

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

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



**"EVALUACIÓN EN ALMACENAMIENTO DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE EN PULPA DE CAMU CAMU (*Myrciaria dubia*
McVaugh H.B.K.) DE TINGO MARÍA EN DOS ESTADOS DE
MADUREZ"**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

HEBER PELEG CORNELIO SANTIAGO

PROMOCIÓN 2007 - II

Tingo María - Perú

Año 2011



F60

C77

Cornelio Santiago, Heber P.

Evaluación en el almacenamiento de la actividad antioxidante en pulpa de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) de Tingo María en dos estados de madurez. Tingo María, 2011

69 h.; 14 cuadros; 30 fgrs.; 76 ref.; 30 cm.

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

MYRCIARIA DUBIA MCVAUGH H.B.K / ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

/ ALMACENAMIENTO / ÁCIDO ASCÓRBICO / PULPA-CAMU CAMU /

TINGO MARÍA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUÁNUCO / PERÚ.



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 11 de Febrero del 2011, a horas 11:45 a.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. **CORNELIO SANTIAGO, Heber Peleg**, titulada:

“EVALUACIÓN EN ALMACENAMIENTO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PULPA DE CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K.) DE TINGO MARIA EN DOS ESTADOS DE MADUREZ”

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

Tingo María, 16 de Marzo de 2011

.....
Blga. M.Sc. **Margarita Alcedo Romero**
Presidente

.....
Ing. **Eduardo Cáceres Almenara**
Miembro

.....
Ing. **Laureano Zavaleta de la Cruz**
Miembro

.....
Ing. **Jhony W. Vargas Solorzano**
Asesor

DEDICATORIA

A DIOS:

Por brindarme la vida, sabiduría, paciencia, e iluminar mí camino para poder alcanzar mis metas.

A MI MADRE:

GLORIA SANTIAGO por su comprensión, paciencia y sacrificio para lograr mi mas deseado anhelo.

A MIS HERMANOS:

YUDITH, CRISTIAN y KATY por su cariño, comprensión y grandes anhelos a lograr mis metas.

A MIS ABUELITOS:

VICTORIA, GREGORIO y MARCIAL por sus consejos y apoyo incondicional para realizarme como profesional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva mi alma mater.

Al Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía Peruana (CIPNA).

Al Ph.D. Manuel Sandoval Chacón, Co-Asesor, por permitirme trabajar en el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) de la UNAS, Tingo María, por las facilidades y por sus orientación académica en la conducción de este trabajo de investigación.

Al Ing. Jhonny Vargas Solórzano, Asesor, por sus orientaciones y alcances durante el trabajo de investigación.

A la Ing. Vanessa Melchor Sandoval, por sus enseñanzas y apoyo técnico durante mi permanencia en el CIPNA – UNAS.

A todos los docentes de la facultad de ingeniería en industrias alimentarias que contribuyeron en mi formación durante el pregrado.

ÍNDICE

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Cultivo de camu camu.....	3
2.1.1. Aspectos generales.....	3
2.1.2. Aspectos botánicos.....	3
2.1.3. Composición química.....	4
2.2. Antioxidantes y radicales libres.....	7
2.2.1. Estrés oxidativo.....	7
2.2.2. Antioxidantes.....	8
2.2.3. Radicales libres.....	9
2.3. Vitamina C.....	14
2.4. Polifenoles.....	18
2.5. Cromatografía líquida de alta performance.....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Lugar de ejecución.....	24
3.2. Materiales y equipos.....	24
3.2.1. Materia prima.....	24
3.2.2. Materiales de laboratorio.....	24
3.2.3. Materiales, equipos y maquinarias de proceso.....	25
3.2.4. Equipos para análisis.....	25
3.2.5. Reactivos.....	26
3.3. Métodos de análisis.....	26

3.3.1. Análisis fisicoquímico.....	26
3.3.2. Determinación del ácido ascórbico.....	26
3.3.3. Cuantificación de polifenoles totales.....	26
3.3.4. Cuantificación de catequina.....	27
3.3.5. Evaluación de la actividad antioxidante.....	27
3.4. Metodología.....	27
3.4.1. Índice de madurez.....	27
3.4.2. Preparación de la muestra.....	27
3.4.3. Determinación de humedad.....	29
3.4.4. Determinación de minerales.....	29
3.4.5. Determinación del ácido ascórbico.....	29
3.4.6. Cuantificación de polifenoles totales.....	30
3.4.7. Cuantificación de catequina.....	31
3.4.8. Evaluación de la actividad antioxidante.....	31
3.5. Análisis estadístico.....	35
3.5.1. Variables.....	35
3.5.1. Estadística descriptiva.....	35
3.5.1. Análisis de regresión lineal.....	35
3.5.1. Análisis de varianza.....	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	37
4.1. Análisis fisicoquímico.....	37
4.2. Evaluación del rendimiento en el fruto pintón y maduro de camu camu.....	38
4.2.1. Balance de materia en la obtención de pulpa.....	38

4.3. Determinación de minerales.....	42
4.4. Determinación de ácido ascórbico.....	43
4.5. Cuantificación de polifenoles totales.....	45
4.6. Cuantificación de catequina.....	47
4.7. Evaluación de la actividad antioxidante.....	49
4.7.1. Radical 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).....	49
4.3.2. Radical peroxílo.....	55
V. CONCLUSIONES.....	58
VI. RECOMENDACIONES.....	59
VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	60
VIII. ANEXO.....	70

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1	Análisis químico de pulpa fresca de camu camu..... 5
Cuadro 2	Análisis de micronutrientes en pulpa fresca de camu camu... 6
Cuadro 3	Resultados de los análisis fisicoquímicos realizados al fruto de camu camu en dos estado de madurez..... 37
Cuadro 4	Balance de materia en la obtención de pulpa pintón..... 39
Cuadro 5	Balance de materia en la obtención de pulpa maduro..... 40
Cuadro 6	Resumen del rendimiento (%) en pulpa, cáscara, semilla del fruto pintón y maduro de camu camu..... 41
Cuadro 7	Resultados de los análisis de micronutrientes realizados a la pulpa fresca de camu camu en dos estado de madurez..... 43
Cuadro 8	Evaluación del contenido de ácido ascórbico en la pulpa de camu camu durante el almacenamiento a -10°C..... 43
Cuadro 9	Evaluación del contenido de polifenoles totales en la pulpa de camu camu durante el almacenamiento a -10°C..... 46
Cuadro 10	Evaluación del contenido de catequina en la pulpa de camu camu durante el almacenamiento a -10°C..... 48
Cuadro 11	Valores de IC ₅₀ de la pulpa pintón y maduro de camu camu frente al radical DPPH, evaluados durante 90 días de almacenamiento a -10°C..... 50
Cuadro 12	Valores de IC ₅₀ de la pulpa pintón y maduro de camu camu frente al radical peroxílo, evaluados durante 90 días de

	almacenamiento a -10°C.....	56
Cuadro 13	Comparación de pH, °Brix y % Acidez en muestras de camu camu de acuerdo al estado fisiológico.....	71
Cuadro 14	Comparación de índice de madurez en muestras de camu camu de acuerdo al estado fisiológico.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Cultivo de camu camu (<i>Myrciaria dubia</i> McVaugh H.B.K) en Tingo María (660 m.s.n.m.), Región Huánuco..... 6
Figura 2	Senda para biosíntesis del ácido ascórbico dentro de las plantas..... 17
Figura 3	Ruta de la pentosa fosfato para la síntesis de componentes fenólicos en plantas..... 21
Figura 4	Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Performancia (HPLC) en gradiente de baja presión..... 23
Figura 5	Diagrama de flujo para la obtención del rendimiento en pulpa, cáscara y semilla del fruto de camu camu en dos estado de madurez..... 28
Figura 6	Secuencia para la determinación de actividad antioxidante, ácido ascórbico, polifenoles totales y catequina..... 34
Figura 7	Índice de madurez de la pulpa de camu camu, en dos estados de madurez..... 38
Figura 8	Rendimiento en pulpa, cáscara y semilla del fruto pintón y maduro de camu camu..... 42
Figura 9	Evaluación del contenido de ácido ascórbico en pulpa pintón y maduro de camu camu, durante el almacenamiento a -10 °C..... 44
Figura 10	Evaluación del contenido de polifenoles totales en pulpa pintón y maduro de camu camu durante el almacenamiento

	a -10° C.....	46
Figura 11	Evaluación del contenido de catequina en pulpa pintón y maduro de camu camu, durante el almacenamiento a -10° C.....	48
Figura 12	Potencial electrostático 3D (A) ácido ascórbico (B) radical DPPH, optimizado mediante mecánica molecular. Color verde (menor capacidad oxidante), color fucsia (con menor capacidad reductora).....	53
Figura 13	Potencial electrostático 2D (A) ácido ascórbico (B) radical DPPH, optimizado mediante mecánica molecular. Color verde (menor capacidad oxidante), color fucsia (con menor capacidad reductora).....	54
Figura 14	Mecanismo de reacción del ácido ascórbico frente al radical DPPH, evaluado mediante simulación con hyperchem.....	55
Figura 15	Curva patrón para la cuantificación de ácido ascórbico por HPLC.....	72
Figura 16	Curva patrón para la cuantificación de (+)-catequina por HPLC.....	72
Figura 17	Curva patrón para la cuantificación de polifenoles totales ...	73
Figura 18	Porcentaje de inhibición de la reacción del radical DPPH frente a las diferentes concentraciones de la pulpa maduro de camu camu al 0 día.....	73
Figura 19	Porcentaje de inhibición de la reacción del radical DPPH frente a las diferentes concentraciones de la pulpa maduro	

	de camu camu a los 90 días.....	74
Figura 20	Porcentaje de inhibición de la reacción del radical DPPH frente a las diferentes concentraciones de la pulpa pintón de camu camu al 0 día.....	74
Figura 21	Porcentaje de inhibición de la reacción del radical DPPH frente a las diferentes concentraciones de la pulpa pintón de camu camu a los 90 días.....	75
Figura 22	Porcentaje de inhibición de la reacción del radical peroxilo frente a las diferentes concentraciones de la pulpa maduro de camu camu al 0 día.....	75
Figura 23	Porcentaje de inhibición de la reacción del radical peroxilo frente a las diferentes concentraciones de la pulpa maduro de camu camu a los 90 días	76
Figura 24	Porcentaje de inhibición de la reacción del radical peroxilo frente a las diferentes concentraciones de la pulpa pintón de camu camu al 0 día.....	76
Figura 25	Porcentaje de inhibición de la reacción del radical peroxilo frente a las diferentes concentraciones de la pulpa pintón de camu camu a los 90 días.....	77
Figura 26	Curva patrón para la cuantificación de Cu por espectrofotometría de absorción atómica.....	78
Figura 27	Curva patrón para la cuantificación de Fe por espectrofotometría de absorción atómica.....	78
Figura 28	Curva patrón para la cuantificación de Zn por	

	espectrofotometría de absorción atómica.....	79
Figura 29	Curva patrón para la cuantificación de Mn por espectrofotometría de absorción atómica.....	79
Figura 30	Cromatograma del ácido ascórbico detectado mediante el Software de interfase CLASS – VP del HPLC en pulpa maduro (A) y pintón (B) de Camu camu.....	80

RESUMEN

El presente estudio se realizó en la Universidad Nacional Agraria de la Selva. El camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K.) es una planta que crece a lo largo de los ríos de selva baja de la Amazonía peruana (< 250 m.s.n.m.) y se caracteriza por producir un fruto con alto contenido de ácido ascórbico. El propósito del estudio fue evaluar la actividad antioxidante y determinar el contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales y catequina durante el almacenamiento a -10 °C en la pulpa pintón y maduro de camu camu. Los frutos de camu camu, se obtuvieron del Distrito de Rupa Rupa (Tingo María), Provincia de Leoncio Prado, Región Huánuco, los mismos que fueron pulpeados, envasados al vacío (100 mB/2min) y almacenados a -10 °C. La actividad antioxidante fue evaluada por la inhibición de los radicales DPPH y peroxílo, el ácido ascórbico y catequina fueron cuantificado por HPLC en fase reversa usando una columna C18, mientras la cuantificación de polifenoles totales se realizó por espectrofotometría. La inhibición del radical DPPH por la pulpa pintón y maduro, expresado como IC₅₀ fue 16,1 ± 0,19 y 13,5 ± 0,19 µg/mL, respectivamente al 0 día y fue 16,5 ± 0,38 y 14,5 ± 0,18 µg/mL, respectivamente a los 90 días. La inhibición del radical peroxílo por la pulpa pintón y maduro, expresado como IC₅₀ fue 5,3 ± 0,08 y 4,1 ± 0,05 µg/mL, respectivamente al 0 día y fue 5,6 ± 0,05 y 4,1 ± 0,13 µg/mL, respectivamente a los 90 días. El contenido de ácido ascórbico en pulpa pintón fue 1864,64 ± 19,61; 1796,36 ± 18,8; 1764,02 ± 30,9; 1828,39 ± 28,9 mg/100 g pulpa al 0, 30, 60 y 90 días, respectivamente y en pulpa maduro fue 1931,32 ± 27,6; 1860,57 ± 34,3; 1865,37 ± 30,3; 1910,98 ± 34,8 mg/100 g pulpa al 0, 30, 60 y 90 días,

respectivamente. El contenido de polifenoles totales en pulpa pintón y maduro fue $107,7 \pm 0,38$ y $248,1 \pm 0,66$ mg (+)-catequina Eq./100g de pulpa, respectivamente al 0 día, y fue $107,1 \pm 0,25$ y $143,6 \pm 0,14$ mg (+)-catequina Eq./100g de pulpa, respectivamente a los 90 días. El contenido de catequina en pulpa pintón y maduro fue $10,68 \pm 0,39$ y $18,09 \pm 0,58$ (+)-catequina/ 100g de pulpa, respectivamente al 0 día, y fue $10,46 \pm 0,25$ y $12,38 \pm 0,48$ mg (+)-catequina/ 100g de pulpa, respectivamente a los 90 días. Durante los 90 días de almacenamiento a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ la variación de la actividad antioxidante en pulpa pintón y maduro de camu camu fue no significativo frente al radical DPPH y peroxílo ($p < 0,05$). La pulpa pintón y maduro de camu camu presentó una pérdida de ácido ascórbico no significativo ($p < 0,05$), después de los 90 días de almacenamiento a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durante los 90 días de almacenamiento a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la pulpa pintón de camu camu no se observó diferencia significativa en la pérdida de polifenoles totales, mientras que en la pulpa maduro la diferencia fue altamente significativo ($p < 0,05$), con una pérdida del 42,12% de polifenoles totales. La variación de la catequina durante los 90 días de almacenamiento a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ fue no significativo en la pulpa pintón y en la pulpa maduro la variación es significativo ($p < 0,05$), mostrándose una pérdida del 31,56% de catequina. De las muestras evaluadas, la pulpa maduro, presentó la mayor actividad antioxidante con valores de $\text{IC}_{50} = 13,5 \pm 0,18$ y $4,1 \pm 0,13$ $\mu\text{g/mL}$ frente al radical DPPH y peroxílo, respectivamente ($p < 0,05$), mayor contenido de ácido ascórbico $1931,32 \pm 27,6$ mg/100g pulpa ($p < 0,05$), polifenoles totales $248,1 \pm 0,66$ mg (+)-Catequina Eq./100 g pulpa ($p < 0,05$) y catequina $18,09 \pm 0,58$ mg (+)-Catequina/100g pulpa ($p < 0,05$).

ABSTRACT

This study was conducted at the University National Agrarian the Jungle. The camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K.) is a plant that grows along the low jungle rivers of the Peruvian Amazon (<250 m.s.n.m.) and is characterized by producing a fruit with high ascorbic acid content. The purpose of this study was to evaluate the antioxidant activity and determine content of ascorbic acid, total polyphenols and catechin during storage at -10 °C in unripe and ripe pulp of camu camu. The fruits of camu camu, were obtained from Distrito of Rupa Rupa (Tingo Maria), Provincia de Leoncio Prado, Huanuco Region, they were pulping, vacuum-packed (100 mB/2min) and stored at -10 °C. Antioxidant activity was evaluated by inhibition of the radical DPPH and peroxy, the ascorbic acid and catechin were quantified by reverse phase HPLC using a C18 column and the quantification of polyphenols was performed by spectrophotometry. DPPH radical inhibition for unripe and ripe pulp, expressed as IC₅₀ was 16,1 ± 0,19 y 13,5 ± 0,19 µg/mL, respectively at 0 day and was 16,5 ± 0,38 y 14,5 ± 0,18 µg/mL, respectively at 90 days. The peroxy inhibition for unripe and ripe pulp, expressed as IC₅₀ was 5,3 ± 0,08 y 4,1 ± 0,05 µg/mL, respectively at 0 day and was 5,6 ± 0,05 y 4,1 ± 0,13 µg/mL, respectively at 90 days. Ascorbic acid content in unripe pulp was 1864,64 ± 19,61; 1796,36 ± 18,8; 1764,02 ± 30,9; 1828,39 ± 28,9 mg/100g pulp at 0, 30, 60 and 90 days of storage, respectively, and ripe pulp was 1931,32 ± 27,6; 1860,57 ± 34,3; 1865,37 ± 30,3; 1910,98 ± 34,8 mg/100g pulp at 0, 30, 60 and 90 days of storage, respectively. The total polyphenol content in unripe and ripe pulp was 107,7 ± 0,38 and 248,1 ± 0,66 mg (+)-catechin Eq./100g pulp, respectively

at 0 day and was $107,1 \pm 0,25$ and $143,6 \pm 0,14$ mg (+)-catechin Eq./100g pulp, respectively at 90 days. Catechin content in unripe and ripe pulp was $10,68 \pm 0,39$ and $18,09 \pm 0,58$ (+)-catechin/100g pulp, respectively at 0 day and was $10,46 \pm 0,25$ and $12,38 \pm 0,48$ mg (+)-catechin/100g pulp, respectively at 90 days. During the 90 days of storage at -10°C the variation of antioxidant activity in pulp unripe and ripe of camu camu was not significant against radical DPPH and peroxy ($p < 0,05$). The unripe and ripe pulp of camu camu showed a loss of ascorbic acid not significant ($p < 0,05$), after 90 days storage at -10°C . During the 90 days of storage at -10°C in the unripe pulp of camu camu was not significant difference in loss of total polyphenols, whereas in ripe pulp the difference was highly significant with a loss of 42,12% of total polyphenols ($p < 0,05$). The variation of the catechin for 90 days of storage at -10°C was not significant in unripe pulp and in ripe pulp the variation is significant ($p < 0,05$), showing a loss of 31.56% of catechin. Of the samples studied, ripe pulp had the highest antioxidant activity with values of $\text{IC}_{50} = 13,5 \pm 0,18$ and $4,1 \pm 0,13$ $\mu\text{g/mL}$ against radical DPPH and peroxy, respectively ($p < 0,05$), higher content of ascorbic acid $1931,32 \pm 27,6$ mg/100g pulp ($p < 0,05$), totals polyphenols $248,1 \pm 0,66$ mg (+)-Catechin Eq./100g pulp ($p < 0,05$) and catechin $18,09 \pm 0,58$ mg (+)Catechin/100g pulp ($p < 0,05$).

I. INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes naturales son apreciados porque pueden ser usados en el diseño de alimentos benéficos para la salud, debido a su capacidad de neutralizar radicales libres, sustancias inestables que contienen uno o más electrones desapareados, quienes son responsables de muchas enfermedades degenerativas, cataratas, arterioesclerosis, muerte celular y cáncer, asimismo por su capacidad de eliminar y atrapar potencialmente a los electrófilos dañadores del ADN, metales tóxicos, hasta la inhibición de enzimas activadoras de precarcinógenos, hasta carcinógenos (THOMAS, 2000). El antioxidante al colisionar con el radical libre (RL) le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico (PERÓN *et al.*, 2001).

El interés de los polifenoles se ha enfocado por su gran potencial en beneficio de la salud humana, con particular referencia a los polifenoles de frutas y vegetales (DREOSTI, 2000).

El camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) es una planta que crece a lo largo de los ríos de selva baja de la Amazonía peruana (< 250 m.s.n.m.) y se caracteriza por producir un fruto con alto contenido de ácido ascórbico, debido a esta característica el camu camu presenta un gran interés para ser utilizado en la agroindustria y farmacia (ZAPATA y DUFOUR, 1993; VILLACHICA, 1996 y INGA *et al.*, 2001). En la actualidad no se tiene datos científicos que

sustenten la concentración de ácido ascórbico, polifenoles totales, catequina y actividad antioxidantes del camu camu sembrado en Tingo María. Por ello no se le considera como cultivo alternativo en las zonas del Alto Huallaga, tal como se está haciendo con el camu camu sembrado en las zonas aluviales de la amazonia peruana, a lo largo de los ríos Ucayali y Amazonas.

El trabajo promoverá el desarrollo sostenible e integral del cultivo del camu camu y la extensión de sembríos ya existentes, ya que este fruto se adapta a suelos ácidos, tierras de baja fertilidad y mal drenaje (VILLACHICA, 1996 y INGA *et al.*, 2001). Además, los aportes tecnológicos obtenidos serán de utilidad para el sector empresarial que exporta pulpa de camu camu congelado.

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron:

- Evaluar en almacenamiento la actividad antioxidante de pulpa de camu camu en dos estados de madurez empleando diferentes modelos *in Vitro*: radicales DPPH y peróxido.
- Determinar el contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales y catequina en pulpa de camu camu en dos estados de madurez, durante el almacenamiento.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Cultivo de camu camu

2.1.1. Aspectos generales

El camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) es una fruta nativa de la Amazonía Peruana (VILLACHICA, 1996 y INGA *et al.*, 2001); que se caracteriza por su alto contenido de ácido ascórbico (ZAPATA y DUFOUR, 1993).

El camu camu arbustivo es nativo de la zonas inundables, desarrollándose sin problemas en las orillas de los ríos, en aguas oscuras o claras, aguas caracterizadas por su acidez, donde permanece sumergido total o parcialmente por más de cinco meses bajo el agua (VILLACHICA, 1996 y INGA *et al.*, 2001); se desarrollan a lo largo de los ríos Ucayali y Amazonas, ubicándose la mayor cantidad de poblaciones naturales entre las localidades de Requena y Pebas en Loreto. Aún así, es posible propagarla exitosamente en condiciones no inundables, fuera de su habitat natural, también puede adaptarse a condiciones de suelos ácidos y de baja fertilidad, constituyéndose un potencial importante para recuperar tierras abandonadas (UDA, 2000).

2.1.2. Aspectos botánicos

2.1.2.1. Morfología

El camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) es un arbusto que alcanza de 3 a 4 m de altura, se ramifica desde la base formando

varios tallos secundarios que este a su vez se ramifican en forma de vaso abierto. El tallo y las ramas son glabros, cilíndricos, lisos de color marrón claro o rojizo y con corteza que se desprende en forma natural. También posee hojas relativamente largas, opuestas, elípticas y oblongas lanceoladas, de color verde brillante, aromáticas y con pequeñas glándulas de aceite (VILLACHICA, 1996 y CELIS *et al.*, 2007).

2.1.2.2. Taxonomía

Según (VILLACHICA, 1996), el camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K), presenta la siguiente información taxonómica.

División	: Fanerógamas
Sud-división	: Angiospermas
Clase	: Dicotiledones
Orden	: Mortales
Familia	: Myrtaceae
Genero	: Myrciaria
Especie	: Dubia H.B.K

2.1.3. Composición química

La principal característica de la pulpa de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K), es su alto contenido de ácido ascórbico con valores que va desde 845 a 2780 mg/100g de pulpa. La pulpa constituye entre 50 y 55% del peso del fruto. Análisis efectuadas con la cascara indican que esta tiene hasta 5% de ácido ascórbico, pero constituye una porción muy baja del peso del fruto y normalmente se descarta en el proceso de pulpeado (VILLACHICA, 1996).

ZAPATA y DUFOUR (1993), realizaron un estudio de la composición química de la pulpa fresca de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) en tres estados de madurez (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Análisis químico de pulpa fresca de camu camu

Parámetro	Verde	Pintón	Maduro
Ácido ascórbico (g/kg)	8,45	9,39	9,39
Ácido dehidroascórbico (g/kg)	0,19	0,25	0,31
Glucosa (g/kg)	2,24	3,61	8,16
Fructosa (g/kg)	3,7	5,07	9,51
Ácido cítrico (g/kg)	29,82	22,93	19,81
Ácido málico (g/kg)	2,8	4,88	5,98
Acidez (Ac. Cítrico)(g/kg)	3,55	3,07	3,08
Ph	2,44	2,53	2,56
Densidad relativa (20/20°C)	1,026	1,025	1,030
°Brix (%)	5,6	5,5	6,8
Sólidos totales	69,8	67,7	81
°Brix/acidez(relación)	1,6	1,8	2,2
Nitrógeno total	0,568	0,624	0,735
Aminoácidos (mg/kg)			
Serina	299	371	637
Valina	99	168	316
Leucina	90	132	289
Glutamato	88	100	119
4-aminobutanato	71	93	108
Prolina	43	53	82
Fenilalanina	17	22	43
Treonina	20	28	36
Alanina	17	28	34

Fuente: Zapata y Dufour (1993).

Cuadro 2. Análisis de micronutrientes en pulpa fresca de camu camu

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

Fuente: Zapata y Dufour (1993).



Figura 1. Cultivo de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) en Tingo María (660 m.s.n.m.), Región Huánuco.

2.2. Antioxidantes y radicales libres

2.2.1. Estrés oxidativo

Los compuestos químicos y las reacciones capaces de generar especies reactivas del oxígeno con potencial tóxico pueden reconocerse como prooxidantes. Por otra parte, a los compuestos y reacciones que eliminan estas especies, disponen de ellas, suprimen su formación o se oponen a sus acciones se les conoce como antioxidantes. En una célula normal existe un equilibrio apropiado entre prooxidantes y antioxidantes. No obstante, este balance puede desplazarse hacia los prooxidantes cuando la producción de estas especies aumenta de modo considerable. Tal circunstancia se presenta después de la introducción en el organismo de ciertos fármacos o venenos insecticidas y/o pesticidas. El desbalance puede presentarse, además, cuando la concentración de antioxidantes disminuye, ya sea debido a una malnutrición como la hipovitaminosis E, o a un fallo funcional de alguna de las enzimas involucradas en la respuesta antioxidante del organismo (NADEEM *et al.*, 2003; BENÍTEZ, 2006).

Especies reactivas del oxígeno (ERO) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas de radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos.

En mamíferos son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a estos agresores. Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la arterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

2.2.2. Antioxidantes

Antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones reduce, retrasa significativamente o previene la oxidación de un sustrato (SIES, 1997). Un antioxidante puede ser definido como una sustancia que en pequeñas cantidades pueden retardar o inhibir la acción de un prooxidante (oxidante) en una reacción de oxidación (SIES, 1997 y WEISBURGER, 1999).

Los antioxidantes son compuestos que prolongan la vida útil de los alimentos, protegiendo contra el deterioro causado por la oxidación. Los antioxidantes inhiben la propagación de radicales libres por eso son utilizados para prevenir el deterioro de los alimentos, evitando la rancidez de las grasas y los cambios de color. Los antioxidantes se clasifican en antioxidantes naturales y antioxidantes sintéticos (SIES, 1997).

El antioxidante al colisionar con el radical libre (RL) le cede un

electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). Los procesos de antioxidación incluyen 1) inhibición de radicales para prevenir su propagación, 2) hidrólisis enzimática de enlaces ésteres para remover ácidos grasos peroxidados de lípidos, 3) quelamiento de iones metálicos de transición, 4) Reducción de peróxidos por catálisis enzimática (THOMAS, 2000).

La importancia de los antioxidantes es crucial ya que brinda protección contra las enfermedades como la arteriosclerosis, degeneración ligada al envejecimiento y el cáncer (SERRA y TRÍBO, 1991).

2.2.2.1. Antioxidantes endógenos

Los antioxidantes endógenos o antioxidantes enzimáticos actúan a nivel intracelular. Existen tres sistemas principales de enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CTL) y glutatión peroxidasa (GPX) (GONZÁLES-TORRES *et al.*, 2000).

2.2.2.2. Antioxidantes exógenos

Los antioxidantes exógenos o no enzimáticos, transforman los radicales en menos agresivos. Entre ellos tenemos: flavonoides, alfa tocoferoles (vitamina E), beta-caroteno, ácido ascórbico y glutatión (KISPERT *et al.*, 2001).

2.2.3. Radicales libres

En el organismo humano el oxígeno es necesario para llevar a cabo reacciones metabólicas, las cuales a su vez producen reacciones de óxido-reducción. En la reducción del oxígeno por medio de la citocromo oxidasa se da la formación de agua, y como producto del oxígeno metabolizado se

producen radicales libres. Estas son sustancias químicas que poseen un electrón desapareado en su órbita siendo extremadamente reactivas e inestables. Al contacto con sustancias orgánicas e inorgánicas, los radicales libres afectan las propiedades químicas y funcionales de las sustancias a su alrededor, en especial moléculas que se encuentran en la membrana celular, los ácidos grasos insaturados, proteínas y ácidos nucleicos. Por ello han sido relacionados con diversos procesos patológicos y fisiológicos, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades degenerativas e inflamatorias, entre otras (GONZÁLES-TORRES *et al.*, 2000; GARCÍA *et al.*, 2001; GUIJA *et al.*, 2005).

Generalmente 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. Las condiciones externas que promueven la producción de radicales libres son: la contaminación, altas temperaturas, radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, rayos X, medicamentos, el humo del tabaco y el smog (GONZÁLES-TORRES *et al.*, 2000 y RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

La principal fuente la constituye la mitocondria, ya que durante el proceso de fosforilación oxidativa se genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar ATP, el aceptor final de electrones es el oxígeno, en esta transferencia de electrones se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación, cediendo uno o dos electrones al oxígeno produciendo intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres.

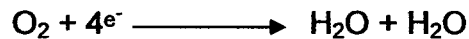
Otro lugar de formación de radicales libres lo constituyen algunas organelas, que poseen pequeñas vacuolas llamadas peroxisomas, que contienen sustancias oxidativas y generadoras de H_2O_2 , el cual es depurado por la enzima catalasa transformándola en agua y un radical libre (O^\cdot) (TISKOW, 1996 y RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

Los leucocitos polimorfonucleares constituyen una fuente importante de radicales libres; cuando se activan por el complemento, interleucinas u otros factores, los leucocitos producen mieloperoxidasa que cataliza la formación de haloideas oxidados con alto poder microbicida. Durante la fagocitosis se da la producción del anión superóxido (O_2^\cdot) por medio de una oxidasa que cataliza una reacción en la que emplea el NADPH para reducir el oxígeno molecular (RAPAPORT, 1993).

Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula (GONZÁLES-TORRES *et al.*, 2000). El desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno reactivo (EROS) y la defensa antioxidante, provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicas, los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

El oxígeno molecular desempeña un papel importante en el organismo; cerca del 2 al 5 por ciento del oxígeno molecular que ingresa al organismo se transforma en un radical libre. Esto se debe a que en las reacciones metabólicas el oxígeno actúa como receptor de electrones, ya que posee dos electrones desapareados con espín paralelo. Si el oxígeno acepta

cuatro electrones se produce agua, a esto se le llama reducción tetravalente (TISKOW, 1996).



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

- Radical hidroxilo (OH^\cdot).
- Anión superóxido (O_2^-).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- Óxido nítrico (NO^\cdot).

2.2.3.1. Radical hidroxilo

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

El radical hidroxilo se forma por la reducción trivalente del O_2 ; de acuerdo a la siguiente ecuación:



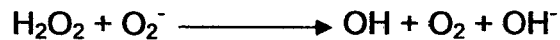
2.2.3.2. Anión superóxido

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

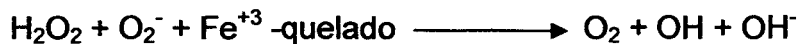


Este proceso fue descrito en 1931 por Haber y Willstater. En 1934, Haber y Weiss descubrieron la reducción secuencial trivalente del O_2 (en combinación con un catalizador en presencia de hierro) la cual da lugar a la producción de

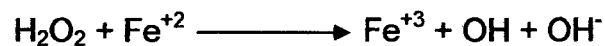
intermediarios oxigenados muy reactivos. En el año 1959 McCord y Fridovich aislaron una enzima, la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir del anión superóxido. Una acumulación de H_2O_2 conduce a un incremento en la producción de radicales OH^\cdot a través de la reacción de Haber-Weiss.



Esta reacción es muy lenta y no puede realizarse sin catálisis. Se supone que los iones férricos son los que desempeñan el papel de catalizador:



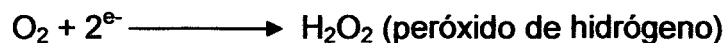
Esto también puede suceder a través de la reacción de Fenton:



El ion superóxido es producido por células fagocíticas y ayuda a inactivar virus y bacterias. Es mucho menos reactivo que el radical hidroxilo, pero un número importante de blancos biológicos son sensibles a él (FRIDOVICH, 1975 y WINTERBOURN, 1995).

2.2.3.3. Peróxido de hidrógeno

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 (TISKOW, 1996).



El H_2O_2 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^\cdot en presencia de metales como Fe (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

2.2.3.4. Oxido nítrico

Es de los pocos radicales libres que no son perjudiciales, más bien útiles *in vivo*. 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. Esta sustancia es un potente agente vasodilatador y puede actuar como neurotransmisor. El óxido nítrico tiene una gran capacidad de reaccionar con el anión superóxido (O_2^-), sobre todo si se encuentra en exceso en los tejidos. El exceso de NO puede ser tóxico, al dañar por ejemplo, proteínas con centro sulfuro - hierro u otros elementos constituyentes de la membrana celular (MONCADA y HIGGS, 1993 y RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

Los radicales libres pueden generarse también a partir de fuentes exógenas, como las radiaciones ionizantes, ultra violeta, la visible o térmica, algunos productos químicos carcinógenos (aumento de metales pesados, xenobióticos, componentes de tabaco, pesticidas), también diversos medicamentos y drogas antitumorales pueden inducir la liberación de radicales libres como el acetaminofén, andriamicina, neomicina, polimixina B, kanamicina, gentamicina y cloramfenicol, así como factores orgánicos y metabólicos (dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios, traumatismo y ejercicios extenuantes) (HALLIWELL *et al.*, 1995; RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

2.3. Vitamina C

También llamado ácido ascórbico, es una vitamina hidrosoluble, constituye uno de los agentes antioxidantes más poderosos que actúa en

compartimientos celulares acuosos (Figura 3). Su función como antioxidante se basa en su poder para suprimir el oxígeno simple reactivo, reacciona con el anión superóxido, estabiliza el radical hidroxilo y regenera la vitamina E reducida (SIES *et al.*, 1992).

