia prima y reactivos**

##### **3.2.1. Materia prima**

El Camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K Mc Vaugh), se obtuvo del centro poblado menor de Castillo Grande, fundo "Familia Sandoval", Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco.

Esta zona está ubicada a una altura de 670 m.s.n.m., una precipitación pluvial mayor a los 1,000 mm y con una temperatura anual que varía entre 22 a 36°C.

La fruta fue recolectada en cestas o canastas de plástico, teniendo en consideración lo mencionado por el CODEX ALIMENTARIO (2 003), que las

frutas que no sean aptas para consumo humano deberán separarse durante la recolección. Las frutas fueron transportadas cuidadosamente al laboratorio donde se clasificaron por estado de madurez (pintón y maduro). El parámetro que se utilizó para la clasificación del fruto fue la tonalidad del color: frutos con 70% de color verde amarillento, 30% de color rojo, fueron seleccionados como pintón (índice de madurez (IM) =  $1,96 \pm 0,02$ ), y frutos con 90% color rojo, 10 % color verde amarillento, como maduro (índice de madurez (IM) =  $2,20 \pm 0,03$ ). Los frutos se guardaron en refrigeración para preservar su calidad hasta el momento en que se procesó.

### **3.2.2. Reactivos**

2,2-Diphenyl-1-picrilhydral (DPPH; Sigma Aldrich, USA), 2,2-azinobis (3-etilenobenzotiazolino-6 ácido sulfónico) (ABTS; Sigma Aldrich, USA), 2,2-azobis-aminodinopropano (ABAP; Sigma Aldrich, USA), ácido ascórbico (Scharlau, UE), fosfato de potasio dihidrogenado (Scharlau, UE), ácido orthofosfórico (Scharlau, UE), ácido Sulfúrico (Merck KGaA), ácido clorhídrico (Merck KGaA), etanol (Merck KGaA), metanol grado de HPLC (Fisher ChemAlert Guide). (+) – Catequin (Sigma Aldrich, USA), carbonato de sodio (Scharlau, UE), fenol de Folin – Ciocalteu (Sigma Aldrich, USA), cloruro de sodio (Scharlau, UE), fosfato de sodio heptahidratado (Scharlau, UE).

### **3.2.3. Materiales y equipos**

#### **3.2.3.1. Materiales**

Se usó vasos de precipitación 50, 100, 500 ml, fiolas de 10, 100, 500 y 1000 ml, probetas 50 ml, pipetas de 10 ml, tubos de ensayo, gradillas,

termómetro de -20 a 100 °C, cubetas de poliestireno de (1cm x 1cm x 4,5 cm), micropipetas de 10 – 200 µl y de 100 – 1 000 µl, tips de 200 y 1 000 µl, tubos de prueba de 15 y 50 ml, filtro de membrana de 0.2 µm, filtros de muestra de 0.2 µm.

### 3.2.3.2. Equipos

Equipo de HPLC (Shimadzu Scientific, MD, USA.) equipado con: Bomba modelo LC-10ATVP, columna PHENOMENEX GEMINI/C-18/110A/5µm/250X46.0mm N° Serie: 280488-2, un Inyector de muestra de capacidad de 20 µl, horno de columna modelo CTO-10ASVP, detector UV-VIS modelo SPD-10AVVP, controlador modelo SCL-10AVP, software de interfase CLASS-VP Release 6.13 SP1, computador compatible USB-52X, espectrofotómetro de absorción molecular modelo Genesys 6 (Thermo, USA) y espectrofotómetro de absorción atómica modelo AA 55B (VARIAN, Australia Pty Ltd), equipado con lámparas de Zn, Fe, Mn de 5 mili amperios (mA), y de Cu con 4 mA. También se usaron balanzas analíticas modelo Scout Pro SP2001 (OHAUS) y Adventurer Pro AV114 (OHAUS), vortex, centrifuga modelo MIKRO 22R (Hettich, Alemania), potenciómetro modelo 3510 (JENWAY), congelador modelo FFV-2065FW (Frigidaire, USA), desionizador de agua modelo D-7035 (Barnstead, USA), autoclave modelo 9000 – D (Napco), rotavapor modelo R-3000 (B.U.CHI.), bomba de vacío modelo ME 2 (Vacuubrand), estufa modelo ODHG-9240A (TOMOS), pulpeador modelo MSZ 152 (BUDAPEST, Hungary), empacadora al vacío modelo A 300/16 (MULTIVAC).



### **3.3. Métodos de análisis**

#### **3.3.1. Análisis físico químico y micronutrientes**

##### **3.3.1.1. Físico químico**

- Humedad, método N° 23.003 (AOAC, 1 995).
- Proteínas, se realizó por el método de Biuret, descrito por ASQUIERI, 2 008.
- Grasa, método Bligh Dyer (ASQUIERI, 2 008).
- Fibra, método N° 930.20 (AOAC, 1 995).
- Ceniza, método N° 942.05 (AOAC, 1 995).
- Carbohidratos totales, método de Fenol sulfúrico, (ASQUIERI, 2 008).
- Azúcares totales, método descrito por (ASQUIERI *et al.*, 2 003).
- Azúcares reductores, método 3,5-Dinitrosalisílico (ASQUIERI *et al.*, 2 003).
- Sacarosa, método 3,5-Dinitrosalisílico (ASQUIERI *et al.*, 2 003).

##### **3.3.1.2. Micronutrientes**

Se realizó por el método de espectrofotometría de absorción/emisión atómica, método descrito por SANDOVAL (1 994). Los elementos analizados fueron: Cu, Fe, Zn y Mn.

Para el análisis se usó como combustible a la mezcla de aire – acetileno. Las absorbancias registradas para Zn, Fe, Mn y Cu fueron a longitudes de onda de 213,9; 248,3; 279,5 y 324,7 nm respectivamente tal como se indica en el manual del equipo.

### **3.3.2. Cuantificación de ácido ascórbico**

Se procedió de acuerdo al método descrito por GOKMEN *et al.* (2 001). Se utilizó como fase móvil una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0,2 M ajustado a un pH de 2,4 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y a una tasa de flujo (flow - rate) de 0.5 ml/min. La detección fue a una longitud de onda de 254 nm del espectro UV-VIS.

### **3.3.3. Cuantificación de polifenoles totales**

Se procedió de acuerdo al método de Folín-ciocalteu, modificado por SANDOVAL *et al.* (2 001).

Se preparó soluciones stock de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y (+)-Catequina a 10mM (0,0296g en 10 ml de metanol grado reactivo (95%)). A partir del stock de catequina se preparó concentraciones de 100, 300, 1 000, 3 000 y 10 000  $\mu\text{M}$ .

A cada tubo se agregó 1,58 ml de agua destilada desionizada ( $\text{H}_2\text{O}$  dd) y 20  $\mu\text{l}$  de cada estándar, control ( $\text{H}_2\text{O}$  dd) y de la muestra. Se homogenizó ligeramente y se agregó 100  $\mu\text{l}$  de solución de Folín-Ciocalteu, se volvió a homogenizar ligeramente y se incubó por 1 minuto a temperatura de ambiente, se neutralizó la reacción adicionando 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y se incubó por

2 horas a temperatura ambiente para una completa reacción. Las lecturas se realizaron a 700 nm del espectro UV-VIS.

### **3.3.4. Cuantificación de catequina**

Se procedió de acuerdo al método descrito por DING *et al.* (1 999). Se usó como fase móvil a una solución de metanol, agua y ácido acético (30:70:01 v/v) y la tasa de flujo (flow-rate) fue modificada de 1ml/mim a 0.8 ml/mim. La detección se realizó a una longitud de onda de 270 nm del espectro UV-VIS.

### **3.3.5. Evaluación de la actividad antioxidante**

#### **3.3.5.1. Radical 2,2-diphenyl-picrilhydrazyl (DPPH)**

Se procedió de acuerdo al método descrito por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1 995), de inhibición del radical DPPH, modificado por SANDOVAL *et al.* (2 002).

Se preparó una solución stock de DPPH a 1mM (0,004g de DPPH en 10 ml de metanol grado reactivo (95%)) y se almacenó a 4°C protegido de la luz. A partir de este stock se preparó una solución de trabajo de DPPH (100  $\mu$ M) que sirvió para hacer reaccionar con las muestras. La inhibición del radical DPPH fue determinado por la adición de 25  $\mu$ l a 975  $\mu$ l de la solución stock del radical DPPH (100  $\mu$ M), inmediatamente se procedió a las lecturas de absorbancia a 414 nm cada 15 s por 5 min. A medida que hay un mayor secuestro de los radicales por un antioxidante, la absorbancia disminuye. La capacidad de secuestro fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = [(A_c - A_{m(t)}) / A_c] \times 100 \quad (1)$$

**Donde:**

**A<sub>c</sub>** : Absorbancia del control, DPPH (100 μM)

**A<sub>m(t)</sub>** : Absorbancia de la muestra en función a tiempo (5 min)

A partir de porcentaje de inhibición obtenido, se determinó el coeficiente de inhibición para el radical DPPH (IC<sub>50</sub>).

### 3.3.5.2. Radical peroxilo

Se procedió de acuerdo al método de TRAP (poder total de actividad reductora), modificado por SANDOVAL *et al.* (2002).

Se preparó soluciones stock en agua destilada desionizada (H<sub>2</sub>O dd) de ABTS a 2,25 mM y ABAP a 20 mM, también se preparó una solución buffer fosfato a pH 7,4 (PBS) con cloruro de sodio (NaCl) a 154 mM, fosfato de sodio heptahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) a 2,7 mM y fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 1,5 mM. La preparación de radical peroxilo consistió en mezclar 10 ml de solución de ABTS, 10 ml ABAP y 80 ml de PBS (pH 7,4), se incubó a 70°C en baño maría por 20 minutos y se dejó enfriar sobre hielo durante 5-10 minutos. La Inhibición del radical peroxilo fue determinado por la adición de 10 μl a 990 μl de la solución stock del radical peroxilo, inmediatamente se procedió a las lecturas de absorbancia a 414 nm cada 15 s por 5 min. La capacidad de secuestro fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición radical peroxilo} = [(A_c - A_{m(t)}) / A_c] \times 100 \quad (2)$$

**Donde:**

$A_c$  : Absorbancia del control, radical peroxilo

$A_{m(t)}$  : Absorbancia de la muestra en función al tiempo (5 min)

A partir del porcentaje de inhibición obtenido, se determinó el coeficiente de inhibición para el radical peroxilo ( $IC_{50}$ ).

### **3.3.6. Análisis microbiológicos**

Los análisis realizados para determinar la carga microbiana en pulpa concentrada de camu camu, al final del almacenamiento, fueron: Coliformes totales, coniformes fecales, E-coli y mohos y levaduras (AOAC, 1998).

## **3.4. Metodología**

### **3.4.1. Proceso para la obtención de pulpa concentrada de camu camu**

Los frutos de camu camu, fueron procesados siguiendo las operaciones indicadas en la figura 1 que se describen a continuación.

#### **3.4.1.1. Cosecha**

Los frutos de camu camu se cosecharon manualmente por la mañana entre los meses de abril y mayo, y se procedió según lo mencionado en el ítem correspondiente a materia prima.

#### **3.4.1.2. Clasificado**

Se clasificó en dos grupos experimentales; el primer grupo, frutos de camu camu pintón y el segundo, frutos de camu camu maduro. Los parámetros pintón y maduro se establecieron por la tonalidad del color del fruto, mencionadas en el ítem correspondiente a materia prima.

#### **3.4.1.3. Lavado**

Los frutos pintones y maduros fueron lavados por separados con agua blanda con la finalidad de eliminar impurezas y parte de los microorganismos adheridos a la fruta.

#### **3.4.1.4. Pulpeado**

Una vez lavados los frutos, se procedió a pulpear. Para esta operación se utilizó un tamiz de 1mm de luz. En esta operación los frutos ingresaron al pulpeador íntegros, el cual por medio del tamiz separó semillas y parte de la cascara de los frutos. Parte de la pulpa de ambos estados madurez (EP y EM), se separó para analizar ácido ascórbico, y se envasó en bolsas de polietileno y se almacenó en congelación entre -15 a -10°C.

#### **3.4.1.5. Concentrado**

Inmediatamente después de haber pulpeado, se procedió a concentrar la pulpa en sus dos estados de madurez (pintón y maduro). Se utilizó un rotavapor al cual se le adaptó una bomba de vacío. Se añadió 200g de pulpa de camu camu en el balón 1, que está inclinado en un ángulo de 30-35° aproximadamente, que éste a su vez rota para homogenizar la muestra. Se concentró hasta un 60% p/p de su peso inicial, a una temperatura de 50°C y

una presión de vacío constante de 24 pulg-Hg lo cual fue medido con un vacuómetro.

#### **3.4.1.6. Envasado**

La pulpa concentrada obtenida de ambos estados de madurez (pintón y maduro), fue envasada a vacío en bolsas de polietileno de 4 mm de espesor con la empacadora a vacío a presión de 100 milibares (mb) por 2 s.

#### **3.4.1.7. Almacenado**

Se protegió de la luz cubriendo las bolsas con papel aluminio y se almacenó a temperatura de congelación en un rango de -15 a -10°C, para preservar sus componentes nutricionales como la vitamina C.

Para la pulpa concentrada de ambos estados de madures (pintón y maduro), se le dividió a cada uno tres grupos para ser evaluada en almacenamiento. Los tratamientos para la pulpa concentrada de camu camu pintón son T1 = 0 días, T2 = 30 días, T3 = 60 días y para la pulpa concentrada de camu camu maduro es T4 = 0 días, T5 = 30 días y T6 = 60 días de almacenamiento.

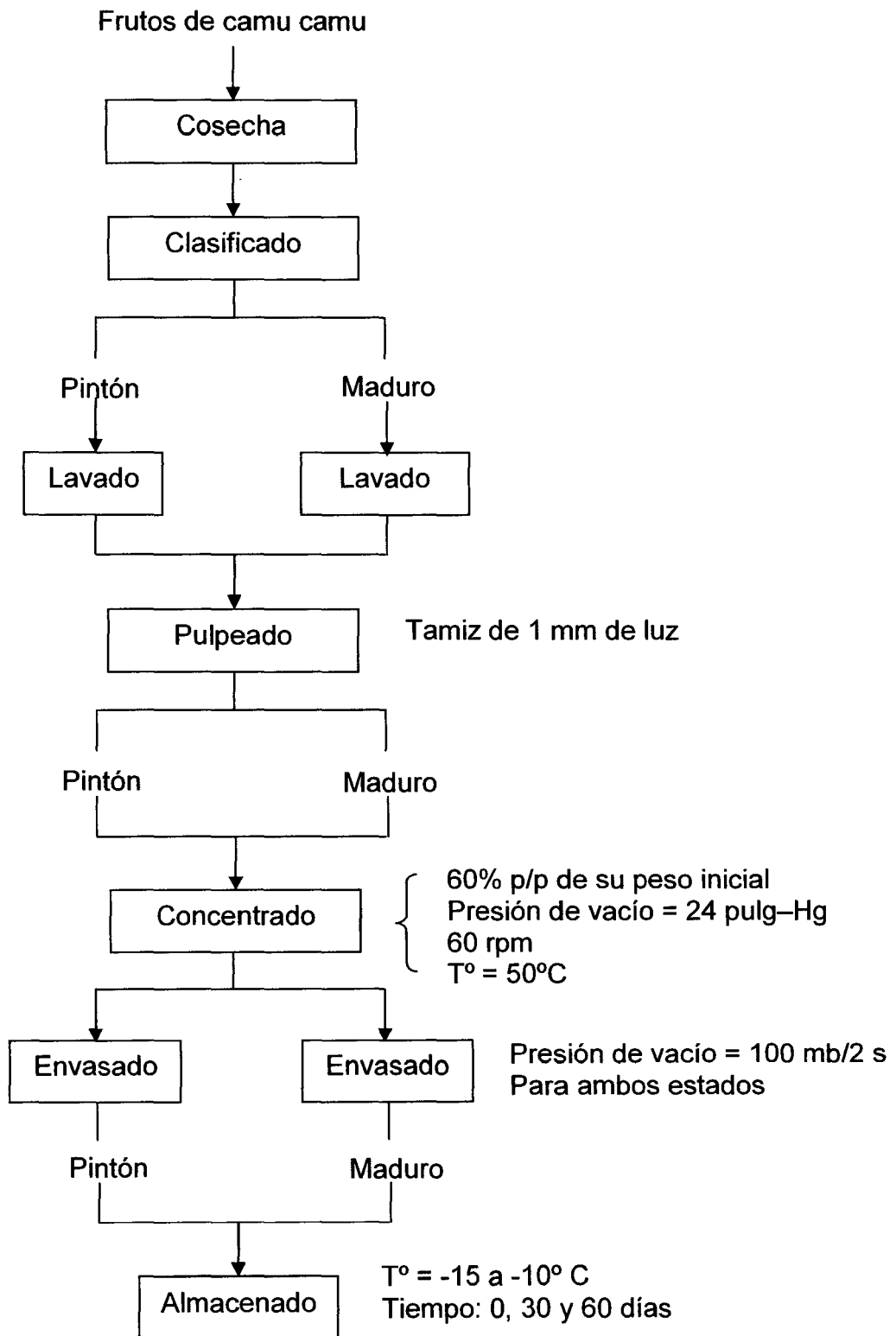


Figura 4. Flujograma de proceso para la obtención de pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.



### **3.4.2. Caracterización fisicoquímica y micronutrientes**

#### **3.4.2.1. Análisis fisicoquímico**

En las determinaciones fisicoquímicas de la pulpa concentrada de camu camu, se consideró: humedad, proteína, grasa, ceniza, carbohidratos totales, °Brix, pH, acidez titulable, azúcares reductores, totales y sacarosa.

#### **3.4.2.2. Determinación de micronutrientes**

##### **3.4.2.2.1. Preparación de los estándares**

Se partió de los estándares de Zn, Fe, Mn y Cu de 1 000 ppm o  $\mu\text{g/ml}$ . Se preparó diluciones con agua desionizada a diversas concentraciones como se muestra en el cuadro 4. Se prepararon según la sensibilidad del método especificado en el manual del equipo.

Para cada corrida de estándar se registró con exactitud las absorbancias, con ello se levantó una curva patrón y se obtuvo una ecuación que esta a su vez sirvió para estimar la cantidad del mineral.

Cuadro 4. Concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$  preparadas a partir de los estándares de Zn, Fe, Mn y Cu, de 1 000  $\mu\text{g/ml}$ .

Niveles	Zn ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fe ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mn ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cu ( $\mu\text{g/ml}$ )
0	0	0	0	0
1	0,1	0,1	0,1	0,1
2	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,5	3,0	2,0	3,0
4	2,0	5,0	3,0	10,0
5	-	15,0	5,0	12,0

#### 3.4.2.2.2. Preparación de la muestra

La pulpa concentrada de camu camu, fue separada en alícuotas 1.5 ml en micro tubos, luego centrifugadas a 10 000 rpm por 5 min a una temperatura de 4°C. Después de centrifugar se separó el sobrenadante y a partir de ello se realizó las diluciones respectivas. Las absorbancias registradas se reemplazaron en la ecuación obtenida con el estándar, que sirvió para estimar la cantidad del mineral. (g/Kg) presente en la pulpa concentrada de camu camu.

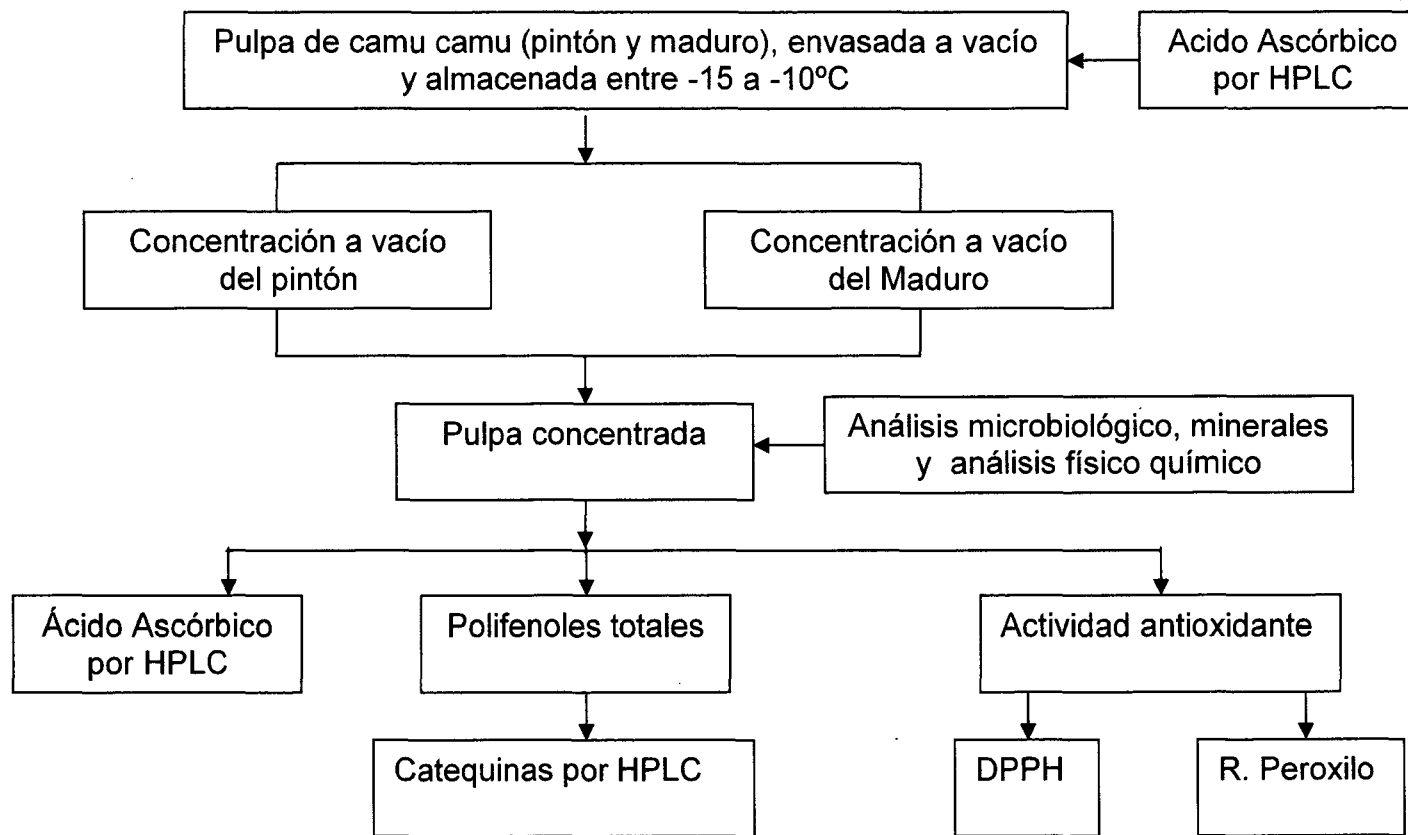


Figura 5. Metodología para determinar el contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales, catequina y la actividad antioxidante de pulpa concentrada de camu camu.

### **3.4.3. Cuantificación de ácido ascórbico de pulpa concentrada de camu camu**

#### **3.4.3.1. Determinación de la curva patrón**

Antes de ser inyectadas las muestras en el HPLC se calibró el instrumento con el estándar de ácido ascórbico (AA). El estándar fue disuelto en H<sub>2</sub>O destilada desionizada (dd) microfiltrada de calidad HPLC. Se preparó un stock de 100 µg/ml, disolviendo 10 mg de AA en 100 ml de agua dd y microfiltrada. A partir del stock se preparó concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml que fueron usados para levantar la curva estándar. Después de la inyección de cada concentración del estándar, se registró con exactitud y precisión el tiempo de retención ( $t_R$ ), (también referido como tiempo de salida de la muestra de la columna), mili unidades de absorbancia (mUA) y el área debajo la curva ( $A_c$ ).

#### **3.4.3.2. Cuantificación de ácido ascórbico**

La pulpa de camu camu fue separada en alícuotas 1,5 ml en microtubos, luego centrifugadas a 10 000 rpm por 5 min a una temperatura de 4°C. Se separó el sobrenadante y se filtró con microfiltros de 0,2 µm antes de ser inyectados al HPLC.

Para cuantificar el contenido de ácido ascórbico de cada muestra se tomaron valores de mUA, teniendo en cuenta el tiempo de retención, y se reemplazó en la ecuación de la curva patrón y se estimó la cantidad de ácido ascórbico en mgAA/100g de pulpa concentrada de camu camu.

