

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
DE LOS ALIMENTOS



“TRATAMIENTO ULTRASONICO DE PULPA DE CAMU CAMU (*Myrciaria
dubia* Mc Vaugh), Y ESTUDIO DE SUS COMPONENTES BIOACTIVOS”

Tesis

Para optar el Título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

MANUEL AUGUSTO, MARIÑAS PÉREZ

PROMOCIÓN 2008 - I

Tingo María-Perú

2011



Q04

M26

Mariñas Pérez, Manuel A.

Tratamiento Ultrasónico de Pulpa de Camu Camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh),
y Estudio de sus Componentes Bioactivos. Tingo María, 2010

76 h.; 10 cuadros; 12 fgrs.; 131 ref.; 30 cm.

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

**1. MYRCIARIA DUBIA 2. ULTRASONIDO 3. ACIDO ASCORBICO 4. ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE 5. POLIFENOLES TOTALES 6. PULPA-CAMU CAMU 7. 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

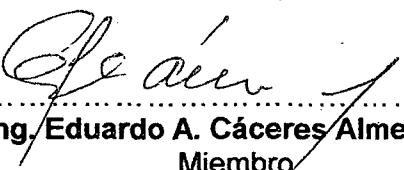
Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 17 de Marzo de 2010, a horas 6:00 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por el Bach. **MARIÑAS PÉREZ, Manuel Augusto**, titulada:

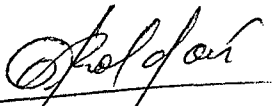
“TRATAMIENTO ULTRASÓNICO DE LA PULPA DE CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh) Y ESTUDIO DE SUS COMPONENTES BIOACTIVOS”

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de BUENO.....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.

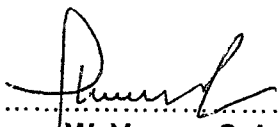
Tingo María, 17 de Marzo de 2010


.....
Dra. Elizabeth S. Ordóñez Gómez
Presidente


.....
Ing. Eduardo A. Cáceres Almenara
Miembro


.....
Ing. Williams V. Roldán Carbajal
Miembro

.....
Ing. MSc. Pedro P. Peláez Sánchez
Asesor


.....
Ing. Jhony W. Vargas Solorzano
Co Asesor

DEDICATORIA

A mis padre, Raúl y Marchuri, que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Por darme una carrera y por creer en mí. En tiempos difíciles estuvieron apoyándome, brindándome su amor y por enseñarme a tener pasión al estudio

AGRADECIMIENTOS

"A Dios, por permitirme ver la luz de su gran amor, vivir plenamente y regalarme una familia maravillosa"

"A mi Alma Mater"

"A mi asesor de tesis Dr. Pedro Peláez, por su ejemplo de profesionalismo que nunca he olvidado, por su guía"

"Al Ing. Jhony Vargas, que gracias a su dirección pude cumplir con los objetivos de esta investigación"

"A mis hermanos Daniel, Gastón, Raúl, Ketty y Katty, por su fraternidad."

"A mis amigos Carmen, Marco, Pocho, Tintaya, Elaine, Karen, Marlen, Huanca, Daniel, Harrinton; que me brindaron palabras de aliento y su amistad en los momentos más difíciles."

"A mis profesores, compañeros y todos aquellos que hicieron posible la confección y elaboración de este trabajo"

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.	Camu-Camu	3
2.1.1.	Aspectos botánicos.....	3
2.1.2.	Fruta.....	4
2.1.3.	Composición del Fruto	5
2.2.	Radicales Libes y Antioxidantes	7
2.2.1.	Radicales libres.....	7
2.2.2.	Antioxidantes	10
2.3.	Polifenoles	12
2.4.	Ácido Ascórbico	15
2.5.	Ultrasonido	16
2.5.1.	Ondas de Ultrasonido	16
2.5.2.	Principio de funcionamiento de los equipos de ultrasonido	17
2.5.3.	Efecto del ultrasonido en los tejidos.....	19
2.5.4.	Efecto del ultrasonido sobre los microorganismos.....	19
2.5.5.	Aplicación del Ultrasonido en alimentos.....	20
2.6.	Conservación de Pulpas.....	21
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24

3.1. Lugar de Ejecución	24
3.2. Materia Prima	24
3.3. Materiales, Equipos y Reactivos.....	25
3.3.1. Materiales	25
3.3.2. Equipos	25
3.3.3. Reactivos	26
3.4. Métodos de Análisis.....	26
3.4.1. Índice de madurez	26
3.4.2. Cuantificación de componentes bioactivos	26
3.4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante	27
3.4.4. Cuantificación del contenido de mohos y levaduras	27
3.5. Metodología	27
3.5.1. Índice de madurez	27
3.5.2. Cuantificación de componentes bioactivos y actividad antioxidante de la pulpa de camu camu en tres estados de madurez.....	28
3.5.3. Tratamiento ultrasónico y almacenamiento de la pulpa de camu camu.	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1. Índice de Madurez	36

4.2. Cuantificación de componentes bioactivos y actividad antioxidante de la pulpa de camu camu en tres estados de madurez	38
4.2.1. Cuantificación componentes bioactivos	38
4.2.2. Evaluación de la capacidad antioxidante	42
4.2.3. Cuantificación de mohos y levaduras	45
4.3. Tratamiento ultrasónico y almacenamiento de la pulpa de Camu camu.....	46
4.3.1. Cuantificación de componentes bioactivos	46
4.3.2. Determinación de la capacidad antioxidante.....	51
4.3.3. Cuantificación de mohos y levaduras	54
V. CONCLUSIONES	56
VI. RECOMENDACIONES.....	57
VII. ABSTRACT	58
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	59
IX. ANEXOS	77

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición de la pulpa de camu camu.....	6
2. Sistemas enzimáticos antioxidantes.....	11
3. Propiedades Físico químicas del ácido ascórbico.....	15
4. Sólidos Solubles Totales (°Bx), % Acidez, e Índice de madurez (IM) de la pulpa de camu camu en 3 estados de madurez.....	36
5. Contenido de ácido ascórbico en la pulpa de camu camu.....	38
6. Contenido de polifenoles totales en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez.....	40
7. Coeficiente de inhibición (CI ₅₀) de la pulpa de camu camu para el radical DPPH.....	42
8. Coeficiente de inhibición (CI ₅₀) de la pulpa de camu camu para el radical ABTS.....	44
9. Contenido de mohos y levaduras en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez.....	46
10. Efecto del tiempo de exposición al ultrasónico (40 kHz), sobre el contenido de mohos y levaduras en la pulpa de camu camu.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ruta de la pentosa fosfato para la síntesis de componentes Fenólicos en plantas.....	13
2	Tipos de ondas de sonido: (a) ondas longitudinales, (b) ondas transversales.....	17
3	Esquema general de un generador de ultrasonido.....	18
4	Metodología Experimental para la cuantificación de componentes bioactivos de la pulpa de camu camu en tres estados de madurez.....	32
5	Metodología experimental para evaluar la conservación de la pulpa de camu camu tratada con ultrasonido, durante el almacenamiento....	34
6	Contenido de polifenoles totales en pulpa de camu camu en tres estados de madurez.....	41
7	Variación del contenido de ácido ascórbico en pulpa de camu camu, almacenada por 3 meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	47
8	Variación del contenido de polifenoles totales en pulpa de camu camu, almacenada por 03 meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	49
9	Variación del CI50 de la actividad antioxidante determinado mediante radical DPPH'.....	51
10	Variación del CI50 de la actividad antioxidante determinado mediante el Cation ABTS ⁺⁺	53
11	Curva patrón para la cuantificación de ácido ascórbico.....	78
12	Curva patrón para la cuantificación de polifenoles totales.....	78

RESUMEN

La presente investigación, se realizó con el objetivo de estudiar el efecto del ultrasonido sobre los componentes bioactivos de la pulpa de camu camu, en almacenamiento. Los componentes bioactivos determinados fueron: ácido ascórbico mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), descrito por GOKMEN *et al.* (2000); determinación de polifenoles totales se realizó por el método reportado por PRICE y BUTLER (1975). La actividad antioxidante se determinó empleándose los métodos: radical DPPH y catión ABTS, descritos por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) y por RE *et al* (1999), respectivamente. Los resultados se evaluaron, mediante el DCA y la prueba de Tukey ($n=3$; $p<0,05$). La pulpa madura mostró el mayor contenido de ácido ascórbico y polifenoles totales con: 2151,11 y 791,14 mg x 100 g⁻¹ de pulpa fresca; de igual manera la actividad antioxidante de la pulpa madura superó a los otros estados de madurez, con CI_{50} : 7,43 y 2,95 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, DPPH y ABTS respectivamente. La sonicación mejoró la disponibilidad, de ácido ascórbico y polifenoles totales (2388,67 y 981,16 mg x100⁻¹ g de pulpa), a intensidad de 40 kHz por 1 y 7 minutos de exposición. La actividad antioxidante, más baja para la pulpa sonicada, expresada en CI_{50} fue de 8,24 μgxmL^{-1} , para el DPPH y 2,1 μgxmL^{-1} , para el ABTS a intensidad de 40 kHz, a los 7 minutos y 10 minutos, respectivamente; mientras que la carga microbiana disminuyó de 24 á 6 UFC xg⁻¹. Durante el almacenamiento, disminuyó significativamente el contenido componentes bioactivos y carga microbiana.

Palabras Claves: *Myrciaria Dubia*, Ultrasonido, Acido Ascórbico, Actividad Antioxidante, Polifenoles Totales, Pulpa Camu-Camu, Perú.

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de la diversidad frutal nativa existente en la Amazonía peruana, el camu camu, es una fruta que se caracteriza por su alto contenido de ácido ascórbico de 1000-3000 mg x 100g⁻¹ (ROCA, 1965 y FERREYRA, 1959), siendo considerado de primer orden para la industria alimentaria, farmacológica y nutracéutica, con potencial económico para la exportación (WEISS, 1998).

Los beneficios que ha demostrado poseer el camu camu, con elevado contenido de componentes bioactivos (ácido ascórbico, polifenoles y otros), y gran capacidad antioxidante, hizo que diversos métodos de conservación se apliquen sobre la pulpa y fruto (RAMOS *et al.*, 2002 y ARÉVALO y KIECKBUSCH, 2005), con la finalidad de prolongar su vida útil, asegurando la calidad nutricional, funcional y organoléptica.

Actualmente es posible obtener pulpa de camu camu congelada, concentrada, deshidratada, atomizada (VÁSQUEZ, 2000); pero también puede obtenerse pulpa con alto valor agregado en sachets, polvos hidrolizables, complementos vitamínicos, entre otros derivados (VEGA, 2002).

La exportación de pulpa se destina principalmente al mercado japonés. Se estima que el Japón requiere 230 mil Tn anuales, valoradas en 40

millones de dólares. Las exportaciones del fruto hacia el mercado japonés actualmente son de 220 Tn de camu camu y 110 Tn de pulpa (LÓPEZ, 2004).

Los objetivos definidos para la investigación fueron:

- Cuantificar el contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales, actividad antioxidante mediante los métodos DPPH^{*} y ABTS^{**}, contenido de mohos y levaduras en pulpa de camu camu verde, pintón y maduro.

- Determinar el efecto ultrasónico en pulpa de camu camu madura, cuantificando ácido ascórbico, polifenoles totales, actividad antioxidante empleando los métodos DPPH^{*} y ABTS^{**}, contenido de mohos y levaduras; a -20°C por 3 meses.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Camu-Camu

2.1.1. Aspectos botánicos

2.1.1.1. Generalidades

El camu camu, es una fruta nativa que crece principalmente en la Amazonía Peruana, disminuyendo la concentración de poblaciones naturales del río Amazonas hacia el Brasil (ALVES *et al.*, 2002, ALLERSLEV, 2007 y ARÉVALO y KIECKBUSCH, 2007). Crece principalmente en zonas de aguas oscuras y claras, siendo éste un recurso con elevado potencial para el desarrollo de la Amazonía peruana. La gran importancia del camu camu, radica por ser fuente de vitamina C y alimento funcional (IMAN, 2000, ALVES *et al.*, 2002 y PETERS Y VÁSQUEZ 1986).

2.1.1.2. Morfología

Myrciaria dubia, es un árbol de hasta 15 m de altura, con ramas glabras, cilíndricos de color marrón claro o rojizo y con cortezas que se desprenden de forma natural, hojas oblongo - elípticas de 6,0 a 12,0 cm de largo y de 2,5 a 3,5 cm de ancho, ápice acuminado y base cuneada a obtusa, glabras con un nervio medio impreso en el haz y con numerosos nervios secundarios subparalelos y más o menos perpendiculares al nervio medio. Las inflorescencias son axilares, en címulas de 2 a 3 flores, glabras y blancas. Los

frutos son de 2 a 3 cm de diámetro, rojizos a negros cuando madura (VILLACHICA, 1996 y LÓPEZ *et al.*, 2004).

2.1.1.3. Taxonomía

El Camu camu pertenece a la familia botánica Myrtaceae, género *Myrciaria*. Se ha clasificado como *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh y como *Myrciaria paraensis* Berg, pero los taxónomos han optado por *M. dubia* debido a que ésta fue la primera denominación válida utilizada (RIVA Y GONZALES, 1996). A continuación se presenta la clasificación taxonómica (PROAPA-GTZ, 2000).

Tipo	: Fanerógamas
Subtipo	: Angiospermas
Clase	: Dicotiledóneas
Orden	: Myrtales
Familia	: Myrtaceae
Género	: <i>Myrciaria</i>
Especie	: <i>Dubia</i> HBK Mc Vaugh

2.1.2. Fruta

El fruto es globoso de superficie lisa y brillante, de color rojo oscuro, hasta negro púrpura al madurar; puede tener 2 a 4 cm de diámetro; con una a cuatro semillas por fruto, siendo lo más común dos a tres semillas. Peso promedio alrededor de 8,4 g por fruto (FERREYRA, 1959 y VILLACHICA, 1996).

Las semillas son reniformes, aplanadas con 8 a 11 mm de longitud y 5,5 a 11 mm de ancho, aplanadas, cubiertas por una vellosidad blanca rala de menos de un mm de longitud. El peso de 1,000 semillas secas está entre 650 y 760 g, escurridas y oreadas a la sombra pesan entre 1000 y 1250 $\text{gx}1000^{-1}$ semillas (VILLACHICA, 1996).

2.1.3. Composición del Fruto

La característica más distintiva del fruto de camu camu es su alto contenido de vitamina C, con valores que varían de 1660 – 2994 $\text{mgx}100 \text{ g}^{-1}$ de pulpa (MAEDA *et al.*, 2007), superando a la acerola y frutos cítricos como el limón, naranja entre otros (VEGA, 2005). El camu camu se caracteriza además por su alto contenido de antocianinas 30-54 $\text{mgx}100 \text{ g}^{-1}$, (ZANATTA *et al.*, 2005) y poseer niveles apreciables de minerales como el sodio, potasio, calcio hierro, magnesio entre otros (JUSTI *et al.*, 2000). Los múltiples beneficios que se le atribuyen al camu camu están determinados por su composición y el aporte de sus componentes a la salud.

Cuadro 1. Composición de la pulpa de camu camu

COMPONENTE	Zapata y Dufour ¹ , 1993 y	Justi <i>et al.</i> , 2000
	Villachica ² , 1996	
Humedad (gx100g ⁻¹)	94 ²	94,1
Proteína (gx100g ⁻¹)	0,5 ²	0,4
Grasa (gx100g ⁻¹)	-	0,2
Fibra (gx100g ⁻¹)	0,6 ²	0,1
Carbohidratos (gx100g ⁻¹)	4,7 ²	3,5
Ceniza (gx100g ⁻¹)	0,2 ²	0,3
Vitamina C (gx100g ⁻¹)	2,78 ²	1,41
Minerales		
Sodio (mgxkg ⁻¹)	27 ¹	111,3
Potasio (mgxkg ⁻¹)	711 ¹	838,8
Calcio (mgxkg ⁻¹)	65 ¹	157,3
Hierro (mgxkg ⁻¹)	1,8 ¹	5,3
Magnesio (mgxkg ⁻¹)	51 ¹	123,8
Manganeso (mgxkg ⁻¹)	2,1 ¹	21,1
Zinc (mgxkg ⁻¹)	1,3 ¹	3,6
Cromo (mgxkg ⁻¹)	-	Nd*
Cobre (mgxkg ⁻¹)	0,8 ¹	2,0
Cobalto(mgxkg ⁻¹)	-	0,1
Cadmio (mgxkg ⁻¹)	-	0,01

Fuente: ZAPATA Y DOUFUR¹ (1993); VILLACHICA² (1996) y JUSTI *et al.* (2000)

*Nd: No detectada

2.2. Radicales Libres y Antioxidantes

2.2.1. Radicales libres

Los radicales libres son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado, ya sea por pérdida o ganancia de ellos, en un nivel energético superior y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas que les confieren una alta e indiscriminada reactividad, cuya sobreexpresión actúan como mutagénicos e inducen la transformación de las células (MOSQUERA *et al.*, 2005 y CAVIA *et al.*, 2007).