Cuando se encuentra en solución la vitamina C es fácilmente oxidable, de igual manera si es expuesta a pH alcalino, calor, oxígeno y metales como hierro y cobre (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

La absorción de la vitamina C ocurre en el duodeno, las cantidades que se ingieren en la dieta tienen una vida corta dentro del organismo, además es excretada por la orina en pequeñas cantidades, por ello debe ingerirse diariamente las dosis para llenar los requerimientos diarios, siendo esta de 60 mg para un adulto. La fruta más rica en vitamina C es la guayaba, aunque también se encuentra en naranja, mandarina, pomelo y vegetales como el tomate, brócoli, pimientos y espinaca. La ingesta de una naranja mediana cubre casi el requerimiento diario de un adulto (PARKS y BOOYSE, 2002 y LING *et al.*, 2002).

El ácido ascórbico es un compuesto que tiene excelente acción reductora; cuando pierde un electrón, se convierte en el radical ascorbato, compuesto que tiene un electrón desapareado en un sistema-p altamente deslocalizado, por cuyo motivo es un radical libre muy poco reactivo, que lo convierte en un buen antioxidante. Pero, una de sus principales propiedades consiste en regenerar el α -tocoferol a partir de radicales tocoferoxilo (GUIJA *et al.*, 2005).

La vitamina C compuesto que el ser humano no lo puede sintetizar

y necesariamente debe ingerirlo en su dieta. Esta vitamina es un eficiente antioxidante; pero, también puede actuar como un agente prooxidante cuando se administra en altas dosis, especialmente cuando está en presencia de elevadas cantidades de metales de transición, generando radicales hidroxilos (SARDI, 2004).

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 (Figura 2) (WHEELER *et al.*, 1998). Debido a que presenta una configuración de lactona, en la que los grupos hidroxilos asociados al doble enlace funcionan como agentes con alto potencial reductor, lo que le permite, incluso, participar en la reducción directa del oxígeno, funcionando así como sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas. También incluye la inhibición de la formación de radicales superóxido, o de nitrosaminas durante la digestión; además, es el agente que reduce los radicales fenoxilo formados durante la actividad vitamínica E, restableciéndola. (BENÍTEZ, 2006).

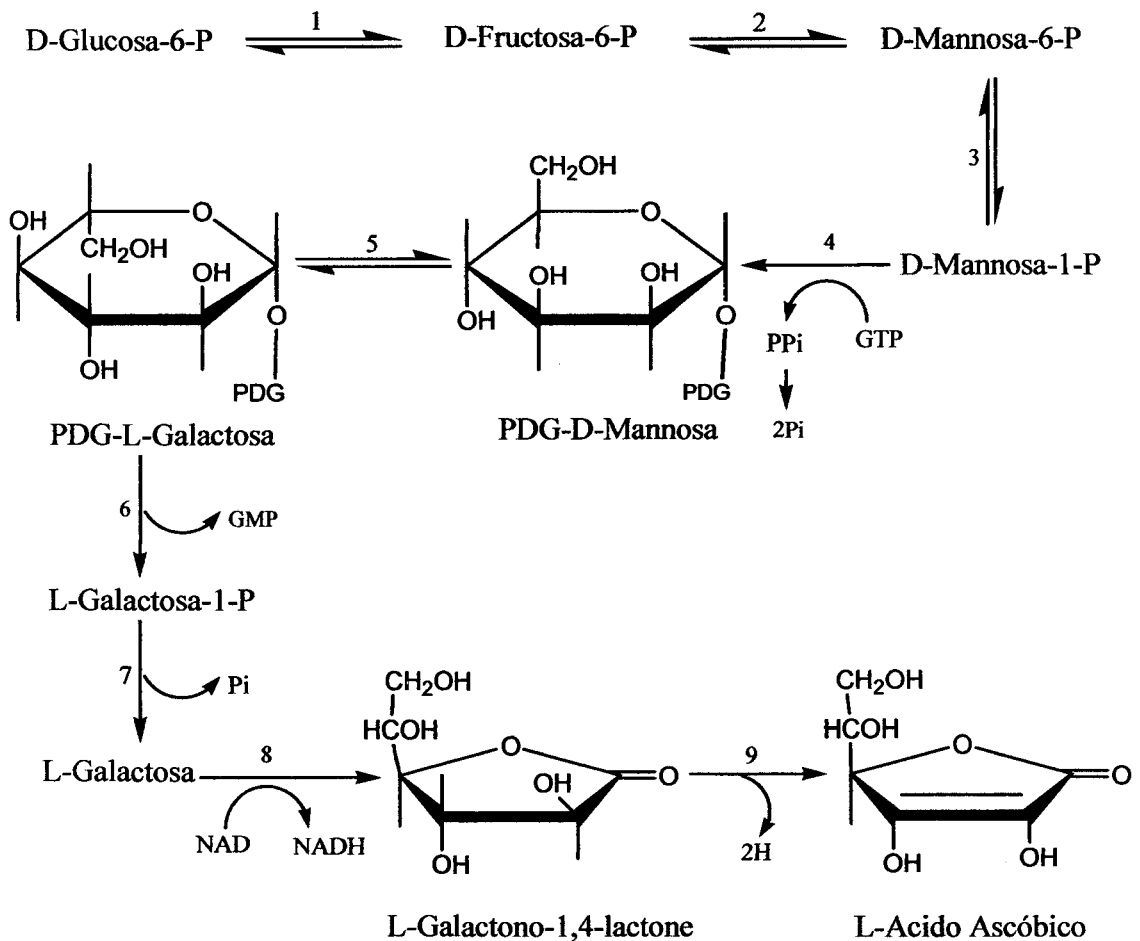


Figura 2. La senda para la biosíntesis del ácido ascórbico dentro de las plantas (WHEELER *et al.*, 1998).

El ácido ascórbico tiene un efecto mediado por la interacción directa con varias especies reactivas de oxígeno, neutralizando el oxígeno singlete, el ozono, captura radicales hidroxilo, también neutraliza otras especies. Reactivas como el ácido hipocloroso, óxido nítrico (ELEJALDE, 2001; GARCÍA *et al.*, 2001).

El ácido ascórbico es estable en estado seco (JHONSON, 1995), sin embargo en solución, esta sustancia llega a ser altamente reactiva, especialmente en presencia de oxígeno, y metales como el hierro y el cobre,

considerándosele como la defensa mas importante contra los radicales libres, eliminándolos de los compartimientos hidrofílicos de la célula, de la matriz extracelular y del sistema circulatorio, además, participa en la protección de las moléculas hidrofóbicas como las lipoproteínas del plasma sanguíneo y de los lípidos membranales (ELEJALDE, 2001).

Esta demostrado que presenta acción antioxidante por que reacciona directamente con los radicales peroxilos y regenera la vitamina E oxidada en su forma activa en las membranas celulares (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). Al ser una vitamina hidrosoluble se considera que es el antioxidante más importante del líquido extracelular, aunque participe también en la zona intracelular (SERRA y TRIBO, 1991).

2.4. Polifenoles

Son compuestos producidos por el metabolismo secundario de algunos vegetales. Su estructura base es un núcleo aromático que contiene un grupo hidroxilo libre o sustituido, se diferencian de otros compuestos que también poseen estructura fenólica (monoterpenos) en su origen biosintético. Se originan principalmente a través de dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos (VASCONCELLOS, 2001 y MARTÍNEZ-FLÓRES *et al.*, 2002).

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 (HERTOG *et al.*, 1993 y MARTÍNEZ-FLÓRES *et al.*, 2002).

Entre las funciones de los compuestos fenólicos 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 (HERTOG *et al.*, 1993 y VASCONCELLOS, 2001).

Las frutas cítricas son ricas fuentes de flavonoides, incluyendo los compuestos diosmina y hesperidina se encuentran en toronjas y naranjas. El ácido elágico, presente en uvas, fresas, zarzamoras, arándanos, nueces y otros alimentos es un ejemplo de un tipo de compuesto fenólico que actúa como un fitoquímico (HERTOG *et al.*, 1993; VASCONCELLOS, 2001 y MARTÍNEZ-FLÓRES *et al.*, 2002).

Los compuestos fenólicos o polifenólicos, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados como metabolitos secundarios de numerosas especies de plantas. La oxidación de los productos de los compuestos fenólicos, al parecer son involucrados en la defensa de las plantas contra la invasión de patógenos, incluyendo bacterias, fungí y virus, así como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de estas

(MARTÍNEZ- VALVERDE *et al.*, 2000).

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas y la contaminación ambiental. Pueden interactuar directamente con especies reactivas de oxígeno y son inhibidores de la lipoperoxidación, (GONZÁLES-TORRES *et al.*, 2000). Son compuestos fenólicos que pertenecen a los populares fitoquímicos, sustancias derivadas de vegetales, con acción potencialmente beneficiosa para la salud y que constituyen el principio activo de muchas plantas medicinales (O'REILLY *et al.*, 2001). El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en vegetales, representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (AHERNE y O'BRIEN, 2002).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (MARTÍNEZ-FLÓRES *et al.*, 2002). El mecanismo de acción de los polifenoles está vinculado a su capacidad para donar hidrógeno y a su acción quelante de iones metálicos; la potente actividad antioxidante reside en sus estructuras químicas con un grupo o-difenólico, un doble enlace conjugado 2-3 y grupos hidroxilos en posiciones 3 y 5, lo que los torna muy eficientes contra radicales hidroxilo y peroxilo. (GUIJA *et al.*, 2005).

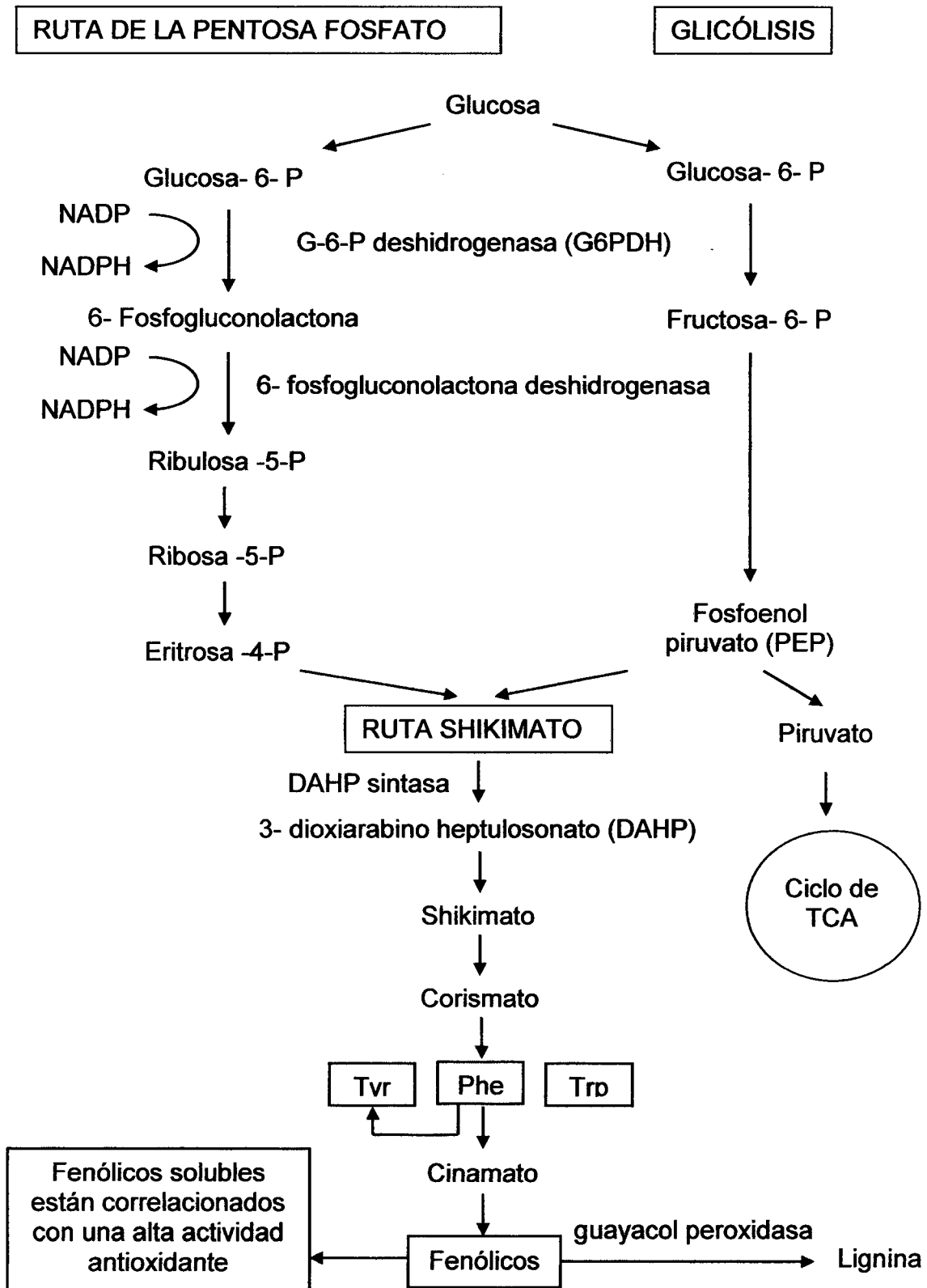


Figura 3. Ruta de la pentosa fosfato para la síntesis de componentes fenólicos

en plantas (SHETTY *et al.*, 2005).

2.5. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Es una técnica de separación de compuestos, que permite aislar, identificar y cuantificar los compuestos desconocidos tales como vitaminas, proteínas y compuestos activos como flavonoides, alcaloides y esteroides en una muestra o solución conocida. Para la cuantificación de estos compuestos se utiliza estándares específicos (HORIE y KOHATA, 2000).

La técnica HPLC describe el proceso en el cual la fase móvil (líquido) es mecánicamente bombeado a través de una columna que contiene la fase estacionaria (sólido) y la cuantificación de los analitos se realiza mediante un detector (NIELSEN, 1998).

Según NIELSEN (1998) el sistema HPLC consta de las siguientes partes:

Bomba: Son dispositivos de alta tecnología que tiene por función entregar la fase móvil a través del sistema, a un flujo variado en cantidades exactas y de manera precisa.

Inyector: El fin del proceso de inyección es introducir la muestra en un reservorio sujeto a acción de la bomba para luego ser llevado a la columna.

Columna: La columna es considerada como una herramienta para la separación de las moléculas presentes en la muestra que está siendo analizado.

Detector: El detector por lo general es ultravioleta (UV) o visibles (VIS), es el instrumento que detecta la presencia de las moléculas motivo de análisis. Una vez que la muestra sale de la columna es presentada al detector que identifica en función a la absorbancia la cantidad presente de un

determinado analito; luego el detector convierte esta interacción en señal electrónica que es enviada al sistema de datos. La magnitud de esta señal es graficada contra el tiempo.

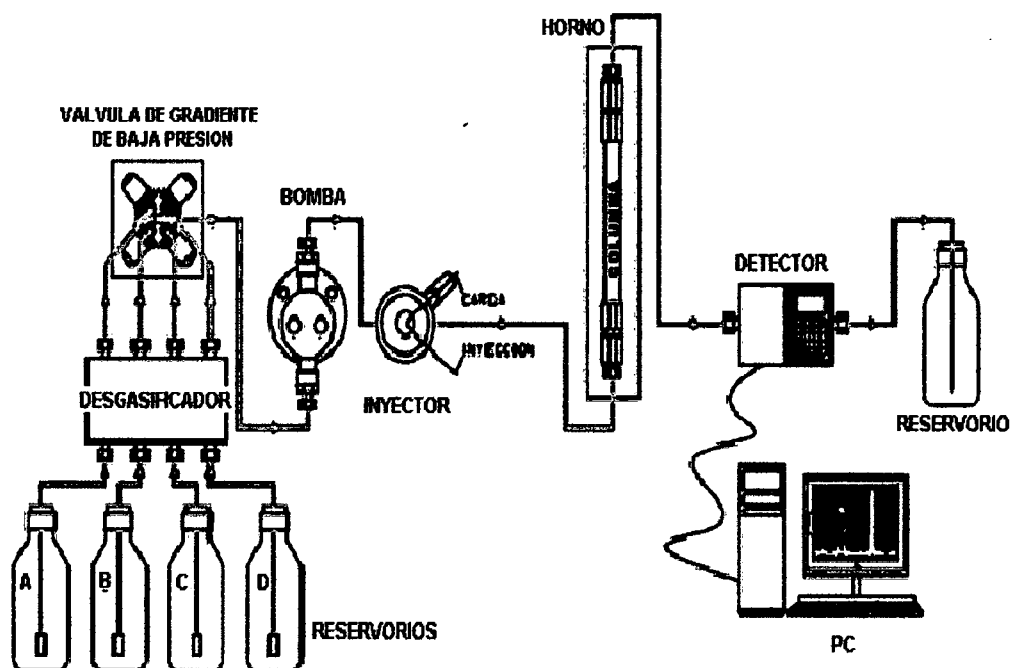


Figura 4. Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Performancia (HPLC) en gradiente de baja presión.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de ejecución

El trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de: Centro de Investigación para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM), Carnes, Análisis de suelos, Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) y la Planta Piloto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en Tingo María, ubicado a 660 msnm, a 09° 17' 08" de Latitud Sur, a 75° 59' 52" de Longitud Oeste, con una temperatura y humedad relativa promedio de 24 °C y 83.5% respectivamente, en el Distrito de Rupa Rupa, Provincia de Leoncio Prado, Región de Huánuco.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Materia Prima

El fruto de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K), fue obtenido del Distrito de Rupa Rupa (Tingo María), Provincia de Leoncio Prado, Región de Huánuco.