### 3.4.4. Cuantificación de polifenoles totales en pulpa concentrada de camu camu

#### 3.4.4.1. Determinación de la curva patrón

Para determinar la curva patrón, procedió de acuerdo a la metodología descrito en los métodos de análisis. La preparación de los estándares se describen en el cuadro 5, partiendo de la solución stock de (+)-Catequina a 10mM. Con las absorbancias del estándar versus concentración se construyó una curva patrón.

Cuadro 5. Preparación de los estándares de (+)-catequina.

Niveles	Cat ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{met}}$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_{\text{cat}}$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_{\text{F}}$
0	0	1 000	0	1 000
1	100	990	10	1 000
2	300	970	30	1 000
3	1 000	900	100	1 000
4	3 000	700	300	1 000
5	10 000	0	1000	1 000

Donde:

$V_{\text{met}}$  : Volumen en  $\mu\text{l}$  de metanol.

$V_{\text{cat}}$  : Volumen en  $\mu\text{l}$  de 10mM (+)-Catequin (estándar).

$V_{\text{F}}$  : Volumen final.

### **3.4.4.2. Cuantificación de polifenoles totales**

Para determinar la cantidad de polifenoles totales producidos durante la reacción, se procedió de acuerdo a la metodología descrito en los métodos de análisis. Las absorbancias registradas de las muestras de pulpa concentrada de camu camu fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar, obteniendo la cantidad de polifenoles totales expresados en (mgCAT/g) presentes en la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.

### **3.4.5. Cuantificación de catequina en pulpa concentrada de camu camu**

#### **3.4.5.1. Determinación de la curva patrón**

Antes de ser inyectadas las muestras en el HPLC, se calibró el equipo con el estándar de catequina (CAT). 0,0148g de CAT fue disuelto en 10 ml de metanol grado HPLC obteniendo un stock de catequina a 5 000  $\mu\text{M}$ , a partir de ello se prepararon soluciones de CAT a 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{M}$  que fueron usados para levantar la curva estándar. Las alícuotas de la solución stock fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para preservar su estabilidad y calidad. De cada pico del estándar se registró con exactitud y precisión el tiempo de retención ( $t_R$ ) (también referido como tiempo de salida de la muestra de la columna), los mili unidades de absorbancia (mUA) y el área debajo la curva ( $A_c$ ), se construyó una curva patrón con mUA versus concentración ( $\mu\text{M}$ ) del estándar.

### **3.4.5.2. Cuantificación de catequina**

La pulpa de camu camu fue separada en alícuotas 1,5 ml en microtubos, luego centrifugadas a 10 000 rpm por 5 min a una temperatura de 4°C. Se separó el sobrenadante y se filtró con microfiltros de 0,2 µm antes de ser inyectados al HPLC.

Para la cuantificación de catequina de cada muestra se tomaron valores de mUA, teniendo en cuenta el tiempo de retención, y se reemplazó en la ecuación de la curva patrón y se estimó la cantidad de catequina en mgCAT/g de pulpa concentrada de camu camu.

### **3.4.6. Determinación de la actividad antioxidante en pulpa concentrada de camu camu**

#### **3.4.6.1. Radical 2,2-diphenyl-picrilhydrazyl (DPPH)**

El procedimiento para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el radical DPPH se muestra en la figura 5.

Para la preparación de la muestra se separaron alícuotas de pulpa concentrada en microtubos de 1,5 ml, se centrifugó a 10 000 rpm/5min y del sobrenadante se prepararon soluciones de trabajo (soluciones intermedias) a concentraciones de 0,2; 0,6; 2 mg/ml para la pulpa concentrada de camu camu pintón y 0,06; 0,2 y 0,6 mg/ml para la pulpa concentrada de camu camu maduro.

A partir de cada una de las concentraciones se tomó 25 µl y se hizo reaccionar con 975 µl DPPH (100µM) en una cubeta, para obtener

concentraciones finales de 5, 15 y 50  $\mu\text{g/ml}$  para la pulpa concentrada de camu camu pintón y 1,5; 5 y 15  $\mu\text{g/ml}$  de pulpa concentrada de camu camu maduro, como se observa en el cuadro 6.

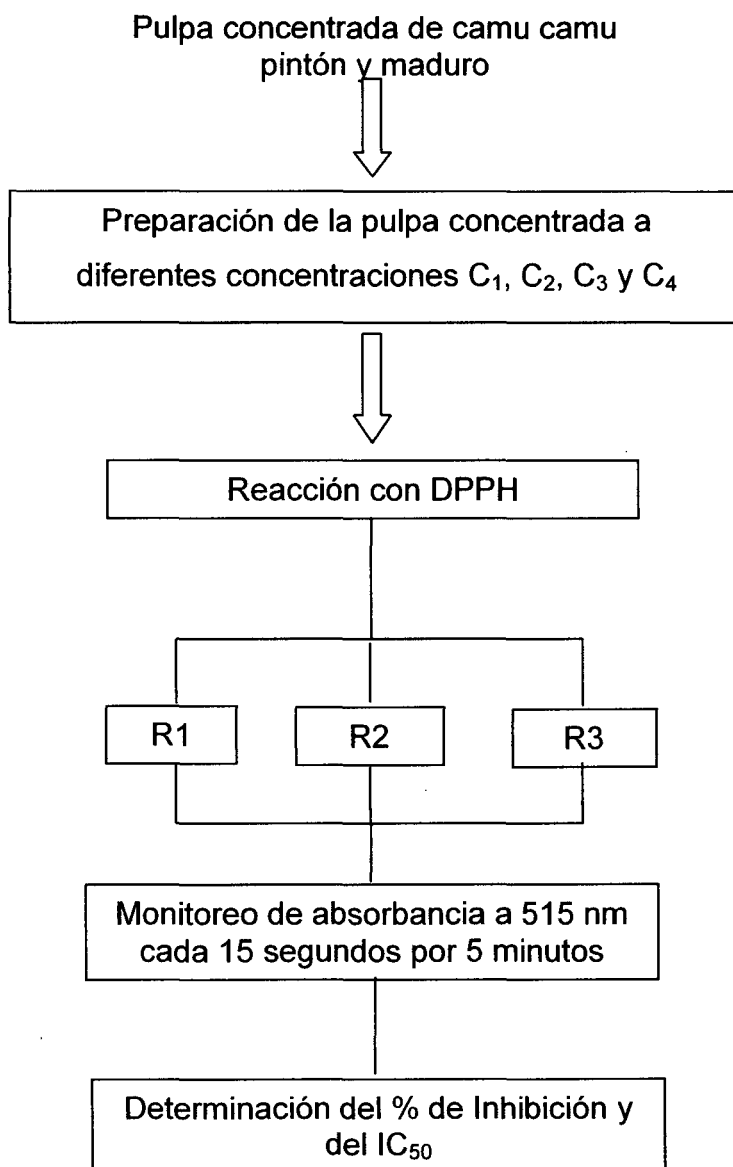
Cuadro 6. Preparación de las reacciones de pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez frente al DPPH.

<b>Pintón</b>	<b>Maduro</b>	<b>Solución de trabajo</b>	<b>DPPH 100 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Vol. final</b>
<b>(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>		<b>(<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>(<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>(<math>\mu\text{l}</math>)</b>
5	1,5	25	975	1 000
15	5	25	975	1 000
50	15	25	975	1 000

El radical DPPH inicia una decoloración de violeta a amarillo inmediatamente después reaccionar con la muestra, esto se refleja en la absorbancia que es medido a 515 nm cada 15 s por 5 min. A medida que hay un mayor secuestro de los radicales por un antioxidante, la absorbancia disminuye. La capacidad de secuestro fue determinado por la ecuación 1, descrita en los métodos de análisis.

El porcentaje de inhibición obtenido con cada una de las concentraciones de las muestras de pulpa concentrada de camu camu, fue utilizado para determinar el coeficiente de inhibición ( $\text{IC}_{50}$ ) para el radical DPPH. Este coeficiente indica la cantidad de pulpa concentrada de camu camu maduro o pintón en  $\mu\text{g/ml}$ , requerido para inhibir el 50 % del radical libre DPPH.





Leyenda:

C<sub>i</sub>: (i=1,2,3,4 y 5) : Concentración (µg/ml)

R<sub>i</sub>: (i= 1,2 y 3) : Repeticiones

Figura 6. Metodología empleada para evaluar la actividad antioxidante de pulpa concentrada de camu camu por el método del radical DPPH.

### 3.4.6.2. Radical peroxilo

El procedimiento para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el radical DPPH se muestra en la figura 6.

Para la preparación de la muestra se separaron alícuotas de pulpa concentrada en microtubos de 1,5 ml, se centrifugó a 10 000 rpm por 5min y del sobrenadante se prepararon soluciones de trabajo (soluciones intermedias) a concentraciones de 0,05; 0,15; 0,5; 0,7 y 1,5 mg/ml para la pulpa concentrada de camu camu pintón y de 0,05; 0,15 y 0,5 mg/ml para la pulpa concentrada de camu camu maduro.

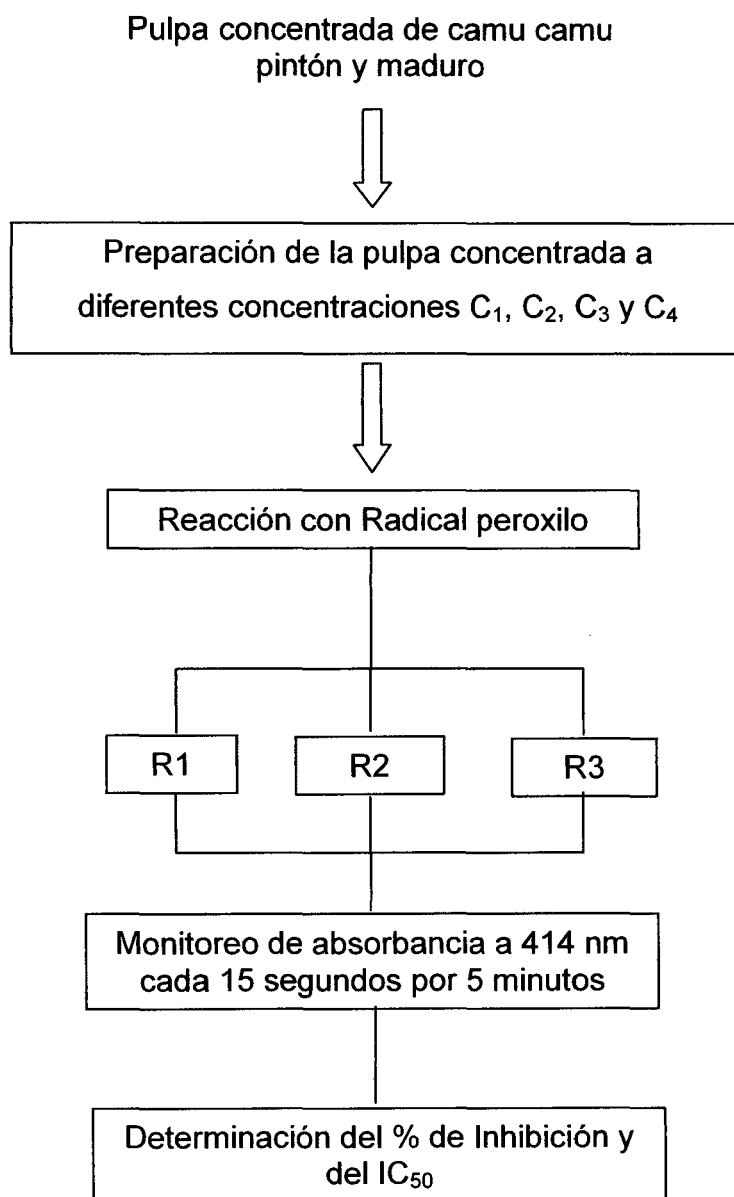
A partir de cada una de estas concentraciones se tomó 10  $\mu$ l y se hizo reaccionar con 990  $\mu$ l del radical peroxilo para obtener concentraciones finales en la cubeta de 0,5; 1,5; 5 y 7  $\mu$ g/ml para la pulpa concentrada de camu camu pintón y de 0,5; 1,5; y 5  $\mu$ g/ml para la pulpa concentrada de camu camu maduro como se muestra en el cuadro 7.

Cuadro 7. Preparación de las reacciones de pulpa concentrada de camu camu maduro y pintón frente al radical peroxilo.

<b>Pintón</b>	<b>Maduro</b>	<b>Solución de trabajo</b>	<b>Radical peroxilo</b>	<b>Vol. final</b>
<b>(<math>\mu</math>g/ml)</b>		<b>(<math>\mu</math>l)</b>	<b>(<math>\mu</math>l)</b>	<b>(<math>\mu</math>l)</b>
0,5	0,5	10	990	1 000
1,5	1,5	10	990	1 000
5	5	10	990	1 000
7	-	10	990	1 000

El radical peroxilo inicia una decoloración de verde a blanco, inmediatamente después de reaccionar con la muestra, esto se refleja en la absorbancia que es medido a 515 nm cada 15 s por 5 min. A medida que hay un mayor secuestro de los radicales por un antioxidante, la absorbancia disminuye. La capacidad de secuestro fue determinado por la ecuación 2, descrita en los métodos de análisis.

El porcentaje de inhibición obtenido con cada una de las concentraciones de las muestras de pulpa concentrada de camu camu, fue utilizado para determinar el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) para el radical peroxilo. Este coeficiente indica la cantidad de pulpa concentrada de camu camu maduro o pintón en  $\mu\text{g/ml}$ , requerido para inhibir el 50 % del radical peroxilo.



Leyenda:

C<sub>i</sub>: (i=1,2,3,4 y 5) : Concentración (µg/ml)

R<sub>i</sub>: (i= 1,2 y 3) : Repeticiones

Figura 7. Metodología empleada para evaluar la actividad antioxidante de pulpa concentrada de camu camu por el método del radical peroxilo.

### **3.4.7. Análisis microbiológico**

Para realizar el análisis de bacterias coliformes, se siguió el método de número más probable (NMP), y para ello se realizó la prueba presuntiva y confirmativa.

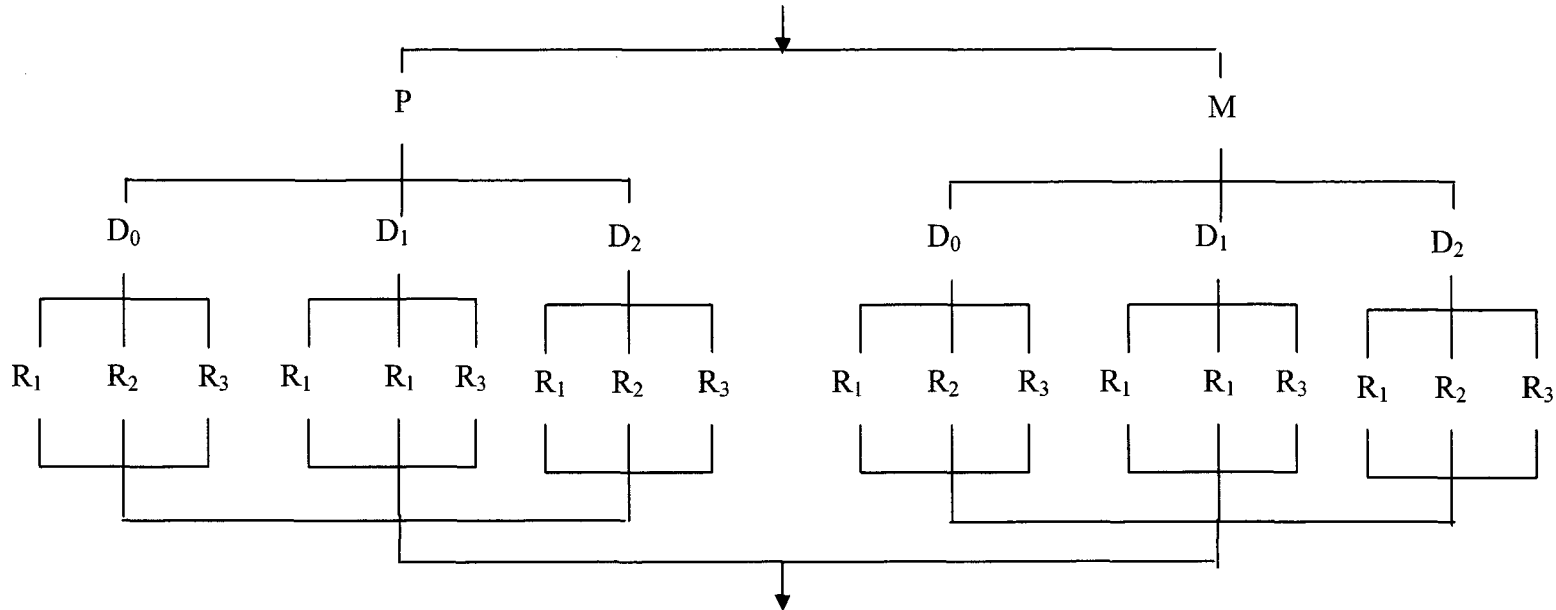
En el ensayo presuntivo, se partió de la muestra original y se inoculó 1 ml en tubos conteniendo caldo lactosado verde brillante bilis al 2% (BRILA) concentrado, y provistos de campanas de durham, también se realizó diluciones de la muestra de 1/10 y 1/100 en agua peptonada, y se inoculó 1 ml de cada dilución en los tubos con caldo BRILA. La incubación se realizó a temperatura de 35 a 37°C por 24 a 48 horas, trascurrido este tiempo se realizaron las lecturas de los tubos. Se consideran los tubos positivos, cuando estos presentan turbidez y gas.

El ensayo confirmativo comprende el análisis de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, y se realizó a partir de los tubos positivos y también de los negativos (esto sólo para descartar los falsos negativos).

Para realizar el análisis de mohos y levaduras, se precedió de la siguiente manera: de la muestra y de las diluciones respectivas, se tomó 1 ml y se inoculó en las placas de petri estériles y vacías, en seguida se adicionó a cada placa petri 10 a 15 ml del agar oxitetraciclina extracto de levadura glucosa (OGY) licuado y atemperado a 44 a 45°C. Se incubaron a temperatura de 24 a 24°C por 3 a 5 días, luego se realizó la lectura correspondiente de las colonias, con la ayuda de un cuenta colonias.

### 3.5. Diseño experimental

Pulpa concentrada de camu camu, envasada al vacío y almacenada en congelación (-15 a -10°C)



Acido ascórbico (AA), Polifenoles totales (PT), Catequinas (CAT), DPPH y Radical peroxilo.

Donde: P y M: Pulpa concentrada de camu camu en estados de madurez (Pintón y Maduro)

D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>: Días de evaluación (D<sub>0</sub> = Día 0, D<sub>1</sub> = Día 30, D<sub>2</sub> = Día 60)

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: Repeticiones

Figura 8. Diseño experimental empleado para evaluar de la actividad antioxidante en pulpa concentrada de camu camu.

En el diseño experimental (figura 8), los tratamientos identificados fueron los siguientes:

- T1: Pintón (Día 0)
- T2: Pintón (Día 30)
- T3: Pintón (Día 60)
- T4: Maduro (Día 0)
- T5: Maduro (Día 30)
- T6: Maduro (Día 60)

Las variables dependientes e independientes identificadas del presente estudio fueron:

- Los resultados de los análisis de AA, CAT, PT, DPPH y Radical peroxilo; como variables dependientes
- P (Estado pintón), M (Estado maduro), D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>; como variables independientes

### **3.6. Análisis estadístico**

#### **3.6.1. Análisis de regresión lineal**

Los datos de absorbancias registradas para los modelos in vitro del radical DPPH y radical peroxilo, fueron sometidos a un análisis de regresión lineal para determinar el coeficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>) de cada muestra (SANDOVAL *et al.*, 2 002 y BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1 995). Asimismo los datos obtenidos con los estándares de ácido ascórbico y catequina también fueron sometidos a regresión lineal, cuya ecuación sirvió para determinar el

contenido de estos compuestos que están presentes en la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.

### **3.6.2. Estadística descriptiva**

Los resultados obtenidos de los análisis de ácido ascórbico, polifenoles totales, catequinas y actividad antioxidante, fueron expresados como promedio  $\pm$  error estándar (ES) (SANDOVAL *et al.*, 2 002)

### **3.6.3. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de los análisis realizados, fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANVA), con un arreglo factorial de 2\*3 y con tres repeticiones. Para determinar la significancia que existe entre los tratamientos evaluados, se usó para ello la prueba Tukey con un límite de significancia de  $p < 0,05$  (MONTGOMERY, 2 004). Para realizar dicho análisis se utilizó el software de STATGRAPHICS Plus versión 5.1, 2 004 (Statistical Graphics Corp.).



## IV. RESULTADOS

### 4.1. Proceso para la obtención de pulpa concentrada de camu camu; rendimiento y características sensoriales

Se procedió según el flujograma de la figura 4, realizándose un control del peso en todo el proceso, el cual se detalla en el balance de materia de la figura 9.

En el cuadro 8, se muestra el rendimiento y algunas características sensoriales de la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.

Cuadro 8. Rendimiento y características sensoriales de pulpa concentrada de camu camu obtenida en dos estados de madurez.

<b>Estado de madurez</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Color</b>	<b>Consistencia</b>
Pitón	34,93	Mostaza claro	Pastosa y poco espesa
Maduro	37,36	Rosado claro	Pastosa y bien espesa

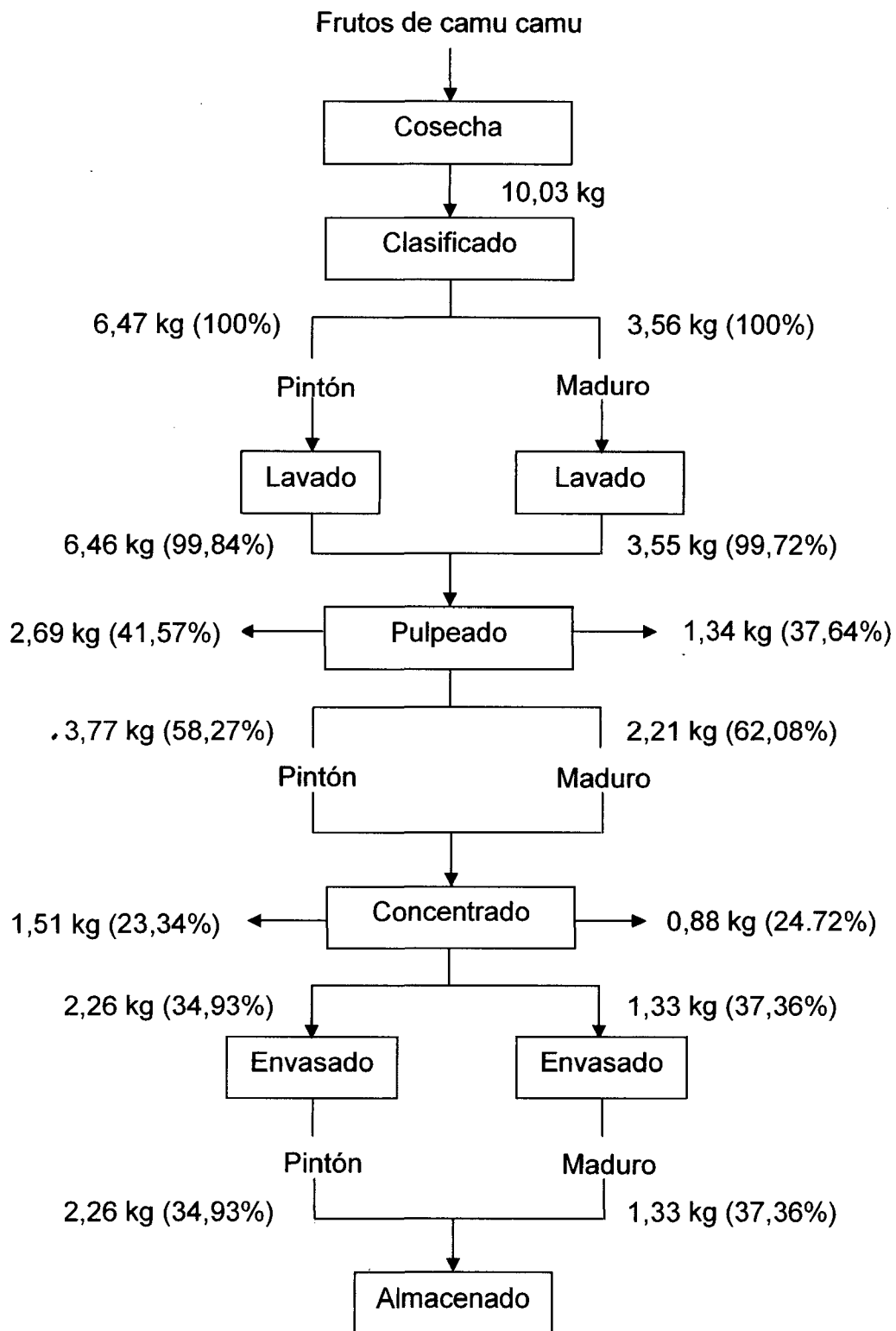


Figura 9. Flujograma y balance de materia para la obtención de pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.