La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas y a membranas celulares. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos. De hecho, nuestro propio cuerpo los fabrica en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus (AVELLO y SUWALSKI, 2007).

Los radicales libres se forman por transferencia de electrones secundaria a reacciones metabólicas, las tres vías de formación son: 1) Por la ruptura homolítica del enlace covalente; 2) Por la pérdida de un electrón; y 3) Por la adición de un electrón, siendo promovida su producción por condiciones externas: la contaminación, altas temperaturas, radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, rayos X, medicamentos, el humo del tabaco, el smog, etc. (GONZALES *et al.*, 2001).

Las principales fuentes de radicales libres lo constituyen la mitocondria, algunos organelas que poseen vacuolas llamadas peroxosimas y leucocitos polimorfonucleares, que durante su metabolismo normal estos

producen intermediarios parcialmente reducidos (RAPAPORT, 1993, DROST, 1996 y RODRÍGUEZ, 2001).

Los principales radicales libres que se forman por reacciones donde participa el oxígeno son:

2.2.1.1. Radical hidroxilo(OH⁻)

Radical libre con una vida corta, aproximadamente de 10^{-10} a 10^{-11} segundos. La reacción del radical OH⁻ con moléculas orgánicas produce radicales libres secundarios, los cuales son muy reactivos con las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácido desoxirribonucleico (DROST, 1996).

El radical hidroxilo se forma por la reducción trivalente del O₂; de acuerdo a la siguiente ecuación:



2.2.1.2. Anión superóxido (O₂⁻)

Se produce de la reacción univalente del oxígeno molecular (DROST, 1996).



Se calcula que del 1 a 3 % del oxígeno respirado se transforma en radical superóxido, principalmente en la cadena de transporte de electrones dentro de la mitocondria como en el retículo endoplasmático (ZENTELLA y SALDAÑA, 1996).

2.2.1.3. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El peróxido de hidrógeno es generado in vivo a partir de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa, o a partir de la reducción divalente del oxígeno molecular (DROST, 1996):



El H₂O₂ es una molécula no radical, que se asemeja al agua en su estructura molecular y es muy difusible dentro de la célula. Aunque no es estrictamente un radical libre, se considera como tal por su capacidad de generar el OH[•] en presencia de metales como el hierro (RODRÍGUEZ, 2001).

2.2.1.4. Óxido nítrico NO

Es de los pocos radicales libres que no son perjudiciales, más bien útiles in vivo, es un segundo mensajero intracelular y participa en la regulación de la presión sanguínea. Esta sustancia es un potente agente vasodilatador y puede actuar como neurotransmisor (ZENNELLA y SALDAÑA, 1996). El óxido nítrico (NO[•]) es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por las células endoteliales vasculares, fagocitos, algunos tipos de neuronas y otras células. El exceso de NO[•] puede ser tóxico, al dañar por ejemplo, proteínas con centro sulfurohierro u otros elementos constituyentes de la membrana celular (MONCADA y HIGGS, 1993 y RODRÍGUEZ, 2001).

2.2.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias químicas que inactivan los radicales libres o inhiben su producción, cediendo un electrón al radical libre, oxidándose y transformándose en un radical libre débil que es inofensivo, en algunos casos puede llegar a regenerarse (STEPHENS, 1996).

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar e interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente-membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (VENEREO, 2002 y GUTIÉRREZ *et al.*, 2007). Los antioxidantes que se encuentran normalmente en el organismo se llaman endógenos y generalmente son sistemas enzimáticos, mientras que los antioxidantes exógenos son los que se ingieren con la dieta encontrándose en los alimentos como las frutas y verduras (ROBBINS, 1995; STEPHENS, 1996; CARBONELL, 2001 y CAVIA, 2007).

2.2.2.1. Antioxidantes endógenos

Conformadas por sistemas enzimáticos, que intervienen en la regulación de especies oxidantes indeseables como el superóxido y peróxidos antes que reaccionen e interaccionen con distintas biomoléculas induciendo daño celular (DROST, 1996, ZENTELLA y SALDAÑA, 1996 y CAVIA *et al.*, 2007).

Cuadro 2. Sistemas enzimáticos antioxidantes.

Enzima	Reacción	Observaciones
Superoxido dismutasa (SOD)	Dismutación de O_2^- a H_2O	Existen varios tipos: 1. CuZn SOD: Espacio intermembranal mitocondrial, citosol y núcleo. 2. Mn SOD: Matriz mitocondrial. Es la isoforma funcionalmente más importante. 3. Extracelular: Producida por fibroblastos y células endoteliales.
Catalasa (CAT)	Conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2	Presente en todos los tejidos, pero más abundante en hepatocitos y eritrocitos.
Glutation peroxidasa (GPX)	Reducción de hidroperoxidos a expensas de GSH	Se puede medir en plasma, y a nivel subcelular se encuentra en citosol y mitocondrias de todas las células, en especial hepatocitos
Glutation reductasa	Reducción a GSSG a GSH. Este último necesario para la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa	Requiere NADPH, el cual es proporcionado por la vía de las pentosas fosfato.

Fuente: FRIDOVICH (1975) y URBINA, (2008)

2.2.2.2. Antioxidantes exógenos

Los antioxidantes exógenos, son los que se ingieren con la dieta encontrándose en diversos alimentos como las frutas y verduras (PINEDA, 2005). Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen. Éstos son: vitamina C, vitamina E, betacarotenos, flavonoides, licopenos, entre otros (VENEREO, 2002).

2.3. Polifenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles provienen del metabolismo secundario de las plantas, son un conjunto heterogéneo de moléculas, que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (LIN, 1996; HAN *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ, 1999 y HERNÁNDEZ *et al.*, 2003). Se originan principalmente a través de dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos (PINEDA, 2005).

En la ruta del ácido shikímico se utilizan aminoácidos aromáticos como fenilalanina y tirosina para formar los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos y derivados, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). Por medio de la ruta de los poliacetatos se originan quinonas, xantonas, orcinoles, etc, aunque algunos compuestos fenólicos como los flavonoides (antocianidinas, catequinas, ácido gálico e isoflavonas) se

pueden formar a través de rutas mixtas que combinan la vía del shikimato y del acetato (PINEDA, 2005).

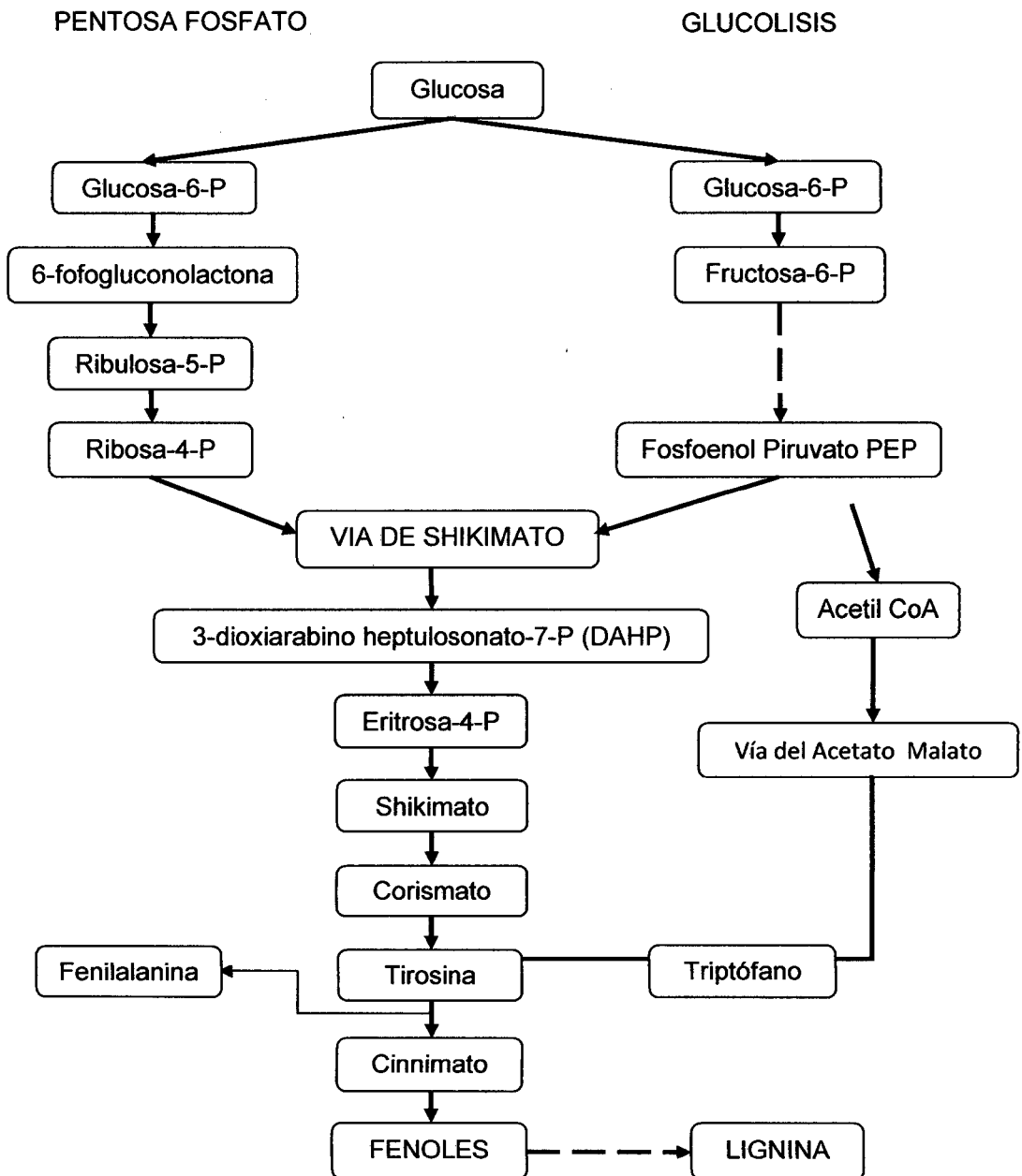


Figura 1. Ruta de la pentosa fosfato para la síntesis de componentes Fenólicos en plantas

Éstos compuestos desempeñan un papel protagónico en la fisiología de la planta, la regulación del crecimiento, su desarrollo y la interacción con otros organismos (RASKIN, 1992), actuando como agentes alelopáticos y contra invasiones de hongos, bacterias y virus (HARBORNE, 1993); en relaciones de mutualismo en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas (RAMOS et al., 1998); en funciones defensivas causando toxicidad (FOO et al., 1997).

Entre las funciones de los compuestos fenólicos en la nutrición humana está la de proteger al organismo contra enzimas que participan en la inflamación; modifican el metabolismo de las prostaglandinas y por lo tanto protegen de la aglomeración de plaquetas; pueden atrapar hierro y cobre evitando su participación en la producción de radicales libres; donan iones H^+ o electrones para inactivar radicales libres y evitan la peroxidación lipídica protegiendo a la membrana celular de daño estructural que interfiere con el transporte de moléculas a través de estas membranas, además de controlar el crecimiento y proliferación celular (PINEDA, 2005).

Entre los mecanismos de acción de los polifenoles, para que estos funcionen mejor en mezclas, es que en éstas existen diferentes compuestos con diferente capacidad antioxidante, siendo los más reactivos aquellos que reduzcan a los radicales más activos, como el alcoxilo y lipoperóxido, mientras que los menos activos actúen generando a los primeros, por ello mientras que no se conozcan bien las proporciones óptimas de las mezclas se recomienda su uso a partir de la fuentes naturales y no de forma aislada (RAMOS y MUÑOZ, 2005).

2.4. Ácido Ascórbico

El ácido ascórbico es un importante antioxidante, así como en las funciones metabólicas de las plantas, animales y humanos destacando a las plantas como la principal fuente de producción. La vitamina C interviene en la totalidad de nuestros metabolismos: síntesis del colágeno, síntesis hormonales, estimulación de la cicatrización (RAMOS *et al.*, 2002). Además, la vitamina C contribuye al mantenimiento del sistema inmunológico y facilita la absorción de nutrientes (incluyendo el hierro) en el sistema digestivo.

Cuadro 3. Propiedades Físico químicas del ácido ascórbico

Aspecto y color	: Blanco
Olor	: Inodoro
Presión de vapor	: No aplicable
Densidad relativa	: 1,65
Solubilidad en agua	: 33 g/ 100 ml
Punto de ebullición	: No aplicable
Punto de fusión (se descompone)	: 190-192°C
Peso molecular	: 176,1

Fuente: BADUI, (1990)

El ácido ascórbico es estable en estado seco, sin embargo en solución, esta sustancia llega a ser altamente reactiva, especialmente en presencia de calor, agua, oxígeno, y metales como el hierro y el cobre, considerándosele como la defensa más importante contra los radicales libres, eliminándolos de los compartimientos hidrofílicos de la célula, de la matriz extracelular y del sistema circulatorio (JHONSON, 1995). Además, participa en

la protección de las moléculas hidrofóbicas como las lipoproteínas del plasma sanguíneo y de los lípidos membranales (JHONSON, 1995 y ELEJALDE, 2001).

2.5. Ultrasonido

El ultrasonido se define como una forma de energía que viaja en ondas de sonido iguales o mayores a 20000 vibraciones por segundo. Otra definición es como cualquier sonido de frecuencia más allá de lo que el oído humano puede escuchar por ejemplo arriba de 16 kHz (JARAMILLO *et al.*, 2005).

2.5.1. Ondas de Ultrasonido

Las ondas ultrasónicas son similares a las ondas de sonido, pero sus frecuencias son demasiado altas para ser percibida oído humano. La transmisión del sonido se produce debido a los movimientos ordenados y periódicos de las moléculas de los medios de comunicación, con la energía de movimiento pasa a las moléculas adyacentes, sin transferencia de materia. Por lo general, el rango de frecuencias percibidas por los seres humanos es de 20 Hz a 20 kHz, mientras que el ultrasonido es de alrededor de 20 a $1,2 \times 10^{10}$ kHz (frecuencia más alta que puede ser transmitido por sólidos o líquidos). El ultrasonido tiene las propiedades de las ondas sonoras, como reflexión, la interferencia, la absorción y dispersión, y puede ser propagado a través de sólidos, líquidos y gases.

Las ondas de sonido pueden ser paralelas o perpendiculares a la dirección de viaje a través del material, y se llaman como ondas longitudinales

y transversales, respectivamente (Figura 2). En la transversal, el movimiento de las partículas son perpendiculares a la dirección de propagación las de ondas. Como los líquidos y los gases no son compatibles con el esfuerzo cortante en condiciones normales, las ondas transversales sólo se propagan a través de los sólidos.

En las ondas longitudinales, la dirección del movimiento de las partículas es el mismo que el movimiento de las olas. Estas ondas son capaces de viajar en los sólidos, líquidos o gases, por lo que son ampliamente usados en aplicaciones de ultrasonidos (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

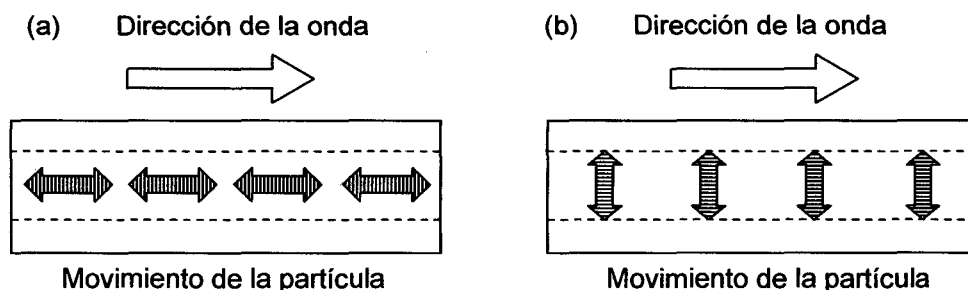


Figura 2 Tipos de ondas de sonido: (a) ondas longitudinales, (b) ondas transversales.

2.5.2. Principio de funcionamiento de los equipos de ultrasonido

El ultrasonido es generado por una corriente eléctrica que es transformada en energía de sonido por medio de diferentes transductores; existen tres tipos de transductores ultrasónicos:

- Transductores conducidos por líquido; son aquellos en los que el líquido es forzado a atravesar por una lámina muy delgada causando que la lámina vibre. Por cada momento de vibración de la cara principal de la lámina,

produce una presión de onda, mientras que la cara posterior genera cavitación en el líquido. Esta generación de presión y cavitación en el líquido da una fuente muy grande de energía, con lo que se genera ondas de sonido.