3.2.2. Materiales de laboratorio

Microtubos de plástico de 1 a 2 mL, tubos de vidrio 10 mL, tubos de plástico de 10 a 50 mL, cubetas de poliestireno (1cm X 1cm X 4,5 cm), papel filtro de 0,2 µm, jeringa hipodérmica de 10 mL, vasos de precipitación de 10 a 1000 mL, matraz volumétrico de 50 a 250 mL, bureta de 20 mL semiautomática, gradilla de metal, pastilla magnética, pizeta, espátula de acero

inoxidable.

3.2.3. Materiales, equipos y maquinarias de proceso

Canastillas de polietileno de 50 X 30 cm, bolsas de polietileno de alta densidad (0,1 mm), pulpeador HUNGARY modelo MSZ 152 (Budapest), empacador al vacío modelo A 300/16 (MULTIVAC), Congeladora Seria.

3.2.4. Equipos para análisis

Micropipeta (ACCUMAX 10 a 1000 μ L), pH-metro con termómetro incluido (OAKTON pH 1100 series), Plato de calentamiento/ Agitador (VWR, Heat: 30-400 °C, Stir: 60-1600 rpm), Balanza analítica (OHAUS Adventure Pro AV 114; 0,0001g), Destilador de agua (GFL, D-30938 Burgwedel, Tipo 2004, N° 11207205J), Desionizador de agua (BARNSTEAD, EASY Pure II, RF/UV ultrapure Water system), Homogenizador (BARNSTEAD internacional, Maxi Mix II, Modelo N° M37610-33, SERIAL N° 1254051228720), Refractómetro (Carl Seiss), Estufa (TOMOS Heating, Modelo: ODHG- 9240A), Espectrofotómetro (Thermo Electrón Corporation, modelo: Genesys™ 6), Centrifuga (Hettich Zentrifuge, modelo: MIKRO R22, Stir: 18000 rpm), Baño maría con tiempo y temperatura regulable (GEMMYCO, Model: YCW-010E), Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Performancia (HPLC) modelo LC-10AVP (Shimadzu Scientific, MD, USA.). Equipado con: Desgasificador (modelo: FCV – 10AL VP), 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, Computadora compatible USB – 52X, Inyector de muestra de capacidad 20 μ l.

3.2.5. Reactivos

1,1- Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), ácido ascórbico, (+)-catequina, metanol grado HPLC, ácido acético, carbonato de sodio, Folin-Ciocalteu, 2,2-azinobis (3-etilenobenzotiazolino-6 ácido sulfónico) (ABTS), 2,2-azobis-(2-amidopropano) hidrócloride (ABAP), hidróxido de sodio, Fosfato de sodio hepta hidratado, Monofosfato de potasio, Ácido ortofosfórico, etanol 95 %, de Sigma Chemical Co, (St. Louis, MO).

3.3. Métodos de análisis

3.3.1. Análisis fisicoquímico

- Sólidos solubles totales, método refractométrico reportado por (MITCHAM *et al.*, 2003).
- Acidez titulable, método potenciométrico reportado por (MITCHAM *et al.*, 2003).
- Determinación porcentual de pulpa, cáscara y semilla, método gravimétrico reportado por (CUNHA *et al.*, 2001).
- Humedad, método gravimétrico N° 950.46 AOAC (1995).
- Determinación de Cu, Fe, Zn y Mn, método de espectrofotometría de absorción atómica reportado por (SANDOVAL, 1994).

3.3.2. Determinación de ácido ascórbico

Se realizó mediante el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC), reportado por (GÖKMEN *et al.*, 2000).

3.3.3. Cuantificación de polifenoles totales

Se realizó mediante el método de espectrofotometría de absorción molecular reportado por (PONGSAWATMANIT *et al.*, 2007).

3.3.4. Cuantificación de catequina

Se realizó mediante el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC), reportado por (DING *et al.*, 1999).

3.3.5. Evaluación de la actividad antioxidante

3.3.5.1. Radical 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Se realizó mediante el método desarrollado por Brand-Williams *et al.*, 1995, de inhibición del radical DPPH[•], reportado por (SANDOVAL *et al.*, 2002a).

3.3.5.2. Radical peroxilo

Se evaluó mediante el método de TRAP (poder total de actividad reductora), reportado por (SANDOVAL *et al.*, 2002a).

3.4. Metodología

3.4.1. Índice de madurez (IM)

Se determinó utilizando los resultados de °Brix y Acidez, mediante la ecuación siguiente:

$$IM = \text{° Brix} / \text{Acidez}$$

La medición de los ° Brix se realizó empleando un refractómetro Carl Seiss, calibrado a 20 °C y la acidez, mediante titulación con una bureta semiautomática, utilizando hidróxido de sodio estandarizado 0,1 N hasta pH 8,1 medido con un pH metro digital (MITCHAM *et al.*, 2003).

También se midió el pH en el fruto pintón y maduro de camu camu (MITCHAM *et al.*, 2003).

3.4.2. Preparación de la muestra

Se procedió de acuerdo al diagrama de flujo esquematizado en la

Figura 5. Las operaciones se describen a continuación: Los frutos de camu camu en sus dos estados de madurez fueron recepcionados, seleccionados, lavados con agua blanda, eliminando toda impureza adherida en su superficie. Luego se pulpeó utilizando un tamiz de 1mm de luz, seguidamente se envasó al vacío a presión y tiempo de 100 mB/2min en bolsas de polietileno de 0, 1 mm de espesor y almacenados a -10°C. Finalmente se peso la pulpa, cáscara y semilla, para luego determinar el porcentaje, respectivamente (CUNHA *et al.*, 2001).

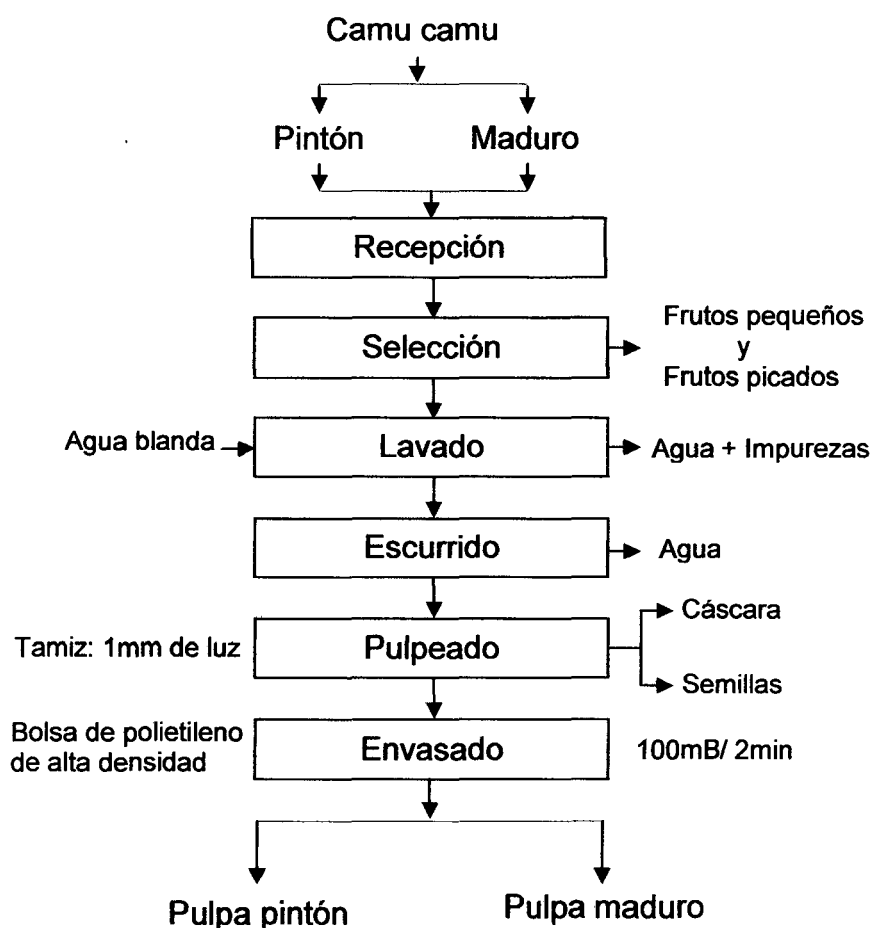


Figura 5. Diagrama de flujo para la obtención del rendimiento en pulpa, cáscara y semilla del fruto de camu camu en dos estado de madurez.

3.4.3. Determinación de humedad

Para determinar la humedad se homogenizó y se tomó una muestra representativa de la pulpa congelada. De esta se peso tres muestras de $5 \pm 0,1\text{g}$ en lunas de reloj, luego fueron secadas las muestras en la estufa hasta que el peso sea constante a $105\text{ }^\circ\text{C}$. Al cabo de este tiempo se colocó en un desecador por media hora y luego se peso (AOAC, 1995).

3.4.4. Determinación de minerales

Se usó un espectrofotómetro de absorción atómica, modelo AA 55B (VARIAN Australia Pty Ltd), el cual trabajo con aire (50) y acetileno (80). Se preparó estándares de concentraciones de $0.03 - 10\text{ }\mu\text{g Cu /mL}$; $0.06 - 15\text{ }\mu\text{g Fe/mL}$; $0.01 - 2\text{ }\mu\text{g Zn /mL}$ y $0.02 - 5\text{ }\mu\text{g Mn /mL}$, los que fueron usados para obtener la curva estándar de cada mineral. La pulpa pesada se colocó en microtubos de 1.5 mL , se centrifugó a $10\ 000\text{ r.p.m/5 min}$ a una temperatura de $4\text{ }^\circ\text{C}$, luego se tomó una parte del sobrenadante, se adicionó agua desionizada, se homogenizó la mezcla y se realizó la lectura de las distintas concentraciones de los diferentes minerales así como de la muestra por triplicado. El resultado de Cu, Fe, Zn y Mn se expresó en mg del mineral/ Kg de pulpa (SANDOVAL, 1994).

3.4.5. Determinación de ácido ascórbico

Se utilizó como fase móvil una solución a $0,2\text{ M}$ de KH_2PO_4 ajustado a un pH de 2,4 con H_3PO_4 y microfiltrada con filtros de $0.2\text{ }\mu\text{m}$. La programación fue a un flujo de 0.5 mL/min y la detección se realizó a 254 nm . Se preparó la solución estándar de L-(+)-ácido ascórbico ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$), de la cual se preparó las soluciones de $10 - 50\text{ }\mu\text{g/mL}$. La pulpa congelada, fue

separada en microtubos de 1.5 mL, para ser centrifugadas a 10 000 r.p.m/5 min a una temperatura de 4 °C, luego se tomó una parte del sobrenadante y se adicionó agua desionizada (F.D = 500), se homogenizó la mezcla y se filtró con membranas de 0.2 µm, finalmente, se inyectó 20 µL tanto del estándar como de la muestra y se realizó la lectura durante 15 minutos. Para la cuantificación de ácido ascórbico, se utilizó valores del área bajo la curva, absorbancia y concentraciones de los estándares y/o muestras. Se utilizó el software Class-VP del sistema del HPLC para obtener la ecuación de la curva estándar, y estimar la cantidad en mg ácido ascórbico /100g de pulpa (GÖKMEN *et al.*, 2000).

3.4.6. Cuantificación de polifenoles totales

Se realizó mediante el método de espectrofotometría de absorción molecular reportado por (PONGSAWATMANIT *et al.*, 2007) con modificaciones como sigue. Se preparó solución al 20% Na₂ CO₃ y solución estándar de 1 mM (+)-Catequina en metanol. Luego se agregó a cada tubo 1.58 mL de agua desionizada y 20 µL de muestra, control y estándares por triplicado. De la solución de 1 mM (+) –catequina, se preparó soluciones diluidas de 100 - 3000 µg/mL. Luego se agregó 100 µL de solución de Folin-Ciocalteu 2N a cada muestra, control y estándares, a estas mezclas se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente, luego se neutralizó la reacción agregando 300 µL de Na₂ CO₃ al 20% y finalmente se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, para una completa reacción. La absorbancia fue leída a 700 nm tanto para la muestra, control y estándar. La cuantificación de polifenoles totales fue expresado en mg (+)-catequina Equivalente/ 100g muestra.

3.4.7. Cuantificación de catequina

Se utilizó como fase móvil una solución (agua: metanol: ácido acético) (700:300:1) v/v, la cual fué filtrado (0.2 μm). La programación fue a un flujo de 1 mL/min y la detección se realizó a 270 nm. Se preparó solución estándar de (+)-catequina (200 $\mu\text{g/mL}$) y de la cual se preparó soluciones diluidas de 10 - 140 $\mu\text{g/mL}$. La pulpa congelada se separó en microtubos de 1.5 mL, para ser centrifugadas a 10 000 r.p.m/5 min a una temperatura de 4 °C, luego se tomó una parte del sobrenadante, se adicionó agua desionizada (F.D = 3), se homogenizó la mezcla y se filtró con membranas de 0.2 μm , finalmente se inyectó 20 μL de estándar y/o muestra. Para la cuantificación de catequina se utilizó valores del área bajo la curva, la absorbancia y las concentraciones de los estándares y/o muestra. Se utilizó el software Class-VP del sistema del HPLC para obtener la ecuación de la curva estándar y a la vez se usó para estimar la cantidad en mg (+)-catequina /100g de pulpa (DING *et al.*, 1999).

3.4.8. Evaluación de la actividad antioxidante

3.4.8.1. Radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Este método, se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH, por antioxidantes. Con modificaciones el método reportado por (SANDOVAL *et al.*, 2002a). Se hizo reaccionar 25 μL del sobrenadante previamente centrifugada a 10000 rpm/5min y diluido en agua (1:20 v/v) con 975 μL de DPPH (100 μM) en etanol al 96 %, la absorbancia fue monitoreada a 515 nm, a intervalos de 15 segundos durante 5 minutos, por triplicado. La cinética de inhibición de la actividad antioxidante fue expresada en términos de IC_{50} y expresando como equivalente de ácido ascórbico (AAE).

– **Coefficiente de Inhibición (IC₅₀)**

Se determinó mediante un análisis de regresión del porcentaje de inhibición versus la concentración necesaria de la pulpa, para inhibir el 50 % del radical DPPH, mediante la ecuación siguiente.

$$\%InhibicionDPPH = \left[\frac{(AbsControl - AbsMuestra)}{AbsControl} \right] \times 100$$

Abs Control: es la absorbancia a tiempo = 0 min y Abs Muestra: es la absorbancia a tiempo = 5 min.

– **Poder antirradical**

El poder antirradical, referido a la eficiencia de un antioxidante, fue evaluado mediante la metodología descrita por (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Para tener mejor claridad sobre la capacidad que tiene un antioxidante para inhibir radicales libres, en esta parte del trabajo, se hizo uso del Software de Sistema de Modelamiento Molecular- Hyperchem (Version 6,01- 2000), determinando el Análisis Conformacional de Mínima Energía, reportado por VAJRAGUPTA *et al.* (2000) y VILLANUEVA *et al.* (2005).

3.4.8.2. Radical Peroxílo

Se realizó mediante el método de TRAP (poder total de actividad reductora). Se prepararon soluciones de 2,25 mM 2,2-azinobis (3-etilenobenzotiazolino-6 ácido sulfónico) (ABTS), 20 mM 2,2-azobis-(2-amidopropano) hidrocloreto (ABAP) y PBS (Solución buffer fosfato: 154 mM Cloruro de sodio, 2.7 mM Fosfato de sodio heptahidratado y 1.5 mM Fosfato de potasio monobásico) ajustado el pH a 7.4. Luego los radicales peroxílos fueron

generados mediante el tratamiento de la mezcla de 10 mL de 2.25 mM ABTS, 10 mL de 20 mM ABAP y 80 mL de PBS (pH 7.4) a 70°C por 20 minutos, finalmente, se hizo reaccionar 10 µL de sobrenadante previamente centrifugada a 10000 rpm/5min y diluido en agua (1:20 v/v), con 990 µL de la solución de radicales ABTS^{•+}, la cual se enfrió durante 10 minutos; la absorbancia fue leído a 414 nm a intervalos de 15 segundos durante 5 minutos (SANDOVAL *et al.*, 2002a). La cinética de inhibición de la actividad antioxidante fue expresada en términos de IC₅₀ y expresando como equivalente de ácido ascórbico (AAE).

– **Coefficiente de Inhibición (IC₅₀)**

Se determinó mediante un análisis de regresión del porcentaje de inhibición versus la concentración necesaria de la pulpa, para inhibir el 50 % del radical peroxilo, mediante la ecuación siguiente.

$$\%InhibicionPeroxilo = \left[\frac{(AbsControl - AbsMuestra)}{AbsControl} \right] \times 100$$

Abs Control: es la absorbancia a tiempo = 0 min y Abs Muestra: es la absorbancia a tiempo = 5 min.