## 4.2. Caracterización fisicoquímica y micronutrientes de pulpa concentrada de camu camu

### 4.2.1. Análisis fisicoquímica

En el cuadro 9, se muestra los resultados.

Cuadro 9. Composición fisicoquímica de pulpa concentrada de camu camu.

Análisis	Estado de madurez	
	Pintón	Maduro
Humedad (%)	87,63 ± 0,25 <sup>a</sup>	83,16 ± 0,03 <sup>b</sup>
Proteína (%)	0,93 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,19 ± 0,04 <sup>a</sup>
Grasa (%)	0,34 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>
Fibra (%)	0,35 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,44 ± 0,014 <sup>a</sup>
Ceniza (%)	0,39 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,54 ± 0,01 <sup>a</sup>
Carbohidratos totales (%)	4,58 ± 0,24 <sup>b</sup>	8,04 ± 0,26 <sup>a</sup>
Azúcares totales (%)	3,61 ± 0,05 <sup>b</sup>	6,34 ± 0,09 <sup>a</sup>
Azúcares reductores (%)	3,46 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,30 ± 0,07 <sup>a</sup>
Sacarosa (%)	0,15 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,99 ± 0,04 <sup>a</sup>
Acidez (%)	4,81 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,64 ± 0,02 <sup>b</sup>
Acidez (%) *	2,82 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,10 ± 0,02 <sup>a</sup>
°Brix	11,93 ± 0,30 <sup>b</sup>	15,60 ± 0,32 <sup>a</sup>
°Brix *	5,52 ± 0,04 <sup>b</sup>	6,83 ± 0,04 <sup>a</sup>
pH	2,76 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,83 ± 0,02 <sup>a</sup>
pH *	2,30 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,36 ± 0,05 <sup>a</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. Valores en la misma fila con diferentes superíndices son significativos (p<0,05). \* Valores obtenidos con pulpa fresca.

#### 4.2.2. Determinación de micronutrientes

En el cuadro 10 y en la figura 10, se muestran los resultados.

Cuadro 10. Contenido de minerales en pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.

Componentes	Pintón	Maduro
	mg/kg	
Cu	1,99 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>b</sup>
Fe	2,10 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,10 <sup>b</sup>
Mn	0,85 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,03 <sup>a</sup>
Zn	13,41 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,78 ± 0,03 <sup>b</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. Valores en la misma fila con diferentes superíndices son significativos ( $p < 0,05$ ).

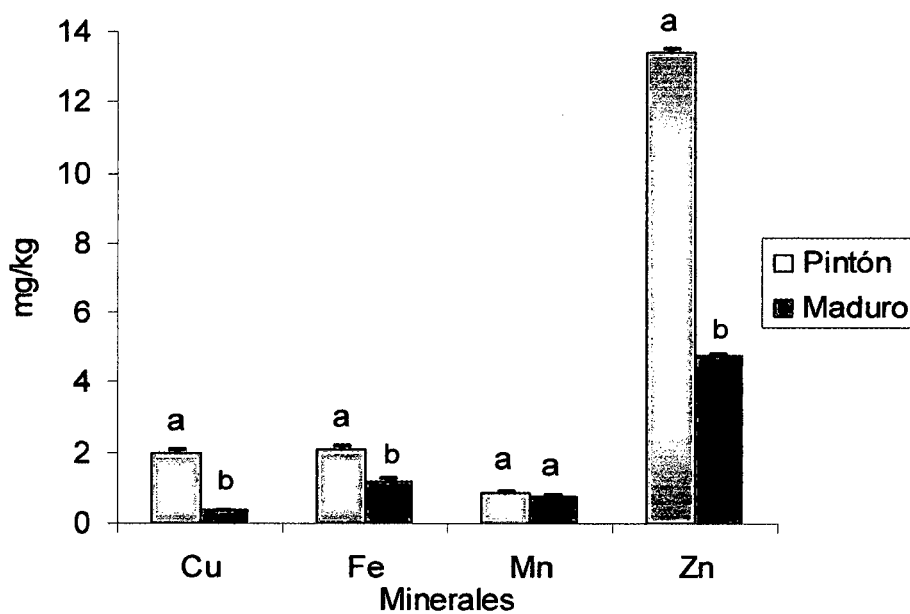


Figura 10. Contenido de micronutrientes en pulpa concentrada de camu camu.

### 4.3. Cuantificación de ácido ascórbico en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre $-15$ a $-10^{\circ}\text{C}$

#### 4.3.1. Determinación de la curva patrón de ácido ascórbico (AA)

En la figura 11, se muestra la curva estándar obtenida con el estándar de AA a concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g/ml}$ , y en la figura 12, se muestra el cromatograma HPLC, obtenido al inyectar 20  $\mu\text{l}$  de AA a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

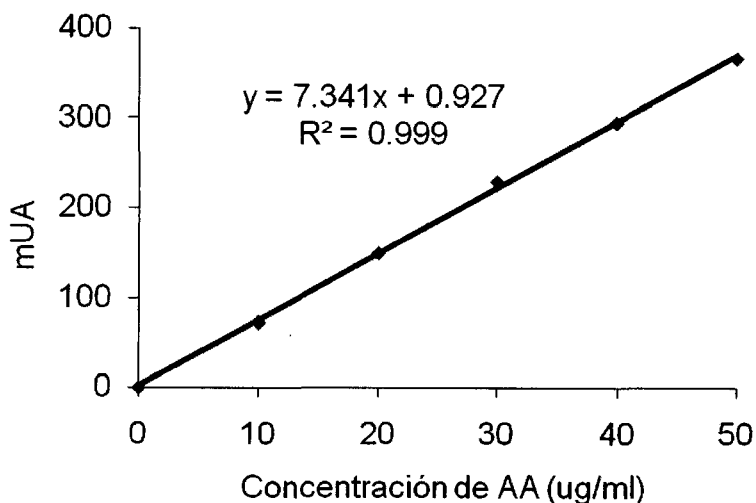


Figura 11. Curva estándar de ácido ascórbico

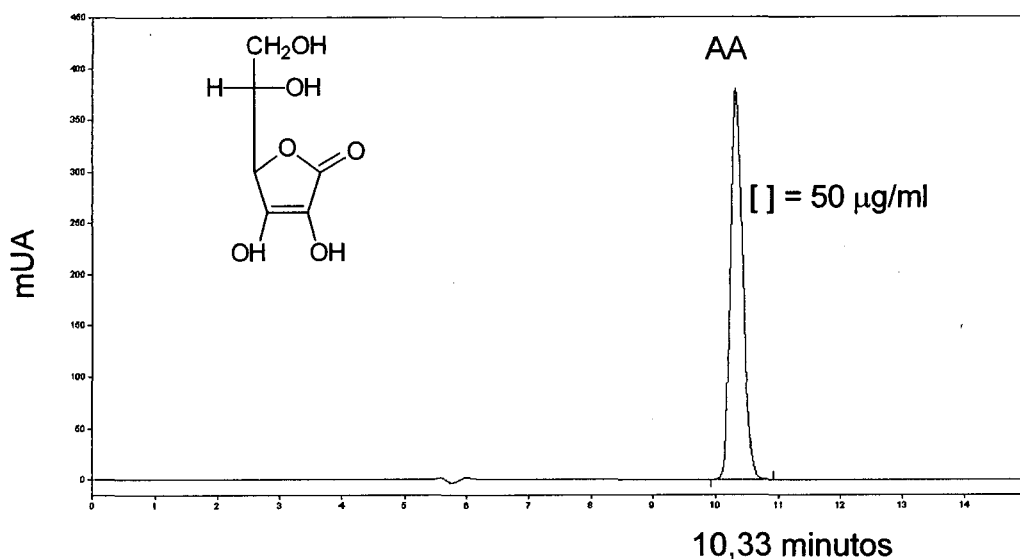


Figura 12. Cromatograma HPLC del estándar de ácido ascórbico a 50 µg/ml, vol. 20µl. Muestra representativa de n=3.

#### 4.3.2. Eficiencia del proceso del concentrado de pulpa de camu camu en el contenido de ácido ascórbico.

En el cuadro 11, se muestra los resultados.

Cuadro 11. Eficiencia del proceso de concentrado de pulpa de camu camu en el contenido de ácido ascórbico.

Estado de madurez	mg AA/100g		Incremento	
	Sin concentrar	Concentrado	(%)	IM
<b>Pintón</b>	1 431,72 ± 51,97	2 041,01 ± 29,68	29,76 ± 3,46	1,43 ± 0,07
<b>Maduro</b>	1 858,65 ± 63,85	2 824,12 ± 41,80	34,22 ± 1,27	1,52 ± 0,03

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. AA: ácido ascórbico. IM: Incremento multiplicativo.

### 4.3.3. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por estado de madurez

En el cuadro 12 y en la figura 13 se muestran los resultados, también en la figura 14, se muestra el cromatograma HPLC de la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.

Cuadro 12. Contenido de ácido ascórbico en mgAA/100g de pulpa concentrada, por estado de madurez en almacenamiento.

Estado de madurez	Almacenamiento (Días)		
	0	30	60
<b>Pintón</b>	2 041,01 ± 29,68 <sup>b</sup>	1 835,11 ± 40,57 <sup>b</sup>	1 865,11 ± 30,46 <sup>b</sup>
<b>Maduro</b>	2 824,12 ± 41,80 <sup>a</sup>	2 950,56 ± 33,15 <sup>a</sup>	2 771,36 ± 43,43 <sup>a</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. AA: Acido ascórbico. Valores en la misma columna con diferente superíndice son significativos (p<0,05).

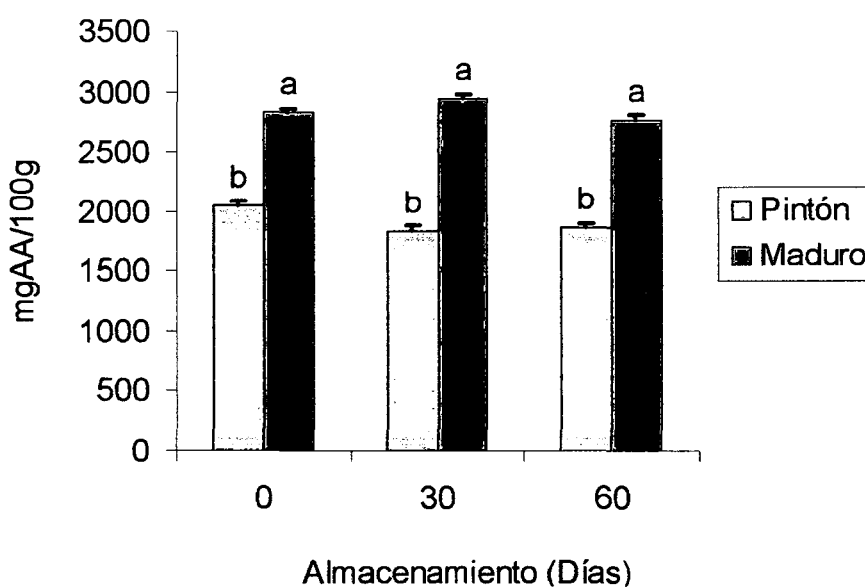


Figura 13. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento.

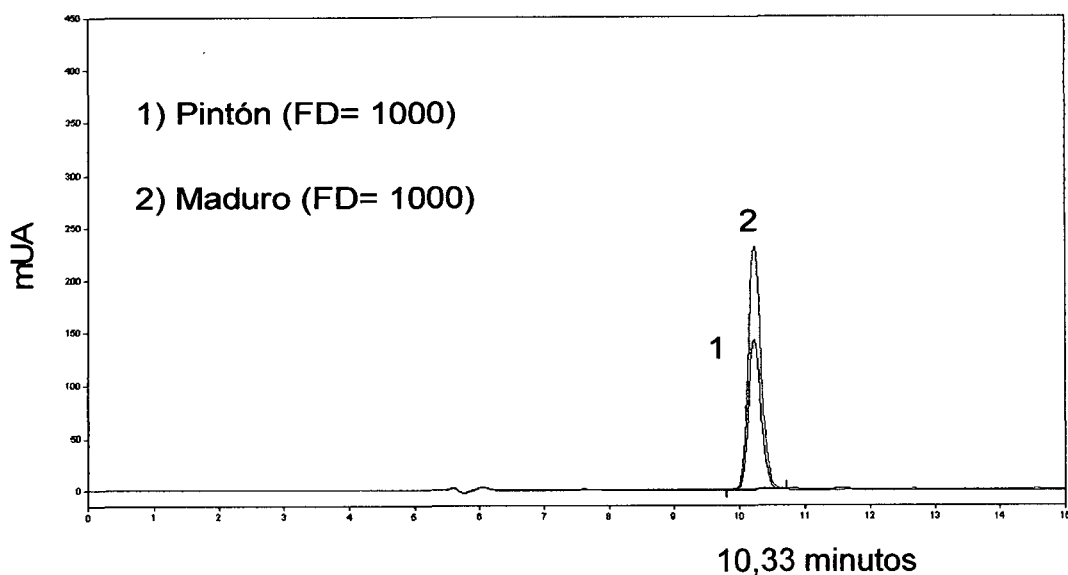


Figura 14. Cromatograma HPLC de las pulpas concentradas de camu camu 1) Estado pintón y 2) Estado maduro a FD (factor de dilución) = 1 000, vol. 20 $\mu$ l. Muestra representativa de n=3.

#### 4.3.4. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento

Cuadro 13. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.

Estado de madurez	Almacenamiento (Días)	mgAA/100g
<b>Pintón</b>	<b>0</b>	2 041,01 $\pm$ 29,68 <sup>a</sup>
	<b>30</b>	1 835,11 $\pm$ 40,57 <sup>b</sup>
	<b>60</b>	1 865, 11 $\pm$ 30,46 <sup>b</sup>
<b>Maduro</b>	<b>0</b>	2 824,12 $\pm$ 41,80 <sup>ab</sup>
	<b>30</b>	2 950,56 $\pm$ 33,15 <sup>a</sup>
	<b>60</b>	2 771,36 $\pm$ 43,43 <sup>b</sup>

Los valores representan el promedio  $\pm$  ES, n=3. AA: ácido ascórbico. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativos ( $p < 0,05$ ).



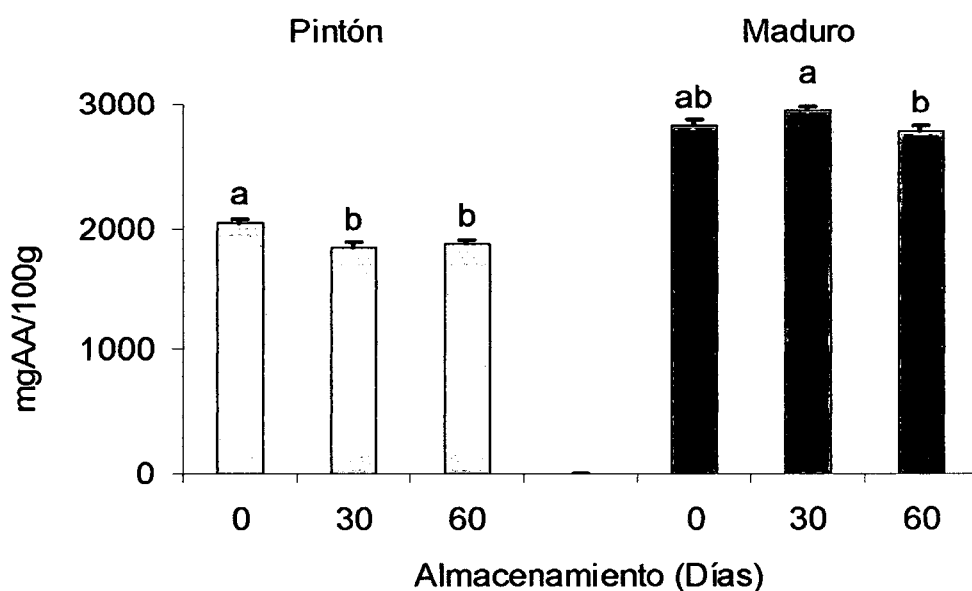


Figura 15. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.

#### 4.3.5. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por tratamientos

En el cuadro 14 y en la figura 16, se muestran los resultados.

Cuadro 14. Contenido de ácido ascórbico por tratamientos.

Tratamientos	mgAA/100g
T1 (Pintón – Día 0)	2 041,01 ± 29,68 <sup>c</sup>
T2 (Pintón – Día 30)	1 835,11 ± 40,57 <sup>d</sup>
T3 (Pintón – Día 60)	1 865, 11 ± 30,46 <sup>d</sup>
T4 (Maduro – Día 0)	2 824,12 ± 41,80 <sup>ab</sup>
T5 (Maduro – Día 30)	2 950,56 ± 33,15 <sup>a</sup>
T6 (Maduro – Día 60)	2 771,36 ± 43,43 <sup>b</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. AA: Acido ascórbico. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativos (p<0,05).

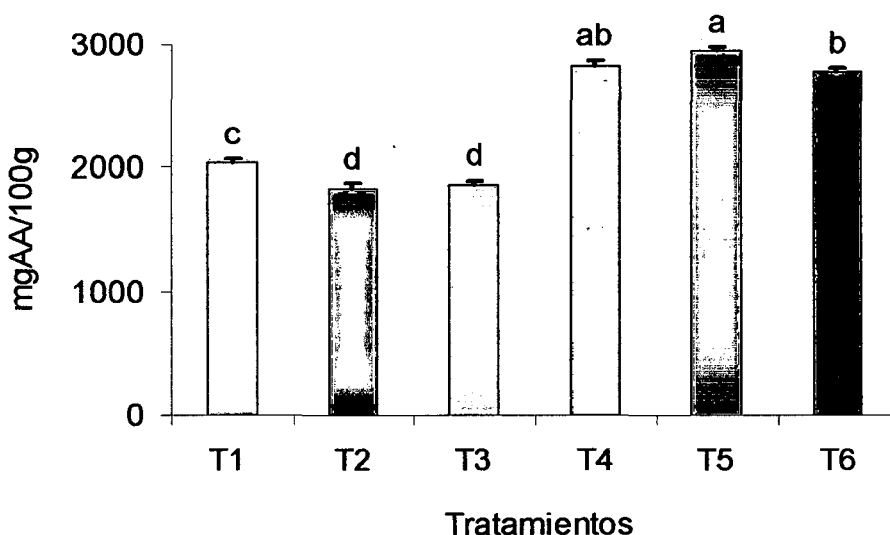


Figura 16. Contenido de ácido ascórbico por tratamientos.

#### 4.4. Cuantificación de polifenoles totales en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre $-15$ a $-10^{\circ}\text{C}$

##### 4.4.1. Determinación de la curva patrón de catequina (CAT)

En la figura 17, se muestra la curva estándar obtenida con el estándar de CAT a concentraciones de 100, 300, 1 000, 3 000 y 10 000  $\mu\text{M}$ .

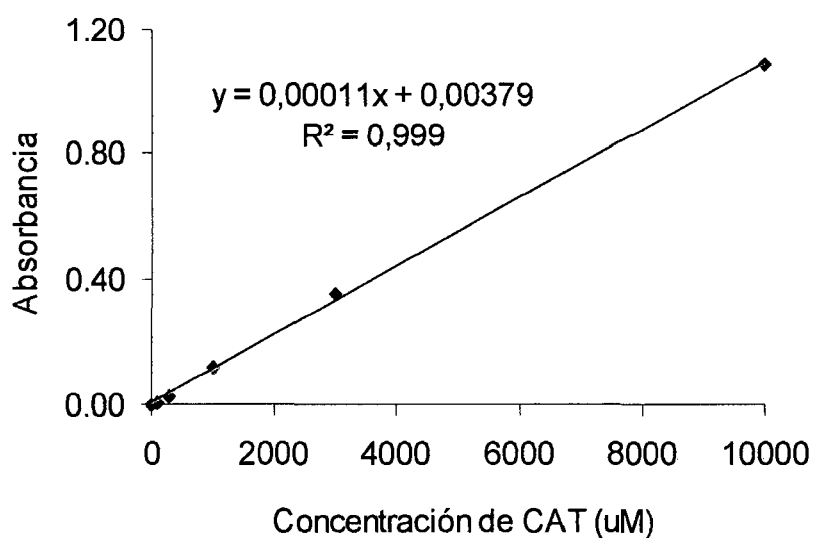


Figura 17. Curva estándar de catequina (CAT), para polifenoles totales

#### 4.4.2. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por estado de madurez

En el cuadro 15 y en la figura 18, se muestran los resultados.

Cuadro 15. Contenido de polifenoles totales en mgCAT/g de pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento.

Estado de madurez	Almacenamiento (Días)		
	0	30	60
<b>Pintón</b>	35,63 ± 0,47 <sup>b</sup>	29,06 ± 0,88 <sup>b</sup>	28,14 ± 1,46 <sup>b</sup>
<b>Maduro</b>	50,23 ± 1,09 <sup>a</sup>	45,63 ± 0,65 <sup>a</sup>	47,57 ± 1,21 <sup>a</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. CAT: Catequina. Valores en la misma columna con diferente superíndice son significativos ( $p < 0,05$ ).

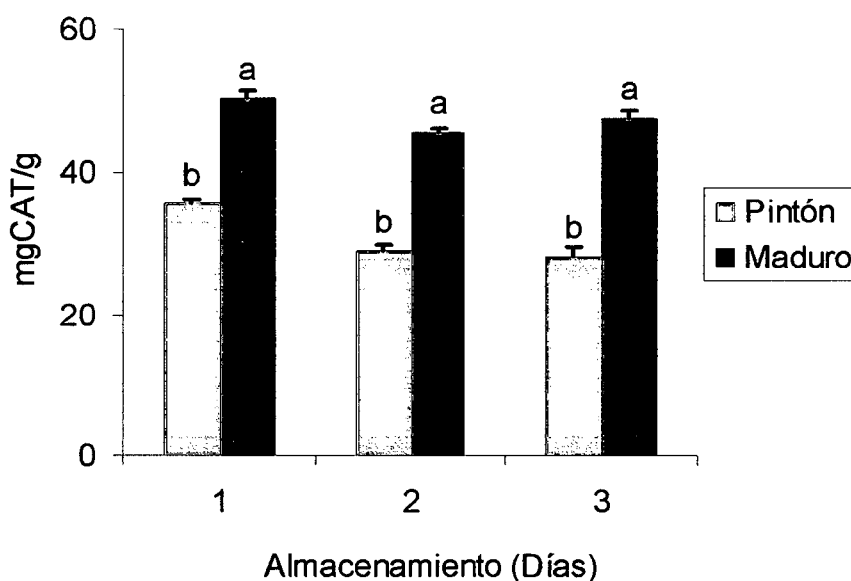


Figura 18. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento.

#### 4.4.3. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento

En el cuadro 16 y en la figura 19, se muestra los resultados.

Cuadro 16. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.

Estados de madurez	Almacenamiento (Días)	mgCAT/g
Pintón	0	35,63 ± 0,47 <sup>a</sup>
	30	29,06 ± 0,88 <sup>b</sup>
	60	28,14 ± 1,46 <sup>b</sup>
Maduro	0	50,23 ± 1,09 <sup>a</sup>
	30	45,63 ± 0,65 <sup>b</sup>
	60	47,57 ± 1,21 <sup>ab</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. CAT: Catequina. Valores en la misma columna por estado de madurez con diferentes superíndices son significativos (p<0,05).

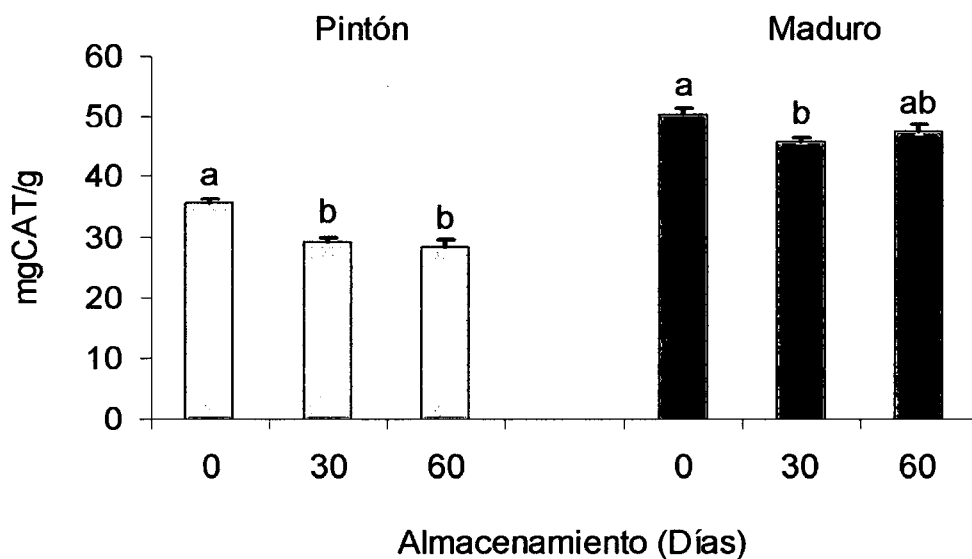


Figura 19. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.