- Transductores de magneto rígido; dispositivos electromecánicos que utilizan materiales ferromagnéticos, materiales que cambian de tamaño por la presencia de un campo magnético. Sus desventajas: el campo de frecuencia se encuentra por debajo de 100 kHz y los sistemas son eficientes al 60%.

- Transductores piezoeléctricos; son los más usados para la generación de ultrasonidos, utilizan materiales cerámicos que contienen materiales piezoeléctricos como el titanio de bario o metaniobato de plomo. Los materiales piezoeléctricos son muy quebradizos, por lo que se sujetan entre materiales metálicos. Sirve para proteger al material cristalino, como también evitar que se recaliente. Estos transductores son más del 95% eficiente electivamente y pueden operar todo intervalo ultrasónico.

El generador ultrasónico (Figura 3) convierte el voltaje a energía eléctrica de alta frecuencia (40 kHz). Esta energía se transmite a un transductor piezoeléctrico donde se convierte en vibraciones mecánicas. Las vibraciones se intensifican por la punta de titanio, creando ondas de presión en el líquido (Figura3).

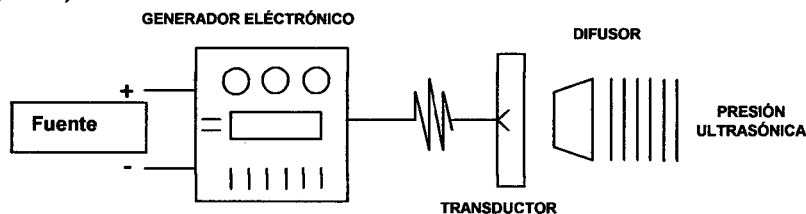


Figura 3 Esquema general de un generador de ultrasonido

2.5.3. Efecto del ultrasonido en los tejidos

La cavitación es la formación y actividad de burbujas en un líquido. Las burbujas formadas pueden ser de gas o vapor de cualquier tipo de líquido bajo diversas condiciones (BARBOSA-CANOVAS *et al.*, 2000).

Se utilizan intensidades muy altas, las presiones y tracciones que sufre el medio atravesado por el ultrasonido pueden llegar a ser tan grandes que literalmente, se desgarre, por lo que sobre el hueso se concentrará más el haz. Este fenómeno se denomina cavitación. Sí que puede ocurrir que en la tracción, al atravesar un líquido orgánico, se produzcan pequeñas burbujas del gas disuelto en ese líquido. Es la llamada pseudocavitación (JARAMILLO *et al.* 2005; MANAS *et al.* 2000).

2.5.4. Efecto del ultrasonido sobre los microorganismos

El efecto bactericida del ultrasonido es generalmente atribuido por la cavitación intercelular generada, en donde los choques micro-mecánicos son creados por la continua formación y ruptura de burbujas microscópicas inducidas por presiones que fluctúan bajo el proceso de ultrasonicación. Estos choques interrumpen componentes estructurales y funcionales celulares hasta el punto de lisis de la célula (BENEDITO *et al.*, 1995 y MANAS *et al.*, 2000).

El daño microbiológico al aplicar diferentes amplitudes de onda de ultrasonido va a depender de factores críticos como el tiempo de contacto con el microorganismo, la cantidad y composición del alimento y la temperatura durante el tratamiento (ALZAMORA *et al.*, 2000).

2.5.5. Aplicación del Ultrasonido en alimentos

El ultrasonido de bajo poder y gran frecuencia ($<1Wxcm^{-2}$, $>100kHz$), ha sido ampliamente usado en el monitoreo de alimentos o su procesamiento (ZBIGNIEW *et al.*, 2007; BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007). La aplicación del ultrasonido ha sido usado en un rango amplio de alimentos teniendo en cuenta particularmente la velocidad, atenuación e impedancia o parámetros relacionados para medir muchas características tales como cambios de fase y distribución del tamaño de la partícula (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

Mientras que el ultrasonido de baja frecuencia ($10-100Wccm^{-2}$, 20-100 kHz), es usado normalmente para alterar las propiedades de un material o afectar el progreso de un proceso. Pudiendo producir cambios físicos, químicos efectos mecánicos. Aplicándose generalmente en combinación con otras tecnologías de procesamiento para mejorar la eficiencia del proceso (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

Ha sido ampliamente usado por las extremas presiones y temperaturas ocasionadas por la cavitación, generando injuria a la pared celular, contribuyendo al calentamiento local produciéndose radicales libres que causan dañar el ADN (AHMED y RUSSELL, 1975 y BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

El ultrasonido ha demostrado poseer efectividad antimicrobiana, destruyendo una variedad de microorganismos incluyendo bacterias, esporas de bacterias, levaduras, hongos, esporas de hongos, protozoos y virus

(GARCÍA *et al.*, 1989; CICCOLINI *et al.*, 1997; GALLEGO, 1998 y BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

El ultrasonido incluso puede combinarse con la sanitización de productos mínimamente procesados, para incrementar la efectividad del lavado y la reducción de *Sallmonella typhimurium* (SEYMOUR *et al.*, 2002).

Otra de las aplicaciones de importancia del ultrasonido de poder es en la bioquímica por su capacidad para causar lisis en la pared celular y liberar su contenido (MASON *et al.*, 1996). Subsecuentemente el ultrasonido de poder ha demostrado que puede usarse para activar enzimas inmovilizadas aumentando el transporte de substratos hacia la enzima. E incluso las mismas enzimas pueden ser afectadas por el ultrasonido y puede utilizarse como un método para su inhibición (ZIBNIEW *et al.*, 2007 y MASON *et el.*, 1996).

El ultrasonido mejora significativamente la extracción de componentes contenidos dentro de las plantas y semillas. Los efectos mecánicos que produce el ultrasonido alteran las paredes celulares, facilitando el pase del solvente mejorando de esa manera el proceso de transferencia de masa (CHENDKE y FOGLER, 1975; MASON y ZHAO, 1994 y BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

2.6. Conservación de Pulpas

Durante el procesamiento mínimo de frutos, la ruptura de los tejidos causa la mezcla de enzima y substrato. Esta sucesión de cambios físicos, fisiológicos y bioquímicos traen consigo la disponibilidad de nutrientes necesarios para la proliferación de microorganismos. La inhibición de las

reacciones enzimáticas y del crecimiento microbiano en alimentos, se puede efectuar, mediante la extracción de calor del sistema disminuyendo su temperatura, reduciendo de esa manera los daños inducidos por las enzimas y microorganismos (GARCÍA Y RIOS, 2001).

La aplicación de bajas temperaturas en la conservación de pulpas ralentiza incrementa su vida en almacenamiento, mas no detiene las reacciones fisicoquímicas y bioquímicos que gobierna el deterioro. Durante el almacenamiento hay un cambio lento de la calidad organoléptica. La pérdida de calidad de las pulpas depende primordialmente de la temperatura de almacenamiento. El crecimiento microbiano está prácticamente detenido a -18°C, sin embargo los cambios enzimáticos y no enzimáticos continúan a tasas más lentas durante el almacenamiento (BARBOZA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

Dada la alta perecibilidad de las pulpas, el almacenamiento en congelamiento, puede constituirse en una alternativa adecuada para aumentar el tiempo de vida de la fracción comestible. En la congelación, al pasar el agua del estado líquido al sólido, disminuye en gran medida las reacciones que conllevan el deterioro de la pulpa, lográndose extender el período de uso del producto (MEJÍA *et al.*, 2006).

El almacenamiento congelado debe garantizar la calidad del producto a través del tiempo; en este sentido se deben tener en cuenta criterios tales como: calidad sensorial, microbiológica, física y química, con el fin de mantener su aceptación por parte de los consumidores (LISIEWSKA Y KMIIECIK, 2000; REDMOND *et al.*, 2003). La calidad de un alimento está definida, en buena medida, por la percepción que tenga el consumidor de él.

En este punto, las características sensoriales son de gran importancia, pues juegan un papel fundamental en la determinación de las condiciones adecuadas de almacenamiento del alimento. La calidad sensorial es el reflejo de las características microbiológicas, físicas y químicas, por lo que se constituye en una herramienta valiosa e integral para el diagnóstico de la calidad del producto (GARCÍA Y RIOS, 2001 y MEJÍA *et al.*, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de Ejecución

El trabajo de investigación se ejecutó en los laboratorios Análisis de Alimentos, Microbiología de los Alimentos, Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnología de la Amazonía (CIDBAM) y Centro de Investigación de Productos Naturales de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María; ubicada a 660 m.s.n.m., con una humedad relativa de 84% y una temperatura promedio anual de 24 °C, investigación llevada a cabo durante el periodo de agosto a diciembre del año 2008.

3.2. Materia Prima

Los frutos de *Myrciaria dubia* Mc Vaugh (Camu camu) utilizados en los ensayos preliminares y definitivos para el desarrollo de la investigación procedieron de la Asociación de Productores de camu camu del Distrito de Manantay, Provincia de Coronel Portillo, Región de Ucayali, ubicada a 150 m.s.n.m., con una temperatura media promedio de 26,4°C y una humedad promedio de 84.24 %.

En la cosecha de los frutos, se tuvo en cuenta la experiencia del agricultor que se guiaron de la coloración de los mismos para su recolección. Para luego determinar su índice de madurez, mediante relación de contenido

de sólidos solubles totales (SST) y la acidez titulable (AT), mediante la siguiente relación $IM = SST/\%A$. El transporte se realizó en jabas de plástico de 25 kilogramos de capacidad. Las jabas fueron cubiertas de papel periódico para evitar daños excesivos al fruto durante el transporte.

3.3. Materiales, Equipos y Reactivos

3.3.1. Materiales

Se usaron los siguientes materiales: vasos de precipitado (100, 50 y 25 mL), matraces (500 y 250 mL), fioles (1000 y 10 mL), pipetas (1 y 10 mL), micropipetas (20-200 y 100-1000 μ L), tips (200 y 1000 μ L), tubos de ensayo, microtubos (2 mL), placas petri, gradillas, microfiltros de 20 μ m, jeringas 10 mL, microjeringa 100 μ L, cubeta de polietileno (1x1x4,5 cm), bolsas de polietileno de densidad media.

3.3.2. Equipos

Se usaron los siguientes equipos: HPLC modelo LC-10AVP (Shimadzu Scientific, MD, USA.), equipado con: bomba modelo LC-10ATVP, columna cromatográfica C18-110R Gemini, horno de columna modelo CTO-10ASVP, detector UV-VIS modelo SPD-10AVVP, controlador modelo SCL-10AVP, software de interfase CLASS-VP, Computador Compatible USB-52X y un inyector de muestra de capacidad de 20 μ L; potenciómetro modelo 3510 (JENWAY); balanza analítica modelos Scout Pro SP2001 (0,0001 g); centrifuga modelo MIRKO 22R (Hettich); equipo de ultrasonido JAC[®] Ultrasonic 1002 Lab Companion; refrigeradora; espectrofotómetro Genesys 8-England; empacadora

de vacío (Multivac – Modelo: A300/76); desionizador de agua marca Easy Pure II RF/UV; pulpeador modelo MSZ (Budapest, Hungary).

3.3.3. Reactivos

Se usaron los siguientes reactivos: 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis(3-etilenbenzotiazolino-6 ácido sulfónico) (ABTS), persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), etanol de 96°, ácido clorhídrico (HCl), ferricianuro de potasio ($KFe_3(CN)_6$), cloruro de hierro ($FeCl_3$), fosfato dihidrogenado de potasio (KH_2PO_4), ácido orto fosfórico (H_3PO_4), ácido ascórbico, ácido gálico.

3.4. Métodos de Análisis

3.4.1. Índice de madurez

Se determinó por medio de la relación que se establece entre los Sólidos Solubles (SST) y la Acidez Titulable (AT), mediante la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{SST}{AT} \dots \dots \dots (1)$$

- Sólidos solubles, método N° 932.12 (AOAC, 1 995).
- Acidez titulable, método N° 642.15 (AOAC, 1 995).

3.4.2. Cuantificación de componentes bioactivos

3.4.2.1. Cuantificación de ácido ascórbico

Método descrito por GÖKMEN *et al.*, (2000).

3.4.2.2. Cuantificación de Polifenoles Totales

Método de azul de prussia (PRICE y BUTLER, 1975).

3.4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante

3.4.3.1. Radical 2,2 diphenyl-picrilhydrazyl (DPPH):

Método del Radical 2,2 diphenyl-picrilhydrazyl (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

3.4.3.2. Cation 2,2 azinobis (3-benzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS):

Método del Cation 2,2 azinobis (3-benzotiazolino-6-ácido sulfónico) (RE *et al.*, 1999).

3.4.4. Cuantificación del contenido de mohos y levaduras

Método para el conteo de mohos y levaduras en alimentos (CAMACHO *et al.*, 2009).

3.5 Metodología

3.5.1. Índice de madurez

Preparación de Muestra

Los frutos en tres estados de madurez se recibieron, pesaron y lavaron con agua clorada a 150 ppm.

Para realizar los análisis de sólidos solubles: se calibró el refractómetro con agua destilada; luego se agregó 3 gotas de pulpa de camu camu, hasta cubrir homogénea y completamente el prisma y se anotó la lectura.

Para los análisis de acidez titulable, se utilizó la pulpa de camu camu, que fue separada cuidadosamente de la semilla y cáscara. Para la

medición de la acidez titulable, se pesó 1 g de pulpa de camu camu y disolvió en 25 mL de agua destilada, se agitó y filtró. Al filtrado se le añadió 3 gotas de fenolftaleína (al 1% en alcohol al 95%) y se procedió a titular con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, hasta el viraje de color, se anotó el gasto y se realizaron los cálculos.

Una vez obtenidos los datos se aplicó la fórmula (1) del ítem 3.1.1., para determinar el índice de madurez.

3.5.2. Cuantificación de componentes bioactivos y actividad antioxidante de la pulpa de camu camu en tres estados de madurez

Los frutos fueron pulpeados, con tamiz de 0,5 mm de luz y paletas cubiertas de goma. La pulpa fue embolsada en polietileno de densidad media de 7cmx15cm, con un peso de 100 gramos y almacenada a -20°C, hasta los análisis correspondientes.

La metodología experimental seguida para la cuantificación de componentes bioactivos y actividad antioxidante en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez se observa en la figura 4.

3.5.2.1. Cuantificación de componentes bioactivos

3.5.2.1.1. Cuantificación de ácido ascórbico

Se preparó una solución de ácido ascórbico a concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se inyectó 20 μL al HPLC y se construyó a partir de sus respectivas lecturas la curva estándar (A-I).

La pulpa de Camu camu, fue separada en alícuotas 1,5 ml en micro tubos, que fueron centrifugadas a 10000 rpm x 5 min⁻¹ a una temperatura de 4°C. Luego de ser centrifugada se separó el sobrenadante, se filtró en filtro de 0,2 µm e inyectó al HPLC.

Para la cuantificación de ácido ascórbico se utilizó valores la miliabsorbancia (mUA), teniendo en cuenta el tiempo de retención. Se utilizó el software Class-VP del sistema del HPLC, con el cual se obtuvo la ecuación generada por el estándar de ácido ascórbico, que se utilizó para estimar la cantidad de ácido ascórbico (mg de ácido ascórbico x 100g⁻¹ de pulpa fresca) presente en la pulpa de Camu camu.

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el diseño completo al azar DCA, en los tratamientos donde existió diferencia significativa se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

3.5.2.1.2. Cuantificación de polifenoles totales

La curva estándar se realizó preparando soluciones de: 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 y 0,01 mM, cada dilución se preparó por triplicado. Se agregó a cada tubo 200 µL de la soluciones e hizo reaccionar con 600 µL de FeCl₃ 0,1 M en HCl 0,1N por 10 minutos, luego se adicionó 600 µL de K₃Fe(CN)₆ 0,008 M por 10 minutos, concluido el tiempo de reacción se colocó en el espectrofotómetro y anotó la lectura. Con los resultados obtenidos se graficó concentración vs absorbancia, se procedió a determinar la ecuación (A-II).

Se pesó 1 gramo de pulpa fresca y diluyó en 20 mL de agua destilada y desionizada. Solución a la cual se llamó extracto acuoso de 50000 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$.

Se tomó 200 μL de extracto acuoso y se adicionó 600 μL de FeCl_3 0,1 M en HCl 0,1N se hizo reaccionar por 10 min, luego se añadió 600 μL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,008 M, se hizo reaccionar por 10 minutos, la absorbancia fue registrada a 720 nm. A partir de los resultados se expresaron en ácido gálico equivalente (AGE) $\times 100 \text{ g}^{-1}$ de pulpa.

Los resultados fueron analizados mediante un Diseño Completo al Azar (ANVA), en caso de existir diferencia significativa se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

3.5.2.2. Evaluación de la actividad antioxidante

3.5.2.2.1. Radical 2,2 Diphenyl-Picrilhydrazyl (DPPH)

En este ensayo la actividad antioxidante se mide en términos de donar hidrógeno o de la capacidad captadora de radicales, usando el radical violeta DPPH que absorbe a 517 nm. La reducción y estabilización de este radical por los antioxidantes da lugar a la decoloración de éste, produciendo una disminución de la absorbancia la cual se puede medir a la longitud de onda antes mencionada.