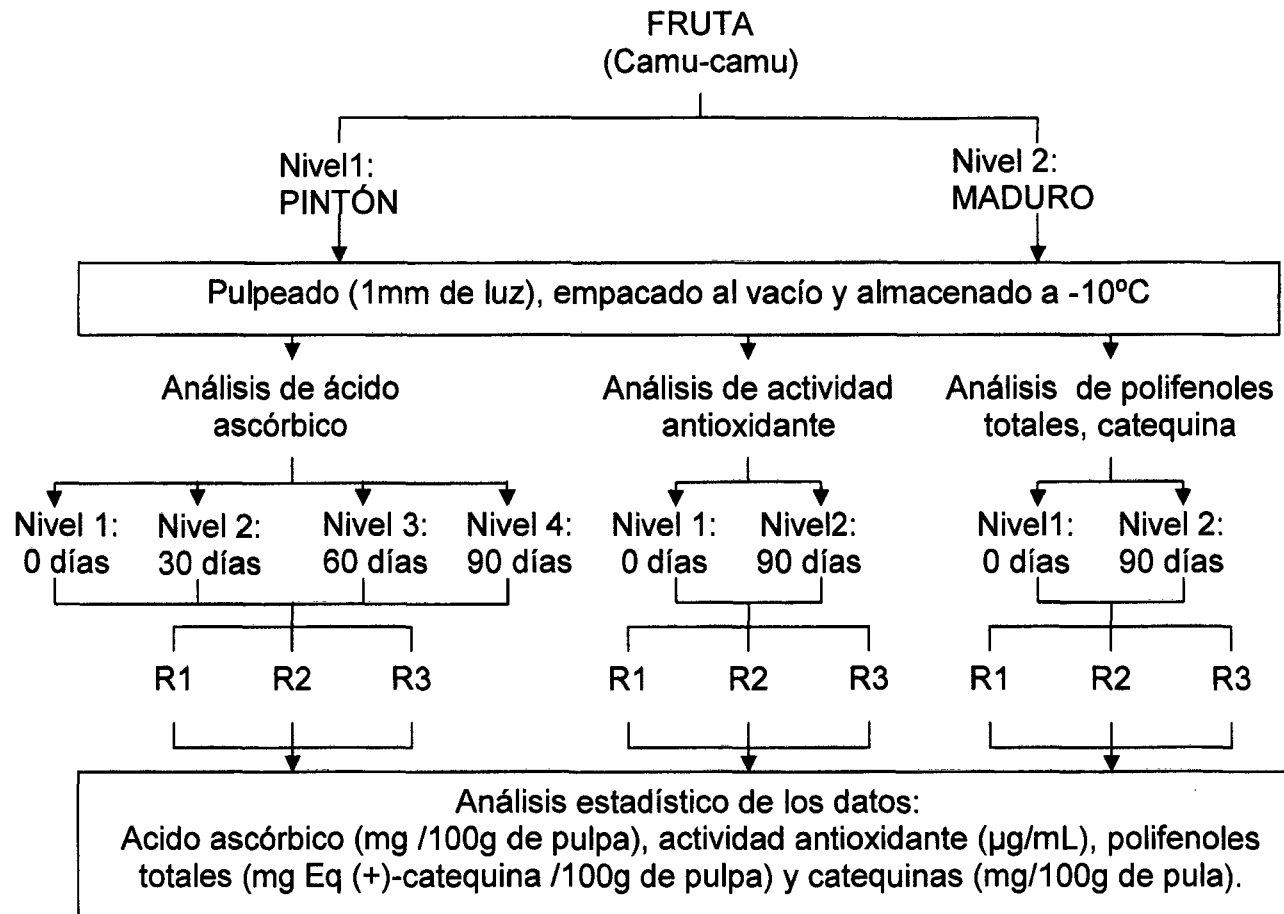


Figura 6. Secuencia para la determinación del ácido ascórbico, polifenoles totales, catequina y actividad antioxidante.

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó por medio del programa STATGRAPHICS Plus versión 5.1, 2004 Statistical Graphics Corp.

3.5.1. Variables

3.5.1.1. Variables independientes

Estado de madurez

Días de almacenamiento

3.5.1.2. Variables dependientes

Cantidad de ácido ascórbico (mg /100g de pulpa), actividad antioxidante ($\mu\text{g}/\text{mL}$), polifenoles totales (mg Eq (+)-catequina/100g de pulpa) y catequina (mg/100g de pulpa).

3.5.2. Estadística descriptiva

Se emplearon en los valores de análisis de índice de madurez, humedad y minerales, rendimiento en pulpa, cáscara y semilla fueron expresados como promedio \pm desviación estándar (CALZADA, 1976).

3.5.3. Análisis de regresión lineal

Los datos de absorbancia registrados para los modelos in vitro del radical DPPH y peróxido fueron evaluados mediante un Arl para determinar el IC_{50} (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; CALZADA,1976), asimismo los datos de absorbancia de polifenoles totales, ácido ascórbico y catequina para ser expresados en términos de Equivalente (+)-catequina, ácido ascórbico y (+)-catequina, respectivamente (CALZADA,1976).

3.5.4. Análisis de varianza

Los valores de IC_{50} y cantidad de ácido ascórbico, polifenoles

totales, catequina, se evaluaron estadísticamente mediante un diseño completo al Azar – DCA, con tres repeticiones y la significancia estadística usando la prueba de t, student's y Tukey con $p < 0,05$ (CALZADA, 1976).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis fisicoquímico

El índice de madurez ($^{\circ}$ Brix / Acidez), mediante el cual, se midió la madurez fisiológica del fruto, fue de $1,85 \pm 0,024$ y $2,26 \pm 0,029$; para la fruta pintón y maduro de camu camu, respectivamente (Cuadro 3 y Figura 7), en donde el estadio de desarrollo de la fruta, generalmente esta asociado con la comestibilidad optima, afirmando el sabor del fruto y del jugo (DEL PILAR *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Resultados de los análisis fisicoquímicos realizados al fruto de camu camu en dos estado de madurez.

Parámetro	Pintón	Maduro
pH	$2,30 \pm 0,1$	$2,36 \pm 0,2$
$^{\circ}$ Brix (%)	$5,52 \pm 0,04$	$6,83 \pm 0,04$
Acidez (Ac. Cítrico) (g/Kg)	$2,98 \pm 0,03$	$3,01 \pm 0,02$
$^{\circ}$ Brix/Acidez (relación)	$1,85 \pm 0,024$	$2,26 \pm 0,029$
Humedad	$90,29 \pm 0,96$	$91,98 \pm 0,78$

Datos expresados en media \pm SD, n=3.

VILLANUEVA (2003), obtuvo índice de madurez de 1,90 y 2,41 para el fruto pintón y maduro de camu camu, respectivamente. Asimismo (ZAPATA y DUFOUR, 1993) determinó el índice de madurez de 1,8 para el fruto pintón y 2,2 para el fruto maduro de camu camu. Observándose que los

resultados (Cuadro 3) coinciden con los valores reportados por Villanueva, Zapata y Dufour (Anexo I, Cuadro 14).

En cuanto a la humedad se determinó valores de $90,29 \pm 0,96$ y $91,98 \pm 0,78$ por ciento para la pulpa pintón y maduro de camu camu, respectivamente (Cuadro 3). Observándose que los resultados encontrados coinciden con lo reportado por (RIVA y GONZÁLES, 1996 y FLORES, 1997) quienes mencionan que la humedad del fruto va de 91,95 a 94,40 por ciento.

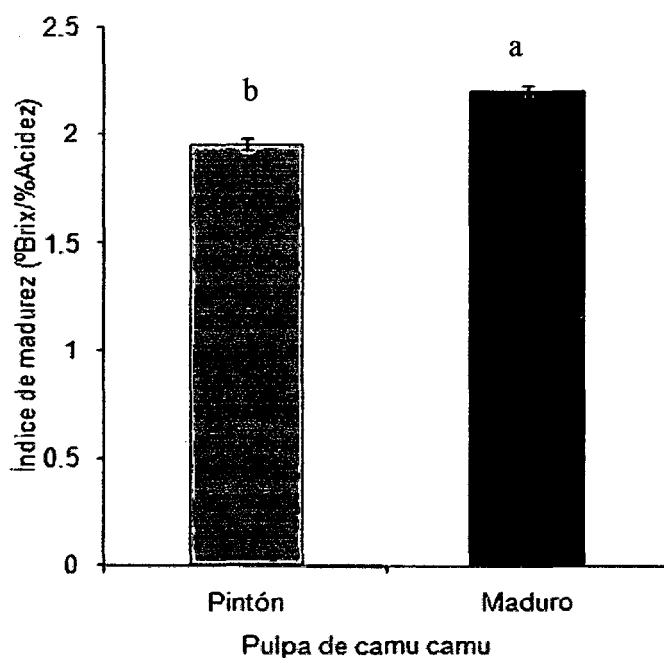


Figura 7. Índice de madurez de la pulpa de camu camu en dos estados de madurez.

4.2. Evaluación del rendimiento en el fruto pintón y maduro de camu camu.

4.2.1. Balance de materia en la obtención de la pulpa.

El rendimiento en el fruto se realizó mediante un balance de materia, tomando 15 kg de fruto (pintón y maduro), que fue convertido a 100 kg como base tal como se observa en los Cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Balance de materia en la obtención de pulpa pintón.

Operación	Materia en movimiento				
	Ingresas	Sale	Continua	R.O	R.P
	Kg	Kg	Kg	(%)	(%)
Recepción	100	0	100	100	100
Selección	100	1,2	98,8	98,8	98,8
Lavado	Fruto = 98,8 Agua = 50	0	148,8	100	148,8
Escurrido	148,8	49,8	99	66,53	99
Pulpeado	99	C + S = 44,98 merma = 1,64	52,38	52,91	52,38
Envasado	52,38	0	52,38	100	52,38

R.O: rendimiento por operación; R.P: rendimiento por proceso; C: cascara; S: semilla.

Se observa en el Cuadro 4 el balance de materia, donde la mayor pérdida se da en la operación de selección y pulpeado en el fruto pintón, con rendimiento por operación de 98,8% y 52,91%; respectivamente.

En la selección se perdió 1,2 kg, debido a que se descartó aquellos frutos defectuosos; en el pulpeado se eliminó cáscara, semilla (44,98 kg) y merma (1,64 kg); donde se puede apreciar la mayor pérdida por operación y por proceso.

Cuadro 5. Balance de materia en la obtención de pulpa maduro.

Operación	Materia en movimiento				
	Ingresas	Sale	Continua	R.O	R.P
	Kg	Kg	Kg	(%)	(%)
Recepción	100	0	100	100	100
Selección	100	1,5	98,5	98,5	98,5
Lavado	Fruto = 98,5 Agua = 50	0	148,5	100	148,5
Escurrido	148,5	49,8	98,7	66,46	98,7
Pulpeado	98,7	C + S = 43,39 merma = 0,35	54,96	55,68	54,96
Envasado	54,96	0	54,96	100	54,96

R.O: rendimiento por operación; R.P: rendimiento por proceso; C: cascara; S: semilla.

De acuerdo al Cuadro 5 en el balance de materia y rendimiento en la obtención de la pulpa maduro, las operaciones con mayor pérdida fueron selección y pulpeado, con rendimiento por operación de 98,5% y 55,68%; respectivamente.

En la selección se perdió 1,5 kg, debido a que se descartó aquellos frutos defectuosos; en el pulpeado se eliminó cáscara, semilla (43,39 kg) y merma (0,35 kg); donde se puede apreciar la mayor pérdida por operación y por proceso.

Cuadro 6. Resumen del rendimiento (%) en pulpa, cáscara, semilla del fruto pintón y maduro de camu camu.

Fruto	Rendimiento (%)	
	Pintón	Maduro
Pulpa	52,91 ± 1,01 ^b	55,68 ± 1,18 ^a
Cáscara y semilla	45,43 ± 1,37 ^a	43,96 ± 1,25 ^b
Merma	1,66 ± 0,11 ^a	0,36 ± 0,10 ^b

Datos expresados en media ± SD, n=3. Diferencia significativa $p < 0,05$, evaluado mediante una prueba de t, student's.

VILLACHICA (1996) menciona que el rendimiento en pulpa es de 50 a 55 por ciento, siendo la proporción mayor en los frutos con poca semilla (dos semillas), lo que concuerda con los resultados obtenidos (Cuadro 6 y Figura 8) ya que al final del proceso se obtuvieron valores de $52,91 \pm 1,01$ y $55,68 \pm 1,18$ por ciento de rendimiento en pulpa pintón y maduro de camu camu, respectivamente; observándose también (Cuadro 6 y Figura 8) que el mayor rendimiento en pulpa presenta el fruto maduro de camu camu en comparación al fruto pintón de camu camu ($p < 0,05$), debiéndose a que en el fruto maduro de camu camu se encontró solo dos semillas en la totalidad de frutos muestreados y coincidiendo con lo mencionado por (VILLACHICA, 1996).

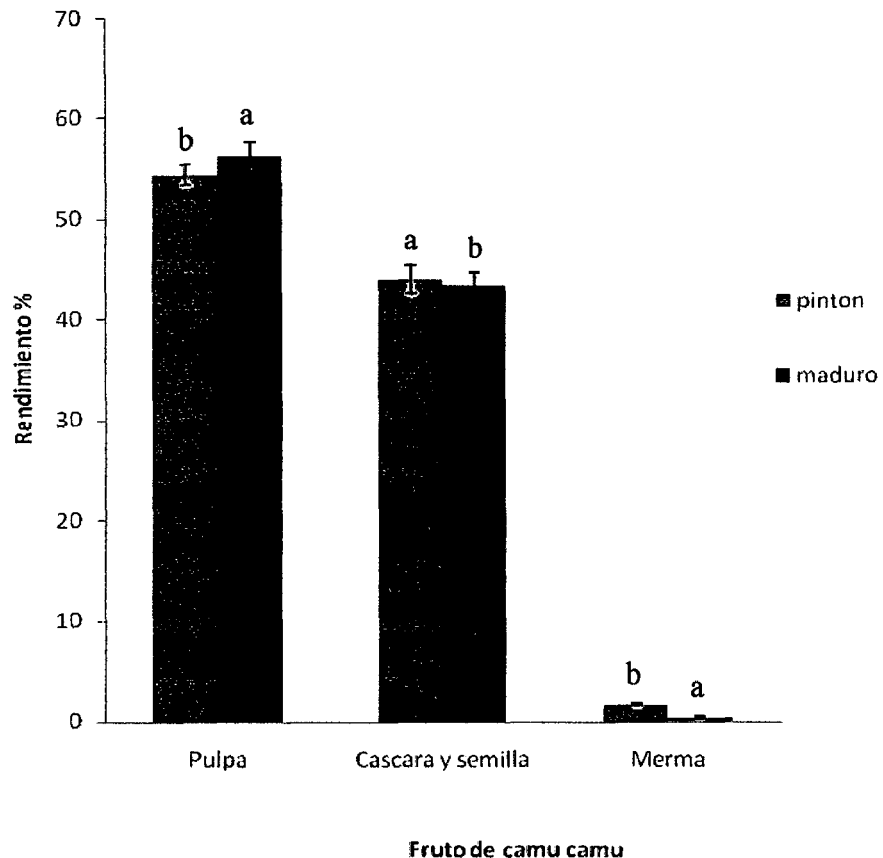


Figura 8. Rendimiento en pulpa, cáscara y semilla del fruto pintón y maduro de camu camu.

4.3. Determinación de minerales

El contenido de minerales, se calculó mediante la ecuación de la curva estándar de Cu, Fe, Mn y Zn (Anexo IV, Figura 26, 27, 28 y 29), se puede observar en el Cuadro 7 que los resultados de micronutrientes como Cu, Fe, Mn y Zn encontrados en pulpa pintón y maduro de camu camu, coinciden con los valores reportados por (ZAPATA y DUFOUR, 1993), para Cu, Fe y Mn (Cuadro 2); y notándose una diferencia en cuanto al contenido de Zn con las muestras evaluadas, esta diferencia podría deberse al pH del suelo donde fue sembrado el cultivo de camu camu, ya que en la mayoría de los suelos el zinc

se presenta naturalmente en pequeñas cantidades y su solubilidad disminuye al elevarse el pH y exceso de humedad presente en el suelo (QUIÑONES, 1991).

Cuadro 7. Resultados de los análisis de micronutrientes realizados a la pulpa fresca de camu camu.

Minerales (mg/Kg)	Pintón	Maduro
Cu	0,83 ± 0,02	0,97 ± 0,02
Fe	1,89 ± 0,02	1,95 ± 0,02
Mn	1,47 ± 0,06	2,16 ± 0,04
Zn	6,01 ± 0,08	6,72 ± 0,05

Datos expresados en media ± SD, n=3. Diferencia significativa $p < 0,05$, evaluado mediante una prueba de t, student's.

4.4. Determinación de ácido ascórbico

En el Cuadro 8 y Figura 9, se muestra los resultados del contenido de ácido ascórbico ($p < 0,05$).

Cuadro 8. Evaluación del contenido de ácido ascórbico en la pulpa de camu camu durante el almacenamiento a -10°C .

Almacenamiento (Días)	mg / 100g pulpa	
	Pintón	Maduro
0	1864.64 ± 19.6 ^b _x	1931.32 ± 27.6 ^a _x
30	1796.36 ± 18.8 ^b _y	1860.57 ± 34.3 ^a _{yz}
60	1764.02 ± 30.9 ^b _{yz}	1865.37 ± 30.3 ^a _y
90	1847.39 ± 28.9 ^b _x	1910.98 ± 34.8 ^a _x

Datos expresados en media ± SD, n =3, (a-b, x-y-z) diferencia significativa ($p < 0,05$), evaluado mediante la prueba de t, student's y kutey.