#### 4.4.4. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por tratamientos

En el cuadro 17 y en la figura 20, se muestra los resultados.

Cuadro 17. Contenido de polifenoles totales por tratamientos.

Tratamientos	mgCAT/g
T1 (Pintón – Día 0)	35,63 ± 0,47 <sup>b</sup>
T2 (Pintón – Día 30)	29,06 ± 0,88 <sup>c</sup>
T3 (Pintón – Día 60)	28,14 ± 1,46 <sup>c</sup>
T4 (Maduro – Día 0)	50,23 ± 1,09 <sup>a</sup>
T5 (Maduro – Día 30)	45,63 ± 0,65 <sup>a</sup>
T6 (Maduro – Día 60)	47,57 ± 1,21 <sup>a</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. CAT: Catequina. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativos ( $p < 0,05$ ).

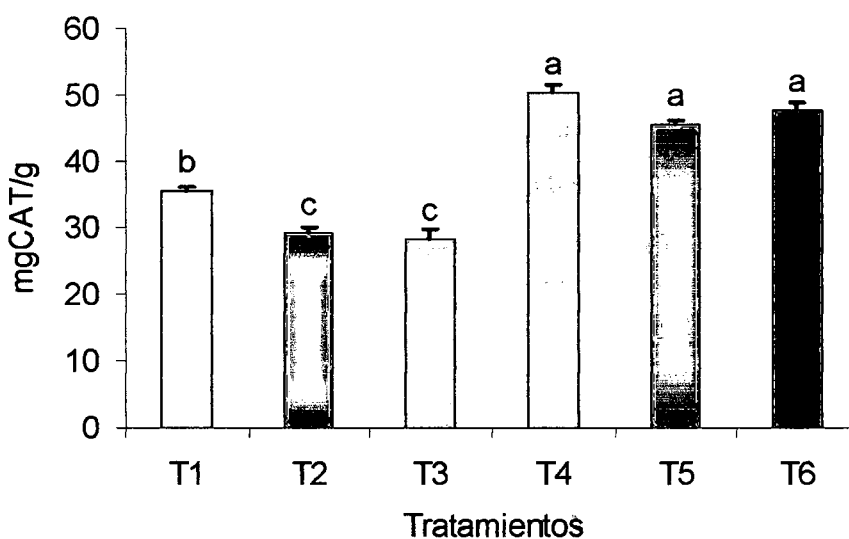


Figura 20. Contenido de polifenoles totales por tratamientos.

#### 4.5. Cuantificación de catequina en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre $-15$ a $-10^{\circ}\text{C}$

##### 4.5.1. Determinación de la curva patrón de catequina (CAT)

En la figura 21 se muestra la curva estándar obtenida con el estándar de catequina a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{M}$  y en la figura 22, se muestra el cromatograma HPLC, obtenido al inyectar 20  $\mu\text{l}$  de CAT a 500  $\mu\text{M}$ .

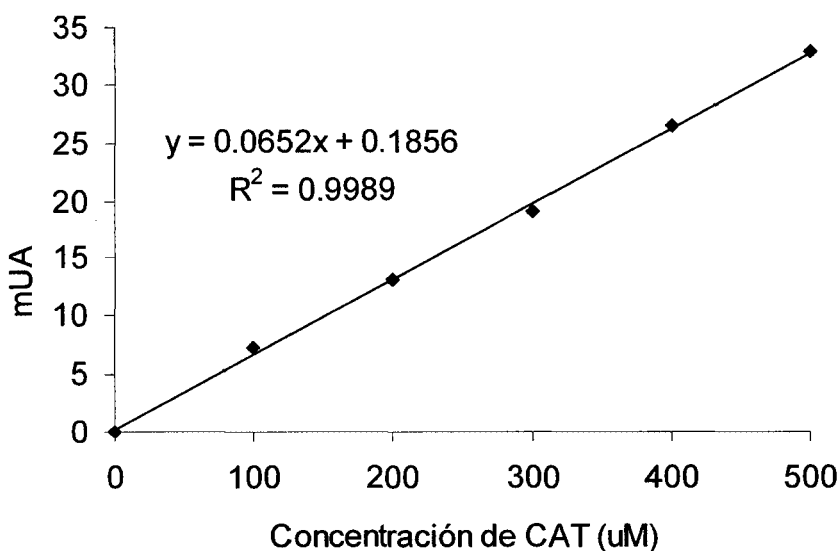


Figura 21. Curva estándar de catequina (CAT) por HPLC.

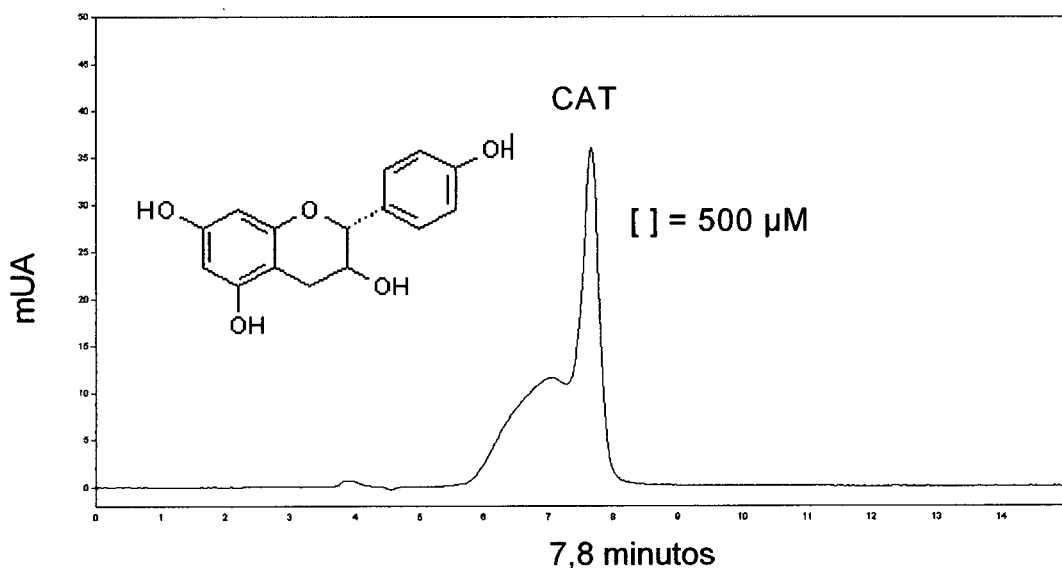


Figura 22. Cromatograma HPLC del estándar de catequina a 500 µM, vol. 20µl.  
Muestra representativa de n=3.

#### 4.5.2. Contenido de catequina en pulpa concentrada por estado de madurez

En el cuadro 18 y en la figura 23, se muestran los resultados, y en las figuras 24 y 25, los cromatogramas HPLC, obtenidos al inyectar la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.

Cuadro 18. Contenido de catequina en mgCAT/g de pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento.

Estado de madurez	Almacenamiento (Días)		
	0	30	60
Pintón	0,28 ± 0,004 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,008 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,009 <sup>b</sup>
Maduro	0,45 ± 0,015 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,008 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,008 <sup>a</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. CAT: Catequina. Valores en la misma columna con diferente superíndice son significativos (p<0,05).

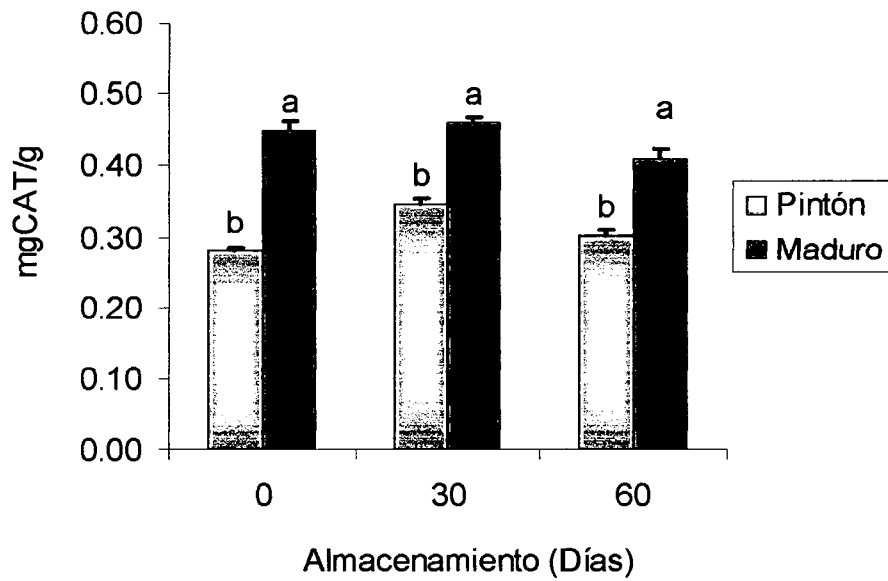


Figura 23. Contenido de catequina en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento.

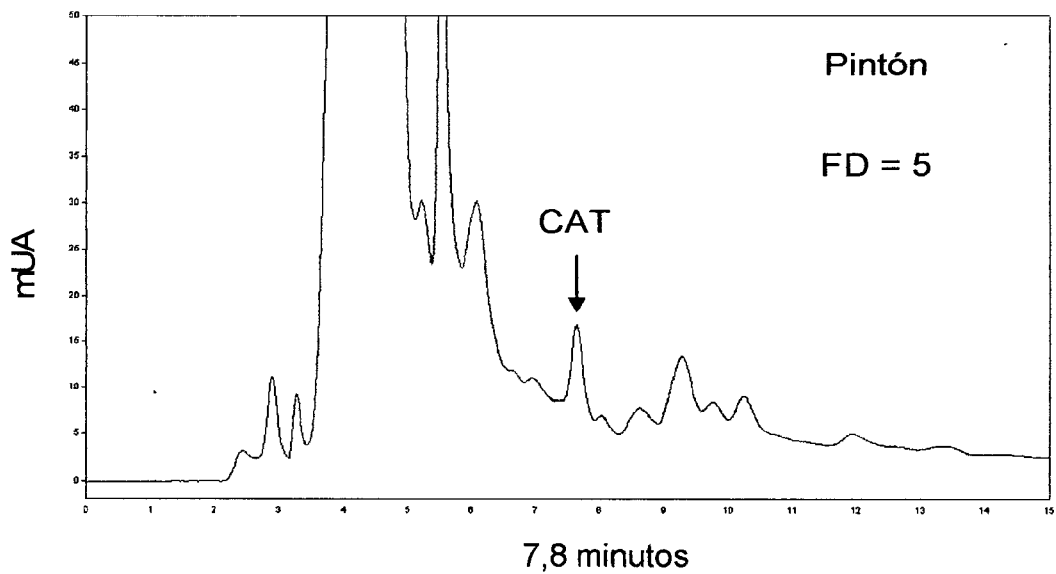


Figura 24. Cromatograma HPLC de pulpa concentrada de camu camu pintón a FD (factor de dilución) = 5, vol. 20 $\mu$ l. Muestra representativa de n=3.



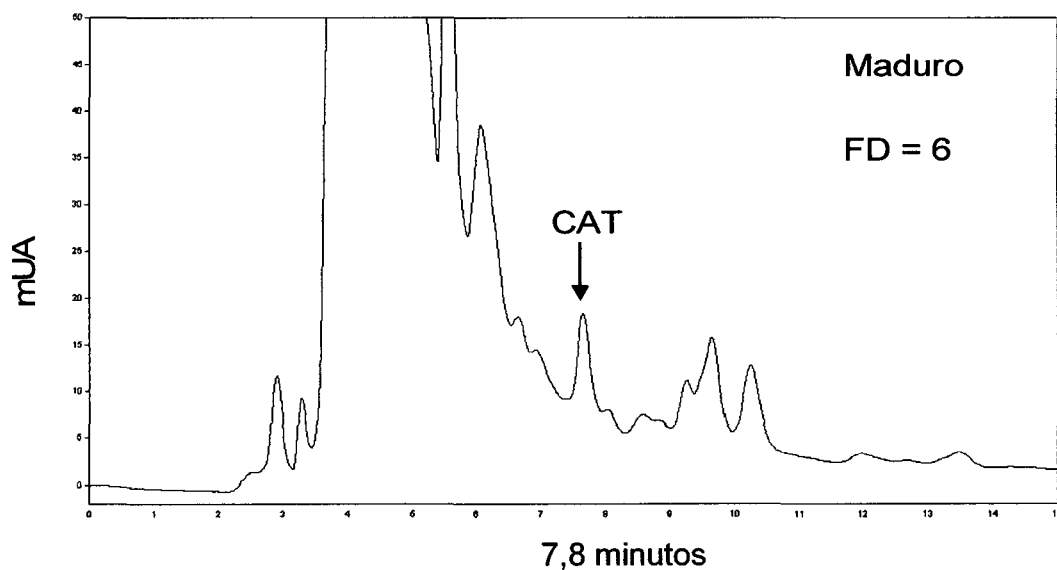


Figura 25. Cromatograma HPLC de pulpa concentrada de camu camu maduro a FD (factor de dilución) = 6, vol. 20 $\mu$ l. Muestra representativa de n=3.

#### 4.5.3. Contenido de catequina en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento

Cuadro 19. Contenido de catequina en la pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.

Estados de madurez	Almacenamiento (Días)	mgCAT/g
<b>Pintón</b>	<b>0</b>	0,28 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>
	<b>30</b>	0,34 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>
	<b>60</b>	0,30 $\pm$ 0,009 <sup>b</sup>
<b>Maduro</b>	<b>0</b>	0,45 $\pm$ 0,015 <sup>ab</sup>
	<b>30</b>	0,46 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>
	<b>60</b>	0,41 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>

Los valores representan el promedio  $\pm$  ES, n=3. CAT: Catequina. Valores en la misma columna por estado de madurez con diferentes superíndices son significativos ( $p < 0,05$ ).

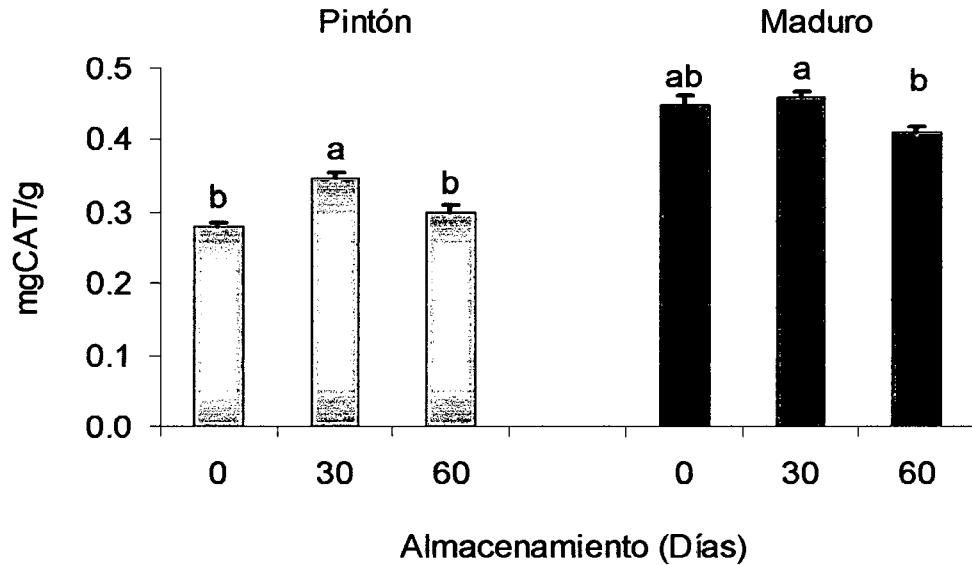


Figura 26. Contenido de catequina en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez.

#### 4.5.4. Contenido de catequina en pulpa concentrada por tratamientos

En el cuadro 20 y en la figura 27, se muestra los resultados.

Cuadro 20. Cuantificación de catequina por tratamientos.

Tratamientos	mgCAT/g
T1 (Pintón – Día 0)	0,28 ± 0,004 <sup>d</sup>
T2 (Pintón – Día 30)	0,34 ± 0,008 <sup>c</sup>
T3 (Pintón – Día 60)	0,30 ± 0,009 <sup>d</sup>
T4 (Maduro – Día 0)	0,45 ± 0,015 <sup>ab</sup>
T5 (Maduro – Día 30)	0,46 ± 0,008 <sup>a</sup>
T6 (Maduro – Día 60)	0,41 ± 0,008 <sup>b</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. CAT: Catequina. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativos (p<0,05).

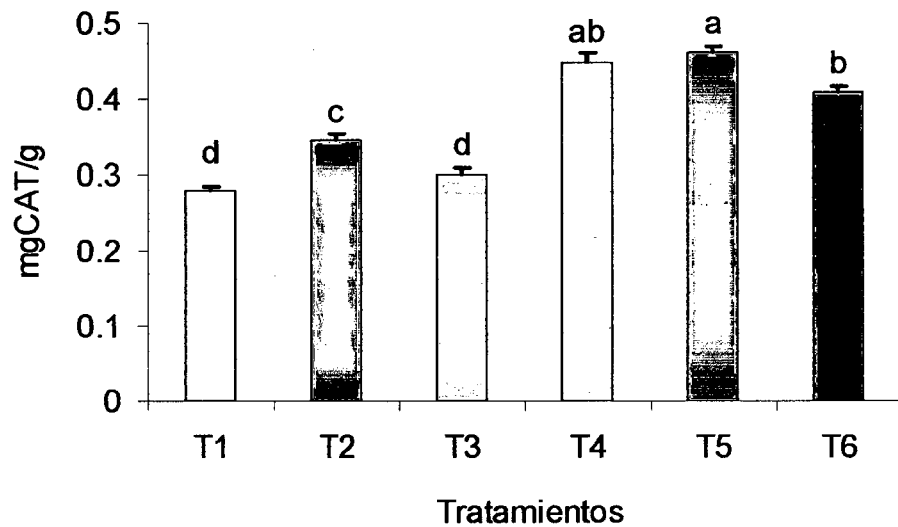


Figura 27. Contenido de catequina por tratamientos.

#### 4.6. Evaluación de la actividad antioxidante en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre $-15$ a $-10^{\circ}\text{C}$

##### 4.6.1. Radical 2,2 diphenyl-1-picrilhidrazyl (DPPH)

##### 4.6.1.1. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por estado de madurez

Los resultados se muestran en el cuadro 21 y en la figura 28.

Cuadro 21. Actividad antioxidante en  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento, frente al radical DPPH.

Estado de madurez	Almacenamiento (Días)		
	0	30	60
Pintón	$19,12 \pm 0,13^b$	$8,35 \pm 0,13^b$	$10,08 \pm 0,28^b$
Maduro	$6,86 \pm 0,13^a$	$6,43 \pm 0,04^a$	$5,85 \pm 0,17^a$

Los valores representan el promedio  $\pm$  ES,  $n=3$ .  $\text{IC}_{50}$ : Coeficiente de inhibición. Valores en la misma columna con diferente superíndice son significativos ( $p<0,05$ ).

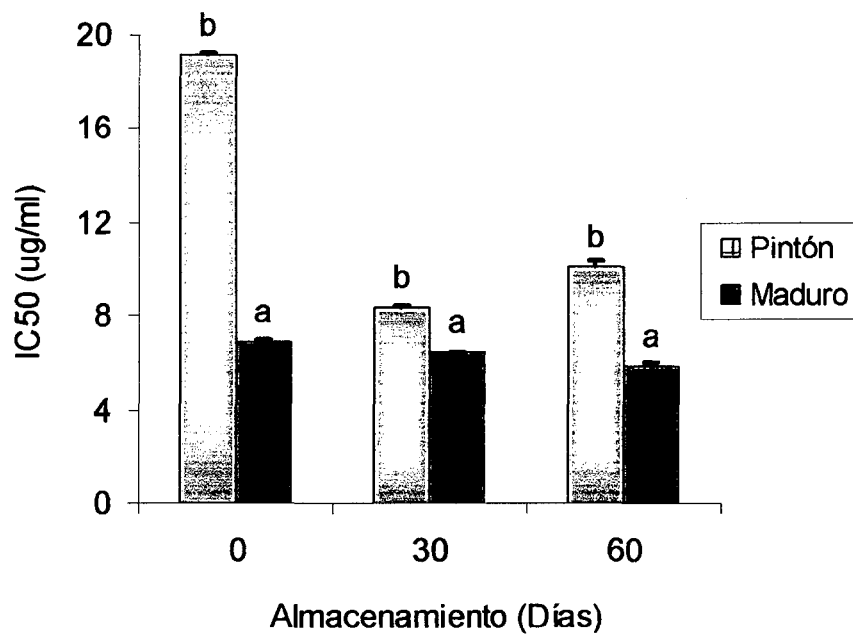


Figura 28. Actividad antioxidante (IC<sub>50</sub>) en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento, frente al radical DPPH.

#### 4.6.1.2. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento

En el cuadro 22 y en la figura 29, se muestran los resultados.

Cuadro 22. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado, frente al radical DPPH.

Estados de madurez	Almacenamiento (Días)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>Pintón</b>	<b>0</b>	19,12 ± 0,13 <sup>a</sup>
	<b>30</b>	8,35 ± 0,13 <sup>c</sup>
	<b>60</b>	10,08 ± 0,28 <sup>b</sup>
<b>Maduro</b>	<b>0</b>	6,86 ± 0,13 <sup>a</sup>
	<b>30</b>	6,43 ± 0,04 <sup>a</sup>
	<b>60</b>	5,85 ± 0,17 <sup>b</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. IC<sub>50</sub>: Coeficiente de inhibición. Valores en la misma columna por estado de madurez con diferentes superíndices son significativos (p<0,05).

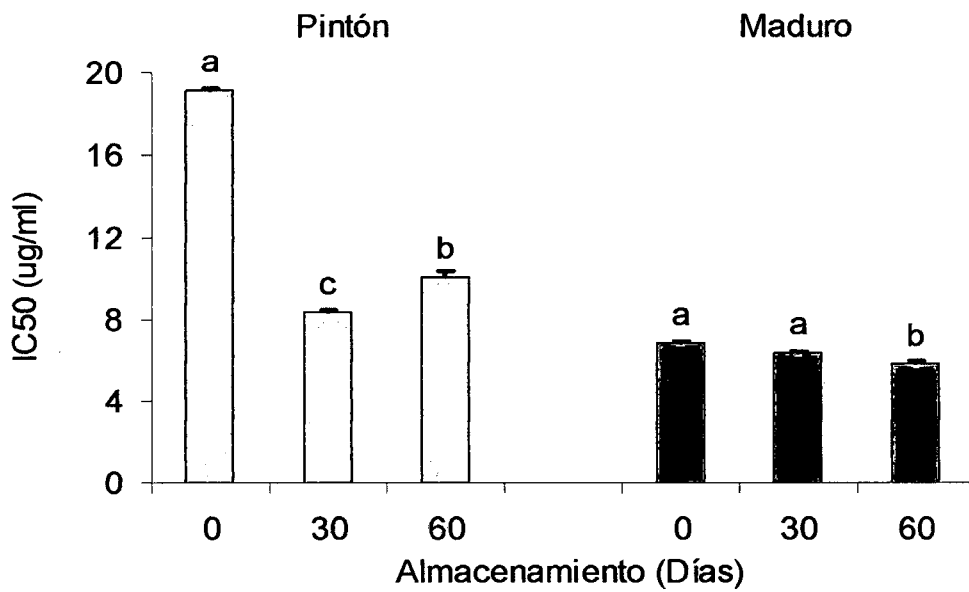


Figura 29. Actividad antioxidante (IC<sub>50</sub>) en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado, frente al radical DPPH.

#### 4.6.1.3. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tratamientos

En el cuadro 23 y en la figura 30, se muestran los resultados.

Cuadro 23. Actividad antioxidante por tratamientos, frente al radical DPPH

Tratamientos	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
T1 (Pintón – Día 0)	19,12 ± 0,13 <sup>a</sup>
T2 (Pintón – Día 30)	8,35 ± 0,13 <sup>c</sup>
T3 (Pintón – Día 60)	10,08 ± 0,28 <sup>b</sup>
T4 (Maduro – Día 0)	6,86 ± 0,13 <sup>d</sup>
T5 (Maduro – Día 30)	6,43 ± 0,04 <sup>de</sup>
T6 (Maduro – Día 60)	5,85 ± 0,17 <sup>e</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. IC<sub>50</sub>: Coeficiente de inhibición. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativos (p<0,05).