Se pesó 1 gramo de pulpa fresca y diluyó en 20 mL de agua destilada y desionizada. Solución a la cual se llamó extracto acuoso de 50000 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A partir de ésta se prepararon diluciones de 300, 100, 30 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, para la pulpa madura 25 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$; 475, 100, 40 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, para la pulpa pintón

y 450, 100, 40 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, para la pulpa verde. Se hizo reaccionar 50 μL de las diluciones del extracto acuoso con 950 μL de DPPH (100 mM), en etanol al 96%, la absorbancia fue monitoreada a 517 nm, por 5 min.

Los datos de CI_{50} fueron analizados mediante un Diseño Completo al Azar y en los tratamientos donde hubo diferencia se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

3.5.2.2.2. Cation 2,2 Azinobis (3-Benzotiazolino-6-Ácido Sulfónico) (ABTS)

El radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ se formó tras la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (2,45mM) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16h. Una vez formado el radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ se diluyó con etanol a 96% hasta obtener un valor de absorbancia de $0,700 \pm 0,05$ a 734nm.

Se pesó 1 gramo de pulpa fresca y diluyó en 20 mL de agua destilada y desionizada. Solución a la cual se llamó extracto acuoso de 50000 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A partir de ésta se prepararon diluciones: 275, 100, 20 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, para la pulpa madura; 350, 100, 30 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ para la pulpa pintón y 400, 100, 40 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, para la pulpa verde.

Se hizo reaccionar 20 μL de extracto de pulpa de Camu camu con 980 μL de $\text{ABTS}^{+\cdot}$, hasta obtener de 20-80% de inhibición. Los resultados fueron expresados en términos de CI_{50} en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los datos de CI_{50} , fueron analizados mediante un diseño completo al azar (DCA) y en los tratamientos donde existió diferencia significativa se realizó la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

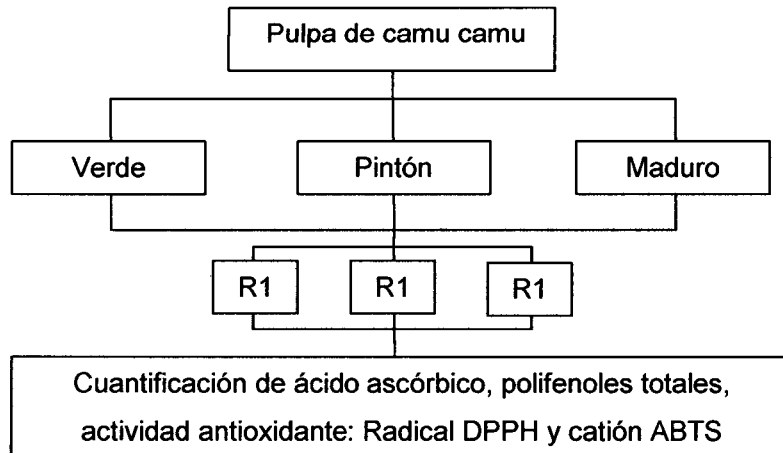


Figura 4 Metodología Experimental para la cuantificación de componentes bioactivos de la pulpa de camu camu en tres estados de madurez

3.5.2.3. Cuantificación de Mohos y levaduras

Se pesó 10 gramos de pulpa y diluyó en una solución amortiguadora de agua peptonada al 0,1%, a la que se llamó dilución 1. Se agitó la muestra por 1 minuto. Luego se tomó 1 mL de la dilución 1 y diluyó nuevamente en 9 mL de agua peptonada al 1% y agitó por 1 minuto, ésta se llamó dilución 2. Se tomó 1 mL de la dilución 2 y diluyó en 9 mL de agua peptonada y agitó por 1 minuto, ésta solución se llamó dilución 3. Se depositó 1 mL de cada dilución en placas petri y se le adicionó 15 mL de agar OGY. La lectura se realizó a los 4 días.

3.5.3. Tratamiento ultrasónico y almacenamiento de la pulpa de camu camu.

La pulpa de camu camu, que presentó el mayor contenido de componentes bioactivos, fue sometida al tratamiento ultrasónico. Embolsadas

en polietileno de densidad media y sonicada por intervalos de 0, 1, 3, 5, 7 y 10 minutos a 40 kHz. Cada bolsa con un contenido de 100 gramos de pulpa. Luego selladas a vacío y almacenadas hasta su análisis respectivo. La metodología experimental seguida se observa en la figura 5.

La pulpa sonicada, fue llevada a almacenamiento de -20°C , por un tiempo de 3 meses (90 días), cada 30 días se realizaron las evaluaciones del contenido de componentes bioactivos y mohos y levaduras.

Los resultados fueron analizados mediante un diseño completo al azar con arreglo factorial de 4×6 a un nivel de significancia del 5%.

3.5.3.1. Cuantificación de componentes bioactivos.

3.5.3.1.1. Cuantificación de ácido ascórbico

La metodología seguida para la cuantificación de ácido ascórbico a este nivel se describe en el ítem 3.5.2.1.1.

3.5.3.1.2. Cuantificación de Polifenoles totales

La metodología seguida para la cuantificación de polifenoles totales a este nivel se describe en el ítem 3.5.2.1.2.

3.5.3.2. Determinación de la Actividad Antioxidante

3.5.3.2.1. Radical 2,2 Diphenyl-Picrilhydryl (DPPH)

La metodología seguida para la cuantificación de la actividad antioxidante mediante el radical DPPH a este nivel se describe en el ítem 3.5.2.2.1.

3.5.3.2.2. Cation 2,2 Azinobis (3-Benzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS)

La metodología seguida para la cuantificación de la actividad antioxidante mediante el catión ABTS ácido ascórbico a este nivel se describe en el ítem 3.5.2.2.2.

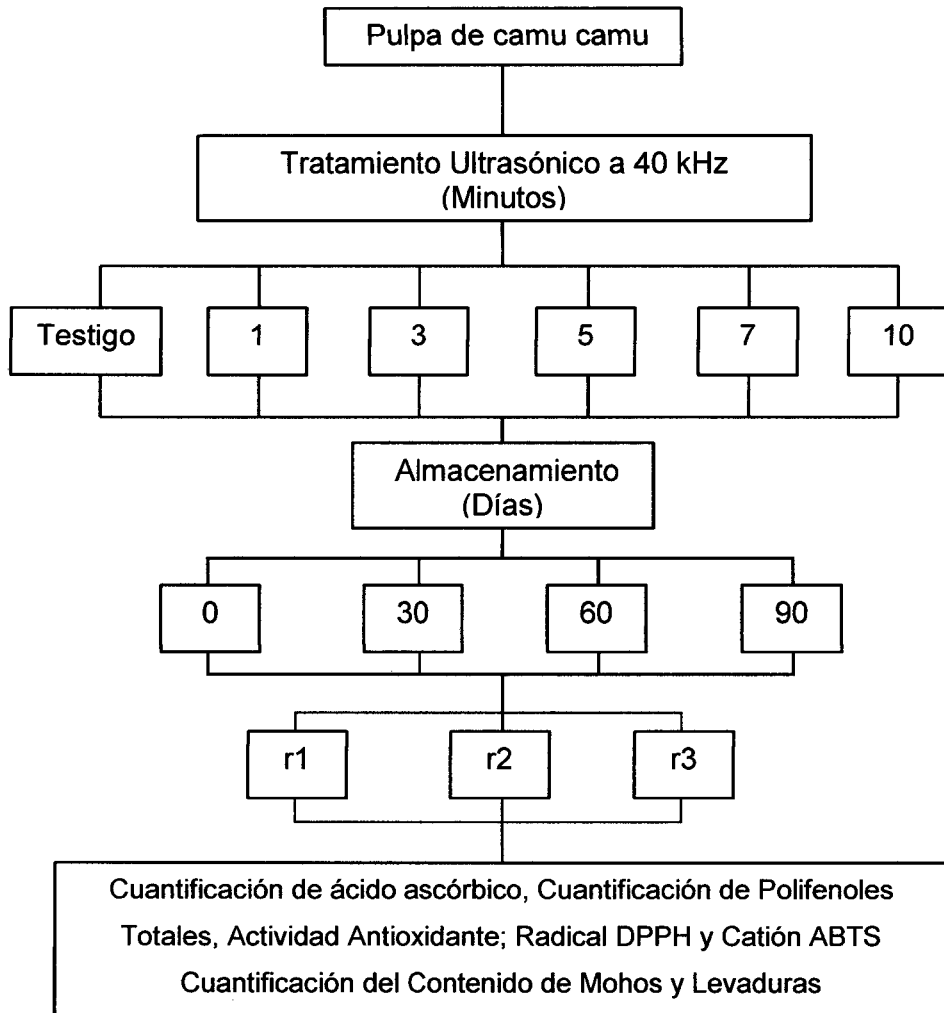


Figura 5 Metodología experimental para evaluar la conservación de la pulpa de camu camu tratada con ultrasonido, durante el almacenamiento.

3.5.3.3. Cuantificación de mohos y levaduras

La metodología seguida para la cuantificación de mohos y levaduras a este nivel se describe en el ítem 3.5.2.3.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Índice de Madurez

En el Cuadro 4 se muestran los valores de °Bx, % Acidez e Índice de Madurez de la pulpa de camu camu de tres estados de madurez. (A-III).

Cuadro 4 Sólidos Solubles Totales (°Bx), % Acidez, e Índice de madurez (IM) de la pulpa de camu camu en 3 estados de madurez.

	SST (°Bx)*	% Acidez*	IM = °Bx / % Acidez*
Verde	4,8 ± 0,051 ^c	2,53 ± 0,042 ^a	1,91 ± 0,014 ^c
Pintón	5,8 ± 0,051 ^b	2,43 ± 0,012 ^b	2,37 ± 0,019 ^b
Maduro	6,8 ± 0,089 ^a	2,30 ± 0,024 ^c	2,96 ± 0,059 ^a

* Datos expresados en media ± SD, n=3

Los resultados obtenidos muestran que el índice de Maduración fue de: 1,91; 2,37 y 2,96 para los frutos verde, pintón y maduro respectivamente; existiendo diferencia estadística(A-III). Los resultados obtenidos son coincidentes con los obtenidos por ZAPATA y DUFOUR (1993), quienes determinaron valores de: 2,2; 1,8 y 1,6 para los frutos maduro, pintón y verde. Mientras que VILLANUEVA (2001), obtuvo valores de: 2,41; 1,90; y 1,31 para el índice de madurez del fruto de Camu camu maduro, pintón y verde respectivamente. El índice de madurez está relacionado directamente con la cantidad sólidos solubles presentes en la fruta ELESBAO *et. al* (2002),

demonstró que los °Bx del Camu camu pueden variar de acuerdo al lugar donde se cultivan; por tanto el índice de madurez varía de acuerdo a la zona de cultivo del fruto.

Los sólidos solubles totales (°Bx) son usados como índice de maduración para algunos frutos, e indican la cantidad de sustancias que se encuentran disueltas, siendo constituidos en su mayoría por azúcares. En el camu camu el contenido de sacáridos es mínimo. El aumento de contenido de azúcar aumenta con la maduración del fruto. GOMES *et. al* (2002); ANDRADE (2005) y ALVES (1996), coinciden los resultados: 4,8; 5,8 y 6,8; para los frutos verde, pintón y maduro respectivamente.

El porcentaje de Acidez para el camu camu, se expresa como ácido cítrico equivalente, ANDRADE (2005). La acidez es un importante parámetro de conservación en frutas reflejando procesos de descomposición del alimento, sea por hidrólisis, oxidación o fermentación. (OLIVEIRA *et. al*, 1999). La acidez, varía en función de múltiples factores como variedad, zona y tipo de cultivo, maduración, etc. Los resultados encontrados fueron: 2,53; 2,43 y 2,30; para los frutos verde, pintón y maduro respectivamente. SILVA y ANDRADE (1996), analizaron los frutos de Camu camu, cosechados en la proximidades de Manaus, obteniendo valores 2,63 y 2,86; para los estados de verde y maduro, respectivamente.

4.2. Cuantificación de componentes bioactivos y actividad antioxidante de la pulpa de camu camu en tres estados de madurez

4.2.1. Cuantificación componentes bioactivos

4.2.1.1. Cuantificación del ácido ascórbico

El Cuadro 5, se muestra el contenido de ácido ascórbico en la pulpa de Camu camu, obtenido a partir de la curva de calibración (A-I). Existe diferencia estadística significativa entre los estados de madurez (A-IV).

Cuadro 5. Contenido de ácido ascórbico en la pulpa de camu camu

Estado de madurez	mg AA x 100 g ⁻¹ de pulpa fresca*
Verde	1778,84 ± 67,19 ^b
Pintón	1874,49 ± 42,95 ^b
Maduro	2151,11 ± 164,36 ^a

*Datos expresados como media ± SD, n=3, p<0,05

El estudio coincide con ALVES *et al.*, (2002), quienes mencionan que la pulpa de camu camu pintón y madura contienen 1910 y 2061 mgAAx100 g⁻¹ respectivamente.

Mientras que LEE y KADER (2000), mencionan que el contenido de ácido ascórbico en frutas puede variar de acuerdo a la madurez. Muchos autores llegan a la conclusión, que la pulpa madura de camu camu, es la que posee el mayor contenido de éste componente (AREVALO y KIECKBUSCH, 2005; ALLERSLEV, 2007 y GUIJA *et al.*, 2005). Por su parte ANDRADE *et al.*, (2005), encontró que el contenido de ácido ascórbico en la pulpa de camu camu, a medida que pasan los días (desde 56 a 113), después de formado el

fruto se incrementa desde 2489,33 hasta 3133,06 mg de ácido ascórbico $\times 100\text{g}^{-1}$.

Estudios realizados sobre la síntesis de ácido ascórbico en frutos como la fresa, papaya, pimiento verde, guayaba de pulpa blanca y roja, en dos estados de madurez (pintón y maduro) demuestran que el contenido de ácido ascórbico se incrementa de acuerdo evoluciona la madurez (BARATA-SOARES *et al.*, 2004).

BARBOZA-CÁNOVAS *et al.* (2007), mencionan que a medida que sucede la maduración el contenido de ácidos orgánicos en los frutos disminuyen, debido al proceso natural de respiración e incluso puede ocurrir un proceso de interconversión de los azúcares a ácidos orgánicos y de esa manera la concentración de algunos ácidos incrementaran su contenido.

El ácido ascórbico, cumple funciones importantes en el desarrollo de la planta, sin embargo a pesar de ser un compuesto importante, no queda muy clara la explicación fisiológica de la gran variación de su concentración en los diversos órganos de almacenamiento de la planta y entre especies individuales (HANCOCK *et al.*, 2003 y TEDONE *et al.*, 2004), aunque se ha demostrado en papas que la síntesis de ácido ascórbico se realiza en el floema de la planta, para luego ser transportado a órganos de almacenamiento como la raíz (FRANCESCHI y THARLYM, 2002 y TEDONE *et al.*, 2004).

4.2.1.2. Cuantificación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez obtenidos a partir de la curva de calibración (A-II), se

muestra en el Cuadro 6 y Figura 6. Donde se encontró evidencia estadística para mencionar que hay diferencia significativa entre los tres estados de maduración (A-V).

Cuadro 6. Contenido de polifenoles totales en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez.

Estado de madurez	mg AGE x 100 g ⁻¹ de pulpa fresca*
Verde	611,41 ± 5,69 ^b
Pintón	610,23 ± 2,64 ^b
Maduro	791,14 ± 2,56 ^a

*Datos expresados como media ± SD, n=3, p<0,05

Como se observa en el Cuadro 6 y la Figura 6, la evolución del contenido de polifenoles totales va correlacionada con el incremento de la madurez fisiológica, presentándose el valor máximo en la pulpa madura con 791,14 mg AGE x 100 g⁻¹.

El reconocimiento de la madurez del fruto de camu camu viene dado por el cambio de coloración de la cáscara, desde verde hasta rojo vino una vez alcanzado su madurez final, tal cambio está asociado al contenido de polifenoles del tipo de las antocianinas en la cáscara (INGA *et al.*, 2001; VEGA, 2005 y MAEDA *et al.*, 2006).