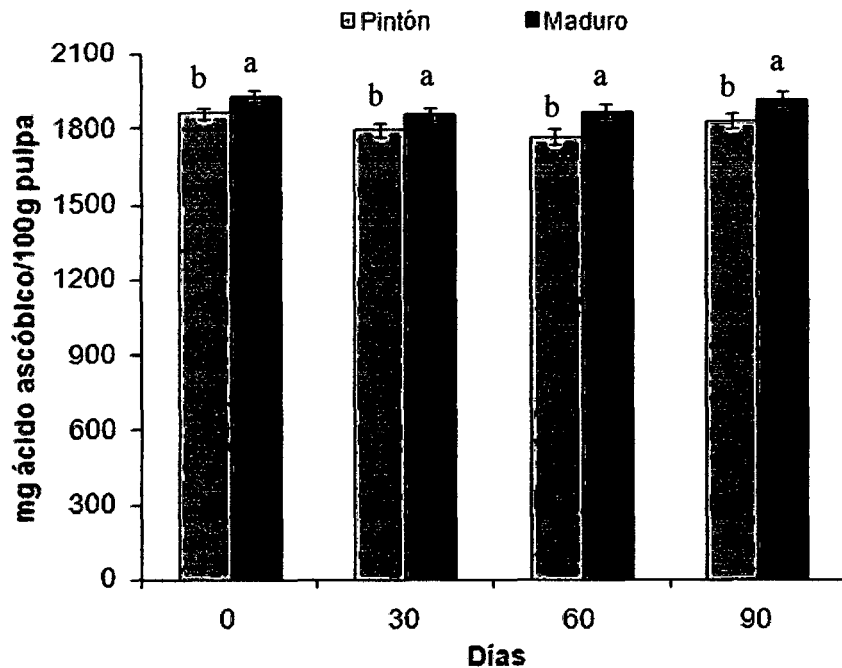


Figura 9. Evaluación del contenido de ácido ascórbico en la pulpa de camu camu durante el almacenamiento a -10°C .

Como se puede observar en el Cuadro 8, la pulpa pintón y maduro de camu camu presentó una pérdida de ácido ascórbico de 0,93% y 1,05 %, respectivamente, después de los 90 días de almacenamiento a -10°C , estadísticamente esta pérdida de ácido ascórbico es no significativo ($p < 0,05$), se puede afirmar que esta variación del contenido de ácido ascórbico, presenta relación con el contenido de acidez, debido a que los ácidos presentes en la fruta, facilitan la degradación del ácido ascórbico, así como la presencia de enzimas y el deterioro por la presencia de agua, que es proporcionado por la fruta (LEE y CHEN, 1998), ya que el ácido ascórbico es estable en estado seco y en solución llega a ser altamente reactiva (JHONSON, 1995 y RODRIGUEZ *et al.*, 2001) como también su degradación se debe a la acción de la enzima ácido ascórbico oxidasa presente en el fruto pintón y maduro (BIDWELL, 1990),

no se aprecia una pérdida considerable ya que las enzimas actúan muy lentamente a -10°C . Por tal motivo se puede expresar que la pulpa maduro de camu camu presentó mayor contenido de ácido ascórbico que la pulpa pintón de camu camu ($p < 0,05$), como se observa en el cuadro y figura mencionado.

La variación del contenido de ácido ascórbico está influenciado también por las condiciones edafoclimáticas de cada piso ecológico donde se desarrolla el cultivo de camu camu, como lo demuestra los estudios realizados por ZAPATA y DUFOR (1993); JUSTI *et al.* (2000); DIB TAXI (2001); RODRÍGUEZ (2002); ELESBÃO *et al.* (2002); KIECKBUSCH *et al.* (2006) y ARÉVALO *et al.* (2006), quienes encontraron valores de ácido ascórbico en pulpa de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) Iguape-SP/Brasil (1721,7 mg / 100g pulpa); Registro-SP/Brasil (2084 mg / 100g pulpa); Manaus /Brasil (1355 mg / 100g pulpa); Manaus/Brasil (1300 mg / 100g pulpa); Nanay-Lo/Perú (845-939 mg / 100g pulpa); Belém/Brasil (1910-2061 mg / 100g pulpa) y (1380–1490 mg/100 g pulpa), respectivamente; cuyos resultados obtenidos en diferentes muestras de camu camu, recolectados en Perú y estados de Brasil, variando desde 845 a 2084 mg/100g pulpa; coincidiendo con los obtenidos por el presente estudio (Cuadro 8 y Figura 9). Afirmando que la concentración de ácido ascórbico puede esta influenciado por las condiciones edafoclimáticas donde se desarrolló el fruto.

4.5. Cuantificación de polifenoles totales

En el Cuadro 9 y Figura 10, se muestra los resultados de la cuantificación de polifenoles totales ($p < 0.05$), para el cual se construyó una curva patrón (Anexo II, Figura 17).

Cuadro 9. Evaluación del contenido de polifenoles totales en la pulpa de camu camu durante el almacenamiento a -10°C .

Almacenamiento (Días)	mg (+)-Catequina Equivalente / 100 g pulpa	
	Pintón	Maduro
0	$107,7 \pm 3,8^{\text{b}}_{\text{x}}$	$248,1 \pm 3,6^{\text{a}}_1$
90	$107,1 \pm 2,5^{\text{b}}_{\text{x}}$	$143,6 \pm 1,4^{\text{a}}_2$

Datos expresados en media \pm SD, n=3. (a-b, x-y, 1-2) diferencia significativa $p < 0,05$; evaluado mediante una prueba de t, student's.

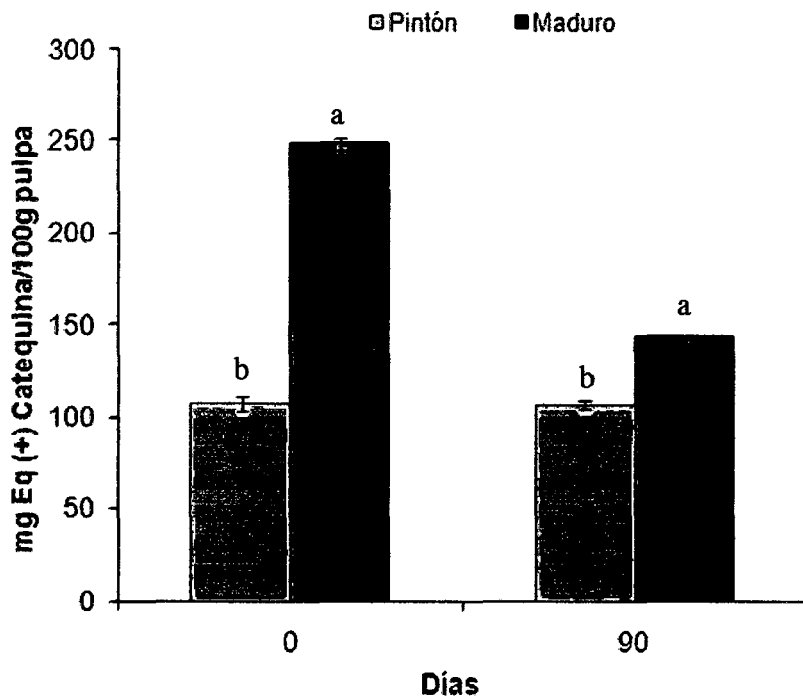


Figura 10. Evaluación del contenido de polifenoles totales en la pulpa de camu camu, durante el almacenamiento a -10°C

Según los resultados obtenidos (Cuadro 9) se observa que no existe diferencia significativa en cuanto al contenido de polifenoles totales durante los 90 días de almacenamiento a -10°C en la pulpa pintón de camu camu ($p < 0,05$), mientras que en la pulpa maduro de camu camu existe una

diferencia altamente significativa en cuanto al contenido de polifenoles totales durante los 90 días de almacenamiento a -10°C ($p < 0,05$), mostrándose con la pérdida del 42,12% de polifenoles totales en la pulpa maduro; se puede afirmar que la variación de los polifenoles totales esta directamente relacionado con la presencia de enzimas en cada estado fisiológico y las condiciones existentes en el medio (EBERHARDT *et al.*, 2000), ya que los compuestos fenólicos constituyen sustratos susceptibles de ser oxidados por enzimas como polifenol oxidasa y peroxidasas en presencia de oxígeno tanto en el estado maduro y senescencia (BIDWELL, 1990), asimismo generan quinonas por la oxidación de los fenoles y estas favorecen el deterioro de las antocianinas presente en la pulpa maduro en su totalidad (RADI *et al.*, 1997), mientras en la pulpa pintón todavía se encuentran enzimas reguladoras (fenilalanina amonialiasa) de la síntesis de fenoles durante las últimas etapas del crecimiento del fruto e inicios de la maduración (SALISBURY y ROSS, 1996). Por lo tanto la pulpa maduro de camu camu presenta mayor contenido de polifenoles totales que la pulpa pintón de camu camu ($p < 0,05$); como se muestra los resultados en el Cuadro 9 y Figura 10. Además la acción de las enzimas (polifenol oxidasa o peroxidasas) en la degradación de los polifenoles es muy lenta a -10°C aun existiendo oxígeno (oxígeno presente en las paredes celulares tanto en la pulpa pintón y maduro) en el medio, así mismo las pocas quinonas generadas también favorecieron el deterioro de las antocianinas en mayor proporción en pulpa maduro de camu camu.

4.6. Cuantificación de catequina

En el Cuadro 10 y Figura 11, se muestra los resultados de la

cuantificación de catequina ($p < 0,05$), para el cual se construyó una curva patrón (Anexo II, Figura 16).

Cuadro 10: Evaluación del contenido de catequina en la pulpa de camu camu durante el almacenamiento a -10°C .

Almacenamiento (Días)	mg (+)-Catequina/100g pulpa	
	Pintón	Maduro
0	$10,68 \pm 0,39^a_x$	$18,09 \pm 0,58^b_1$
90	$10,46 \pm 0,25^a_x$	$12,38 \pm 0,48^b_2$

Datos expresados en media \pm SD, $n=3$. (a-b, x-y, 1-2) diferencia significativa $p < 0,05$; evaluado mediante una prueba de t, student's.

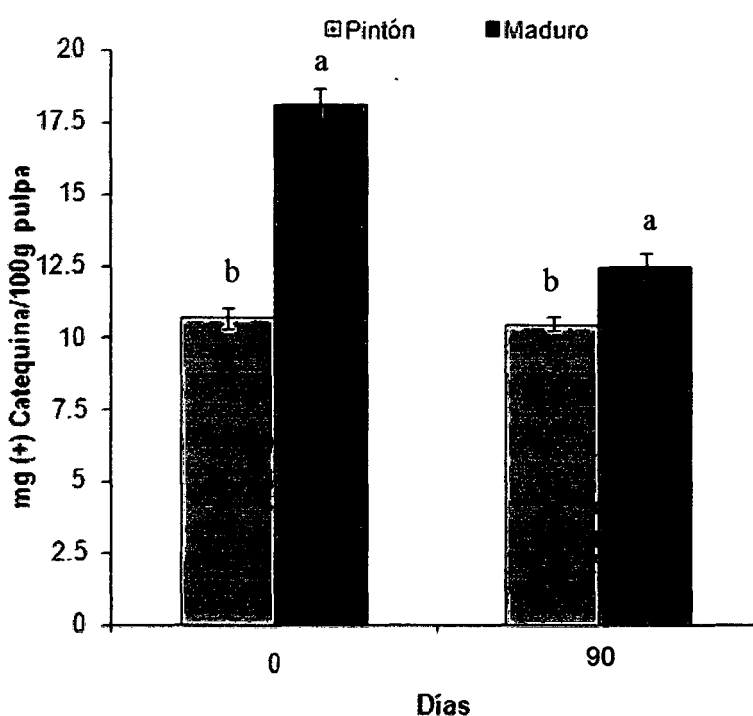


Figura 11. Evaluación del contenido de catequina en la pulpa de camu camu durante el almacenamiento a -10°C .

Como se observa en el Cuadro 10 no existe diferencia significativa

en el contenido de catequina en pulpa pintón de camu camu durante los 90 días de almacenamiento a -10°C ($p < 0,05$) y en cuanto a la pulpa maduro de camu camu existe una diferencia significativa durante los 90 días de almacenamiento a -10°C ($p < 0,05$), representada por la pérdida de 31,56% de catequina. Esta diferencia de pérdida de catequina esta relacionado con la presencia de enzimas en cada estado fisiológico (EBERHARDT *et al.*, 2000), ya que los compuestos fenólicos constituyen sustratos susceptibles de ser oxidados por enzimas como polifenol oxidasa y peroxidasas en estado maduro y senescencia (RADI *et al.*, 1997), mientras en la pulpa pintón todavía se encuentran enzimas reguladoras (fenilalanina amonialiasa) de la síntesis de fenoles durante las últimas etapas del crecimiento del fruto e inicios de la maduración (SALISBURY y ROSS, 1996); esta pérdida se le atribuye a la acción de las enzimas polifenol oxidasa presentes en mayor proporción en la pulpa maduro de camu camu, quienes en presencia del oxígeno que aun existente en la paredes celulares de la pulpa maduro a podido degradar a la catequina y no pudiendo apreciarse una pérdida mucho mayor debido a que las enzimas actúan muy lentamente a temperaturas de -10°C . Por consiguiente podemos decir que la pulpa maduro de camu camu presentó mayor contenido de catequina que la pulpa pintón de camu camu ($p < 0,05$), como se muestra en el Cuadro 10 y Figura 11.

4.7. Evaluación de la actividad antioxidante

4.7.1. Radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

– Coeficiente de Inhibición (IC_{50})

Los valores de coeficiente de inhibición (IC_{50}) mostrados en el

Cuadro 11 fueron calculados mediante un análisis de regresión lineal (Anexo III, Figura 18, 19, 20 y 21).

Cuadro 11. Valores de IC₅₀ de la pulpa pintón y maduro de camu camu frente al radical DPPH, evaluados durante 90 días de almacenamiento a -10°C.

Almacenamiento	Pulpa	IC ₅₀ (µg/mL) ¹	AAE ² (ppm)
		DPPH ⁻	DPPH ⁻
0 días	Pintón	16,1 ± 0,19 ^{ab}	5,4 ±0,11
	Maduro	13,5 ± 0,18 ^{1a}	4,6 ±0,14
90 días	Pintón	16,5 ± 0,38 ^{ab}	5,5 ±0.21
	Maduro	14,5 ± 0,19 ^{1a}	4,9 ±0.13

¹Datos expresados en media ± SD, n=3, (a-b,1-2) diferencia significativa p<0,05, evaluado mediante una prueba de t, student's. Medido luego de 5 minutos de reacción. AAE²: ácido ascórbico equivalente, ppm.

De acuerdo con éste parámetro, los bajos valores de coeficiente de inhibición (IC₅₀), reflejan una alta capacidad para inhibir radicales libres (VILLANUEVA, 2003). En el Cuadro 11 se observa que la actividad antioxidante frente al radical DPPH en la pulpa pintón y maduro de camu camu muestra una diferencia no significativa durante el almacenamiento (p<0,05), éstos resultados demuestran que el ácido ascórbico es el responsable de la actividad antioxidante frente al radical DPPH (VILLANUEVA, 2003) y de cierta manera los polifenoles porque aun existiendo perdida de polifenoles durante el almacenamiento en la pulpa maduro de camu camu se a mantenido la actividad antioxidante durante los 90 días de almacenamiento; es importante destacar que las determinaciones de capacidad antioxidante realizadas in vitro, dan sólo una aproximación de lo que podría ocurrir en situaciones mucho más complejas

(in vivo), donde ocurre una gran cantidad de reacciones bioquímicas, y en donde los resultados finales de una mezcla están determinados no solamente por la suma de las capacidades antioxidantes de los compuestos presentes, sino que además, por los variados efectos sinérgicos o inhibitorios que se producen entre estos componentes y el ambiente al cual pertenecen (ZUÑIGA, 2005).

POURMORAD *et al.* (2006) calculó valores de IC₅₀ en extracto de *Mellilotus officinalis* (18 µg/mL) y estándares puros de BHT (40 µg/mL), Quercetina (0,25 µg/mL), también RAMOS (2003) y SANDOVAL *et al.* (2002b) calcularon valores de IC₅₀ en extracto acuoso de *Camellia sinensis* (32 µg/mL) y *Uncaria guianensis* (13 µg/mL), respectivamente. Así mismo (VILLANUEVA, 2003), calculó valores de IC₅₀ para los extractos acuosos de cáscara de camu camu maduro, pintón y verde, obteniendo 114,2 µg/mL, 46,20 µg/mL y 117,8 µg/mL, respectivamente. Según los resultados (Cuadro 11) se observa que la pulpa de camu camu maduro presentó el mejor coeficiente de inhibición con respecto a las muestras de pulpa pintón de camu camu ($p < 0,05$), extracto acuoso de cáscara de camu camu maduro, pintón, verde, *Mellilotus officinalis*, *Camellia sinensis* y estándar puro de BHT, siendo superados por el extracto acuoso de *Uncaria guianensis* y quercetina; sin embargo las muestras investigadas presentan una eficiente actividad antioxidante para proteger las células contra el estrés oxidativo, ya que están en el rango de la eficiencia de *Camellia sinensis* (32 µg/mL) y *Uncaria guianensis* (13 µg/mL), ideales para desarrollar alimentos o bebidas funcionales.