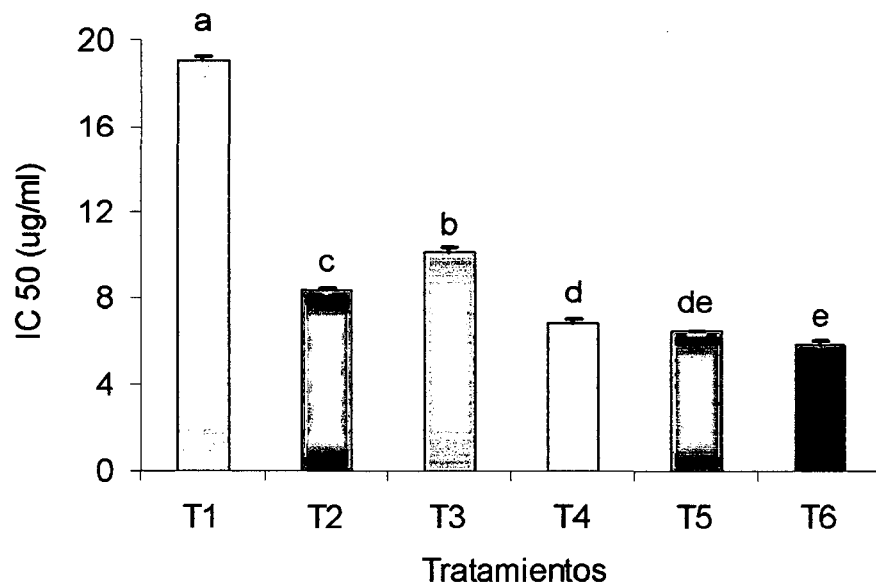


Figura 30. Actividad antioxidante (IC<sub>50</sub>) por tratamientos, frente al radical DPPH.

#### 4.6.2. Radical peroxilo

##### 4.6.2.1. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por estado de madurez

Los resultados se muestran en el cuadro 24 y en la figura 31.

Cuadro 24. Actividad antioxidante en  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento, frente al radical peroxilo.

Estado de madurez	Almacenamiento (Días)		
	0	30	60
Pintón	$2,96 \pm 0,03^b$	$2,77 \pm 0,07^b$	$1,94 \pm 0,04^a$
Maduro	$1,75 \pm 0,02^a$	$2,08 \pm 0,07^a$	$1,77 \pm 0,08^a$

Los valores representan el promedio  $\pm$  ES,  $n=3$ .  $IC_{50}$ : Coeficiente de inhibición. Valores en la misma columna con diferente superíndice son significativos ( $p<0,05$ ).

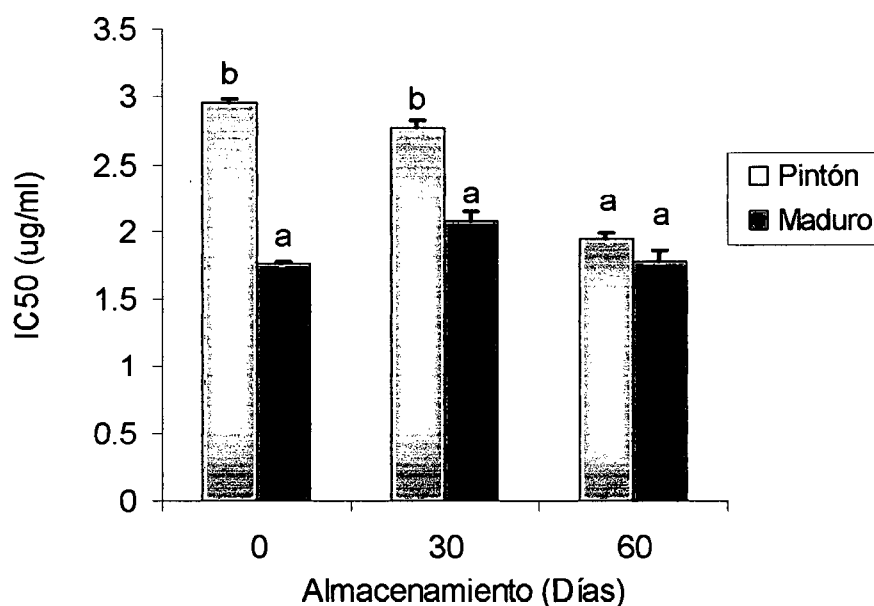


Figura 31. Actividad antioxidante ( $IC_{50}$ ) en pulpa concentrada por estado de madurez en almacenamiento, frente al radical peroxilo.

#### 4.6.2.2. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento

En el cuadro 25 y en la figura 32, se muestra los resultados.

Cuadro 25. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado, frente al radical peroxilo.

Estados de madurez	Almacenamiento (Días)	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
Pintón	0	2,96 ± 0,03 <sup>a</sup>
	30	2,77 ± 0,07 <sup>a</sup>
	60	1,94 ± 0,04 <sup>b</sup>
Maduro	0	1,75 ± 0,02 <sup>b</sup>
	30	2,08 ± 0,07 <sup>a</sup>
	60	1,77 ± 0,08 <sup>b</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. IC<sub>50</sub>: Coeficiente de inhibición. Valores en la misma columna por estado de madurez con diferentes superíndices son significativos (p<0,05).

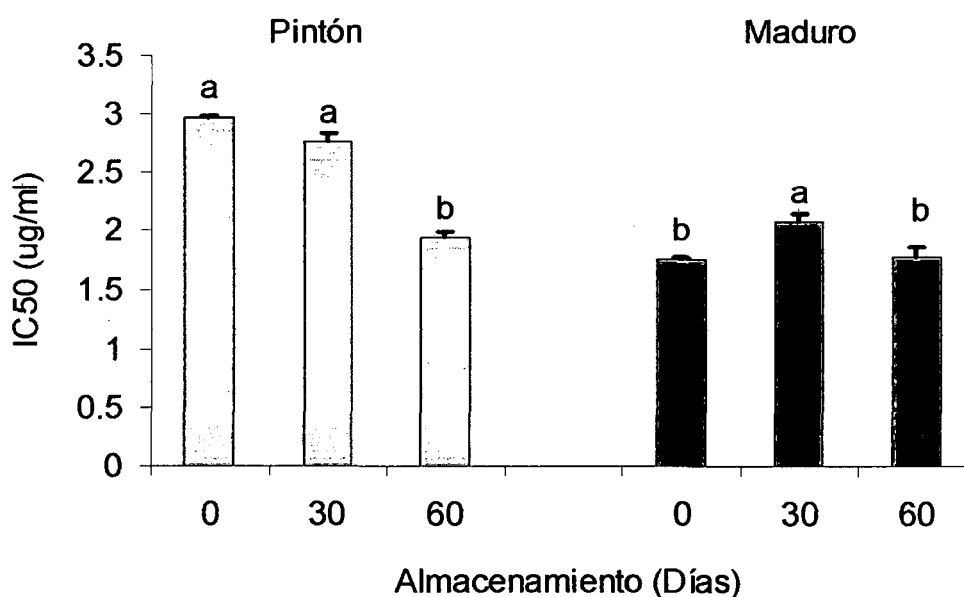


Figura 32. Actividad antioxidante (IC<sub>50</sub>) en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento en cada estado, frente al radical Peroxilo.



#### 4.6.2.3. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tratamientos

En el cuadro 26 y en la figura 33, se muestran los resultados.

Cuadro 26. Actividad antioxidante por tratamientos, frente al radical peroxilo

Tratamientos	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
T1 (Pintón – Día 0)	2,96 ± 0,03 <sup>a</sup>
T2 (Pintón – Día 30)	2,77 ± 0,07 <sup>a</sup>
T3 (Pintón – Día 30)	1,94 ± 0,04 <sup>bc</sup>
T4 (Maduro – Día 0)	1,75 ± 0,02 <sup>c</sup>
T5 (Maduro – Día 30)	2,08 ± 0,07 <sup>b</sup>
T6 (Maduro – Día 60)	1,77 ± 0,08 <sup>c</sup>

Los valores representan el promedio ± ES, n=3. IC<sub>50</sub>: Coeficiente de inhibición. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativos (p<0,05).

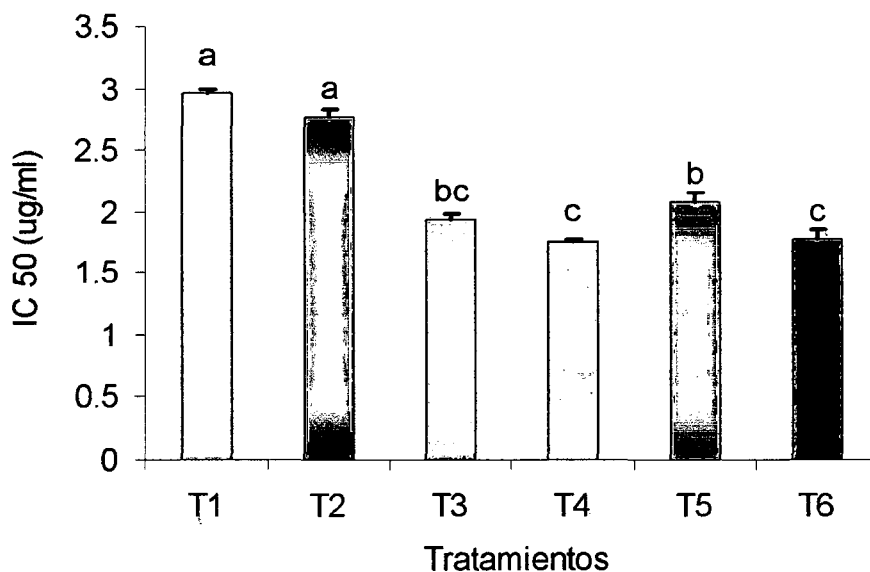


Figura 33. Actividad antioxidante (IC<sub>50</sub>) por tratamientos, frente al radical peroxilo.

#### 4.7. Análisis Microbiológicos

En el cuadro 27, se muestra el análisis microbiológico en la pulpa concentrada de camu camu en dos estados de madurez.

En la prueba presuntiva, todos los tubos de caldo BRILA provistos de campanas durham, conteniendo alícuotas de muestra original y diluida, se consideraron negativos, porque no presentaron turbidez ni gas.

Se realizó la prueba confirmativa de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, a pesar de no haber obtenidos tubos positivos, esto es necesario para descartar los falsos negativos.

Cuadro 27. Análisis microbiológico en pulpa concentrada de camu camu luego de 6 meses de almacenamiento.

<b>Análisis Microbiológico</b>	<b>Pintón</b>	<b>Maduro</b>
Coliformes totales	< 0,3/g	< 0,3/g
Coliformes fecales	< 0,3/g	< 0,3/g
<i>Escherichia coli</i>	< 0,3/g	< 0,3/g
Mohos y Levaduras	5 u.f.c. /g	3 u.f.c. /g

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Proceso para la obtención de pulpa concentrada de camu camu; rendimiento y características sensoriales

La concentración de las pulpas de ambos estados de madurez tomó un tiempo promedio de 3 horas, como se indica en el cuadro 8. Este tiempo está influenciado por la forma como se adaptó el rotavapor. A medida que la pulpa se va concentrando el contenido de sólidos aumenta, esto hace que el punto de ebullición también aumente y por lo tanto se necesita más presión de vacío para continuar con la ebullición (SINGH, 1997). Para incrementar la velocidad de evaporación, se generaba vacío por un periodo de 15 min, interrumpiendo esta operación por 5 min con el objeto de eliminar el vacío en el sistema. Otro factor que directamente influye en el tiempo de concentración es la velocidad angular del balón del rotavapor conteniendo la pulpa. Se trabajó a un promedio de 60 r.p.m.

Esta forma de concentrar tuvo efectos en el color de las pulpas, ocurriendo un cambio de color, este fenómeno de pérdida de color se indica en el cuadro 8. Lo mismo ocurrió con el color de la pulpa de mango (*Mangifera indica* L.) que determinó HASHMI *et al.* (2007), disminuyó el color significativamente ( $p < 0,01$ ) durante el almacenamiento. Esta pérdida de color se podría atribuir a las enzimas presentes en las pulpas de las frutas, como por ejemplo la enzima polifenol oxidasa que al contrario ésta genera un

oscurecimiento en la pulpa de manzana (VILLEGAS-OCHOA *et al.*, 2 005). Se atribuye el color púrpura de la pulpa de camu-camu, a las antocianinas que provienen de la cáscara (SALISBURY y ROSS, 1 994). ZAPATA y DUFOUR (1 993), realizaron un extracto de antocianinas de la cáscara de camu camu macerando 30 g de cáscara en 100 ml de solución de HCl/Metanol/Agua (1:29:70, v) por 18 horas a 4°C. En efecto, los frutos de camu camu ingresaron en forma íntegra al pulpeador, obteniéndose un producto tamizado (1 mm) que incluye partículas de cáscara.

ACEVEDO y AVANZA (2 005), mencionan que al concentrar pulpa de frutas por evaporación a vacío se modifican propiedades sensoriales y nutricionales debido a la pérdida de compuestos volátiles del aroma, además hay una degradación del color. MEDINA y PAGANO (2 003), indican que el orden en el cual se deterioran los atributos que definen la calidad de productos procesados, primero se altera el sabor, luego el color, la textura y posteriormente suceden las pérdidas nutricionales.

La cáscara de los frutos maduros es más blanda que los frutos pintones ya que el grado de firmeza de una fruta cambia con el avance del proceso de maduración del fruto (CIRO y OSORIO, 2 008). Esto se correlaciona con el mayor rendimiento obtenido en la pulpa madura, puesto que, durante el pulpeado la cáscara blanda fácilmente pasa por el tamiz.

## **5.2. Caracterización fisicoquímica y micronutrientes**

### **5.2.1. Análisis fisicoquímico**

Los resultados se muestran en el cuadro 9.

#### **5.2.1.1. Humedad**

Se observa mayor contenido de humedad en pulpa concentrada de camu camu pintón respecto al estado maduro. VILLACHICA (1 996) y SALVADOR (1 997) indican 94,4% y GONZALES (2 007) indica 93,3% en pulpa de camu camu sin concentrar, pero no indica el estado de madurez. Muchas frutas tienen un contenido de humedad entre 81 a 90%, tales como la manzana, uva, piña, naranja, mandarina y el limón. Frutas exóticas como la acerola (*Malpighia emarginata* DC.) y la carambola (*Averrhoa carambola*) tienen una humedad de 89,2% y 91,2%, respectivamente (SENSER y SCHERZ, 1 999). La pulpa concentrada de camu camu presenta similitud con el contenido de estas frutas, con excepción del limón, la acerola y la carambola que tienen mayor humedad.

En el cuadro 9 se observa que la pulpa madura contiene mayor contenido de sólidos solubles, que contribuyen a un mayor contenido de sólidos totales ó menor contenido de humedad. Esto se correlaciona al observarse que la pulpa madura tiene una consistencia pastosa y bien espesa tal como se reporta en el cuadro 8. Los valores de humedad en pulpas concentradas son menores con relación al contenido de humedad en la pulpa de camu camu sin concentrar; esto se debe que en el proceso de concentrado al que ha sido sometido la pulpa, se eliminó un 40% de agua.

#### **5.2.1.2. Proteína**

Se observa mayor contenido de proteína en pulpa concentrada de camu camu maduro respecto a la pulpa concentrada de camu camu pintón.

VILLACHICA (1 996), SALVADOR (1 997) y GONZALES (2 007), indican 0,5% de proteína en pulpa de camu camu sin concentrar, pero no indica el estado de madurez. Muchas frutas tienen un contenido de proteína entre 0,3 a 1%, tales como la manzana, uva, piña, naranja, mandarina y el limón. Frutas exóticas como la acerola y la carambola tienen un contenido de proteína de 0,2% y 1,2%, respectivamente (SENSER y SCHERZ, 1 999). La pulpa concentrada de camu camu presenta similitud con el contenido de proteína del limón y la carambola.

Generalmente el contenido de proteína de las frutas se debe a las enzimas presentes tales como la polifenol – oxidasa, pectinasas, poligalacturonasas, pectín liasas etc. (ROBINSON, 1 991; BRASIL *et al.*, 2 008) y a los aminoácidos que son precursores de los flavonoides y compuestos fenólicos que son característicos en plantas cuyos frutos son de color rojo, azul o púrpura (SALISBURY y ROSS, 1 994).

### **5.2.1.3. Grasa**

No se observa diferencia significativa en el contenido de grasa para ambos estados de madurez. GONZALES (2 007) indica 0,1% de grasa en pulpa de camu camu sin concentrar, y no reporta estado de madurez. Los resultados obtenidos presentan similitud al contenido de grasa en la manzana, uva, piña, naranja, mandarina y limón (0,2 a 0,6%). Frutas exóticas como la acerola y la carambola contienen 0,2% y 0,5%, respectivamente (SENSER y SCHERZ, 1 999). El ligero incremento de grasa entre las pulpas concentradas

y sin concentrar, se debe al aumento de sólidos totales durante el proceso de concentrado.

#### **5.2.1.4. Fibra**

Se observa mayor contenido de fibra en pulpa concentrada de camu camu maduro respecto a la del pintón. VILLACHICA (1 996) y SALVADOR (1 997), indican 0,6% de fibra, GONZALES (2 007), menciona 0,4% de fibra; estos valores son obtenidos en pulpa de camu camu sin concentrar, y no indican el estado de madurez. Los resultados obtenidos en pulpa concentrada, se asemejan a lo obtenido por GONZALES (2 007), encontrándose que la pulpa concentrada de camu camu presenta similitud en el contenido de fibra de la pulpa fresca. Muchas frutas tienen un contenido de fibra entre 1,4 a 2,3%, tales como la manzana, uva, piña y la naranja. Frutas exóticas como la guayaba (*Psidium guajava*) y la fruta de la pasión (*Passiflora edulis*) tienen un contenido de fibra de 5,2 y 1,5%, respectivamente (SENSER y SCHERZ, 1 999). La pulpa concentrada de camu camu presenta menor contenido de fibra que estas frutas.

#### **5.2.1.5. Ceniza**

Se observa mayor contenido de ceniza en pulpa concentrada de camu camu maduro respecto a la del pintón. VILLACHICA (1 996), SALVADOR (1 997) y GONZALES (2 007), indican 0,2% de ceniza; estos valores son obtenidos en pulpa de camu camu sin concentrar, y no indican el estado de madurez. Los resultados obtenidos en pulpa concentrada, soy mayores a lo obtenido por estos autores, esto podría deberse al proceso de

concentrado de la pulpa de camu camu. Muchas frutas tienen un contenido de fibra entre 0,3 a 0,7%, tales como la manzana, uva, piña, naranja, mandarina y el limón. Frutas exóticas como la acerola, carambola, fruta de la pasión y la guayaba, tienen un contenido de ceniza que varía de 0,4 a 0,9% (SENSER y SCHERZ, 1 999). La pulpa concentrada de camu camu presenta similar contenido de ceniza que estas frutas.

#### **5.2.1.6. Carbohidratos totales**

Los carbohidratos totales se refieren al contenido de carbohidratos solubles (glucosa, fructosa, sacarosa, ácidos orgánicos) e insolubles (lignina, celulosa, hemicelulosa y almidón) (ROBINSON, 1 991).

Se encontró diferencia significativa en el contenido de carbohidratos totales de la pulpa concentrada de camu camu maduro respecto a la del pintón. VILLACHICA, (1 996), SALVADOR (1 997), indican 4,7% y GONZALES (2 007) indica 5,9% de carbohidratos en pulpa de camu camu sin concentrar y también no reportan el estado de madurez. La manzana contiene 11,8%, la uva 15,6%, la piña 12,4%, la naranja 8,0%, la mandarina 10,1% y el limón 3,2% de carbohidratos y otras frutas exóticas como la acerola y la carambola que tienen 2,7% y 3,5%, respectivamente (SENSER y SCHERZ, 1 999). Los resultados obtenidos son mayores al contenido de carbohidratos presentes en la pulpa de camu camu sin concentrar, y al comparar con otras frutas, la pulpa concentrada de camu camu en ambos estados supera a las frutas exóticas y al limón; son superados por la manzana, la uva, la piña y la



mandarina, e igualada por la naranja a la pulpa concentrada de camu camu maduro.

- **Azúcares totales**

El contenido de azúcares totales en pulpa concentrada de camu camu maduro es significativamente mayor al obtenido en el pintón. Al referirnos a azúcares totales, se entiende por azúcares reductores y no reductores. La miel contiene 80,51% de azúcares totales determinados por el mismo método de análisis (ASQUIERI *et al.*, 2 003). La miel supera a nuestro resultados, esto se debe a que los azúcares son los constituyentes mayoritarios de la miel, representando el 95 al 99 % de la materia seca, compuesta básicamente por glucosa y fructosa, con algo de sacarosa y dextrinas en cantidades menores (ZANDAMELA, 2 008).

- **Azúcares reductores**

Se entiende por azúcares reductores cuando el carbono  $\alpha$  del azúcar tiene un grupo aldehído libre, para ser reducido a cetona. (BOHINSKI, 1 991).

El contenido de azúcares reductores en pulpa concentrada de camu camu maduro es significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) a la del pintón (maduro,  $5,30 \pm 0,07$  vs pintón,  $3,46 \pm 0,02\%$ ). La miel contiene 78,69% de azúcares reductores determinados por el mismo método de análisis (ASQUIERI *et al.*, 2 003), al igual que en la composición de azúcares totales, la miel supera a los resultados obtenidos, esto se debe a que la composición de la miel es mayormente azúcares reductores (ZANDAMELA, 2 008). Los azúcares

reductores presentes en pulpa fresca (FP) y concentrada (CR) de acerola son 3,70% y 13,17%, respectivamente (BRASIL *et al.*, 2 008). El resultado obtenido en pulpa concentrada de camu camu maduro es mayor a la pulpa fresca de acerola (FP), pero superado por la pulpa concentrada (CR) de acerola.

- **Sacarosa**

El contenido de sacarosa es significativamente mayor en pulpa concentrada de camu camu maduro en comparación con la del pintón ( $p < 0,05$ ). La miel contiene 1,82% de sacarosa, determinado por el mismo método de análisis (ASQUIERI *et al.*, 2 003). La miel supera ligeramente a los resultados obtenidos, ya que contiene sacarosa pero en cantidades menores (ZANDAMELA, 2 008).

#### **5.2.1.7. Acidez titulable**

Se encontró mayor acidez titulable en pulpa concentrada de camu camu pintón en comparación con la del maduro ( $p < 0,05$ ). ZAPATA y DUFOUR (1 993), obtuvieron en pulpa de camu camu verde, pintón y maduro 3,55%, 3,07% y 3,08% respectivamente, observándose que a medida que las frutas maduran, sus ácidos orgánicos disminuyen (expresado como ácido cítrico); también RODRIGUES *et al.* (2 004), reportan 3,5% de acidez en pulpa fresca de camu camu. Los resultados obtenidos son mayores que los reportados; esto se debe al proceso de concentrado en la pulpa de camu camu, que al eliminarse agua de la pulpa, aumenta la concentración de ácidos orgánicos. Esto se correlaciona con lo obtenido por BRASIL *et al.* (2 008), que

obtuvieron en pulpa fresca y concentrada de acerola, 0,97% y 3,46% de acidez respectivamente.

#### **5.2.1.8. Sólidos solubles totales (°Brix)**

Se observa que el proceso de concentrado eleva el contenido de sólidos solubles en ambos estados de madurez, además la pulpa madura posee mayor contenido de sólidos solubles comparada con el pintón, tanto en pulpa fresca como en concentrada. Durante el proceso de concentrado se trabajó a 50°C, incrementándose la acidez de  $2,82 \pm 0,03$  a  $4,81 \pm 0,02$  (pintón) y  $3,10 \pm 0,02$  a  $4,64 \pm 0,02\%$  (maduro). Estas condiciones permitieron el incremento de los sólidos solubles debido a la reducción de los azúcares por acción de las pectinasas (poligalacturonasas y pectín liasas) sobre los derivados poligalacturónicos así como a la hidrólisis de azúcares no reductores como la sacarosa, en medio ácido y a temperaturas altas (BRASIL *et al.*, 2 008).

ZAPATA y DUFOUR (1 993), obtuvieron en pulpa de camu camu verde, pintón y maduro 5,6; 5,5 y 6,8 °Brix, respectivamente y, RODRIGUES *et al.* (2 004), obtuvieron 6,1 y 14.8 °Brix en pulpa fresca y concentrada por osmosis inversa respectivamente. Los resultados obtenidos en pulpa sin concentrar en ambos estados de madurez concuerdan con los reportados por estos autores. BRASIL *et al.* (2 008), concentraron pulpa de acerola reportando 6,0 °Brix para la pulpa fresca y 38,0 °Brix para la pulpa concentrada en rotavapor, eliminándose más de un 80% de agua en el proceso. En el presente estudio el proceso de concentrado de pulpa de camu

camu maduro fue hasta eliminar el 40 % de agua, obteniéndose un producto con  $15,60 \pm 0,32$  °Brix.