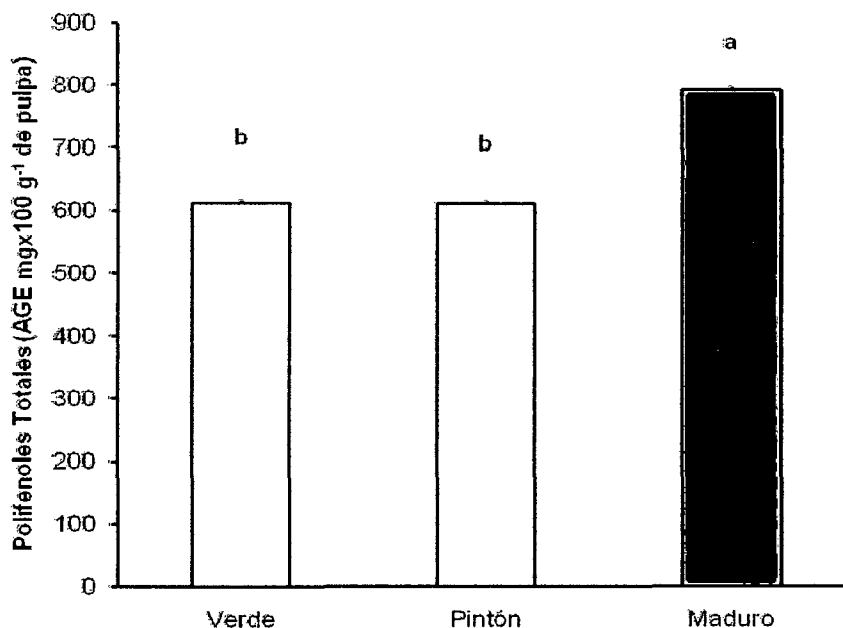


Figura 6. Contenido de polifenoles totales en pulpa de camu camu en tres estados de madurez.

VILLANUEVA (2001), realizó estudios sobre la cáscara de camu camu encontrando que el mayor contenido de polifenoles totales posee la cáscara del fruto pintón, maduro y verde, con 7,7; 6,0 y 5,9 mg AGE x g⁻¹ de cáscara seca respectivamente.

De acuerdo va ocurriendo el proceso de maduración se incrementa el contenido de polifenoles, debido a la producción de antocianinas que modifican la coloración de la cáscara (MAEDA *et al*, 2006 y CONDE *et al.*, 2007).

El incremento del contenido de polifenoles en la pulpa de camu camu, se debe en gran medida al pulpeado, que consiste en la extracción del mesocarpo mediante el estrujamiento, separándola de la cáscara y semillas. La acción mecánica rompe las células epiteliales del exocarpo que contiene gran cantidad de componentes bioactivos como los polifenoles, mezclándose con el

mesocarpo, llevándose a cabo la difusión de componentes desde la cáscara hacia la pulpa, adquiriendo así sus características peculiares (BLÁZQUEZ *et al.*, 2005 y CONDE *et al.*, 2007).

4.2.2. Evaluación de la capacidad antioxidante

4.2.2.1. Radical 2,2 Diphenyl-Picrilhydralyl (DPPH)

Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante se presentan en el cuadro 7, se muestra que el menor Coeficiente de Inhibición (CI_{50}), lo presenta el estado maduro seguido por el verde y el pintón según el análisis estadístico (A-VI).

Cuadro 7. Coeficiente de inhibición (CI_{50}) de la pulpa de camu camu para el radical DPPH

Estado de madurez	CI_{50} ($\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$)*
Verde	$10,96 \pm 0,20^b$
Pintón	$12,38 \pm 0,18^c$
Maduro	$7,43 \pm 0,09^a$

*Datos expresados como media \pm SD, n=3, p<0,05

La actividad antioxidante, viene a ser la cantidad necesaria de muestra para inhibir el 50% de inhibición de la absorbancia, determinado a partir del ploteo de las concentraciones de trabajo. El CI_{50} , es una medida de la concentración inhibitoria en la que valores bajos reflejan una gran actividad antioxidante de la muestra (TZE y WHITEMAN, 2007). En la investigación la pulpa madura de camu camu, resultó poseer una gran capacidad antioxidante,

debido a su alta concentración de ácido ascórbico, polifenoles totales y otros componentes no estudiados.

La actividad antioxidante, está fuertemente correlacionada con el contenido polifenoles y ácido ascórbico siendo muy elevada para el camu camu (RAMOS *et al.*, 2008 y MARX *et al.*, 2008).

PINEDA *et al.*, (1999), menciona que la actividad antioxidante en frutas se debe principalmente a su contenido en vitamina C, E, carotenos y polifenoles, sin embargo Elderbarth *et al.*, (2000), mencionado por ROBLES *et al.*, (2007), en un estudio realizado en manzanas, demostró que la vitamina C, por sí sola aporta menos del 0,4% de la actividad antioxidante total del fruto, sugiriendo que la mezcla compleja de antioxidantes en las frutas, aportan beneficios sobre la salud, a través de la combinación de los efectos sinérgicos.

Puede que las variaciones en el contenido de los componentes activos causaran un efecto positivo en la actividad antioxidante, sin embargo, la variación de la capacidad antioxidante no solo viene dada por la suma de la actividad antioxidante de cada componente sino también depende del microambiente en el que se encuentre el compuesto, pudiendo interactuar entre sí, produciendo efecto sinérgico o inhibitorios (PINEDA *et al.*, 1999 y MUÑOZ *et al.*, 2007).

SMIRNOFF (2002), menciona que los antioxidantes de una planta aumentan al incrementar el tiempo de exposición solar, ya que se producen compuestos que cumplen con la función de protección del fruto a la luz ultravioleta. Otros factores de variabilidad de los componentes que incrementan

la actividad antioxidante son el tipo de suelo, clima, contaminación ambiental, el grado de maduración entre otros (PINEDA, 2005).

4.2.2.2. Cation 2,2 Azinobis (3-Benzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS)

Los resultados de la actividad antioxidante se muestran en el Cuadro 8. En donde se puede observar que la pulpa madura de camu camu, posee la mayor capacidad antioxidante seguido del pintón y verde respectivamente, encontrándose diferencia significativa en los tres estado de madurez (A-VII).

Cuadro 8. Coeficiente de inhibición (CI_{50}) de la pulpa de camu camu para el radical ABTS

Estado de Madurez	CI_{50} ($\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$)*
Verde	$3,97 \pm 0,04^c$
Pintón	$3,55 \pm 0,02^b$
Maduro	$2,95 \pm 0,06^a$

*Datos expresados como media \pm SD, n=3, p<0,05

Como se observa, en los datos presentados en el cuadro anterior, la relación existente en la actividad antioxidante y el estado de madurez del fruto, observando que a medida se desarrolla, lo hace también la actividad antioxidante, esto se debe al incremento del contenido de ácido ascórbico y polifenoles, durante la maduración del fruto. Sin embargo, podemos observar también, que el coeficiente de inhibición (CI_{50}), mediante método del catión

ABTS^{•+}, es mucho menor al del radical DPPH, debido a que el método el catión ABTS^{•+}, ha sido ampliamente usado, tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrofílica o lipofílica y para compuestos coloreados en el caso de las antocianinas (KUSKOSKI *et al.*, 2005; BADAMI *et al.*, 2005; APAK *et al.*, 2007 y REBUGLIO *et al.*, 2007). Estudios realizados por WONG *et al.* (2006), sobre la actividad antioxidante de flavonoides aislados a partir de *Cudrania tricuspidata* (planta medicinal koreana), demostraron que los mismos flavonoides aislados, poseen valores diferentes de CI_{50} , cuando se realizan los ensayos de actividad antioxidante mediante ABTS ($CI_{50} < 10 \mu M$) y DPPH ($CI_{50} > 300 \mu M$), demostrando así la mayor efectividad del catión ABTS^{•+}, para medir la capacidad antioxidante de muestras.

4.2.3. Cuantificación de mohos y levaduras

En el Cuadro 9 el resultado del contenido de mohos y levaduras presentes en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez (Verde, pintón, maduro) los mismos que fueron analizados estadísticamente presentado diferencia significativa entre los tratamientos (A-VIII).

Ramos *et al.* (2008), menciona que la pulpa de camu camu debe poseer 0 UFCxg^{-1} , el estudio demostró que el contenido de mohos y levaduras no cuenta con los requisitos mínimos para ser llamada una pulpa de exportación. La Norma Técnica Peruana 011.031.2007 elaborada por INDECOPI (2007), menciona que la pulpa de camu camu debe poseer menos de 10 UFCxg^{-1} .

Cuadro 9. Contenido de mohos y levaduras en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez

Estado de Madurez	UFC x g ⁻¹ de pulpa
Verde	163 ± 15 ^b
Pintón	8,0 ± 8 ^c
Maduro	973 ± 30 ^a

*Datos expresados como media ± SD, n=3, p<0,05

La pulpa madura, contiene el mayor contenido de componentes bioactivos, actividad antioxidante y posee el mayor contenido de mohos y levaduras. Debido a esto es la que se elige para su posterior estudio, tratándola con ultrasonido y almacenándola.

4.3. Tratamiento ultrasónico y almacenamiento de la pulpa de Camu camu

4.3.1. Cuantificación de componentes bioactivos

4.3.1.1. Cuantificación de ácido ascórbico

El tratamiento ultrasónico influyó significativamente sobre el contenido de componentes bioactivos en la pulpa de camu camu (A-IX). La Figura 7, muestra la variación del contenido de ácido ascórbico antes de la sonicación, después de la misma y durante el almacenamiento, el cual disminuyó en todos los casos. Existe evidencia estadística para mencionar que la sonicación incrementa el contenido de ácido ascórbico en la pulpa de camu camu (A-XI).

El ácido ascórbico es el componente bioactivo de mayor interés en la pulpa de camu camu, y su preservación es importante en la elección y aplicación del método de conservación. El ultrasonido tiene efecto benéfico sobre su disponibilidad, incrementándose significativamente hasta 2388,77; 2241,50 y 2285,33 $\text{mg} \times 100\text{g}^{-1}$ de pulpa fresca; cuando se aplica intensidades de 40 kHz y tiempos de exposición de 1, 3 y 5 minutos respectivamente.

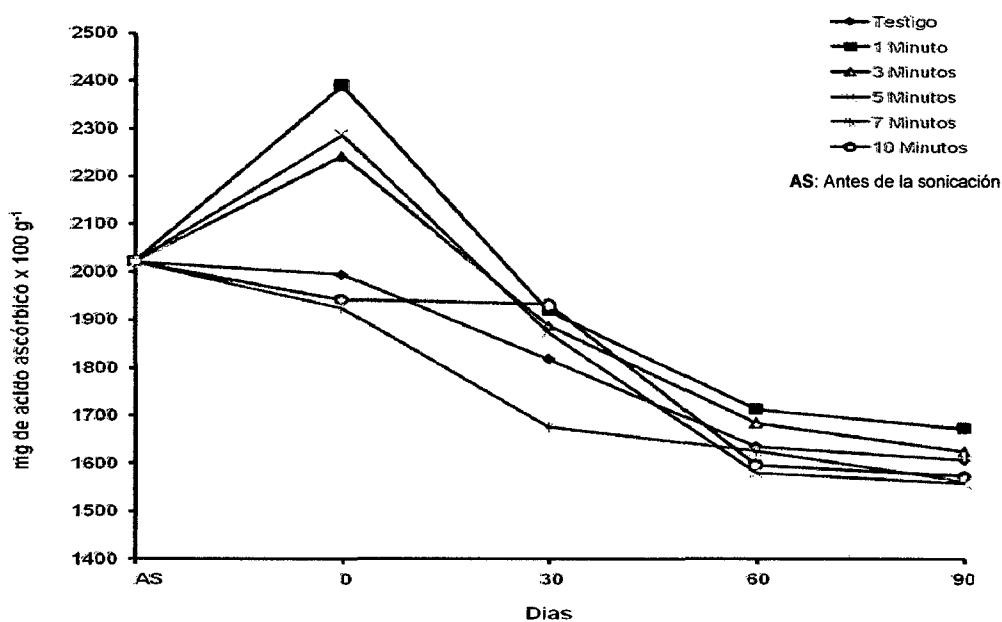


Figura 7. Variación del contenido de ácido ascórbico en pulpa de camu camu, almacenada por 3 meses a -20°C .

El mejor tratamiento fue a 1 minuto de exposición ultrasónica, sin embargo, éste mostró la mayor pérdida del componente a los 90 días de almacenamiento a -20°C ; a pesar de ello fue el tratamiento que durante todo el experimento mantuvo la mayor concentración de vitamina C. BARBOSA-CANOVAS (2007), menciona que el ultrasonido es usado para lisar células e incrementar el proceso de transferencia de masa, las grandes presiones que

genera, rompen las paredes celulares, haciendo más disponibles los componentes al mismo tiempo su difusión sobre los solventes. Menciona también que puede incluso accionar enzimas al incrementar la energía de activación de las mismas si se aplican a intensidades y tiempos adecuados, sin embargo si los tiempos de exposición se elevan, puede incluso inactivarlas.

Durante el almacenamiento los tratamientos de sonicación de la pulpa de camu camu, tuvieron el mismo comportamiento, decayendo significativamente en todos los casos. Las pérdidas cuantificables con respecto a los 0 días del almacenamiento, fueron: 31,8%; 30 % y 27,5% del contenido de ácido ascórbico, equivalentes a los tratamientos 5, 1 y 3 minutos de exposición ultrasónica.

Los tratamientos que en un inicio mostraron mayor concentración luego de la sonicación, al parecer son más propensos a un rápido deterioro. ARÉVALO y KIECKBUSCH (2007), menciona que las pérdidas de vitamina C en pulpa de camu camu llegan hasta 9% a los ocho días de almacenado a temperatura de refrigeración. RAMOS *et al* (2002), menciona que las pérdidas totales del ácido ascórbico son de 24.6% en congelación de -17 a -22 °C.

La oxidación de la vitamina C, es acelerada de manera intensa cuando hay ruptura de tejidos como en el caso del pulpeado, en donde se liberan enzimas teniendo como resultando la pérdida de la vitamina C (CHITARRA, 1999). JUSTI *et al.* (2000), congeló la pulpa de camu camu por 335 días obteniendo pérdidas de vitamina C de 26% a los 100 días manteniéndose casi constante hasta el fin del estudio y almacenamiento.

4.3.1.2. Cuantificación de Polifenoles Totales

La Figura 8, muestra la variación del contenido de polifenoles totales, observándose que a los 7 minutos de exposición ultrasónica a 40 kHz, se produjo un incremento importante de éste componente, mientras que otros casos como se muestra, decreció significativamente por debajo del tratamiento testigo (A-X).

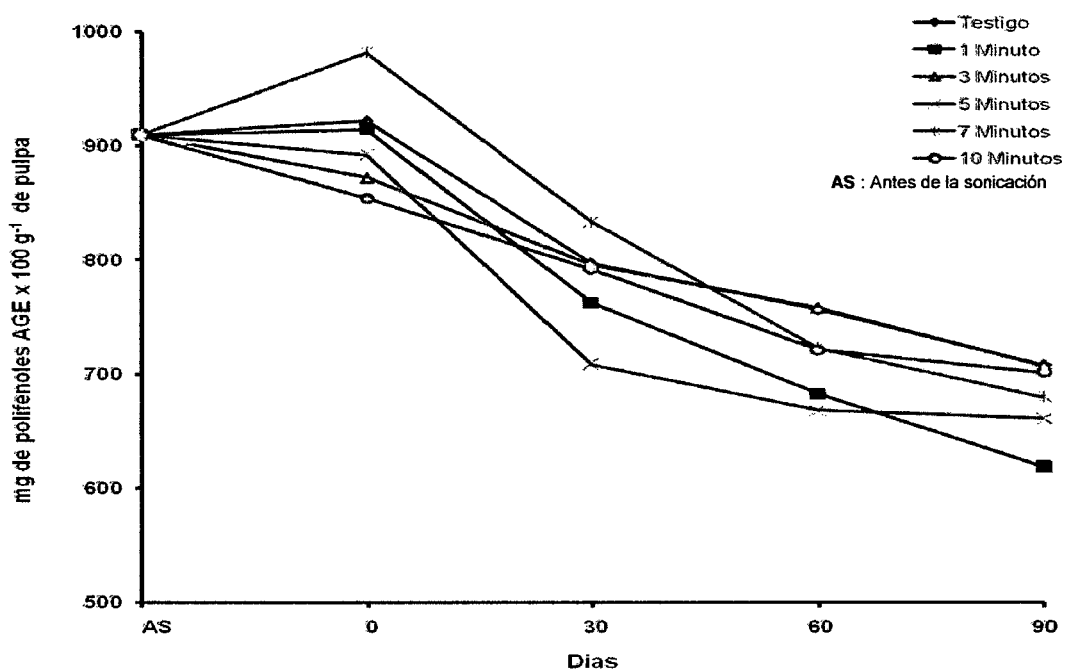


Figura 8. Variación del contenido de polifenoles totales en pulpa de camu camu, almacenada por 03 meses a -20°C .