– Poder antiradical

El valor de ARP, en parte explica la capacidad que tiene el antioxidante, para neutralizar un radical libre (donación de hidrógenos), teniendo una relación directa con la acción inhibidora (BRAND WILLIAMS *et al.*, 1995). El valor del ARP para la pulpa pinto y maduro al 0 día fue $6,1 \pm 0,14$ y $6,9 \pm 0,1$; y a los 90 días fue $6,2 \pm 0,1$ y $7,4 \pm 0,1$, respectivamente. BRAND WILLIAMS *et al.* (1995), calcularon el ARP con estándares puros de ácido cafeico, ácido protocatequina, ácido rosmarico, BHT, BHA obteniendo valores de 9,1; 7,1; 6,9; 4,2; 4,1 respectivamente. Se puede observar que la pulpa maduro tiene mejores valores de ARP que los compuestos puros de ácido protocatequina, ácido rosmarico, BHT, BHA; solo siendo superado por el ácido cafeico. Para un mejor entendimiento del ARP, se presenta la simulación de reacción del ácido ascórbico frente al radical DPPH, usando el Software Hyperchem Ver 6.01, Calculando las propiedades fisicoquímicas, mediante los descriptores de energía del orbital de alta ocupación molecular (E_{HOMO}) y energía del orbital de baja ocupación molecular (E_{LUMO}), carga del electrón, potencial electrostático; determinando así la relación entre la estructura – actividad (Figura 12) (VILLANUEVA, 2005), que correlacionan con la actividad biológica (WEBB *et al.*, 2000).

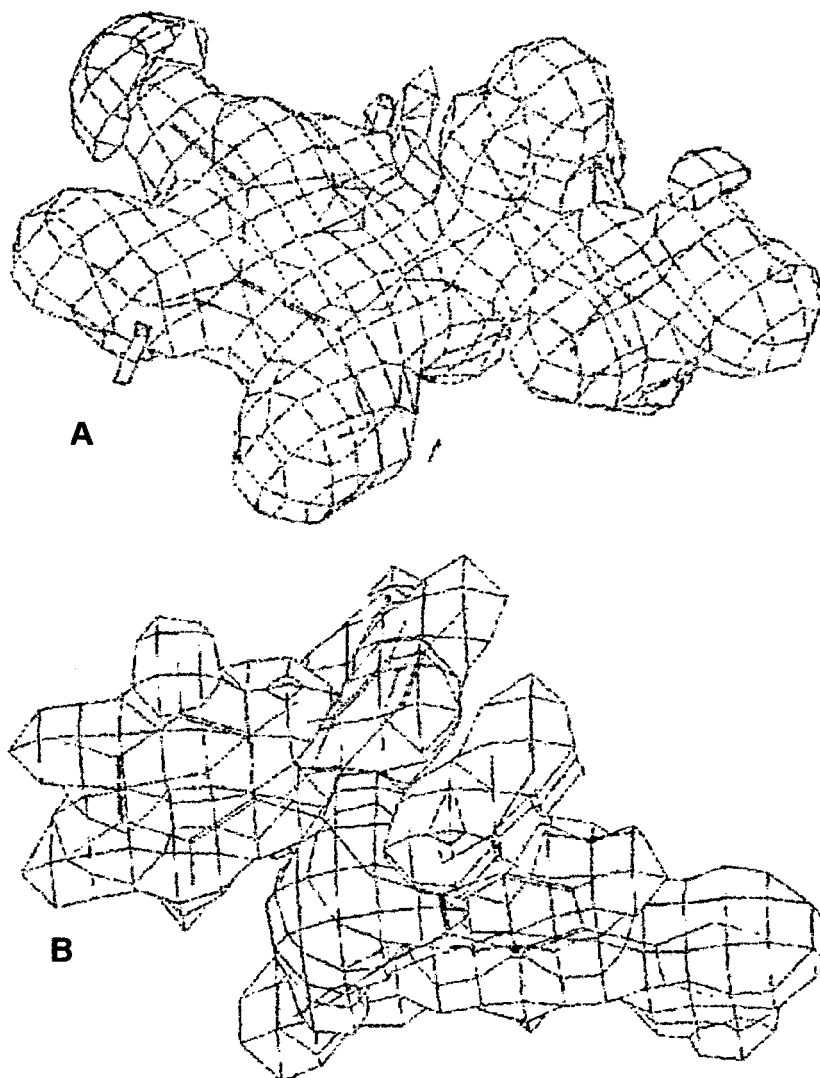


Figura 12. Potencial electrostático 3D (A) ácido ascórbico (B) radical DPPH, optimizado mediante mecánica molecular. Color verde (menor capacidad oxidante), color fucsia (con menor capacidad reductora).

ascórbico (5,19 eV) (Figura 13), en la cual, el contorno de color verde, representa la región positiva, con menor capacidad oxidante, mientras que la región fucsia, con menor capacidad reductora, representa la región desfavorable en la zona estérica.

Produciéndose una cesión de transferencia de electrones del doble enlace, hacia el oxígeno, que quedo oxidado, repitiendo la misma acción en el siguiente átomo de oxígeno, que sufrió la perdida de la molécula de hidrógeno, hasta establecerse el equilibrio de energía.

De acuerdo a esta reacción, el ácido ascórbico cede dos hidrógenos, aplicando así su eficiente como un excelente antioxidante.

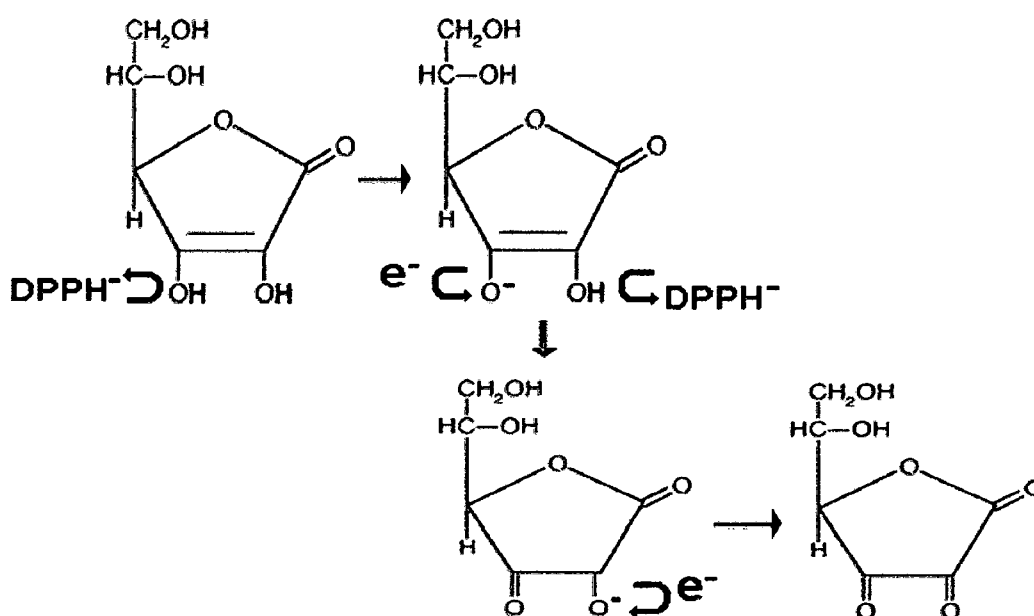


Figura 14. Mecanismo de reacción del ácido ascórbico frente al radical DPPH evaluado mediante simulación con hyperchem.

4.7.2. Radical Peroxílo

– Coeficiente de Inhibición (IC_{50})

Se muestran en el Cuadro 12 los valores del coeficiente de

inhibición (IC₅₀), calculados mediante un análisis de regresión lineal (Anexo III, Figura 22, 23, 24 y 25).

Cuadro 12. Valores de IC₅₀ de la pulpa pintón y maduro de camu camu frente al radical peroxílo, evaluados durante 90 días de almacenamiento a - 10°C.

Almacenamiento	Pulpa	IC ₅₀ (µg/mL) ¹	AAE ² (ppm)
		Peroxílo	Peroxílo
0 días	Pintón	5,3 ± 0,08 ^{ab}	1,1 ± 0,13
	Maduro	4,1 ± 0,13 ^{1a}	0,9 ± 0,01
90 días	Pintón	5,6 ± 0.05 ^{ab}	1,2 ± 0.08
	Maduro	4,1 ± 0.05 ^{1a}	0,9 ± 0.03

¹Datos expresados en media ± SD, n=3, (a-b,1-2) diferencia significativa p<0,05, evaluado mediante una prueba de t, student's. Medido luego de 5 minutos de reacción. AAE²: ácido ascórbico equivalente, ppm.

Los valores de IC₅₀ para la pulpa pintón y maduro de camu camu al 0 día fue de 5,3 ± 0,08 µg/mL y 4,1 ± 0,05 µg/mL; y a los 90 días fue 5,6 ± 0.05 µg/mL y 4,1 ± 0.13, respectivamente (p<0,05) como se observa en el Cuadro 12, estos resultados muestran que no hay diferencia significativa (p<0,05) en la actividad antioxidante frente al radical peroxílo durante el almacenamiento tanto en la pulpa pintón y maduro de camu camu; demostrando así que el ácido ascórbico y los polifenoles no son los únicos responsables de la actividad antioxidante frente al radical peroxílo, suponiendo la acción de terceros componentes (KAHKOMEN *et al.*, 1999; ZHENG y WANG, 2001).

SANDOVAL *et al.* (2002a) y SANDOVAL *et al.* (2002b), evaluó la actividad antioxidante de *Lepidium meyenii* y *Uncaria guianensis*, frente al

radical peroxílo obteniendo un valor de IC₅₀ de 430 µg/mL y 4,8 µg/mL, respectivamente. Así mismo VILLANUEVA (2003) evaluó extracto acuoso de cáscara de camu camu pintón frente al radical peroxílo, obteniendo un IC₅₀ de 22,1 µg/mL. Según los resultados (Cuadro 12) se puede afirmar que la pulpa maduro de camu camu muestra una mayor actividad antioxidante frente al radical peroxílo en comparación con la pulpa pintón ($p < 0,05$), *Lepidium meyenii*, *Uncaria guianensis* y extracto acuoso de cáscara de camu camu pintón. Se puede indicar también que las muestras en experimento contribuyen a la disminución de la formación de radical peroxílo.

V. CONCLUSIONES

- Durante los 90 días de almacenamiento a -10°C la variación de la actividad antioxidante en pulpa pintón y maduro de camu camu fue no significativo frente al radical DPPH y peroxilo, respectivamente ($p < 0,05$).
- La pulpa pintón y maduro de camu camu presentó una pérdida de ácido ascórbico no significativo, respectivamente ($p < 0,05$), después de los 90 días de almacenamiento a -10°C . Durante los 90 días de almacenamiento a -10°C en la pulpa pintón de camu camu no se observó diferencia significativa en la pérdida de polifenoles totales ($p < 0,05$), mientras que en la pulpa maduro la diferencia fue altamente significativo con una pérdida del 42,12% de polifenoles totales ($p < 0,05$). La variación de la catequina durante los 90 días de almacenamiento es no significativo en la pulpa pintón y en la pulpa maduro la variación es significativo ($p < 0,05$), mostrándose una pérdida del 31,56% de catequina. De las muestras evaluadas la pulpa maduro de camu camu presentó la mayor actividad antioxidante con valores de $\text{IC}_{50} = 13,5 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ y $4,1 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ frente al radical DPPH y peroxilo, respectivamente ($p < 0,05$); el mayor contenido de ácido ascórbico con valor de $1931.32 \pm 27.6 \text{ mg} / 100\text{g}$ pulpa ($p < 0,05$); el mayor contenido de polifenoles totales con valor de $248,1 \pm 0.66 \text{ mg (+)-Catequina Equivalente} / 100 \text{ g}$ pulpa ($p < 0,05$) y el mayor contenido de catequina con valores de $18,09 \pm 0,58 \text{ mg (+) Catequina} / 100\text{g}$ pulpa ($p < 0,05$).

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad antioxidante de la pulpa de camu camu, usando el radical hidroxilo (OH°), peroxinitrito, capacidad de absorbanza de radicales oxígeno (ORAC), peroxidación lipídica y poder antioxidante reductor de hierro (FRAP).
- Realizar pruebas in vivo (cultivos celulares), debido a que la muestra en estudios demostró tener buena eficiencia para neutralizar los radicales peroxilo, siendo estos responsables del daño celular.
- Evaluar el contenido de antocianinas (Malvidin 3,5-diglycoside, Cyanidin 3-glycoside, Pelargonidin) y carotenoides (β -caroteno) en pulpa de camu camu.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- AHERNE, S. A., O'BRIEN, N. M. 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *J. Applied basic Nutr. Sci.* 18:75-81.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11.ed. Washington: AOAC, 1995. 1115p.
- ARÉVALO, R., QUAST, L., KIECKBUSCH, T. 2006. Viscosidad Aparente de la Pulpa de Camu-Camu (*Myrciaria dubia*) in natura y con Pré-Tratamiento Térmico. XXII IACCHE (CIIQ) 2006 / V CAIQ. Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP-CEP, SP – Brasil. 12p.
- AVELLO, M., SUWALSKY, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Revista Atenea.* 2: 161- 172
- BENÍTEZ, D. 2006. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed* 25(2): 1- 8.
- BIDWELL, R. G. S. 1990. *Fisiología Vegetal.* A.G.T. Editor. México, D.F. p. 784
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss Technol.* 28: 25-30.
- CALZADA, B.1976. *Métodos Estadísticos.* Lima s.n Tercera Edición. 640p.
- CELIS, C., PINO, J., CLARA E. 2007. Constituyentes volátiles de las hojas de Camu-Camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K.). *Rev. Cubana de*

Química. 19(1): 52-53.

- CUNHA, H., ELESBÃO, R., CORDEIRO DE OLIVEIRA, A., HERBSTER, C., COSTA, A. 2001. Calidad de Frutas Nativas de Latinoamérica para Industria: Jobo (*Spondias mombin* L.). Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. 43:72-76.
- DEL PILAR, P. M., FISCHER, G., CORREDOR G. 2007. Determination of the maturity stages of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.). Agron. Colomb. 25(1): 83-95.
- DIB TAXI, A. M. C. 2001. Suco de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K.) Microencapsulado obtido através de secagem por atomização, tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil. p. 166.
- DING, M., YANG, H., XIAO, S. 1999. Rapid Direct Determination of Polyphenols in Tea by Reversed-Phase Column Liquid Chromatography. J. Chrom. A, (849) 637-640.
- DREOSTI, I. E. 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. Nutrition. 16(7-8): 692-694.
- EBERHARDT, M., LEE, C., LIU, C. 2000. Antioxidants activity of fresh apples. Nature. 405: 903-904.
- ELEJALDE, J. 2001. Oxidación entre la vida y la enfermedad. An. Med. Interna. Madrid. 18(1): 1- 4.
- ELESBÃO, R., CUNHA, H., HERBSTER, C., COSTA, N., SILVA, A. 2002. Camu-Camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K.): A Rich Natural Source of Vitamin C. Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. Brazil, 46:11-13.

- FLORES, P. S. 1997. Cultivo de frutales amazónicos, manual para el extensionista. Tratado de cooperación amazónica. Secretaria pro tempore. Lima – Perú. 45pp.
- FRIDOVICH, I. 1975. Superoxide dismutases. *Science*. 44:147-159.
- GARCIA, B., GARCIA, G., ROJO, D., SANCHEZ, G. 2001. Plantas con Propiedades Antioxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 20(3): 231- 235.
- GÖKMEN, V., KAHRAMAN, N., DEMIR, N., 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.
- GONZÁLES-TORRES, M., BETACOURT-RULE, M., ORTIZ-MUÑIZ, R. 2000. Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica. Universidad Autónoma Metropolitana. Mexico*. 25 (1): 3-9.
- GUIJA, H., TRONCOSO, L., GUIJA, E. 2005. Propiedades prooxidantes del Camu Camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K). *Revista científica de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. 66 (6): 261-268.
- HALLIWELL, B., MARCIA, M., CHIRICO, S., AUROMA, L. 1995. Free Radicals and Antioxidants in Food and in Vivo; GAT they Do and How they Work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 35(1-2): 7-20.
- HERTOG, M., FESKENS, E., HOLLMAN, P., KATAN, M., KROMHOUT, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet*; 342(8878):1007-1011.
- HORIE, H., KOHATA, K. 2000. Analysis of tea components by high

- performance liquid chromatography and high – performance capillary electrophoresis. *J. Chrom A*: 881(1- 2): 425 – 438.
- INGA, H., PINEDO, M., DELGADO, C., LINARES, C., MEJÍA, K. 2001. Fenología Reproductiva de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K.) *Folia Amazónica IIAP*. 12 (1-2): 99-106.
- JHONSON, L.1995. Food technology of the antioxidant nutrients. *Crit. Rev. Food Sci Nutr*. 35(1 - 2):149-159.
- JUSTI, K. C., VISENTAINER, J. V., SOUZA, N. E., MATSUSHITA, M. 2000. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu–camu (*Myrciaria dubia*) pulp. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 50: 405 - 408.
- KAHKOMEN, M., HOPIA, A., VUORELA, H., RAHUA, J., PIHLAJA, K., KUJALA, T., HEINONEN, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*. 47(10): 3954–3962.
- KIECKBUSCH, T., DA SILVA, M., SOBRAL, P. 2006. Water Sorption And Glass Transition Of Freeze-Dried Camu-Camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K.) pulp. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 84(2): 435–439.
- KISPERT, L., POLYAKOV, N., LESHINA, T., KONOVALOVA, T. 2001. Carotenoids as scavengers of free radicals in fenton reaction. Antioxidants or pro-oxidants. *J. Free. Rad. Biol. Med*. 31(3): 398-404.
- LEE, H., CHEN, CH. 1998. Rates of vitamin C loss and discoloration in clear orange juice concentrate during storage at temperature of 4- 24°C. *J.*

- Agric. Food Chem. 46 (11):4723- 4727.
- LING, L., ZHAO, S., GAO, M., ZHOU, Q., LI, Y., XIA, B. 2002. Vitamin C preserves endothelial function in patients with coronary heart disease after a high-fat meal. Clin Cardiol. 25 (5): 219-224.
- MARTÍNEZ-FLÓRES, J., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. M., CULEBRAS, J., TUÑÓN, M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. 17(6): 271-278.
- MARTÍNEZ - VALVERDE, I., PERIAGO, M., ROS, G. 2000. Significado Nutricional de los Compuestos Fenólicos de la Dieta. Arch. Latinoam. Nutr. 50(1): 5-15.
- MITCHAM, E., CANTWELL, M., KADER, A. 2003 Methods for determining quality of fresh commodities. Perishables Handling Newsletter, 85: 1-5.
- MONCADA, S., HIGGS, A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. N. Engl.J. Med.; 329: 2002-2011.
- NADEEM, A., CHABRA, S., MASOOD, A., RAJ, H. 2003. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. J. Allergy Clin Immunol. 111(1):72-78.
- NIELSEN, S. 1998. Food analysis 2^{da}. Edic. Edit. Services Ruthbloom. USA. pp. 487 – 526.
- O'REILLY, J., MALLETT, A., MCANLIS, G., YOUNG, I., HALLIWELL, B., SANDERS, T., WISEMAN, H. 2001. Consumption of Flavanoids in onions and Black Tea Lack of Effect on F2- isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. Am. J. Clin. Nutr. 73 (6): 1040-1044.