#### 5.2.1.9. pH

Se encontró diferencia significativa en el pH de la pulpa de camu camu tanto en estado fresco como en el concentrado ( $p < 0.05$ ) observándose mayor pH en el estado maduro. MEDINA y PAGANO (2 003), mencionan que en las frutas, la concentración de iones hidrógeno y su variación puede relacionarse con los cambios que se producen durante el proceso de maduración de los frutos, en el cual ocurre una disminución en la acidez total titulable y con esto, una disminución de la concentración de iones hidrógeno presentes. ZAPATA y DUFOUR (1 993), obtuvieron en pulpa de camu camu verde, pintón y maduro 2,44; 2,53 y 2,56 respectivamente, también en pulpa de camu camu RODRIGUES *et al.* (2 004), obtuvieron 2,7 y BRASIL *et al.* (2 008), obtuvieron en pulpa de acerola 3,3 y en concentrado de acerola 3,21. Los valores de pH determinados en el presente estudio son mayores que los reportados por estos autores, pero al comparar con la pulpa de acerola, la de camu camu posee menor pH. El aumento del pH de producto fresco a concentrado no se correlaciona con lo obtenido por BRASIL *et al.* (2 008), quienes reportan una disminución del pH durante el proceso de concentrado de jugo de acerola empleando rotavapor y también no hay correlación con lo obtenido por ACEVEDO y AVANZA (2 005) donde mencionan que el pH permanece prácticamente constante durante todo el proceso de evaporación de jugo de lima rangpur (*Citrus limonia* Osbeck) empleando rotavapor a 40, 50 y 70°C. Este resultado puede atribuirse a la distinta composición de ácidos

orgánicos presentes en ambas frutas, ya que en el proceso de concentrado parte de estos ácidos se transforman en sales de ácidos al asociarse con los minerales de la pulpa, generándose una capacidad amortiguadora del conjunto de ácidos orgánicos predominantes en el sistema biológico. MEDINA y PAGANO (2003), indican que la relevancia del pH además está asociada, a la presencia de sales, proteínas y otros compuestos coloidales que permiten al sistema biológico conservar el pH.

Otro factor que influye en estos resultados podría ser el método de concentración utilizado. RODRÍGUEZ *et al.* (2004), reportan una ligera disminución del pH (de 2,7 a 2,6) al concentrar jugo de camu camu empleando osmosis inversa a 20 bar y al aumentar la presión a 40 y 60 bar obtuvieron mayor disminución del pH, de 2,7 a 2,5. Estos autores también reportan una disminución significativa del pH al concentrar pulpa de camu camu empleando evaporación osmótica, de 2,6 a 2,2 por lo que se puede afirmar que el método de concentración influye en el pH del producto concentrado.

### **5.2.2. Determinación de micronutrientes**

Con los datos del cuadro 10 se obtuvo la figura 9, observándose que el Zinc (Zn) está presente en mayor cantidad en ambos estados de madurez. También se observa que hay disminución significativa ( $p < 0,05$ ) con la maduración para todos los minerales analizados, con excepción de manganeso (Mn) que se encuentra en igual cantidad ( $p < 0,05$ ).

Se sabe que los minerales son cofactores de muchas enzimas, esta es la razón principal porqué los minerales se consideran micronutrientes esenciales (BOHINSKI, 1 991).

Las sales minerales ejercen múltiples funciones en el organismo humano como electrolitos, como componentes de enzimas y como elementos constitutivos de determinadas sustancias corporales, pero como componentes de los alimentos no solo resultan importantes por razones de fisiología de la nutrición, sino porque también participan frecuentemente en el sabor, activan e inactivan reacciones catalíticas y de otra naturaleza, e influyen sobre la consistencia. (SENER y SCHERZ, 1 999).

ZAPATA y DUFOUR (1993), reportan en pulpa de camu camu para los estados de madurez pintón y maduro respectivamente, un contenido en Zn, de 1,2 y 1,3 mg/kg; un contenido en Cu, de 0,7 y 0,8 mg/kg; un contenido en Mn, de 1,4 y 2,1 mg/kg y; un contenido en Fe, de 1,8 para ambos. Estos valores reportados no concuerdan con lo obtenido en los análisis. MEDINA y PAGANO (2003), mencionan que en las frutas, el contenido de minerales depende del manejo agronómico de las tierras.

### **5.3. Cuantificación de ácido ascórbico en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre -15 a -10°C**

El ácido ascórbico es nutrimento esencial para el ser humano. Una baja ingesta causa una enfermedad, por deficiencia, conocida como escorbuto (GUTIÉRREZ *et al.*, 2 007). La vitamina C (L-ácido ascórbico) es un importante antioxidante y tiene funciones metabólicas en plantas y animales, pero en

humanos, y en algunas otras especies de animales, han perdido la capacidad de sintetizarlo (WHEELER *et al.*, 1998).

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el diseño completo al azar (DCA) con un arreglo factorial de 2x3 (ANEXO A – I).

### **5.3.1. Determinación de la curva patrón de ácido ascórbico**

La determinación de ácido ascórbico (AA) se realizó bajo condiciones de aire acondicionado a  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  y se preparó los estándares en el mismo momento de la evaluación, para garantizar un análisis con mínimo error proveniente de la degradación del ácido ascórbico. Según GUTIÉRREZ *et al.* (2007), el estándar puro de ácido ascórbico a una concentración de 2,08 mg/100ml, se preserva mejor a 4 y  $10^\circ\text{C}$  por 9 horas, por el contrario, acelera su degradación a 20, 30 y  $40^\circ\text{C}$ , degradándose totalmente a esta última temperatura con tan solo transcurrir 6 horas.

En la figura 11, se muestra la curva estándar de AA obtenido al inyectar 20  $\mu\text{l}$  de 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g/ml}$  de AA al sistema HPLC y en la figura 12 se muestra el cromatograma HPLC de AA a 50  $\mu\text{g/ml}$ . Se obtuvo un coeficiente de correlación ( $r^2 = 0,999$ ), cuya ecuación lineal permitió determinar el contenido de ácido ascórbico presente en la pulpa de camu camu en dos estados de madurez. GOKMEN *et al.* (2000), determinaron el contenido de ácido ascórbico en frutas y vegetales de la misma forma, donde la concentración de ácido ascórbico lo determinó usando una curva de calibración basado en la grafica de concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) vs área del pico (convertido a mili unidades de absorbancia, mUA).

### **5.3.2. Eficiencia del proceso de concentrado de pulpa de camu camu en el contenido de ácido ascórbico**

En pulpa de camu camu fresco, GONZÁLEZ (2 007) y VILLACHICA (1 996) obtuvieron 2 780,0 mgAA/100g pero no reportan el método empleado; ZAPATA y DUFOUR (1 993), por el método de HPLC en fase reversa y con muestras obtenidas de Iquitos, Perú, obtuvieron valores de 845 mg/100g en la pulpa de camu camu verde y de 939 mgAA/100g en pulpa de camu camu pintón y maduro; RODRIGUES *et al.* (2 004), en camu camu de Brasil obtuvo 1 100 mgAA/100g con el método espectrofotométrico. Los resultados que se indican en el cuadro 11 de pulpa fresca en ambos estados de madurez, están dentro del rango de ácido ascórbico en camu camu, existiendo algunas diferencias entre ellos. MEDINA y PAGANO (2 003), reportan en pulpa fresca de guayaba que, los rangos amplios en el contenido de ácido ascórbico dependen de varios factores: a) del estado de madurez del fruto (verdes, ligeramente maduras y completamente maduras); b) su distribución en la fruta no es uniforme (piel y pulpa central); c) la localización geográfica, las prácticas de cultivo, estación del año y el cultivar del guayabo. Además menciona que para el caso específico de limones y mandarinas el contenido de vitamina C es alto en zonas altas en comparación con las procedentes de zonas tropicales. Otros factores podrían atribuirse al método de pulpeado y al método de análisis. El método de cromatografía HPLC se diferencia de otros métodos porque garantiza límites de detección y cuantificación más bajos, teniendo una especificidad incrementada por el hecho



de separar o eliminar eficazmente las sustancias interferentes (ADRIAN, 2 000 y GUTIÉRREZ, 2 007).

En el cuadro 11 también se observa un incremento en el contenido de ácido ascórbico, de  $29,76 \pm 3,46\%$  ( $1,43 \pm 0,07$  veces) y  $34,22 \pm 1,27\%$  ( $1,52 \pm 0,03$  veces) para las pulpas pintón y maduro, respectivamente, esto es, debido al proceso de concentrado al que fueron sometidas las pulpas, y que hizo aumentar también el contenido de sólidos solubles. En el estado pintón aumentó de 5,5 °Brix (pulpa sin concentrar) a 10,5 °Brix (pulpa concentrada) y en el estado maduro de 6,8 °Brix (pulpa sin concentrar) a 11,5 °Brix (pulpa concentrada).

RODRIGUES *et al.* (2 004), concentraron pulpa de camu camu por el método de osmosis reversa y evaporación osmótica; para osmosis reversa partieron de una pulpa con 6,1 °Brix y con 1 100 mgAA/100g y obtuvo al final del concentrado una pulpa concentrada con 14, 8° Brix y con 2 170mgAA/100g, representando este aumento el 49,31% en cantidad de ácido ascórbico, y para el método de evaporación osmótica partieron de una pulpa que contenía 6,6 °Brix y 1 140 mgAA/100g, obteniendo al final una pulpa concentrada con 24,7 °Brix y con 4 170 mgAA/100g, representando este aumento el 72,66% en cantidad de ácido ascórbico; por otra parte, BRASIL *et al.* (2 008), concentraron pulpa de acerola (*Malpighia emarginata* DC.), partiendo de una pulpa con 6,0 °Brix y 612,08 mgAA/100g y obtuvieron una pulpa concentrada con 38,0 °Brix y con 2 112,28 mgAA/100g, este aumento representa el 71,02%.

Según los resultados obtenidos, el proceso de concentrado desarrollado fue eficiente en concentrar el ácido ascórbico de la pulpa de camu camu en dos estados de madurez. Los autores obtuvieron mayores rendimientos esto debido al método y condiciones de concentrado utilizado y a la cantidad final de sólidos solubles mayor que en el presente estudio.

### **5.3.3. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por estado de madurez**

Según el ANVA del ANEXO A – II, muestra que existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el contenido de ácido ascórbico presente en las pulpas concentradas de camu camu, encontrándose mayor contenido en el estado maduro con un promedio de  $2\ 848,68 \pm 64,22$  mgAA/100g en comparación con el estado pintón que posee  $1\ 913,74 \pm 53,17$  mgAA/100g, esta diferencia se observa en la figura 14, donde se muestra el cromatograma HPLC de AA presente en la pulpa concentrada de camu camu pintón y maduro. Ha sido muy conocido que el contenido de vitamina C en alimentos puede variar apreciablemente dependiendo a condiciones de crecimiento, estado de madurez, diferentes regiones y estaciones del año (VANDERSLICE y HIGGS, 1 991). ZAPATA y DUFOUR (1 993), no encontraron diferencia significativa en el contenido de ácido ascórbico de los estados de madurez pintón y maduro, analizados en frutos de camu camu procedente de Iquitos – Perú, indicando que a la fruta pintona se extrajo las cáscaras y semillas, pero no indica si se hizo lo mismo con la fruta madura. En el presente estudio se empleó fruta entera tal que en el proceso de pulpeado sólo se eliminó semillas y cáscaras de un tamaño superior a 1 mm de diámetro.

Al comparar el contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por estado de madurez en cada día de evaluación según los ANEXOS A – IIa, IIb y IIc, cuadro 12 y figura 13, se observa que el estado maduro posee mayor contenido de ácido ascórbico que el estado pintón, en todos los días de evaluación existiendo diferencias altamente significativas entre ellos ( $p < 0,05$ ).

En conclusión estos resultados indican que la pulpa concentrada de camu camu maduro contiene mayor contenido de ácido ascórbico que el estado pintón.

BRASIL *et al.* (2008), determinaron el contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada de acerola (*Malpighia emarginata* DC.), obteniendo 2112,28 mgAA/100g, y GUTIÉRREZ *et al.* (2007), encontraron en la uchuva (*Physalis peruviana* L.), que contiene 33,2 mgAA/100g. La pulpa concentrada de camu camu maduro supera en contenido de ácido ascórbico a pulpa de acerola concentrada y a la uchuva, pero la pulpa concentrada de camu camu pintón solo supera a la uchuva.

#### **5.3.4. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento**

Según el ANVA del ANEXO A – III, muestra que no existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento en ambos estados de madurez, esto es cuando los promedios de ambos estados se comparan en el tiempo de almacenamiento, pero, al comparar por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez, según los ANEXOS A – IIIa, IIIb, cuadro 13 y figura 15, muestran que, en el estado pintón hay diferencias

significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento, y comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), se encontró mayor contenido al inicio de la evaluación con  $2\ 041,01 \pm 29,68$  mg/100g, asimismo se observa que no hay deterioro de ácido ascórbico en días 30 y 60. En la pulpa concentrada de camu camu maduro, hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento, y comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), el mayor contenido de ácido ascórbico se registró a los 0 y 30 días de almacenamiento con  $2\ 824,12 \pm 41,80$  y  $2\ 950,56 \pm 33,15$  mgAA/100g, respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre ellos. Además no existe diferencias estadísticas entre los días 0 y 60, pero si entre los días 30 y 60 de la evaluación.

ARTÉS-HERNÁNDEZ *et al.* (2007), evaluaron el deterioro del ácido ascórbico en trozos de limón (*Citrus lemon* L.) envasados en plástico rígido y almacenados a 0, 2, 5 y 10 °C por 10 días. Partieron todas las evaluaciones de un inicial en ácido ascórbico de 38,4 mg/100ml de limón. A los 4 días de almacenamiento encontraron un aumento en los trozos cortados (1/2) almacenados a 0°C con 40,5 mg/100ml, disminuyendo a 28,8 mg/100ml a los 7 días y aumentando a 36,7 mg/100ml de limón a los 10 días. Sin embargo los trozos de limón cortados (1/4), almacenados a 10°C, disminuyeron el contenido de ácido ascórbico en los días 4 y 7 con 35,7 mg/100ml y 30,7 mg/100ml de limón, respectivamente, e incrementó a 38,5 mg/100ml de jugo a los 10 días de almacenamiento.

De acuerdo con estos resultados, la pulpa concentrada de camu camu pintón y maduro envasada al vacío en bolsas de polietileno y almacenada entre -15 a -10°C, tuvo un comportamiento parecido comparado al limón (aumento y disminución en el contenido de ácido ascórbico), en los días de almacenamiento.

En conclusión en el estado maduro, el contenido de ácido ascórbico se conservó en almacenamiento, y en el estado pintón disminuyó significativamente. Podría atribuirse a la baja temperatura de almacenamiento (rango de -15 a -10°C), por lo cual el contenido de ácido ascórbico del estado maduro conservó.

#### **5.3.5. Contenido de ácido ascórbico en pulpa concentrada por tratamientos**

Los resultados fueron analizados según el ANEXO A – IV. En el cuadro 14 y en la figura 16, se muestran los resultados del contenido de ácido ascórbico en la pulpa concentrada de camu camu por tratamientos, observándose que no existe diferencia significativa entre los tratamientos T5 y T4; T5 es significativamente superior a T1, T2, T3 y T6. Además no hay significancia entre T4 y T6 pero ambos tratamientos son estadísticamente superiores a T1, T2 y T3; también T1 es estadísticamente superior a T2 y T3; no existiendo significancia entre T2 y T3 ( $p < 0,05$ ).

Los resultados indican que los tratamientos T4 y T5 correspondiente al estado maduro, son los que poseen mayor contenido de ácido ascórbico.

#### **5.4. Cuantificación de polifenoles totales en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre $-15$ a $-10^{\circ}\text{C}$**

Hay un crecimiento interesante en el uso de antioxidantes polifenólicos extraídos de plantas como suplemento en la dieta alimenticia (PUANGPRONPITAG *et al.*, 2 008). Los compuestos fenólicos son de gran importancia biológica y se encuentran presentes principalmente en frutas pero también en menor cantidad en hojas, flores y otros órganos vegetales (VILLEGAS-OCHOA *et al.*, 2 005).

Los resultados se analizaron mediante el diseño completo al azar (DCA) con un arreglo factorial de  $2 \times 3$  (ANEXO B – I).

##### **5.4.1. Determinación de la curva patrón de catequina**

Se obtuvo un coeficiente de correlación ( $r^2 = 0,998$ ), con una ecuación lineal:  $\text{Absorbancia} = 0,00011(\text{Concentración de CAT, } \mu\text{M}) + 0,00379$  para determinar el contenido de polifenoles totales presente en la pulpa de camu camu en dos estados de madurez (figura 17). VARGAS *et al.* (2 005), determinaron el contenido de fenólicos libres enlazados y totales en pulpa de arazá usando el reactivo de Folin-Ciocalteu y lectura espectrofotométrica a 765 nm, para lo cual efectuaron una curva de calibración con D(+)catequina.

##### **5.4.2. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por estado de madurez**

Según el ANVA del ANEXO B – II, muestra que existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), en el contenido de polifenoles totales presente en las pulpas concentradas de camu camu, encontrándose mayor contenido en el

estado maduro con un promedio de  $47,81 \pm 2,36$  mgCAT/g en comparación con el estado pintón que posee  $30,94 \pm 1,33$  mgCAT/g.

Al comparar el contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por estado de madurez en cada día de evaluación según los ANEXOS B – IIa, IIb y IIc, cuadro 15 y figura 18, se observa que el estado maduro posee mayor contenido de polifenoles totales que el estado pintón, en todos los días de evaluación existiendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). ARTÉS-HERNÁNDEZ *et al.* (2007), mencionan que el contenido de compuestos fenólicos decrece con la maduración en frutas como el plátano, guaba y granada. En el presente estudio, ocurre lo contrario ya que se obtuvo mayor contenido de polifenoles en el estado maduro. Esta diferencia podría atribuirse a la distinta composición que poseen estas frutas en comparación con el camu camu ó también debido al mayor contenido de polifenoles que existe en la cáscara del maduro y que la mayor parte de esta cáscara fue desmenuzada en el pulpeado y está presente en la pulpa.

En conclusión estos resultados indican que la pulpa concentrada de camu camu maduro contiene mayor contenido de polifenoles totales que el estado pintón.

#### **5.4.3. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento**

Según el ANVA del ANEXO B – III, muestra que no existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento en ambos estados de madurez, esto es cuando los promedios de ambos estados se

compara en el tiempo de almacenamiento, pero, al comparar por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez, según los ANEXOS B – IIIa , IIIb, cuadro 16 y figura 19, muestran que, en el estado pintón hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento, y comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), se encontró mayor contenido al inicio de la evaluación con  $35,63 \pm 0,47$  mgCAT/g, además se observa una pérdida de polifenoles totales significativa a los 30 días de almacenamiento, manteniéndose constante entre los 30 y 60 días. En la pulpa concentrada de camu camu maduro, hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento, y comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), el mayor contenido de polifenoles totales se registró a los 0 y 60 días de almacenamiento con  $50,23 \pm 1,09$  y  $47,57 \pm 1,21$  mgCAT/g, respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre ellos, y una pérdida de polifenoles totales significativa a los 30 días, pero no siendo significativa ante el día 60 de evaluación.

ARTÉZ-HERNÁNDEZ *et al.* (2007), mencionan que los compuestos fenólicos están involucrados en muchas interacciones que responden al estrés biótico y abiótico en las plantas. En efecto, los frutos de camu camu fueron pulpeados y concentrados por lo que podría decirse que los frutos se sometieron a un stress abiótico, repercutiendo este proceso en las variaciones del contenido de polifenoles. Evaluaron también el contenido de polifenoles totales en trozos de limón (*Citrus lemon* L.) envasados en plástico rígido y almacenados a 0, 2, 5 y 10°C, encontrando pérdida gradual a los 10



días de almacenamiento en todas las temperaturas, excepto en los limones almacenados a 0°C, que mantuvo su contenido de polifenoles.

El contenido de polifenoles totales está influenciado por el contenido de compuestos fenólicos libres y enlazados. Los compuestos enlazados por lo general se encuentran como glucósidos. Si existe actividad glucosídica, se generarán los carbohidratos y las respectivas agliconas, por lo que, ocurrirá un incremento de los compuestos fenólicos libres. Además los compuestos fenólicos libres pueden ser atacados a una mayor velocidad que los enlazados por enzimas tales como la polifenoloxidasa y la peroxidasa. VARGAS *et al.* (2005). En el presente estudio las pulpas no fueron tratadas térmicamente (operación de blanqueado) por lo que, estas enzimas, presentes en muchas frutas también podrían estar presentes en el camu camu y no fueron inactivadas con el objeto de preservar el contenido de ácido ascórbico tal y como provienen de la cosecha para su evaluación en almacenamiento entre -15 a -10°C.

En conclusión en el estado maduro, el contenido de polifenoles totales se conservó en almacenamiento, y en el estado pintón disminuyó significativamente.

#### **5.4.4. Contenido de polifenoles totales en pulpa concentrada por tratamientos**

En el cuadro 17, en la figura 20 y el ANVA del ANEXO B – IV, se observa que los tratamientos T4, T5 y T6 son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ) y son superiores a T1, T2 y T3. Además, T1 es superior a T2 y T3

( $p < 0,05$ ), no existiendo diferencia significativa entre T2 y T3 ( $p < 0,05$ ). Estos datos nos indican que los tratamientos T4, T5 y T6 correspondiente al estado maduro evaluados a los 0, 30 y 60 días de almacenamiento, son los que siempre poseen mayor contenido de polifenoles totales.

### **5.5. Cuantificación de catequina en pulpa concentrada de camu camu, almacenado entre $-15$ a $-10^{\circ}\text{C}$**

Las polifenoles (catequinas) de origen vegetal como la catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, galato de catequina, galato de galocatequina, galato de epicatequina y galato de epigalocatequina tienen una actividad antioxidante poderosa y tienen numerosas propiedades medicinales potencialmente benéficos, incluyendo la inhibición de carcinogénesis (DALLUGE, J y NELSON, B. 2 000).

Los resultados se analizaron mediante el diseño completo al azar (DCA) con un arreglo factorial de  $2 \times 3$  (ANEXO C – I).

#### **5.5.1. Determinación de la curva patrón de catequina**

Se obtuvo un coeficiente de correlación ( $r^2 = 0,9989$ ), con una ecuación lineal: Absorbancia (mUA) =  $0,0652$  (Concentración de CAT,  $\mu\text{M}$ ) +  $0,1856$  para determinar el contenido de catequina presente en la pulpa de camu camu en dos estados de madurez (figura 21), y en la figura 22 se muestra el cromatograma HPLC obtenido al inyectar estándar de CAT a  $500 \mu\text{M}$ . DING *et al.* (1 999), mencionan que hay muchos métodos para determinar polifenoles en té, siendo la cromatografía líquida en columna, el método mas conveniente. Desarrollaron un método rápido por cromatografía líquida en fase

reversa para determinar los principales polifenoles y cafeína en té: catequina, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, epigallocatequina, epicatequina y cafeína, los cuales fueron separados satisfactoriamente en 15 min. Sandoval *et al.* (2002a), determinaron catequinas en extractos acuosos de Maca (*Lepidium meyenii*) y té verde (*Camellia sinensis*), por HPLC en fase reversa, usando estándares de catequina, galato de epigallocatequina y polifenón 60 (mezcla de epigallocatequina, epicatequina y galato de epicatequina). Sandoval *et al.* (2002b), determinaron catequinas en muestras liofilizadas de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) empleando HPLC en fase reversa, detectando catequina, epigallocatequina, epicatequina y galato de epigallocatequina.

### **5.5.2. Contenido de catequina en pulpa concentrada por estado de madurez**

Según el ANVA del ANEXO C – II, muestra que existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), en el contenido de catequina presente en las pulpas concentradas de camu camu, encontrándose mayor contenido el estado maduro con un promedio de  $0,44 \pm 0,015$  mgCAT/g en comparación con el estado pintón que posee  $0,31 \pm 0,019$  mgCAT/g, esta diferencia se observa en las figuras 24 y 25, donde se muestran los cromatogramas HPLC de CAT presente en la pulpa concentrada de camu camu pintón y maduro.