La sonicación afectó considerablemente el contenido de polifenoles totales, incrementándolo desde 909,5 a 981,16 mg AGE \times 100 g $^{-1}$ de pulpa fresca, a los 7 minutos tal como se observa en la figura 8. Estudios mencionan que la sonicación, es aplicada para incrementar la eficiencia de las extracciones de polifenoles, causando lisis e incrementando el proceso de difusión de las paredes celulares, haciendo disponible los componentes,

incrementando la solubilidad y la transferencia de masa (AZUOLA y VARGAS, 2007). Sin embargo también puede causar degradación de componentes cuando se aplican por tiempos prolongados o cuando éstos son sobreexpuestos por periodos largos de tiempo pueden causar incluso la formación de radicales libres ocasionando daños al ADN (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

El estudio demostró que la cantidad de polifenoles, con respecto al día 0 de la evaluación, disminuyó cuando se almacenó por 90 días, en 17,9%, 18,9%, 23,2%, 25,9%, 30,7% y 30,4%, para: 10, 3, 0, 5, 7 y 1 minuto de sonicación respectivamente comparándose con los resultados iniciales, existiendo diferencia significativa entre los tratamientos.

En estudios realizados por MARQUEZ y GALVÃO (2009), sobre la pulpa de acerola en congelación a $\pm 18^{\circ}\text{C}$, demuestran que el contenido de antocianinas disminuye significativamente cuando se almacena en congelación llegando a pérdidas de 15 % a 30 %. MAEDA *et al.* (2007), encontró que las antocianinas se degradan en almacenamiento, con ello una notable disminución de su contenido en polifenoles totales.

De acuerdo con BOBBIO y BOBBIO (1992), las antocianinas interactúan con el ácido ascórbico, los metales, los azúcares, oxígeno, luz, temperatura y las enzimas, con la producción de polímeros que reducen su estabilidad. JURD (1972), menciona que hay una reacción de condensación entre el ácido ascórbico y antocianinas, en este sentido, a mayor concentración de esta vitamina C en el sistema, mayor será la velocidad de degradación de las antocianinas por ende en su contenido de polifenoles totales.

4.3.2. Determinación de la capacidad antioxidante

4.3.2.1. Radical 2,2 Diphenyl-Picrilhydrazyl (DPPH)

El tratamiento ultrasónico de la pulpa de camu camu a 7 y 10 minutos produjo un incremento de la actividad antioxidante disminuyendo su CI_{50} a 8,24 y 9,00 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ respectivamente, como se puede observar en la Figura 9, a los 0 días de almacenamiento (A-XI). El ultrasonido de alta intensidad ocasiona cavitación sobre los tejidos que a su vez debido a las grandes diferencias de presión las células presentes en la pulpa colapsan liberando y haciendo disponible los componentes bioactivos, generando el incremento de la actividad antioxidante (GALLEGO, 2007; DA-WEN y LI, 2003 y AZUOLA y VARGAS, 2007).

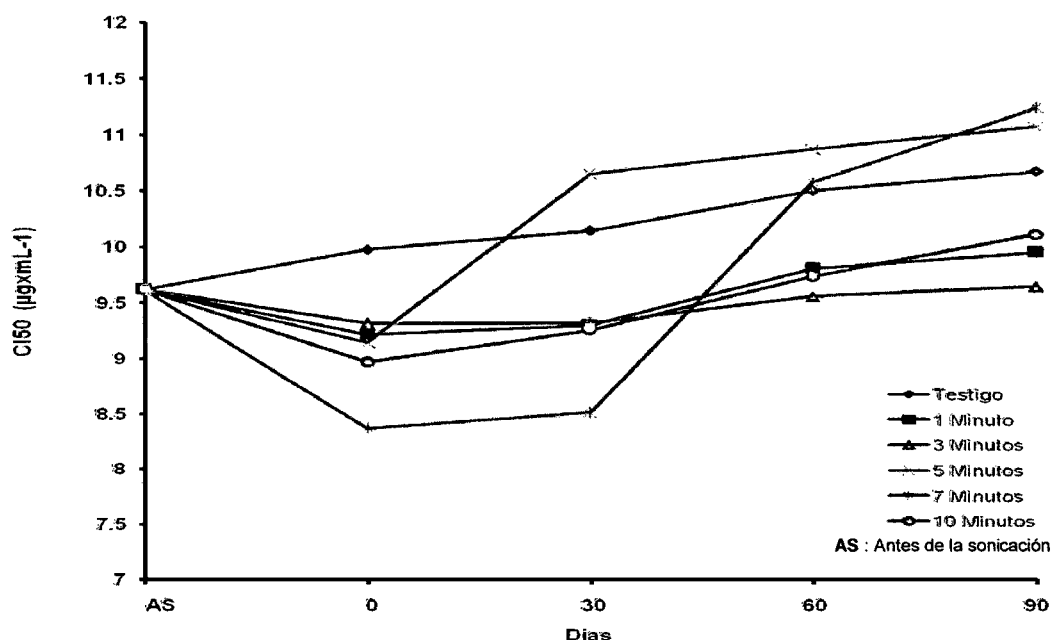


Figura 9. Variación del CI_{50} de la actividad antioxidante determinado mediante radical DPPH*

A los 90 días de almacenamiento la capacidad antioxidante disminuyó, incrementándose el coeficiente de inhibición a 3, 6, 7, 12, 21 y 34 %

para los tratamientos 3, 0, 1, 10, 5 y 7 minutos de sonicación respectivamente, teniendo en cuenta las evaluaciones iniciales. Esto implica que la capacidad antioxidante disminuyó debido a la degradación de los principales componentes bioactivos como el caso del ácido ascórbico, polifenoles totales, carotenos entre otros (MEJÍA *et al.*, 2006; BRAVO, 2007; MAEDA *et al.*, 2007 y BOLIVAR *et al.*, 2009).

4.3.2.2. Cati3n 2,2 Azinobis (3-Benzotiazolino-6-acido sulf3nico) (ABTS)

La actividad antioxidante mediante el cati3n ABTS, demostr3 el mismo efecto que el radical DPPH, encontr3ndose diferencia estadística significativa (A-XII), siendo el efecto m3s efectivo a los 7 y 10 minutos disminuyendo su CI_{50} a 2,1 y 2,07 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ respectivamente (Figura 10). Ésta capacidad est3 ligada al total de componentes capaces de capturar radicales libres lipofílicos e hidrofílicos (KUSKOSKI *et al.*, 2005), éste método es generalmente usado para medir la actividad antioxidante de muestras vegetales que contienen flavonoides y fenoles (PELLEGRINI *et al.*, 1999; VELLOSA *et al.*, 2007 y OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Como se observa en la figura 10, el tratamiento ultras3nico afect3 la actividad antioxidante a los 7 y 10 minutos disminuyendo el CI_{50} , a 2,1 y 2,07 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. Hecho explicado por la sonicaci3n que lisa la pared celular y hace disponible los componentes capaces de proporcionar la actividad antioxidante (BARBOZA-CÁNOVAS *et al.*, 2007).

Durante el almacenamiento los componentes que brindan la capacidad antioxidante disminuyen, como se muestra en la Figura 10, donde se observa el incremento del coeficiente de inhibición. A los 90 días de almacenamiento los contenidos de sustancias bioactivas se uniformizaron, no existiendo diferencias entre los tratamientos, determinándose como el mejor tratamiento aquel que presentó mayor capacidad antioxidante, la sonicación en este tratamiento se realizó por un tiempo de 10 minutos. Este tratamiento produjo una disminución de su actividad antioxidante del 28%, con respecto a la evaluación inicial, durante el almacenamiento.

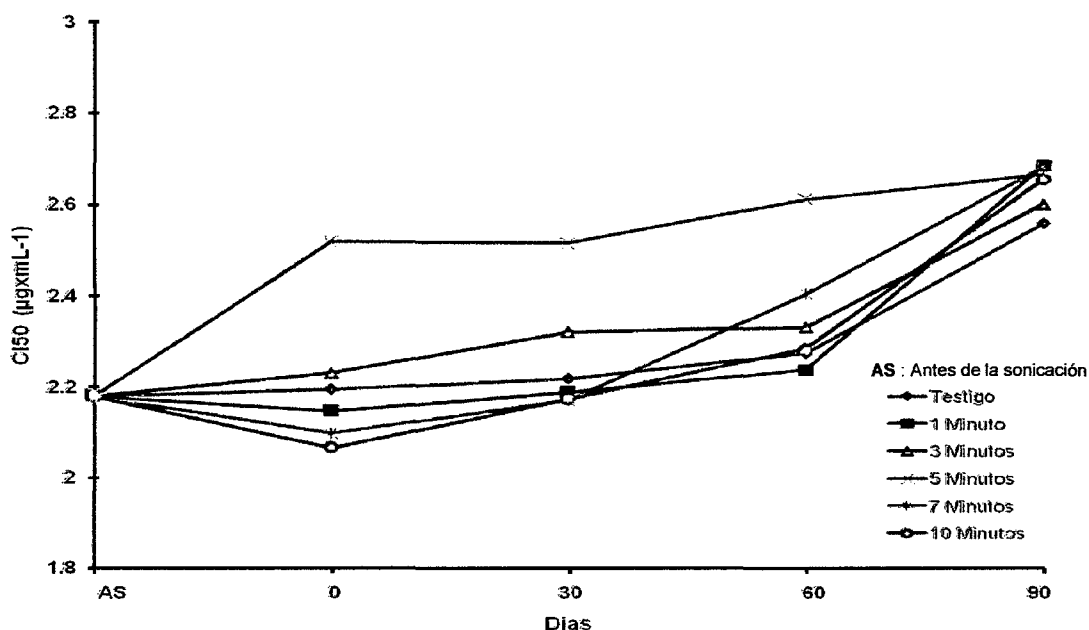


Figura 10. Variación del CI₅₀ de la actividad antioxidante determinado mediante el Cation ABTS⁺

El almacenamiento produce una reducción del principal componente que brinda la capacidad antioxidante, el ácido ascórbico que es susceptible a la degradación por presencia de oxígeno y a la ácido ascórbico oxidasa (ARELLANO *et al.*, 2005).

4.3.3. Cuantificación de mohos y levaduras

En el Cuadro 10, se observa el contenido de mohos y levaduras en la pulpa madura de camu camu, después del tratamiento ultrasónico a 40 kHz donde se encontró diferencia estadística significativa al inicio y durante el almacenamiento (A-XIII).

Cuadro 10. Efecto del tiempo de exposición al ultrasónico (40 kHz), sobre el contenido de mohos y levaduras en la pulpa de camu camu

Sonicación (Min)	Días * (UFC x g ⁻¹ de pulpa fresca)			
	0	30	60	90
Testigo	24 ± 18 ^a	4 ± 4 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b
1	10 ± 3 ^{ab}	8 ± 9 ^b	1 ± 1 ^b	0 ± 0 ^b
3	11 ± 4 ^{ab}	2 ± 1 ^b	3 ± 3 ^b	1 ± 1 ^b
5	15 ± 4 ^{ab}	2 ± 2 ^b	2 ± 2 ^b	1 ± 1 ^b
7	6 ± 2 ^b	3 ± 5 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b
10	5 ± 5 ^b	1 ± 1 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b

*Datos expresados como media ± SD, n=3, p<0,05

La sonicación disminuyó el contenido de mohos y levaduras, encontrándose que a mayor tiempo de exposición el contenido de mohos y levaduras disminuye significativamente, como se muestra en el Cuadro 10, dicha disminución es causada por la cavitación en las células que afectan componentes estructurales y funcionales hasta el punto de la lisis y muerte celular (ORDOÑEZ *et al*, 1992; HERRERO y ROMERO, 2006 y ZBIGNIEW *et al*, 2007). Las grandes presiones generadas por la cavitación ejercen sobre los microorganismos reducción de su contenido, a pesar de que éstas se generan

por periodos cortos de tiempo es un factor muy importante a tener en cuenta cuando se somete a ultrasonido un alimento (BELLATERRA, 2004).

Después del tratamiento con ultrasonido se observa que su contenido de mohos y levaduras decae significativamente mientras se sónica por tiempos más prolongados a 7 y 10 minutos. Esta caída del conteo de mohos y levaduras en la pulpa de camu camu, puede atribuirse a la acción del frío ya que uno de los principales factores que afecta el crecimiento de microorganismos. Disminuyendo significativamente la actividad enzimática de muchos microorganismos y a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ocasiona la muerte lenta de microorganismos gram negativos, mientras aquellos que son capaces de producir esporas son más resistentes a bajas temperaturas (FRAZIER Y WHESTHOFF, 1993).

INDECOPI (2007), menciona que la pulpa de camu camu debe poseer menos de 10 UFCxg^{-1} , con ausencia total de coliformes. La pulpa de camu camu a inicio de la investigación no cumple las características requeridas por dicha institución, sin embargo durante la mayor parte de la evaluación y al final de ésta cumple con los requisitos microbiológicos establecidos por las Normas Técnicas Peruanas, INDECOPI (2007).

V. CONCLUSIONES

- La pulpa de camu camu madura presentó el mayor contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales, capacidad antioxidante, mohos y levaduras; con $2151,11 \text{ mg} \times 100 \text{ g}^{-1}$; $791,14 \text{ mg} \times 100 \text{ g}^{-1}$; CI50 de DPPH: 7,43 y ABTS $2,95 \text{ } \mu\text{gxmL}^{-1}$; $1,3 \times 10^3 \text{ UFCxg}^{-1}$ de pulpa fresca, respectivamente.

- La sonicación incrementó significativamente el contenido de ácido ascórbico ($2388,67 \text{ mg}$ de ácido ascórbico $\times 100^{-1}$ de pulpa fresca), a intensidad de 40 kHz por 1 minuto de exposición. El contenido de polifenoles totales se incrementó significativamente a $981,16 \text{ mg} \times 100^{-1}$ de pulpa fresca a la intensidad de 40 kHz por 7 minutos. La actividad antioxidante, más baja para la pulpa sonicada, expresada en CI50 fue de $8,24 \text{ } \mu\text{gxmL}^{-1}$, para el DPPH y $2,1 \text{ } \mu\text{gxmL}^{-1}$, para el ABTS a intensidad de 40 kHz, a los 7 minutos y 10 minutos, respectivamente; mientras que la carga microbiana disminuyó de 24 a 6 $\text{UFC} \times \text{g}^{-1}$.

- Durante el almacenamiento se observó disminución del contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales, capacidad antioxidante y carga microbiana; existiendo diferencia estadística entre los tratamientos, al final del almacenamiento.

VI. RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo estudios del perfil de componentes bioactivos más amplios, extendiéndolo a componentes minoritarios que poseen participación activa en el proceso de remoción radical de agentes tóxicos de oxígeno.
- Realizar estudios, detallados de las diversas sustancias bioactivas y su efecto a la exposición ultrasónica, en pulpa y de manera aislada como componentes puros en solución.
- Realizar estudios acerca del efecto del consumo de pulpa de camu camu, en la capacidad antioxidante de plasma sanguíneo de animales y seres humanos.
- Ampliar el espectro de materias primas y estudiar su efecto sobre la aplicación de ultrasonido, sobre componentes bioactivos, como también para enzimas, proteínas entre otros.
- Evaluar el efecto del ultrasonido, sobre diversos tipos de microorganismos, presentes en las materias primas, como también de manera aislada, en soluciones manipuladas de crecimiento.
- Realizar estudios más profundos sobre los cambios físicos, químicos, organolépticos que ocasiona el ultrasonido sobre las materias primas.

ULTRASONIC TREATMENT OF CAMU CAMU PULP (*Myrciaria dubia* Mc
Vaugh) AND STUDY OF ITS COMPONENTS BIOACTIVE

ABSTRACT

This research was conducted with the aim of studying the effect of ultrasound on the bioactive components of the camu camu, in storage. Certain bioactive components were: ascorbic acid by high pressure liquid chromatography (HPLC), described by GOKMEN *et al.* (2000), determination of total polyphenols was performed by the method reported by PRICE AND BUTLER (1975). The antioxidant activity was determined using the methods: DPPH radical and ABTS cation described by BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) and RE *et al.* (1999), respectively. The results were evaluated by the DCA and the Tukey test ($n = 3$, $p < 0.05$). The ripe pulp showed the highest content of ascorbic acid and polyphenols to: 2151.11 and 791.14 mg x 100 g⁻¹ fresh pulp, just as the antioxidant activity of mature pulp surpassed the other states of maturity, with IC₅₀: 7.43 and 2.95 pg x mL⁻¹, using the DPPH and ABTS methods respectively. Sonication significantly improved availability of ascorbic acid and polyphenols (2388.67 and 981.16 mg x 100g⁻¹ pulp) at 40 kHz intensity for 1 and 7 minutes of exposure. The antioxidant activity, lower sonicated for pulp, expressed as IC50 was 8.24 µgxmL⁻¹ for the DPPH and 2.1 µgxmL⁻¹ for the intensity of ABTS to 40 kHz, at 7 minutes and 10 minutes, respectively, while the microbial load decreased from 24 to 6 CFU xg⁻¹. During storage, significantly decreased the content of bioactive compounds and microbial content.

Keywords: *Myrciaria Dubia*, Ultrasound, Ascorbic Acid, Activity Antioxidant, Total Polyphenols, Camu Camu - Pulp, Peru.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AHMED, F. & RUSSELL, C. 1975. Synergism between ultrasonic waves and hydrogen peroxide in killing of microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*. 39: 31–40.
- ALVES, R. 1996. Características das frutas para exportação. En: *Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita*. Ministério da Agricultura. Publicações Técnicas Frupex. Brasília. 30 p.
- ALVES, R., ALMEIDA, H., FILGUEIRAS, C., HEBSTER, F., COSTA, N. y SILVA, A. 2002. Camu-Camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh): A Rich Natural Source of Vitamin C. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 46:11-13 p.
- ALLERSLEV, K. 2007. Phytochemical analysis of bioactive constituents from edible myrtaceae fruits. New York-United States. 141 p
- ALZAMORA, S.M., GUERRO, S.N. y LOPEZ-MALO, A. 2000. Ultrasound as a Food Preservation Method. IFT Annual Meeting. USA. 25 p.
- ANDRADE, R.; ARAGÃO, C.; GALEAZZI, M. y FERREIRA, M. 2005. Changes in the concentration of total vitamin c during maturation and ripening of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh) fruits cultivated in the upland of Brazilian central Amazon. *Acta Horticulturae*. 370: ABSTARCT
- AOAC. 1 995. Official methods of analysis of the association official analytical. Chemistry. Edition 17th. Vol II. Ed Washington.

- APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ESIN,S.; BEKTAŞOĞLU, B.; BERKER, K. y ÖZYURT D. 2007. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*. 12: 1496-1547 p.
- ARELLANO, L.; SAUCEDO, C. y ARÉVALO, L. 2005. Cambios bioquímicos y fisiológicos durante la maduración de frutos de zapote negro (*Diospyros digina* JACQ.). *Agrociencia*. México. 39(002): 173-181 p.
- ARÉVALO, R. y KIECKBUSH, T. 2005. Concentración de ácido ascórbico en frutos de Camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh), provenientes de diferentes regiones de Sao Paulo. UNICAMP. Campinas- Brasil. 7 p.
- _____ 2007. Tiempo de vida útil de la fruta Camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh), almacenado a diferentes condiciones. UNICAMP. Campinas- Brasil. 7 p.
- AVELLO, M. y SUWALSKI, M. 2007. Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. *Fac. de Cien. Quím. Universidad de Concepción*. 6 p.
- AYDIN, N. y KADIOGLU, A. 2001. Changes in the chemical composition, polyphenol oxidase, and peroxidase activities during development and ripening of medlar fruits (*Mespilus germanica* L). *Bulg. J. Plant Physiol.* 27(3-4); 85-92.
- AZUOLA, R. y VARGAS, P. 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido. *Rev. Tecnología en marcha*. Octubre – diciembre. Vol. 20-4. p 30 – 40.

- BADAMI, S.; PRAKASH, O.; DONGRE, S. y SURESH, B. 2005. *In vivo* antioxidant properties of *Solanum pseudocapsicum* leaf extracts. Indian J. Pharmacol. 37(4):251-252 p.
- BADUI, S. 1990. Química de los alimentos. Alhambra. México. 430 p.
- BARATA-SOARES, A.; GOMEZ, M.; DE MESQUITA, C. y LAJOLO, M. 2004. Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. Braz. J. Plant Physiol. 16(3): 143-154 p.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.; GÓNGORA, M. y SWANSON, B. 2000. Processing Fruits and Vegetables by Pulsed Electric Field Technology. En: Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamentals and Applications. Eds. SM Alzamora, A López-Malo y MS Tapia. Gaithersburg, Maryland, An Aspen Publication.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.; DAVIDSON, P.; DREHER, M.; HARTEL, R.; JUNEJA, L.; KAREL, M.; LABBE, R.; LUND, D.; MIN, D.; NOLLET, L.; SALMINEN, S.; THORNGATE, J.; WALSTRA, P.; WHITAKER, J. y YADA, R. 2007. Handbook of Food Preservation. 2th Edition. Edit. M. Shafiur Rahman. US. 1089 p.
- BELLATERRA, L. 2004. Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el gazpacho y el zumo de uva. Memoria Presentada para Optar el Grado de Doctora en Ciencias de Tecnología de Alimentos. Planta de Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona. 161 p.
- BENEDITO, J., BON, J., SANJUAN, N. y FRAU, M. 1995. Utilization of Ultrasound in the Food Industry. I. Fundamental Concepts. Aliment. Equip. Tecnol.; 14: 79-83.

- BLÁZQUEZ, I.; PRODANOV, M.; SOBREVIELA, E. y ALONSO, G. 2005. Capacidad antioxidante en hollejos de uva: correlación con el contenido en polifenoles y antocianos. Univ. Castilla de la Mancha. Albacete – España. ABSTARCT
- BOLIVAR, N.; SAUCEDO, C.; SOLIS, S. y SAURI, E. 2009. Maduración de frutos de saramuyo (*Annona squamosa* L) desarrollados en Yucatán Mexico. AGROCIENCIA. 43(2): 133-141 p.
- BRAND-WILLIAMS, W.; PRENZJELER, P. y SCOLLARY, G. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm. Wiss. Technol. 25-30pp.
- BOBBIO, G. y BOBBIO, P. 1992. Química do processamento de alimentos. 2. ed. São Paulo: Editora Varela.
- BRAVO, L. 2007. Caracterização de Vitamina C em frutos de Camu-Camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) em diferentes estágios de maturação do Banco Ativo de Germoplasma de Embrapa. Monografia apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a Obtenção da Especialização em Nutrição Humana. Universidade de Brasília. 121 p.
- CAMACHO, A.; GILES, M.; ORTEGÓN, A.; PALAO, M.; SERRANO, B. y VELÁZQUEZ, O. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- CARBONELL F. 2001. Estrés oxidativo y riesgo cardiovascular. Boletín Secf. 4: 120 p.
- CAVIA, M.; LÓPEZ, A.; HERNANDO, B.; LÓPEZ, A.; GARCÍA-GIRÓN, C.; COMA, M. y MUÑIZ, P. 2007. Estado redox celular y cáncer: influencia

- sobre el tratamiento con citostáticos. *Electron. J. Biomed.* 2007(2): 51-55 p.
- CHENDKE, P. y FOGLER, H. 1975. Macrosonics in industry. Part 4: Chemical processing. *Ultrasonics*: 13(1) 31-37 p.
- CHITARRA, M. 1999. *Processamento mínimo de frutas y hortaliza*. *Tecnología e Treinamento Agropecuário*. 2(9): 7 p.
- CICCOLINI, L., TAILLANDIER, P., WILHEM, A. M., DELMAS, H., & STREHAIANO, P. (1997). Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: effect of temperature and of ultrasonic power. *Chemical Engineering Journal*, 65, 145–149.
- CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N.; DIAS, A.; TAVARES, R.; SOUSA, M.; AGASSE, A.; DELROT, S. y GERÓS, H. 2007. Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Food*. 1(1), 1-22 p.
- CONKLIN, P. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment*. 24: 383–394 p.
- DA-WEN, S. y LI, B. 2003. Microstructural change of potato tissues frozen by ultrasound-assisted immersion freezing. *J. Food. Sci.* 57: 337-345 p.
- DROST, T. 1996. Radicales libres en biología y medicina: una breve revisión. *Rev. Cub. Med. Milit.* 2: 44-57 p.
- ELEJALDE, G. 2001. Oxidación entre la Vida y la Enfermedad. *Anales de Medicina Interna*. Madrid – España. P: 1 – 4.
- ELESBAO A., ; CUNHA, F.; HEBSTER M.; COSTA A. y SILVA A. 2002. Camu-Camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh): A Rich Natural Source of Vitamin C.

- FERREYRA, R. 1959. Camu camu, nueva fuente nacional de vitamina C. En: Bol. Exp. Agropecuaria 7(4): 28 p.
- FOO, L.; LU, Y.; MCNABB, W.; WAGHORN, G. y ULYATT, M. 1997. Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry*. 45:1689
- FRANCESCHI, R.; THARLYM, N. 2002. L-Ascorbic Acid Is Accumulated in Source Leaf Phloem and Transported to Sink Tissues in Plants. *Plant Physiology*. 130: 649–656 p.
- FRAZIER, W. y WHESTHOFF, D. 1993. Microbiología de los alimentos. 4ta Edición. Editorial Acribia S.A.
- FRIDOVICH, I. 1975. Superoxide dismutases. *Sci*. 44:147-159 p.
- GALLEGO J. 1998. Some applications of air-borne power ultrasound to food processing. In *Ultrasound in Food Processing*, Povey, M. J. W., & Mason, T. J., (Eds.), Blackie Academic and Professional: London, pp. 127–143.
- _____. 2007. Acústica en las ciencias de la vida. *Rev. Acust. España*. 39(2): 5-15 p.
- GARCIA, M.; BURGOS, J.; SANZ, B. y ORDONEZ, J. (1989). Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. 67: 619–628.
- GARCÍA, R y RIOS, A. 2001. Conservación de la pulpa de camu camu y arazá en la elaboración de paletas congeladas de plátano. *Revista Amazónica de Investigación: Alimentaria*, 1(1): 15 – 21 p.

- GONZALES, M.; MUÑIZ, P. y VALL, V. 2001. Actividad antioxidante de la cerveza, estudios in-vivo e in-vitro. Centro de información Cerveza y Salud. 57p.
- GOMES, P.; FIGUEIRÊDO, R. y QUEIROZ, A. 2002. Caracterização e isotermas de adsorção de umidade da polpa de acerola em pó. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, 4(2).
- GÖKMEN, V.; KAHRAMAN, N.; DEMIR, N. y ACAR, J. 2000. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. Journal of Chromatography A, 881: 309–316 p.
- GUTIÉRREZ, A.; LEDESMA, L.; GARCÍA, I. y GRAJALES, O. 2007. Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. Rev Cubana Salud Pública. 33(1): 1-7 p.
- GUIJA, T.; TRONCOSO, L. y GUIJA, E. 2005. Propiedades prooxidantes del Camu camu (*Myrciaria dubia*). An Fac Med. Lima-Perú. 66(4): 261-268 p.
- HAN, X.; SHEN, T. y LOU, H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. Int. J. Mol. Sci. 8: 950-988 p.
- HANCOCK, R.; McRAE, D., HAUPT, S. y VIOLA, R. 2003. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. BMC Plant Biology 3(7): 1-13 p.
- HARBORNE, J. 1993. Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, USA. 232 p.
- HERNÁNDEZ, M. 2001. Conservación del fruto del arazá (*Eugenia stipitata*) durante la poscosecha mediante la aplicación de diferentes técnicas.

Tesis de doctorado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

HERNANDEZ, M.; GARCÍA, L.; ROJO, D. y OLIVARES, D. 2003. Almendro de la india: potencial biológico valioso. Rev. Cub. De Invest. Biomed. 22(1): 41-47 p.

HERNÁNDEZ, M. y PRIETO, M. 1999. Plantas que contienen polifenoles. antioxidantes dentro del estilo de vida. Rev Cubana Invest. Biomed. 18(1):12-4 p.

HERRERO, A. y ROMERO, M. 2006. Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no Térmicas. Rev. Med. Univ. Navarra. 50(4): 71-74 p.

IMAN S. 2000. Cultivo de Camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.) en la región de Loreto". INIA – SINITTA, Lima – Perú.

INDECOPI: NTP 011.031.2007. PRODUCTOS NATURALES. Pulpa de Camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh). Definiciones y Requisitos. 1ª Edición. 10 p.

INGA, H.; PINEDA, M.; DELGADO, C.; LINARES, C. y MEJIA, K. 2001. Fenología reproductiva de *Myrciaria dubia* HBK Mc Vaugh Camu camu. Fol. Amazon. 12(1-2): 99-106 p.

JARAMILLO, L. MARÍN, S. y PINEDA, C. 2005. Ultrasonido. Escuela de Ingeniería de Antioquia-Instituto de Ciencias de la Salud. 16 p.

JHONSON, I. 1995. Food Technology of the Antioxdiant Nutrients. Critical Reviews in Foods Science and Nutrition. 149-159 p.

- JURD, L. 1972. Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. In: The chemistry of plant pigments. New York: Academic Press.
- JUSTI, K.; VISENTAINER, J. ; DE SOUZA, N. y MATSUSHITA, M. 2000. Nutritional composition and vitamin C stability in stored Camu-Camu (*Myrciaria dubia*) pulp. Arch. Latin. de Nutr.: Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. 50(4): 405-408 p.
- KRUAWAN, K. y KANGSADALAMPAI, K. 2006. Antioxidant activity, phenolic compound contents and antimutagenic activity of some water extract of herbs. Thai J. Pharm. Sci. 30 (2006) 28-35 p.
- KUSKOSKI, E.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A.; MANCINI, J. y FETT, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas. 25(4): 726-732 p.
- LEE, S. y KADER, A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharv. Biol. and Tech. 20(2000): 207–220 p.
- LIN, C. 1996. Novel antiplatelet constituents from Formosan Moraceous plants. J. Nat. Prod. 59(9):834-8 p.
- LISIEWSKA, Z. y KMIECIK, W. 2000. Effect of storage period and temperature on the chemical composition and organoleptic quality of frozen tomato cubes. J. Food Chem. 70, 167-173.
- LÓPEZ, A. 2004. Requerimiento nutricional de Camu camu *Myrciaria dubia* H.B.K Informe Técnico 2004. IIAP Ucayali. 10 p.

- MAEDA, R.; PANTOJA, L.; YUYAMA, L. y CHAAR, J. 2006. Determinação da formulação e caracterização do néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(2): 313-316 p.
-
- _____. 2007. Estabilidade de ácido ascórbico e antocianinas em néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(1): 70-74 p.
- MANAS, P.; PAGAN, R.; RASO, J.; SALA, J.F. y CONDON, S.J. 2000. Inactivation of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella senftenberg* by Ultrasonic Waves under Pressure. J. Food Protec. 63: 451-456.
- MARQUEZ, M. y GALVÃO, V. 2009. Efeito do congelamento sobre a estabilidade da polpa de acerola adicionada de extrato comercial de própolis. Alim. Nutri. 20(1): 87 - 94 p.
- MARX, F.; BURGER-RODRIGUES, R.; GORDON, A y PAPAGIANNPOULOS, M. 2008. Bioactive Substances in Tropical Fruits – An Evaluation with TOSC Assay and “Activity Guided” RP-HPLC-Fractionation. University of Bonn-Germany. 1-4 p.
- MASON T.J., ZHAO Y., 1994. Enhanced extraction of tea solids using ultrasound. Ultrasonics 32(5): 375-377 p.
- MASON T.; PANIWNYK L. y LORIMER J. 1996. The uses of ultrasound in food technology. Ultrason. Sonochem. 3: 253-260 p.

- MEJÍA, L.; NARVÁEZ, C. y RESTREPO, L. 2006. Cambios físicos, químicos y sensoriales durante el almacenamiento congelado de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). *Agronomía Colombiana* 24(1): 87-95 p.
- MOLYNEAUX, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219 p.
- MONCADA, S. y HIGGS, A. 1993. The l-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*; 329: 2002-2011 p.
- MOSQUERA, O., NIÑO, J., CORREA, Y y BUITRAGO, D. 2005. Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Sci. et Techn.* 11(27): 231-234 p.
- MUÑOZ, A.; RAMOS-ESCUADERO, D.; ALVARADO-ORTIZ, C. y CASTAÑEDA, B. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 73(3): 141-149 p.
- OLIVEIRA, M.; BASTOS, M.; FEITOSA, T.; BRANCO, M.; SILVA, M. 1999. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajã e caju. *Ciencia e tecnologia de Alimentos, Campinas.* 19(3): 13-22 p.
- OLIVEIRA, O.; VELLOSA, J.; FERNANDES, A.; BUFFA-FILHO W.; HAKIMESILVA, R.; FURLAN, M. y BRUNETTI, I. L. 2007. Antioxidant activity of *Agaricus blazei*. *Fitoterapia.* 78: 263-264 p.