Al comparar el contenido de catequina en pulpa concentrada por estado de madurez en cada día de evaluación según los ANEXOS C – IIa, IIb y IIc, cuadro 18 y figura 23, se observa que el estado maduro posee mayor

contenido de catequina que el estado pintón, en todos los días de evaluación existiendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Al comparar la pulpa concentrada del estado maduro con el extracto acuoso de maca (*Lepidium meyenii*) micropulverizada y con el te verde (*Camellia sinensis*), el estado maduro tiene mayor contenido de catequina que la maca y menor contenido que el té verde (te verde,  $30,39 \pm 1,9$  mg/g, extracto acuoso de  $[\ ] = 50$  mg/ml  $>$  estado maduro,  $0,45 \pm 0,015$  mg/g  $>$  maca,  $0,32 \pm 0,001$  mg/g de extracto acuoso de  $[\ ] = 50$  mg/ml) (SANDOVAL *et al.*, 2 002a); asimismo es inferior a la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) ( $8,47 \pm 0,1$  mg/g de producto liofilizado), (SANDOVAL *et al.*, 2 002b).

En conclusión los resultados obtenidos indican que la pulpa concentrada de camu camu maduro contiene mayor contenido de catequina que la maca y el estado pintón.

### **5.5.3. Contenido de catequina en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento**

Según el ANVA del ANEXO C – III, muestra que no existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento en ambos estados de madurez, esto es cuando los promedios de ambos estados se compara en el tiempo de almacenamiento, pero, al comparar por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez, según los ANEXOS C – IIIa , IIIb, cuadro 19 y figura 26, muestran que, en el estado pintón hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento, y comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), se encontró mayor contenido

a los 30 días de la evaluación con  $0,34 \pm 0,008$  mgCAT/g, ya que en este día aumentó su contenido de catequina, asimismo se observa que hay una pérdida significativa de catequina en el día 60, pero que no es significativo en comparación con el día 0 de la evaluación. En la pulpa concentrada de camu camu maduro, hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento, y comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), el mayor contenido de catequina se registró a los 0 y 30 días de almacenamiento con  $0,45 \pm 0,015$  y  $0,46 \pm 0,008$  mgCAT/g, respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre ellos, además se observa que no hay diferencias significativas entre los días 0 y 60, pero si entre los días 30 y 60 de la evaluación.

En conclusión en el estado pintón el contenido de catequina se conservó en el almacenamiento al igual que en el estado maduro.

#### **5.5.4. Contenido de catequina en pulpa concentrada por tratamientos**

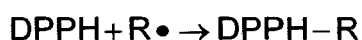
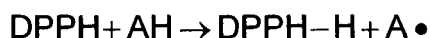
En el cuadro 20, en la figura 27 y según el ANVA del ANEXO C – IV, se observa que los tratamientos T4, T5 son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ); T5 es superior a T1, T2, T3 y T6 ( $p < 0,05$ ). Además no hay significancia entre T4 y T6 ( $p < 0,05$ ), pero T6 es estadísticamente superior a T1, T2 y T3 ( $p < 0,05$ ); T2 y T3 son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ) y también son superiores a T1 ( $p < 0,05$ ). Estos resultados nos indican que los tratamientos T4, T5 y T6 correspondiente al estado maduro evaluados a los 0, 30 y 60 días de almacenamiento, son los que siempre poseen mayor contenido de catequinas.

## 5.6. Evaluación de la actividad antioxidante en pulpa concentrada de camu camu, almacenado a $-15$ a $-10^{\circ}\text{C}$

Los resultados se analizaron mediante el diseño completo al azar (DCA) con un arreglo factorial de  $2 \times 3$ . ANEXO D – I para el radical DPPH y ANEXO E – I para el radical peroxilo.

### 5.6.1. Radical 2,2 diphenyl-1-picrilhidrazyl (DPPH)

Para evaluar la actividad antioxidante de compuestos específicos ó extractos, éstos se hacen reaccionar con el radical estable 2,2 diphenyl-1-picrilhidrazyl (DPPH) en solución de metanol. La reducción del DPPH es seguido monitoreando el decremento en su absorbancia a una longitud de onda característica durante la reacción. En su forma radical, el DPPH absorbe a 515 nm, pero en la reducción por un antioxidante (AH) o una especie radical ( $\text{R}\bullet$ ) la absorción desaparece (BRAND-WILLIAMS et al, 1 995).



El DPPH es un radical libre estable que puede aceptar un electrón ó radical de hidrógeno para volverse una molécula diamagnética estable. Debido a su electrón impar, la solución metanólica muestra una banda de absorción fuerte a 517 nm, el cual decrece en la presencia de capturadores de radicales libres (antioxidantes). La actividad de capturar al DPPH ha sido ampliamente usada como un parámetro rápido y confiable para evaluar la actividad antioxidante general in vitro de extractos de plantas, atribuido a

compuestos fenólicos, ácidos fenólicos y flavonoides. (GONÇALVES *et al.*, 2 005).

#### **5.6.1.1. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por estado de madurez**

Ambos estados de madurez presentaron gran eficiencia para inhibir al radical DPPH; el % Inhibición promedio de las 3 fechas de evaluación para el estado pintón y maduro es  $95,19 \pm 0,34$  y  $95,49 \pm 0,33\%$ , respectivamente. Bajos valores en el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ), reflejan mayor actividad para inhibir los radicales libres (DE ANCOS *et al.*, 2 000); según este parámetro los resultados obtenidos de  $IC_{50}$ , calculados mediante el % de inhibición del radical DPPH (ANEXO F, figura 34 y 35), existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambos estados de madurez (ANEXO D – II) , el estado maduro presenta menor  $IC_{50}$  (promedio de las 3 fechas de evaluación), en comparación con el estado pintón ( $6,38 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$  vs  $12,52 \pm 3,34 \mu\text{g/ml}$ ), por lo tanto la pulpa concentrada de camu camu maduro presenta mayor actividad para inhibir el radical DPPH. La actividad antioxidante se ve influenciado directamente al contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales (VÁSQUEZ *et al.*, 2 007) y al contenido de catequina.

Al comparar la actividad antioxidante en pulpa concentrada por estado de madurez en cada día de evaluación según los ANEXOS D – IIa, IIb y IIc, cuadro 21 y figura 28, se observa que el estado maduro posee mayor actividad antioxidante que el estado pintón, en todos los días de evaluación existiendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Al comparar los resultados obtenidos (al inicio del almacenamiento) con otros productos analizados por este mismo método, las pulpas concentradas de camu camu de ambos estados de madurez poseen mayor actividad antioxidante ( $IC_{50}$ ) que la maca micropulverizada (*Lepidium meyenii*) (extracto acuoso de  $[\ ]=50$  mg/ml) determinado por SANDOVAL *et al.* (2 002a), (estado maduro, 6,86  $\mu$ g/ml > estado pintón, 19,12  $\mu$ g/ml > maca, 610  $\mu$ g/ml), además superiores a las dos especies de uña de gato (producto liofilizado) determinados por SANDOVAL *et al.* (2 002b) *Uncaria tomentosa* (UT) y *Uncaria guianensis* (UG) (estado maduro, 6,86  $\mu$ g/ml > UG, 12,6  $\mu$ g/ml > UT, 20,8  $\mu$ g/ml), en cambio en el estado pintón solo supera a la UT (UG, 12,6  $\mu$ g/ml > estado pintón, 19,12  $\mu$ g/ml > UT, 20,8  $\mu$ g/ml), también ambos estados de madurez son superiores a la cascara de camu camu determinado por VILLANUEVA (2 003) (estado maduro, 6,86  $\mu$ g/ml > estado pintón, 19,12  $\mu$ g/ml > cascara pintón, 46,20  $\mu$ g/ml).

En conclusión estos resultados indican que la pulpa concentrada de camu camu maduro contiene mayor actividad antioxidante que el estado pintón.

#### **5.6.1.2. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento**

Según el ANVA del ANEXO D – III, muestra que no existe diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre los días de almacenamiento en ambos estados de madurez, esto es cuando los promedios de ambos estados se compara en el tiempo de almacenamiento, pero, al comparar por tiempo de



almacenamiento en cada estado de madurez, según los ANEXOS D – IIIa , IIIb, cuadro 22 y figura 29, muestran que, en el estado pintón hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento, y comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), se observa mayor actividad antioxidante esta a los 30 días de almacenamiento con un  $IC_{50}$  igual  $8,35 \pm 0,13$   $\mu\text{g/ml}$ , baja actividad al inicio de la evaluación y una mejora significativa a los 60 días, con respecto al primer día, pero una disminución significativa con respecto al día 30. En la pulpa concentrada de camu camu maduro, hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento, y comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), se observa mayor actividad antioxidante en los 60 días de almacenamiento con un  $IC_{50}$  igual  $5,85 \pm 0,17$   $\mu\text{g/ml}$ , además se mantiene la actividad antioxidante en los primeros 30 días de almacenamiento, incrementándose significativamente al final de la evaluación.

En conclusión la actividad antioxidante aumentó en almacenamiento en ambos estados de madurez.

#### **5.6.1.3. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tratamientos**

En el cuadro 23, en la figura 30 y según el ANVA del ANEXO D – IV, se observa que los tratamientos T5 y T6 son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ) y poseen las mayores actividades antioxidantes; T6 es superior a T1, T2, T3 y T4 ( $p < 0,05$ ) y T5 es superior a T1, T2 y T3. Comparando T4 y T5 se observa que no hay significancia entre ellos ( $p < 0,05$ ), y ambos son

estadísticamente superiores a T1, T2 y T3 ( $p < 0,05$ ); T2 es superior a T1 y T3 ( $p < 0,05$ ), pero T3 es superior a T1 ( $p < 0,05$ ). Estos resultados nos indican que los tratamientos T4, T5 y T6 correspondiente al estado maduro evaluados a los 0, 30 y 60 días de almacenamiento, son los que siempre poseen mayor actividad antioxidante.

### **5.6.2. Radical peroxilo**

La determinación del potencial antioxidante total (TRAP) ha sido la técnica ampliamente usada para el estudio de antioxidantes en fluidos biológicos (SANDOVAL *et al.*, 2 002; PINEDA *et al.*, 1 999). Radical peroxilo está formado sobre la reacción de los radicales centrados en carbono con oxígeno y esta formación es el mejor paso de propagación en cadena en la peroxidación de lípidos. Son biológicamente especies de actividad relevante con alta capacidad de hacer daño a los constituyentes celulares (GONÇALVES *et al.*, 2 005).

#### **5.6.2.1. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por estado de madurez**

Ambos estados de madurez presentaron gran eficiencia para inhibir al radical peroxilo; el % Inhibición promedio de los 3 tiempos de almacenamiento para el estado pintón y maduro es  $94,60 \pm 1,08\%$  y  $97,10 \pm 0,47\%$ , respectivamente. Al igual que en el análisis de actividad antioxidante mediante el radical DPPH, bajos valores en el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) reflejan mayor actividad para inhibir los radicales libres; según este parámetro los resultados obtenidos de  $IC_{50}$ , calculados mediante el % de

inhibición del radical peroxilo (ANEXO F, figura 36 y 37), existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambos estados de madurez (ANEXO E – II) , el estado maduro presenta menor  $IC_{50}$  (promedio de las 3 fechas de evaluación), en comparación con el estado pintón (maduro,  $1,86 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$  vs pintón,  $2,56 \pm 0,31 \mu\text{g/ml}$ ) ( $p < 0,05$ ), por lo tanto la pulpa concentrada de camu camu maduro presenta mayor actividad para inhibir el radical peroxilo. La actividad antioxidante se ve influenciado directamente con el contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales (VÁSQUEZ *et al.*, 2 007) y al contenido de catequina.

Al comparar la actividad antioxidante en pulpa concentrada por estado de madurez en cada día de evaluación según los ANEXOS E – IIa, IIb y IIc, cuadro 24 y figura 31, se observa que el estado maduro posee mayor actividad antioxidante en los primeros 30 días de almacenamiento en comparación con el estado pintón ( $p < 0,05$ ), pero la actividad de estado pintón mejora al final de la evaluación, igualando estadísticamente al estado maduro en ese mismo día de evaluación (día 60) ( $p < 0,05$ ).

Al comparar los resultados obtenidos (en el inicio del almacenamiento) con otros productos analizados por este mismo método, las pulpas concentradas de camu camu de ambos estados de madurez poseen mayor actividad antioxidante ( $IC_{50}$ ) que la maca (*Lepidium meyenii*) micropulverizada (extracto acuoso de  $[\ ] = 50 \text{ mg/ml}$ ) determinado por SANDOVAL *et al.* (2 002a), (estado maduro,  $1,75 \mu\text{g/ml}$  > estado pintón,  $2,96 \mu\text{g/ml}$  > maca,  $430 \mu\text{g/ml}$ ), además superiores a las dos especies de uña de

gato (producto liofilizado) determinados por SANDOVAL *et al.* (2 002b) *Uncaria tomentosa* (UT) y *Uncaria guianensis* (UG), (estado maduro, 1,75 µg/ml > estado pintón, 2,96 µg/ml > UG, 4,8 µg/ml > UT, 7,7 µg/ml), también ambos estados de madurez son superiores a la cascara de camu camu determinado por VILLANUEVA (2 003) (estado maduro, 1,75 µg/ml > estado pintón, 2,96 µg/ml > cascara pintón, 8,30 µg/ml).

En conclusión estos resultados indican que la pulpa concentrada de camu camu maduro contiene mayor actividad antioxidante que el estado pintón, con excepción del último día de evaluación (día 60), que ambos estados presentan actividad antioxidante estadísticamente igual.

#### **5.6.2.2. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tiempo de almacenamiento**

Según el ANVA del ANEXO D – III, muestra que no existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento en ambos estados de madurez, esto es cuando los promedios de ambos estados se compara en el tiempo de almacenamiento, pero; al comparar por tiempo de almacenamiento en cada estado de madurez, según los ANEXOS E – IIIa , IIIb, cuadro 25 y figura 32, muestran que, en el estado pintón hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento, y comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), se observa mayor actividad antioxidante al final de la evaluación con un  $IC_{50}$  igual  $1,94 \pm 0,04$  µg/ml, y menor actividad antioxidante en los primeros 30 días de almacenamiento ya que entre los valores de los días 0 y 30 son estadísticamente iguales. En la

pulpa concentrada de camu camu maduro, hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento, y comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), se observa mayor actividad antioxidante en los 0 y 60 días de almacenamiento con un  $IC_{50}$  igual  $1,75 \pm 0,02$  y  $1,77 \pm 0,08$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre ellos. A los 30 días de almacenamiento, hay una disminución significativa de la actividad antioxidante, volviendo a recuperar su actividad al final de la evaluación.

En conclusión la actividad antioxidante aumentó en el estado pintón y se mantuvo constante durante el almacenamiento en el estado maduro.

#### **5.6.2.3. Actividad antioxidante en pulpa concentrada por tratamientos**

En el cuadro 26, en la figura 33 y el análisis del ANVA del ANEXO E – IV, se observa que los tratamientos T3, T4 y T6 presentan una actividad antioxidante estadísticamente igual ( $p < 0,05$ ) y son superiores a T1, T2 y T5 ( $p < 0,05$ ). Además no hay significancia en la actividad antioxidante entre T5 y T3 ( $p < 0,05$ ), pero ambos son estadísticamente superiores a T1 y T2 ( $p < 0,05$ ), siendo T1 y T2 estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ). Estos resultados nos indican que los tratamientos T4 y T6 correspondiente al estado maduro evaluados a los 0 y 60 días de almacenamiento, poseen mayor actividad antioxidante que los demás tratamientos, con excepción del tratamiento T3, que corresponde al estado pintón a los 60 días de almacenamiento, que llega a tener una actividad antioxidante estadísticamente igual a los tratamientos T4 y T6.

## 5.7. Análisis microbiológicos

La existencia de bacterias coliformes, mohos y levaduras en un alimento o un producto transformado, indican la mala higiene que se haya tenido durante la recolección, el transporte u otra operación durante el proceso.

En los resultados obtenidos se observa que el contenido de bacterias coliformes totales, fecales y *Escherichia coli* están presentes en una cantidad  $< 0,3/g$  en ambos estados de madurez, y los mohos y levaduras en 5 u.f.c./g en el estado pintón y 3 u.f.c./g en el maduro. Según la ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS) (1 992), recomienda que no debe existir presencia de bacterias patógenas en un alimento destinado al consumo humano. Los resultados obtenidos, muestran que la pulpa concentrada de camu camu, obtenida con nuestras condiciones experimentales, permitió obtener un producto con las cualidades de calidad y salubridad recomendadas por la OMS.

HASHMI *et al.* (2 007), evaluaron la calidad microbiológica y sensorial de pulpa de mango y encontró que el promedio del conteo total de bacterias (TBC) of mango fue significativamente ( $p < 0,01$ ) incrementándose de 5,4 u.f.c./g a 135.9 u.f.c./g durante el almacenamiento. Esto no sucedió en la pulpa de camu camu, conservando su calidad microbiológica hasta los 60 días almacenamiento.

Los flavonoides que están presentes en las frutas, son sustancias relevantes por su capacidad antioxidante, propiedades antialérgicas, antivirales y antimicrobianas (contra bacterias Gram positivas y Gram negativas),

antiinflamatorias, antitumorales, entre otras (SOTO *et al.*, 2 007). También se ha observado que el uso de antioxidantes y agentes antimicrobianos, ya sea solos o en combinación con otras tecnologías, pueden reducir el oscurecimiento, deterioro y el desarrollo de microorganismos en algunos alimentos de origen vegetal (VILLEGAS-OCHOA *et al.*, 2 005).

El pH ácido de la pulpa concentrada, pudo ser, también un factor importante que contribuyó a la inhibición del crecimiento bacteriano. En tal sentido las pulpas concentradas obtenidas, preservaron su calidad microbiológica por el bajo pH y por los compuestos antioxidantes que poseen.

## VI. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y a los objetivos del presente estudio se puede concluir lo siguiente:

- La pulpa concentrada de camu camu maduro presentó mayor contenido de ácido ascórbico. En este estado de madurez el contenido de ácido ascórbico se mantuvo constante en el almacenamiento, mientras que en el estado pintón disminuyó significativamente. El tratamiento T5 presento mayor contenido de ácido ascórbico con  $2\,950,56 \pm 33,15\text{mgAA}/100\text{g}$ .

- La pulpa concentrada de camu camu maduro presentó mayor contenido de polifenoles totales. En este estado de madurez el contenido de polifenoles totales se mantuvo constante en el almacenamiento, mientras que en el estado pintón disminuyó significativamente. El tratamiento T4 presento mayor contenido de polifenoles totales con  $50,23 \pm 1,09\text{mgCAT}/\text{g}$ .

- La pulpa concentrada de camu camu maduro presentó mayor contenido de catequina. En ambos estados de madurez el contenido de catequina se mantuvo constante en el almacenamiento. El Tratamiento que presento mayor contenido de catequina fue T4 con  $0,46 \pm 0,008\text{mgCAT}/\text{g}$ .

- En la prueba de radical DPPH, la pulpa concentrada de camu camu maduro presentó mayor actividad antioxidante. Ambos estados de



madurez incrementaron significativamente su actividad antioxidante durante el almacenamiento. El tratamiento que presentó mayor actividad fue T6, con un  $IC_{50}$  de  $5,85 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$ .

- En la prueba del radical peróxido, la pulpa concentrada de camu camu maduro presentó mayor actividad antioxidante. El estado pintón presentó un incremento significativo en la actividad antioxidante durante el almacenamiento, mientras que en el estado maduro se mantuvo constante. El tratamiento que presentó mayor actividad fue T4 con un  $IC_{50}$  de  $1,75 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ .

- Se caracterizó el producto concentrado al término del periodo de almacenamiento encontrándose que ambos estados de madurez presentaron cantidades apreciables de proteína, humedad, grasa, fibra, ceniza y carbohidratos, y minerales como el Cu, Fe, Zn y Mg. Además ambos estados presentaron buena calidad microbiológica y de salubridad recomendadas por la OMS.

## VII. RECOMENDACIONES

Según los resultados obtenidos, se recomienda lo siguiente:

- Procesar el camu camu de selva alta en estado maduro, por presentar mayor actividad antioxidante que el pintón.

- Fomentar el cultivo de camu camu producido en la zona de Selva Alta para la exportación de pulpa concentrada, envasada a vacío y congelada, por los resultados obtenidos en el presente estudio.

- Fomentar la elaboración de productos Nutracéuticos tales como capsulas y bebidas, con alto contenido en vitamina C, para propósitos de salud.

- Cuantificar vitamina C total en muestras de camu camu cultivadas en la zona de Selva Alta, por reducción del ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico, empleando agentes reductores tal como el ditiotreitrol (DTT).

- Evaluar los parámetros tecnológicos para obtener un producto atomizado ó liofilizado empleando pulpa procesada como en el presente estudio.

- Realizar estudios de actividad antioxidante, antocianinas, ácido ascórbico, catequinas y polifenoles totales en pulpa de camu camu

concentrado hasta más del 60% p/p, empleando el equipo de rotavapor adecuado.

- Realizar estudios de actividad antioxidante, antocianinas, ácido ascórbico, catequina y polifenoles totales, en pulpa de camu camu cultivado en Selva Alta, concentrado por otros métodos tales como: osmosis inversa, evaporación osmótica y crioconcentración.

- Realizar estudios de clarificación con enzimas pectolíticas para obtener zumo claro de camu camu, a partir de pulpa fresca de frutos cultivados en Selva Alta.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- ACEVEDO, B. y AVANZA, J.** 2 005. Concentración por evaporación de jugos de lima Rangpur. UNNE. E-056. p. 3.
- ADRIAN, J.** 2 000. Análisis nutricional de los alimentos. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S.A. 292 p.
- AOAC.** 1 995. Official methods of analysis of the association official analytical. Chemistry. 16<sup>th</sup> Ed. Vol II. Washington. 850 p.
- AOAC.** 1 998. Bacteriological Analytical Manual 18<sup>th</sup> Ed. Gaithersburg. 429 p.
- ARTÉS-HERNÁNDES, F.; RIVERA-CABRERA, F.; KADER, A. A.** 2007. Quality retention and potential shelf-life of fresh-cut lemons as affected by cut type and temperature. Postharvest Biology and Technology. 43, 245-254.
- ASQUIERI, E. R.** 2 008. Curso internacional a nivel de Post Grado denominado "TÉCNICAS DE ANALISIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS EN ALIMENTOS". Universidad Nacional Agraria de la Selva, del 19 al 23 de Mayo del 2008, Tingo María – Perú.
- ASQUIERI, E. R.; SILVA, R.; MONTEIRO, V.; ALCANFOR, J.; ASSIS, E.** 2 003. Comparação de métodos para a determinação de açúcares reductores e totais em mel. Cienc. Tecnol, Aliment., Campinas, 23 (3): 337-341.

- BIANCHI, M.; ANTUNEZ, L.** 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr., Campinas*, 12 (2) 123 - 130.
- BOHINSKI, R.** 1991. *Bioquímica*. Editorial ADDISON-WESLEY Iberoamericana. Wilmington, USA. 739 p.
- BOVANOVA, L.; BRANDSTETEROVA, E.** 2000. Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 880, 149-168.
- BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M.E.; BERSET, C.** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 22, 25-30.
- BRASIL, I. M.; TELES, K. H.; OLIVEIRA, G. S.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.** 2008. Physicochemical changes during extraction and concentration of acerola juice (*Malpighia emarginata* DC.) using pectinases and clarifying agents. *Braz. J. Food Technol., Campinas*. Vol. 10 (4) 266 -270.
- CIRO, H Y OSORIO, J.** 2008. Avance experimental de la ingeniería de postcosecha de frutas colombianas: Resistencia mecánica para frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Dyna*, año 75, Nro. 154, 39-46.
- CODEX ALIMENTARIO.** Código de practicas de higiene para alimentos poco ácidos elaborados y envasados asépticamente CAC/RCP 40-1 993. p. 32.
- CODEX ALIMENTARIO.** Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. CODEX STAN 247-2 005. p. 21.

- CODEX ALIMENTARIO.** Código de prácticas de higiene para las frutas y hortalizas frescas CAC/RCP 53-2 003. p. 26.
- DALLUGE, J. Y NELSON, B.** 2 000. Determination of tea catechins. *Journal of Chromatography A.* 881 411-424.
- DE ANCOS, B.; GONZALES, E.; CANO, P.** 2 000. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radicals scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4565 – 4570.
- DING, M.; YANG H.; XIAO, SH.** 1 999. Rapid, Direct Determination of Polyphenols in Tea by Reversed-Phase Column Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A.* 849, 637-640.
- GOKMEN V.; KAHARAMAN N.; DEMIR N.; ACAR J.** 2 000. Validación enzimática del método de cromatografía líquida para la determinación de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico en frutas y vegetales. Elsevier Science B.V. *J. Chromatogr. A.*, 881, 309-316.
- GOMES, E. R. S.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; BARROS, S. T. D.** 2 005. **Evaluation of the acerola juice concentrated by reverse osmosis.** *Brazilian archives of Biology and Technology* Vol. 78, 175-183.
- GONÇALVES, C.; DENIS, T.; BATISTA, M. T.** 2 005. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* 66, 89-98.
- GONZALES, A.** 2 007. *Frutales Nativos Amazónicos, Patrimonio alimenticio de la humanidad.* Iquitos, Perú. IIAP. 76 p.