- ORDOÑEZ, J.; BURGOS, J.; RASO, J.; LOPEZ, P.; CONDON, S. y SALA, F. 1992. Procedimiento para la destrucción de microorganismos y enzimas mediante la aplicación combinada de calor y ultrasonidos bajo presión: proceso MTS (Mano-Termo-Sonicación). Of. Española, de Patentes y Marcas. ES 2046944(9200686): 1 - 10 p.
- PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M. y EVANS, C. R. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid - rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'- azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol.* 299: 379-389 p.
- PÉREZ, Y. 2007. Eventos fisiológicos asociados a la madurez y calidad de los frutos cítricos en Cuba y su relación con los productos transformados de la industria. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Cuba. Nota Informativa. On line: [http:// www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1067/cuf0114s.pdf](http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1067/cuf0114s.pdf). 1-21 p.
- PETERS, CH. y VÁSQUEZ, A. 1986. Estudios Ecológicos de Camu camu *Myrciaria dubia*. I. Producción de Frutos en Poblaciones Naturales. En: *Acta Amazónica* 16 -17 (Número único). Brasil. 161-174 p.
- PINEDA, A.; SALUCCI, M.; LÁZARO, R.; MAIANI, G. y FERRO-LUZI, A. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 13(2): 104-11 p.
- PINEDA, A. 2005. Determinación de las propiedades antioxidantes de variedades de injerto (*Pouteria viridis*) que se cultivan en tres regiones

- de guatemala. Trabajo Profesional Para Optar el Título de QUIMICA BIOLOGA. UNIVERSIDAD DE GUATEMALA. 79 p.
- PRICE, L y BUTLER, G. 1975. Rapid visual estimation spectrophometric determinación of tannin content of sorghum grain. J. Agric. Food. Chem. 1268-1273pp.
- PROAPA-GTZ. 2000. Estudio de Mercado para *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh (Camu camu). Lima-Perú. 46 p.
- RAMOS, E.; CASTAÑEDA, B. y IBÁÑEZ, A. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. Rev. Acad. Peru. Salud. 15(1): 42-47 p.
- RAMOS, F y MUÑOZ, A. 2005. Compuestos fenólicos en los alimentos. VII CONACYTA. Lambayeque-Perú. 1-7 p
- RAMOS, G.; FRUTOS, P.; GIRÁLDES, F. y MANTECÓN, A. 1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. Arch. J. Zootec. 47 (180):597
- RAMOS, Z.; GARCÍA, L. y PINEDO, M. 2002. Evaluación de factores de procesamiento y conservación de pulpa de *Myrciaria Dubia* H.B.K. (Camu-Camu) que reducen el contenido de vitamina C (Ácido ascórbico). Rev. Amazon. de Invest. Alim. 2(2): 89 – 99 p.
- RAPAPORT, S. 1993. Introducción a la Hematología. 2 ed. Fontan F Trad. México: Salvat. 14(625): 216-218 p.
- RASKIN, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:439

- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. y RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1231-1237 p.
- REBUGLIO, J.; DE FRIAS, V.; MAISSAR, N.; DE FREITAS, A.; MACEDO, F.; FURLAM, M.; LOURENÇO, I. y DE FARIAS, O. 2007. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 43(3): 447-453 p.
- REDMOND, G.; GORMLEY, T. y BUTLER, F. 2003. The effect of short and long-term freeze-chilling on the quality of mashed potato. *Innov. Food Sci. Emerging Technol.* 4, 85-97.
- RIVA, S. y GONZALES, R. 1996. Tecnología del Camu camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh) en la Amazonía Peruana. Ministerio de Agricultura. Perú. 40 p.
- ROBBINS, S. 1995. Patología funcional y estructural. 5 ed. México: Mc Graw Hill Interamericana. XIV. 1533 p.
- ROBLES, M.; GORINSTEIN, S.; MARTÍN, O.; ASTIAZARÁN, H.; GONZALES, G. y CRUZ, G. 2007. Frutos tropicales mínimamente procesados: Potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia.* 2007 – 32 (4): 227-232 p.
- ROCA, N. A. 1965. Estudio químico-bromatológico de la *Myrciaria paraensis* Berg. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis de Química. 51 p.

- RODRÍGUEZ, P. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cub. Med. Milit.* 30(1):15-20 p.
- RODRIGUES, R.; MENEZES, H. y CABRAL L. 2002. Clarificação e concentração de suco de camu camu (*Myrciaria dubia*) por processos de membranes, XVIII Bras. Congr. Food Sci. Tech., Porto Alegre (Brazil).
- RODRÍGUEZ, R. y MARX, F. 2006. Camu camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh]: a promising fruit from the Amazon Basin. *Ernährung-Nutrition*, 30(9): 376 - 381p.
- SALE, S.; TUNSTALL, R. y GARCEA, G. 2005. Polyphenolics phytochemicals as colorectal cancer chemopreventive agents: An intelligent alternative to NSAIDs? *Int. J. Canc. Research.* 1(1-2): 60-70 p.
- SEYMOUR, I.; BURFOOT, D.; SMITH, R.; COX, L. Y LOCKWOOD, A. (2002). Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 547–557.
- SEYMOUR, B.; TAYLOR, J. y TUCKER, G. 1993. *Biochemistry of fruit rippening*. Chapman Hall. Cambridge. Great Britain. 454 p.
- SILVA, C. y ANDRADE, J. 1996. Postharvest modifications in camu-camu fruits (*Myrciaria dubia* McVaugh) in response to the stage of maturation and modified atmosphere. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 40: 90-92.
- SLEZAK, I.; KIBBIC, M.; KARSPINKI, B. y MISZALSKI, Z. 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Act. Bioq. Polonic.* 54(1): 39-50.

- SMIRNOFF, N. 2002. Antioxidants and Reactive Oxygen species in plants. Special Issue. Jour. Exp. Bot. 53(372):1331-1341.
- STEPHENS, C. 1996 Cambridge heart antioxidant study (CHAOS). Lancet. 1996; 347: 781 p.
- TEDONE, L.; HANCOCK, R.; ALBERINO, S.; HAUPT, S. y VIOLA, R. 2004. Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. BMC Plant Biology 2004, 4(16): 1-8 p.
- TUSON, I.; USTUN, N. y TEKGULER, B. 2008. Physical and chemical changes during ripening of blackberry fruits. Sci. Agric. 65(1): 87-90 p.
- TZE, T. y WHITEMAN, M. 2007. Antioxidant activities of some fruits tropicals. National University of Singapur. 1-6 p.
- URBINA, A. 2008. Nuevo papel de los radicales libres del oxígeno en el ejercicio: ¿otra paradoja?. Col. Méd. 39(3):266-275 p.
- VALDERRAMA, J.; FISCHER, G. y SERRANO, M. 2005. Fisiología poscosecha en frutos de dos cultivares de feijoa (*Acca sellowiana* O. Berg Burret) sometidos a un tratamiento cuarentenario de frío. Agronomía Colombiana. 23(2): 276-282 p.
- VÁSQUEZ, M. A. 2000. El Camu camu; cultivo, manejo e investigaciones. Editora Gráfica e Imprenta Universal SRL. Iquitos-Perú.
- VEGA, R. 2002. Valor agregado en Camu camu: Informe final de investigación. IIAP. Pucallpa, Perú.
- _____. 2005. Liofilización de pulpa de *Myrciaria dubia* HBK Mc Vaugh, Camu camu. Fol. Amazón. 14 (2): 51- 56 p.

- VELLOSA, J.; KHALIL, N.; FONSECA, L.; BRUNETTI, I. y OLIVEIRA, O. 2007. Does cotinine act over reactive oxygen species and peroxidases?. *Eclet. Quím.*, v.32, p.65-70.
- VENEREO, J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar. *Rev Cubana Med Milit.* 31(2):126-33
- VILLACHICA, H. 1996. El cultivo del Camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) en la amazonia peruana. 53 p.
- VILLANUEVA, J. 2001. Antiocianina, Acido Ascórbico, Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante en la Cáscara de Camu camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh H.B.K.). Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentaria. Tingo María- Perú. Pág. 47.
- WEISS, D. 1998. Un estudio del mercado mundial para Camu camu. Winrock International. Proyecto de Desarrollo Alternativo USAID/CONTRADROGAS. Convenio USAID - INADE. 18 p.
- WONG, B.; HWAN, J.; WAN, S.; HWANG, Y. y HUN, K. 2006. Selective ABTS Radical-Scavenging Activity of Prenylated Flavonoids from *Cudarnia tricuspidata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(2): 427-432 p.
- ZAPATA, S. y DUFOUR, J. 1993. Camu camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh) Chemical Composition of Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 61: 349-351 p.
- ZANATTA, C.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F.; WINTERHALTER, P. y MERCADANT, Z. 2005. Determination of Anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (24), 9531 -9535 p.

ZENTELLA, M. y SALDAÑA, Y. 1996. Papel fisiológico de los radicales libres.

Bol. Educ. Bioq. (México). 15(4): 152-161 p.

ZBIGNIEW J.; STADNIK, J. y STASIAK, D. 2007. Applications of ultrasound in

food technology. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 6(3): 89-99 p.

IX. ANEXOS

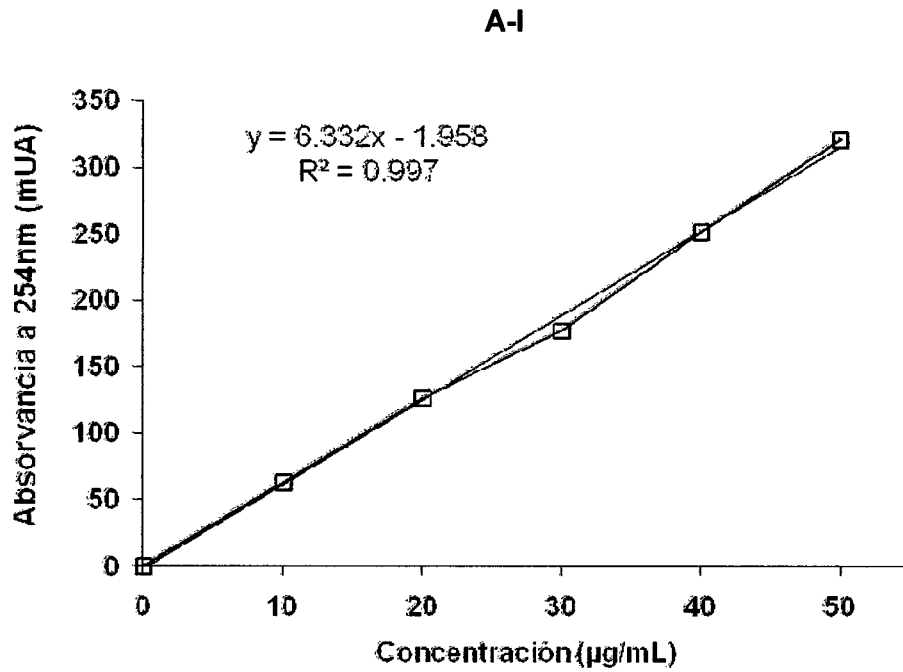


Figura 11. Curva patrón para la cuantificación de ácido ascórbico.

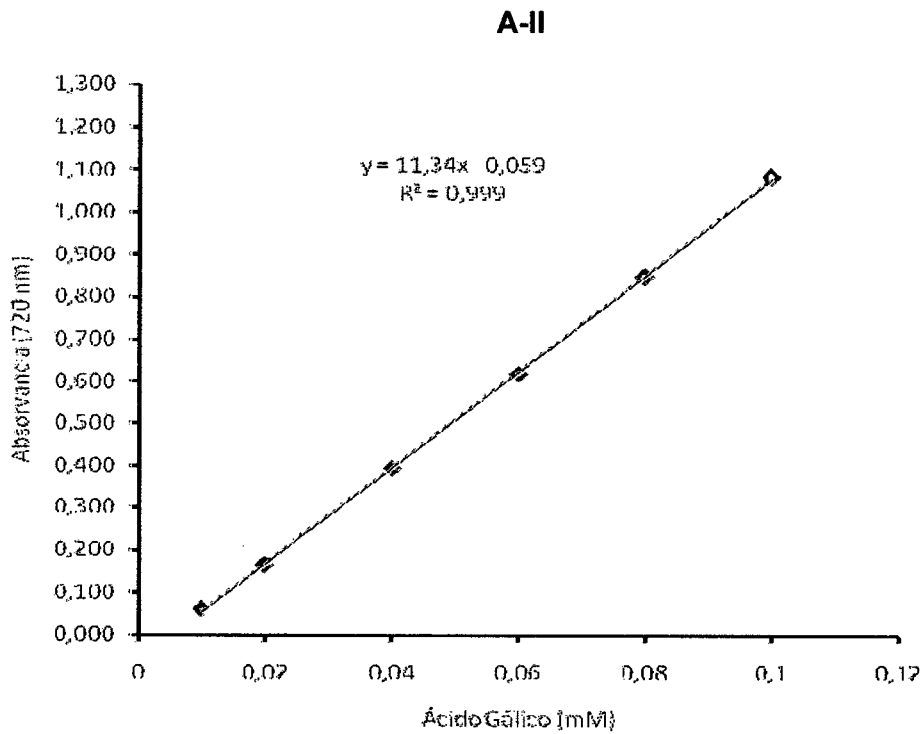


Figura 12 . Curva patrón para la cuantificación de polifenoles totales.

A-III

Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles, acidez titulable e Índice de Madurez en la pulpa de camu camu en tres estados (n=3, p<0,05)

Sólidos Solubles

FV	SC	GL	F	Sig.
Tratamientos	6,009	2	901,333	0,000
Error	0,020	6		
Total	6,029	8		

CV = 1,3

Acidez Total

FV	SC	GL	F	Sig.
Tratamientos	0,077	2	52,606	0,000
Error	0,004	6		
Total	0,082	8		

CV = 0,6

Índice de Madurez

FV	SC	GL	F	Sig.
Tratamientos	1,641	2	690,252	0,000
Error	0,007	6		
Total	1,648	8		

CV = 0,8

A-IV

Análisis de varianza para el contenido de ácido ascórbico en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez (n=3, p<0,05)

FV	SC	GL	F	Sig.
Tratamientos	224246,282	2	10,079	0,012
Error	66744,050	6		
Total	290990,332	8		

CV: 5,45

A-V

Análisis de varianza para el contenido de polifenoles totales en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez (n=3, p<0,05)

FV	SC	GL	F	Sig.
Tratamientos	65032,693	2	2124,229	0,000
Error	91,844	6		
Total	65124,538	8		

CV: 0,58

A-VI

Análisis de varianza del Cl_{50} por el método del catión DPPH^{*} en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez (n=3, p<0,05)

FV	SC	GL	F	Sig.
Tratamientos	38,994	2	691,109	0,000
Error	0,169	6		
Total	39,163	8		

CV: 1,6

A-VII

Análisis de varianza del Cl_{50} por el método del catión ABTS** en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez (n=3, p<0,05)

FV	SC	GL	F	Sig.
Tratamientos	1,577	2	347,824	0,000
Error	0,014	6		
Total	1,590	8		

CV: 1,3

A-VIII

Análisis de varianza para el contenido de mohos y levaduras en la pulpa de camu camu en tres estados de madurez (n=3, p<0,05)

FV	SC	GL	F	Sig.
Tratamientos	1611723,39	2	1950,05	0,00
Error	2479,5	6		
Total	1614202,89	8		

CV: 1,19

A-IX

Análisis de varianza para el contenido de ácido ascórbico (n=3, p<0,05)

FUENTE	SC	GL	Fc	Sig.
A:Dias	$3,19 \times 10^{+11}$	3	154,83	0,0000
B:TratSonicacion	391583	5	11,40	0,0000
AB	411868	15	4,00	0,0001
Error	329676	48		
TOTAL	$4,32 \times 10^{+11}$	71		

CV: 4,59

A-X

Análisis de varianza para el contenido de polifenoles totales (n=3, p<0,05)

FUENTE	SC	GL	Fc	Sig.
A:Dias	533487	3	333,71	0,0000
B:TratSonicacion	48848,1	5	18,33	0,0000
AB	46872,6	15	5,86	0,0000
Error	25578,8	48		
TOTAL	654786	71		

CV: 2,99

A-XI

Análisis de varianza para la actividad antioxidante mediante el radical DPPH*
(n=3, p<0,05)

FUENTE	SC	GL	Fc	Sig.
A:Dias	184,727	3	218,58	0,0000
B:TratSonicacion	111,802	5	79,37	0,0000
AB	119,672	15	28,32	0,0000
Error	13,522	48		
TOTAL	429,724	71		

CV: 5,4

A-XII

Análisis de varianza para la actividad antioxidante mediante el catión ABTS**
(n=3, p<0,05)

FUENTE	SC	GL	Fc	Sig.
A:Dias	198,635	3	154,43	0,0000
B:TratSonicacion	0,676207	5	31,54	0,0000
AB	0,313343	15	4,87	0,0000
Error	0,2058	48		
TOTAL	31,817	71		

CV: 2,76

A-XIII

Análisis de varianza para el contenido de mohos y levaduras (n=3, p<0,05)

Fuente	SC	GL	F	Sig.
A: Días	1562,000	3	23,357	0,000
B: Ultrasonido	223,944	5	2,009	0,094
AB	599,833	15	1,794	0,064
Error	1070,000	48		
Total	3455,778	71		

CV: 17.26