- GUTIÉRREZ, T. M.; HOYOS, O. L.; PÁEZ, M. I.** 2 007. Determinación del Contenido de Ácido Ascórbico en Uchuva (*Physalis peruviana L.*), por cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol. 5. (1) 70-79.
- HASHMI, M ; ALAM, S.; RIAZ, A.; AND SATTAR SHAH, A.** 2 007. Studies on microbial and sensory quality of mango pulp storage with chemical preservatives. Pakistan Journal of Nutrition, 6 (1), 85-88.
- HORIE, H; KOHATA, K.** 2 000. Analysis of tea components by high performance liquid chromatography and high - capillary electrophoresis. J. Chrom A. 881, 4725 – 4738.
- INGA, H.; PINEDO, M.; DELGADO, C.; LINARES, C.; MEJÍA, K.** 2 001. Fenología reproductiva de *Myrciaria dubia* Mc Vaugh (H.B.K.) Camu Camu. IIAP. Folia Amazónica. Vol. 12 (1-2) 99-106.
- LEE, B.** 2 000. Fundamentos de biotecnología de los alimentos. Zaragoza, España, Editorial ACRIBIA, S.A. 475p.
- MAVI, A.; TERZÍ, Z.; OZGEN, U.; YILDIRIM, A.; COSKUN, M.** 2 004. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). Biol. Pharm. Bull. 27 (5) 702-705.
- MAZZA, G.** 2 000. Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesado. Madrid, España, Editorial ACRIBIA, S.A. p. 457.

- MEDINA, M. Y PAGANO, F.** 2 003. Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo "Criolla Roja". Rev. Fac. Agron. LUZ 20, 72-86.
- MELCHOR, V.** 2 002. Procesamiento tecnológico para la obtención de te verde (*Cumellia sinersis*), determinación de su actividad antioxidante y cuantificación de flavonoles por HPLC. Tesis UNAS. Tingo María – Perú. 110 p.
- MILLER D.** 2 001. Química de los alimentos. Manual de laboratorio. Baldareras 95, México, DF, Editorial Limusa, S.A. 173 p.
- MONTGOMERY, D. C.** 2004. Desing and Analysis of Experiment. 6th ed. Wiley Publishers, 660p.
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD.** 1 992. Tercera Ed. Manual de resoluciones de la asamblea mundial de salud y del consejo ejecutivo. Ginebra OMS 147.
- PINEDA, A.** 2 005. Determinación de las propiedades antioxidantes de variedades de injerto (*Pouteria viridis*) que se cultivan en tres regiones de Guatemala. Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 79 p.
- PINEDA, D.; SALUCCI, M.; LAZARO, R.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A.** 1 999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes de algunos alimentos. Rev Cubana Aliment Nutr 13 (2), 104-111.
- POKORNY** 2 001. Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. Zaragoza, España, Editorial ACRIBIA, S.A. 364 p.



- PUANGPRONPITAG, D.; AREEJITRANUSORN, P.; BOONSIRI, P.; SUTTAJIT, M. AND YONGVANIT, P.** 2 008. Antioxidant activities of polyphenolic compounds isolated from *Antidesma thwaitesianum* Mull. Arg. Seed and marcs. Journal of Food Science. Vol. 73, Nr. 9, 648–653.
- RODRIGUES, R. B.; MENEZES, H. C; CABRAL, L. M. C; DORNIER, M; RIOS, G. M; REYNES, M.** 2 004. Evaluation of reverse osmosis and osmotic evaporation to concentrate camu camu juice (*Myrciaria dubia*). Journal of Food Engineering 63, 97-102.
- ROBINSON, D.** 1 991. Bioquímica y valor nutricional de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 516 p.
- RUBINSON, K. Y RUBINSON, J.** 2 001. Análisis Instrumental. Editorial Pearson Education, S.A. Madrid (España) 847 p.
- RUSÇUKLU, D.** 2 005. Characterization and genetic mapping of health related traits in tomato. Tesis de Maestría. School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology. Izmir. 51 p.
- SALISBURY, F. B y ROSS, C. W.** 1 994. Fisiología vegetal. Editorial Iberoamericana México. México. p. 759.
- SALVADOR, F.** 1 997. Cultivo de frutales nativos amazónicos. Manual para el Extensionista. Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaria Pro-Tempore. Lima-Perú. 367 p.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F.; MELCHOR, V.; CONDEZO, L.; LAO, J.; MILLER, M.** 2 002a. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). Food Chemistry 79, 207-213.

- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ZHANG, J.; CONDEZO, L. A.; LAO, J.; ANGELES, F.; MUSAH, R.; MILLER, M.** 2 002b. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* 9, 325-337.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F.** 2 001. Técnicas de investigación para determinar la actividad antioxidativa y anti-inflamatoria de plantas medicinales de la amazonía. 1<sup>st</sup> International Workshop. Iquitos – Perú. p. 35
- SANDOVAL, M.** 1 994. Aplicaciones de la espectrofotometría de absorción/emisión atómica en programas de investigación en agricultura, biología y medicina. Louisiana State University. 1<sup>o</sup> Curso taller. Tingo María – Perú. p. 34.
- SENSER, F.; SCHERZ, H.** 1 999. Tabla de composición de alimentos. El pequeño "Souci – fachmann – kraut". Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. p. 430.
- SINGH, R. PAUL.** 1 997. Introducción a la ingeniería de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. p. 544.
- SKOOG, D Y LEARY, J.** 1 994. Análisis instrumental. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. 935p.
- SOTO, M.; GONZALES; KITE Y MARTÍNEZ.** 2 007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 30 (1) 43 – 49.

- VANDERSLICE, J.; HIGGS, D.** 1 991. Vitamin C content of foods: Sample variability. *Am J Clin Nutr* 54: 1323S-7S.
- VARGAS, M.; RIVERA, A.; NARVÁEZ, C.** 2 005. Capacidad antioxidante durante la maduración del arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). *Revista Colombiana de Química* 34, 57-65.
- VÁSQUEZ, A.; CALA, M.; MIRANDA, I.; TAFUR, G.; MARTÍNEZ, J.; STASHENKO, E.** 2 007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia et Technica* Año XIII, No 33, 205-207.
- VILLACHICA, L.** 1 996. El cultivo del camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) en la Amazonía Peruana. Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaria Pro-Tempore. Lima-Perú. 95 p.
- VILLACHICA, L.** 1 996. Frutales y Hortalizas Promisorios de la Amazonía. Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaria Pro-Tempore. Lima-Perú. 367 p.
- VILLANUEVA, J.** 2 003. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles, y actividad antioxidante en la cáscara de camu camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh H.B.K.). Tesis UNAS. Tingo María – Perú. 110 p.
- VILLEGAS-OCHOA, M.; AYALA-ZAVALA, F.; CRUZ, R.; HERNÁNDEZ, J.; GONZÁLES-AGUILAR, G.** 2 005. Efecto antioxidante de extractos naturales en manzana 'Red Delicios'. Simposium "Nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales frescos cortados" La Habana, Cuba. p. 25-32.

- VOLLMER, G.** 1 999. Elementos de la bromatología descriptiva. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S.A. p. 644.
- WHEELER, G.; JONES, M.; SMIRNOFF, N.** 1 998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. Vol. 393, 365 – 368.
- ZANATTA, C.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.** 2 005. Determination of anthocyanins from camu camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9531-9635.
- ZAPATA, S.; DUFOUR, J.** 1 993. Camu Camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh: Chemical Composition of Fruit. *J. Sci. Food Agri.* 61, 349-351.
- ZANDAMELA, E.** 2 008. Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra (Cerdanyola del Vallés). España. p. 241.

## **IX. ANEXOS**

**A - I. ANVA del análisis de ácido ascórbico en pulpa concentrada de camu camu**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	4058605,664	811721,133	198,306	0,000
Estado	1	3933482,006	3933482,006	960,962	0,000
Tiempo	2	40430,579	20215,289	4,939	0,027
Estado * Tiempo	2	84693,079	42346,539	10,345	0,002
Error experimental	12	49119,307	4093,276		
Total	17	4107724,970			

**A - II. ANVA del análisis de ácido ascórbico por estado de madurez**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	3933480,0	3933480,0	361,20	0,0000
Error experimental	16	174243,0	10890,2		
Total	17	4107720,0			

**A - Ila. ANVA del Análisis de ácido ascórbico por estado a los 0 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	919883,0	919883,0	233,37	0,0001
Error experimental	4	15767,2	3941,8		
Total	5	935650,0			

**A - Iib. ANVA del análisis de ácido ascórbico por estado a los 30 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	1866360,0	1866360,0	453,35	0,0000
Error experimental	4	16467,3	4116,82		
Total	5	1882820,0			

**A - Iic. ANVA del análisis de ácido ascórbico por estado a los 60 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	1231940,0	1231940,0	291,84	0,0001
Error experimental	4	16884,8	4221,21		
Total	5	1248820,0			

**A - III. ANVA del análisis de ácido ascórbico por tiempo de almacenamiento**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
DIAS	2	40430,6	20215,3	0,07	0,9285
Error experimental	15	4067290,0	271153,0		
Total	17	4107720,0			

**A – IIIa. ANVA del análisis de ácido ascórbico por tiempo de almacenamiento en el estado pintón**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tiempo	2	74239,649	37119,825	10,745	0,010
Error	6	20727,320	3454,553		
Total corregida	8	94966,969			

**A – IIIb. ANVA del análisis de ácido ascórbico por tiempo de almacenamiento en el estado maduro**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tiempo	2	50884,008	25442,004	5,377	0,046
Error	6	28391,987	4731,998		
Total corregida	8	79275,995			

**A – IV. ANVA del análisis de ácido ascórbico por tratamientos**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamientos	5	4058605,664	811721,133	198,306	0,000
Error experimental	12	49119,307	4093,276		
Total	17	4107724,970			



**B – I. ANVA del análisis de polifenoles totales en pulpa concentrada de camu camu**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	1412,022	282,404	90,663	0,000
Estado	1	1279,689	1279,689	410,831	0,000
Tiempo	2	114,574	57,287	18,391	0,000
Estado * Tiempo	2	17,758	8,879	2,851	0,097
Error experimental	12	37,379	3,115		
Total	17	1449,401			

**B – II. ANVA del análisis de polifenoles totales por estado de madurez**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	1279,69	1279,69	120,65	0,0000
Error experimental	16	169,711	10,607		
Total	17	1449,4			

**B – Ila. ANVA del análisis de polifenoles totales por estado a los 0 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	319,544	149,85	0,0003	
Error experimental	4	8,52945	2,13236		
Total	5	328,074			

**B – IIb. ANVA del análisis de polifenoles totales por estado a los 30 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	411,422	411,422	227,39	0,0001
Error experimental	4	7,23744	1,80936		
Total	5	418,659			

**B – IIc. ANVA del análisis de polifenoles totales por estado a los 60 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	566,482	566,482	104,85	0,0005
Error experimental	4	21,6117	5,40292		
Total	5	588,093			

**B – III. ANVA del análisis de polifenoles totales por tiempo de almacenamiento**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
DÍAS	2	114,574	57,2872	0,64	0,5392
Error experimental	15	1334,83	88,9884		
Total	17	1449,4			

**B – IIIa. ANVA del análisis de polifenoles totales por tiempo de almacenamiento en el estado Pintón**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tiempo	2	100,271	50,136	15,993	0,004
Error	6	18,809	3,135		
Total corregida	8	119,081			

**B – IIIb. ANVA del análisis de polifenoles totales por tiempo de almacenamiento en el estado maduro**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tiempo	2	32,061	16,031	5,180	0,049
Error	6	18,569	3,095		
Total corregida	8	50,631			

**B – IV. ANVA del análisis de polifenoles totales por tratamientos**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	1412,022	282,404	90,663	0,000
Error experimental	12	37,379	3,115		
Total	17	1449,401			

**C – I. ANVA del análisis de catequina en pulpa concentrada de camu camu**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	0,087	0,017	67,304	0,000
Estado	1	0,076	0,076	294,755	0,000
Tiempo	2	0,008	0,004	14,975	0,001
Estado * Tiempo	2	0,003	0,002	5,908	0,016
Error experimental	12	0,003	0,000		
Total	17	0,090			

**C – II. ANVA del análisis de catequina por estado de madurez**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	0,0759014	0,0759014	87,72	0,0000
Error experimental	16	0,013845	0,000865313		
Total	17	0,0897464			

**C – Ila. ANVA del análisis de catequina por estado a los 0 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	0,0415672	0,0415672	118,77	0,0004
Error experimental	4	0,00139987	0,000349968		
Total	5	0,0429671			

**C – Iib. ANVA del análisis de catequina por estado a los 30 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	0,019735	0,019735	93,92	0,0006
Error experimental	4	0,0008405	0,000210125		
Total	5	0,0205755			

**C – Iic. ANVA del análisis de catequina por estado a los 60 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	0,0176417	0,0176417	83,05	0,0008
Error experimental	4	0,00084971	0,000212428		
Total	5	0,0184914			

**C – III. ANVA del análisis de catequina por tiempo de almacenamiento**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
DÍAS	2	0,00771246	0,00385623	0,71	0,5097
Error experimental	15	0,0820339	0,00546893		
Total	17	0,0897464			

**C – IIIa. ANVA del análisis de catequina por tiempo de almacenamiento en el estado pintón**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tiempo	2	0,007	0,003	19,548	0,002
Error	6	0,001	0,000		
Total corregida	8	0,008			

**C – IIIb. ANVA del análisis de catequina por tiempo de almacenamiento en el estado maduro**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tiempo	2	0,004	0,002	6,062	0,036
Error	6	0,002	0,000		
Total corregida	8	0,006			

**C – IV. ANVA del análisis de catequina por tratamientos**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	0,087	0,017	67,304	0,000
Error experimental	12	0,003	0,000		
Total	17	0,090			

**D - I. ANVA del análisis de capacidad antioxidante en pulpa concentrada de camu camu por medio del radical DPPH**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	371,549	74,310	938,676	0,000
Estado	1	169,508	169,508	2141,210	0,000
Tiempo	2	113,813	56,906	718,837	0,000
Estado * Tiempo	2	88,229	44,114	557,249	0,000
Error experimental	12	0,950	0,079		
Total	17	372,499			

**D – II. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por estado de madurez**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	169,508	169,508	13,36	0,0021
Error experimental	16	202,991	12,687		
Total	17	372,499			

**D – IIa. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por estado a los 0 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	225,356	225,356	4504,36	0,0000
Error experimental	4	0,200123	0,0500307		
Total	5	225,556			

**D – IIb. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por estado a los 30**

**Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	5,57563	5,57563	190,34	0,0002
Error experimental	4	0,117175	0,0292937		
Total	5	5,69281			

**D – IIc. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por estado a los 60**

**Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	26,8046	26,8046	169,47	0,0002
Error experimental	4	0,632677	0,158169		
Total	5	27,4373			

**D – III. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por tiempo de almacenamiento**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
DIAS	2	113,813	56,9064	3,30	0,0649
Error experimental	15	258,687	17,2458		
Total	17	372,499			



**D – IIIa. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por tiempo de almacenamiento en el estado pintón**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tiempo	2	200,500	100,250	895,786	0,000
Error	6	0,671	0,112		
Total corregida	8	201,172			

**D – IIIb. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por tiempo de almacenamiento en el estado maduro**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tiempo	2	1,541	0,770	16,600	0,004
Error	6	0,278	0,046		
Total corregida	8	1,819			

**D – IV. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por tratamientos**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamientos	5	371,549	74,310	938,676	0,000
Error experimental	12	0,950	0,079		
Total	17	372,499			

**E – I. ANVA del análisis de capacidad antioxidante en pulpa concentrada de camu camu por medio del radical peroxilo**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	4,105	0,821	89,486	0,000
Estado	1	2,133	2,133	232,466	0,000
Tiempo	2	1,156	0,578	62,980	0,000
Estado * Tiempo	2	0,817	0,408	44,502	0,000
Error experimental	12	0,110	0,009		
Total	17	4,216			

**E – II. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por estado de madurez**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	2,13305	2,13305	16,39	0,0009
Error experimental	16	2,08256	0,13016		
Total	17	4,2156			

**E – IIa. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por estado a los 0 Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	2,19753	2,19753	1206,68	0,0000
Error experimental	4	0,00728451	0,00182113		
Total	5	2,20481			

**E – IIb. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por estado a los 30**

**Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	0,710424	0,710424	50,83	0,0020
Error experimental	4	0,0559093	0,0139773		
Total	5	0,766333			

**E – IIc. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por estado a los 60**

**Días**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Estado	1	0,0417709	0,0417709	3,56	0,1322
Error experimental	4	0,046915	0,0117287		
Total	5	0,0886859			

**E – III. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por tiempo de almacenamiento**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
DIAS	2	1,15577	0,577887	2,83	0,0904
Error experimental	15	3,05983	0,203989		
Total	17	4,2156			

**E – IIIa. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por tiempo de almacenamiento en el estado pintón**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tiempo	2	1,770	0,885	115,989	0,000
Error	6	0,046	0,008		
Total corregida	8	1,815			

**E – IIIb. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por tiempo de almacenamiento en el estado maduro**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tiempo	2	0,203	0,101	9,458	0,014
Error	6	0,064	0,011		
Total corregida	8	0,267			

**E – IV. ANVA del análisis de capacidad antioxidante por tratamientos**

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamientos	5	4,105	0,821	89,486	0,000
Error	12	0,110	0,009		
Total corregida	17	4,216			

Anexo F – I.

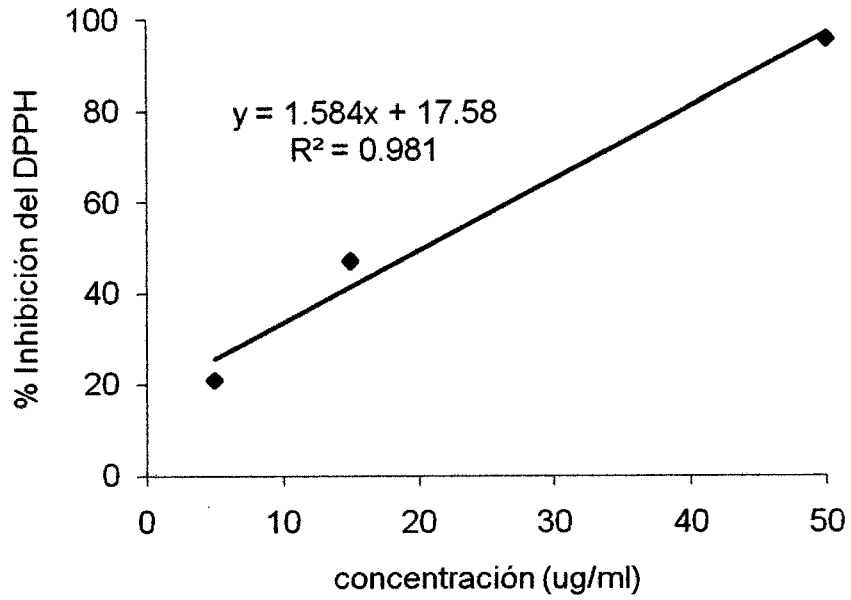


Figura 34. Inhibición del radical DPPH para la pulpa concentrada de camu camu pintón

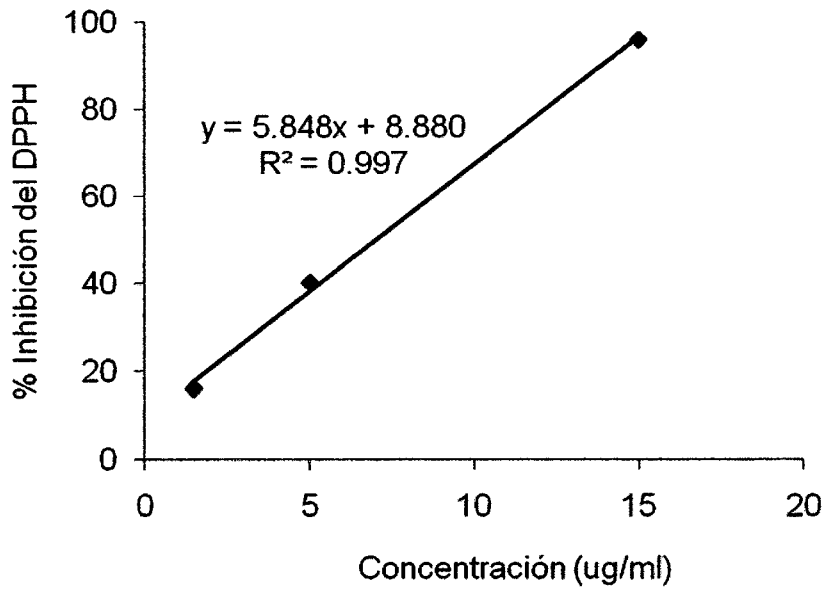


Figura 35. Inhibición del radical DPPH para la pulpa concentrada de camu camu maduro

Anexo F – II.

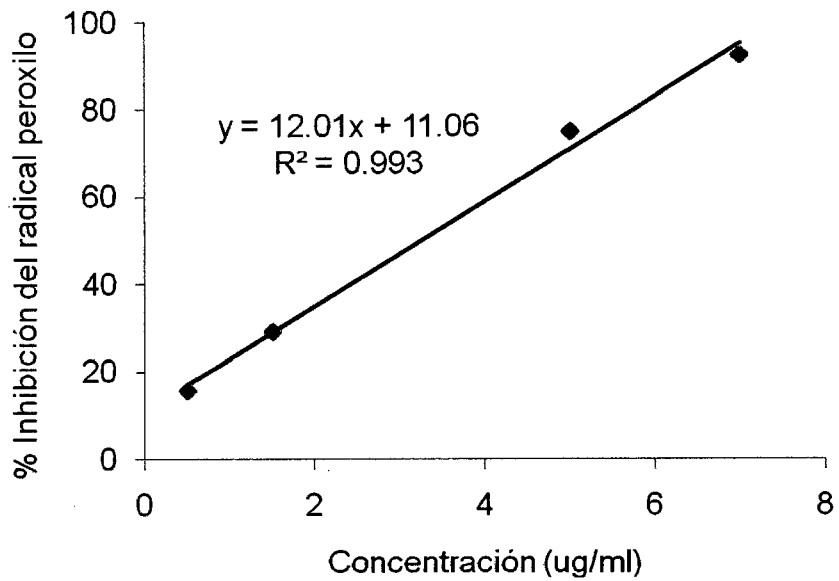


Figura 36. Inhibición del radical peroxilo para la pulpa concentrada de camu camu pintón

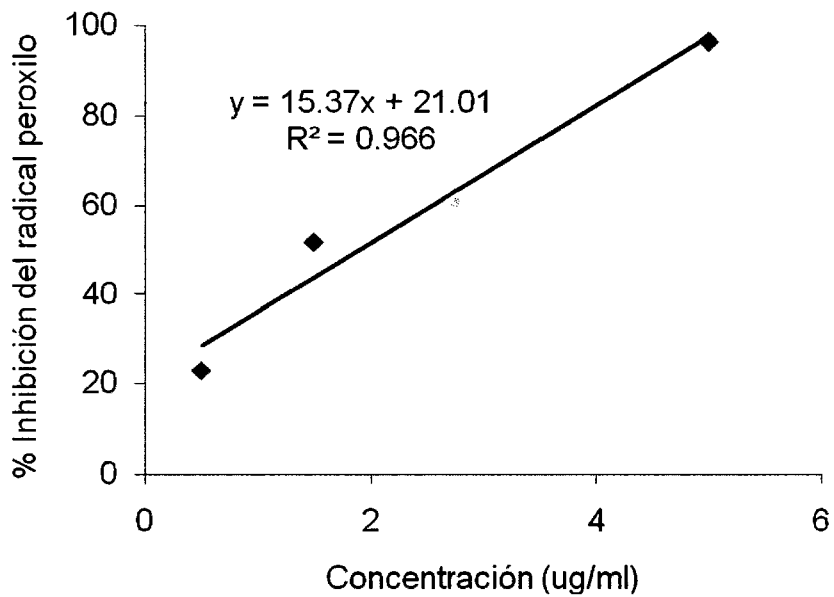


Figura 37. Inhibición del radical peroxilo para la pulpa concentrada de camu camu maduro