- PARKS, D., BOOYSE, F. 2002. Cardiovascular protection by alcohol and polyphenols : role of nitric oxide. *Ann NY Acad. Sci.* 957:115-121.
- PERÓN, J., LÓPEZ, J., LÓPEZ, Y. 2001. Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar.* 30 (1): 15 - 20.
- PONGSAWATMANIT, R., MAISUTHISAKUL, P., SUTTAJIT, M. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem.* 100: 1409–1418.
- POURMORAD F., HOSSEINIMEHR S., SHAHABIMAJD N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5 (11) 1142-1145.
- QUIÑONES, A. 1991. Características de fertilidad de los suelos venezolanos vista a través de los resúmenes de análisis rutinarios. IV disponibilidad de micronutrientes (cobre, zinc, hierro y manganeso) en la región oriental. FONAIAP - Estación Experimental Anzoátegui. Serie C. No 35. 24 p
- RADI, M., MAHROUZ, M., JAOUAD, A. 1997. Phenolic composition, browning susceptibility and carotenoid content of several apricot cultivars at maturity. *HortScience* 32: 1087-1091.
- RAMOS, F. 2003. Diseño y evaluación de la capacidad antioxidante in vitro de una bebida en base a te verde (*Camellia sinensis*) y hierba luisa (*Cymbogon citratus* staph). Tesis para obtener el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Tingo María- Perú.
- RAPAPORT, S. I. 1993 *Introducción a la Hematología*. 2.ed. México. p. 216-218

- RIVA, R., GONZÁLES, R. 1996. Tecnología del Cultivo de Cama Camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) en la Amazonía Peruana. Ministerio de Agricultura. Perú. 40p.
- RODRÍGUEZ, J., MENÉNDEZ, J., TRUJILLO, Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cub. Med. Milit. 30(1):15-20.
- RODRIGUEZ, R. B. 2002. Aplicacao dos procesos de separacao por membranas para producao de suco clarificado e concentrado de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K.). Dissertacao (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil. 146p.
- SALISBURY, F., ROSS, C. 1996. Fisiología Vegetal. Grupo editorial Iberoamericana. México. 759 p.
- SANDOVAL, M. 1994. Aplicación de la Espectrofotometría de Absorción/ Emisión Atómica en Programas de Investigación en Agricultura, Biología y Medicina. Louisiana State University, School of Medicine Department of Pediatrics. 1-34p.
- SANDOVAL, M., OKUHAMA, N., ANGELES, F., MELCHOR, V., CONDEZO, L., LAO J., MILLER, M. 2002a. Antioxidant Activity of the Cruciferous Vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). Food chem. 79: 207-213.
- SANDOVAL, M., OKUHAMA, N., ZHANG, X., CONDEZO, L., LAO J., ANGELES, F., MUSAH, R., BOBROWSKI, P., MILLER, M. 2002b. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. Phytomedicine. 9: 325- 337.
- SARDI, B. 2004. High-dose vitamin C and iron overload. Ann Intern Med. 140,

10: 6 - 7.

- SERRA, E., TRÍBO, M. 1991. Antioxidantes. *Nutrición Clínica. Escuela de Nutrición. Universidad de Granada Actualidad Dermatológica.* 21-27.
- SHETTY, K., RANDHIR, R., VATTEM, D. 2005. Antioxidant enzyme response studies in H₂O₂-stressed porcine muscle tissue following treatment with oregano phenolic extracts. *Process Biochemistry.* 40: 2123 – 2134.
- SIES, H. 1997. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. USA. Academia Press Inc. 38: p. 293
- SIES, H., STHAL, W., SUNDQUIST, R. 1992 Antioxidant functions of vitamins E and C, b-carotene and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci.* 30; 669: 7-20.
- THOMAS, M. 2000. The Role of Free Radicals and Atioxidants Nutrition. 16 (7 - 8): 716-718.
- TISKOW, D. G. 1996 Radicales libres en biología y medicina: una breve revisión. *Rev. Cub. Med. Milit;* 2: 44-57.
- UNIDAD DE DESARROLLO DE LA AMAZONIA (UDA). 2000. Programa Nacional de camu camu 2000-2020. Presidencia de la Republica. Ministério de Agricultura-Instituto Nacional de Recursos Naturales. pp. 5-12.
- VAJRAGUPTA, O., BOONCHOONG, P., WONGKRAJANG, Y. 2000. Comparative quantitative structure-activity study of radical scavengers. *Bioorganic and chemistry.* 8: 2617- 2628.
- VASCONCELLOS, A. 2001. Alimentos funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. *the workd of food science.* 3: 1-17.

- VILLACHICA, L. 1996. El cultivo de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K) en la Amazonia Peruana. Tratadote Cooperación Amazónica. Secretaria Pro-Tempore. Lima- Perú.95p.
- VILLANUEVA, J. 2003. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenóles totales y actividad antioxidante en la cascara de camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K). Trabajo de tesis para Optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo Maria - Peru.
- VILLANUEVA, J., LEANDRO C., ALFARO S. Determinación de la relación entre la estructura química y la actividad biológica de flavonoides. In: VII Congreso Nacional de Ciencias y Tecnología de Alimentos (2005, Lambayeque, Perú). 2005. Universidad Pedro Ruiz Gallo. p. 1- 6.
- WEBB, R., DURST, G., PERNICH, D., HALL, CH. 2000. linteraction of ciclohexanediones with acetyl coenzyme A carboxylase and an artificial target site antibody mimic: a comparative molecular field analysis. J. Agric. Food Chem. 48: 2506- 2511.
- WEISBURGER, J. H. 1999. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables tomatoes and tea. Food Chem. Toxicol. 37: 943-948.
- WHEELER, O., JONES, M., SMIRNOFF, N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Letters to nature. 393: 365-368.
- WINTERBOURN, C. 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the fenton reaction. Toxicol Lett; 82: 969-974.
- ZAPATA, S., DUFOUR, J. 1993. Camu camu (*Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K)

chemical composition of fruit. *J. Agric. Food Chem.* 61:348-351.

ZÚÑIGA, M. C. 2005. Caracterización de fibra dietaria en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. Trabajo de tesis para Optar el Título de Ingeniero agrónomo mención: enología. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

ZHENG, W., WANG, S. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in select herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49 (11): 5165 - 5170.

VIII. ANEXO

Anexo – I

Cuadro 13. Comparación de pH, °Brix y % acidez en muestras de camu camu de acuerdo al estado fisiológico.

Camu camu	pH		°Brix		% Acidez	
Pintón	2,30± 0,1*	2.67**	5,52±0,04*	5.5**	2,82± 0,03*	2.98**
Maduro	2,36± 0,2*	2.69**	6,83±0,04*	7.5**	3,10± 0,02*	3.11**

*Datos obtenidos experimentalmente, n = 3 ± SD; ** Datos obtenidos por Villanueva (2003).

Cuadro 14. Comparación de índice de madurez en muestras de camu camu de acuerdo al estado fisiológico.

Camu camu	Índice de madurez		
Pintón	1,957 ± 0,024*	1.80**	1.90***
Maduro	2,203 ± 0,029*	2.20**	2.41***

*Datos obtenidos experimentalmente, n = 3 ± SD; ** Datos obtenidos por Villanueva (2003); *** Datos obtenidos por Zapata y Dufour (1993).

Anexo - II

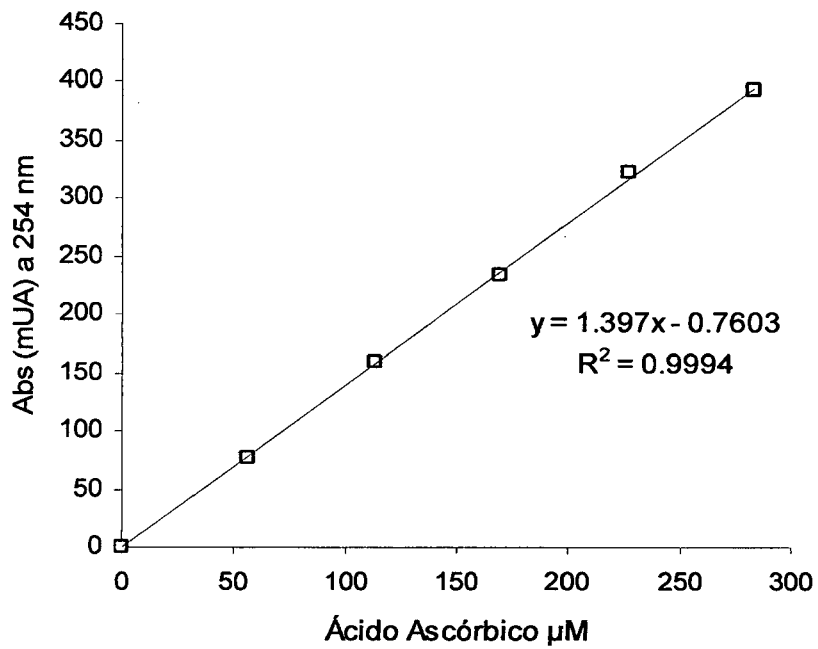


Figura 15. Curva patrón para la cuantificación de ácido ascórbico por HPLC.

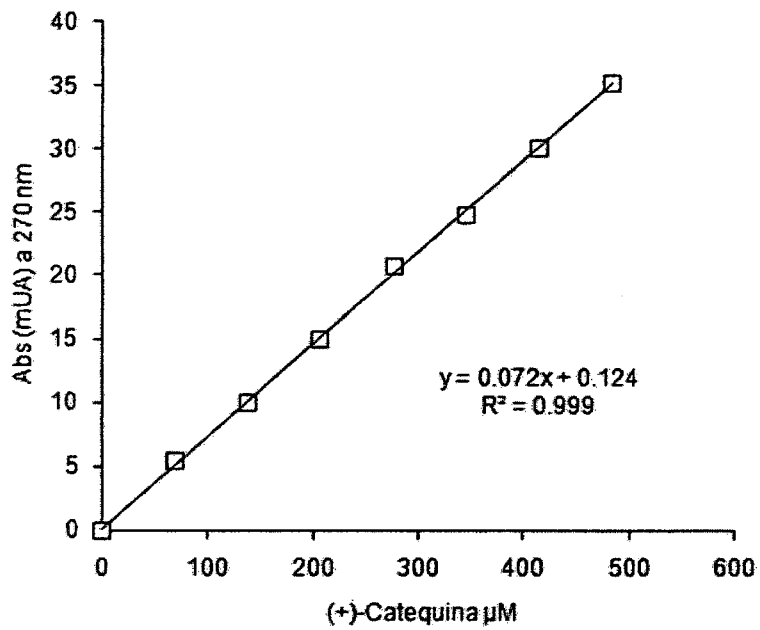


Figura 16. Curva patrón para la cuantificación de (+)-catequina por HPLC.

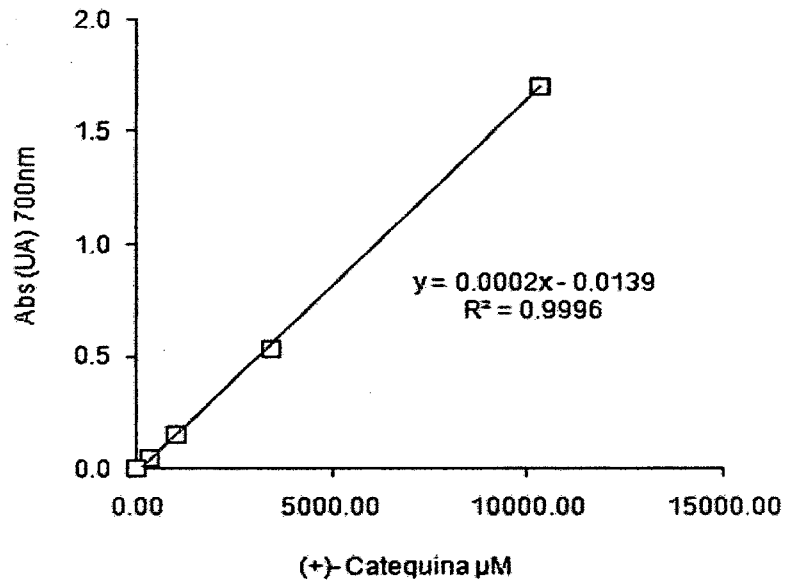


Figura 17. Curva patrón para la cuantificación de polifenoles totales.

Anexo - III

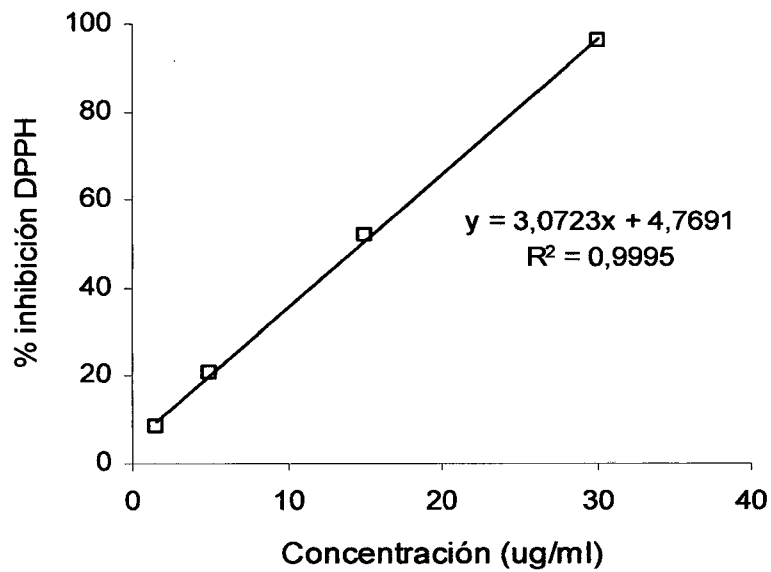


Figura 18. Porcentaje de inhibición de la reacción del radical DPPH frente a las diferentes concentraciones de la pulpa maduro de camu camu al 0 día.

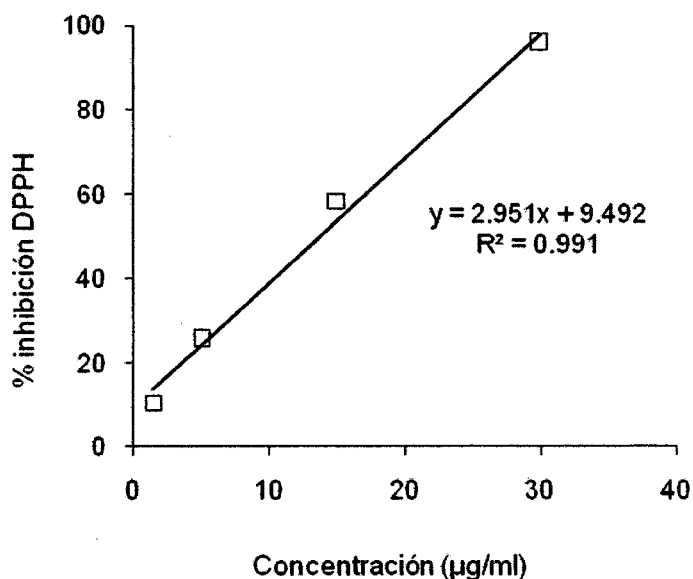


Figura 19. Porcentaje de inhibición de la reacción del radical DPPH frente a las diferentes concentraciones de la pulpa maduro de camu camu a los 90 días.

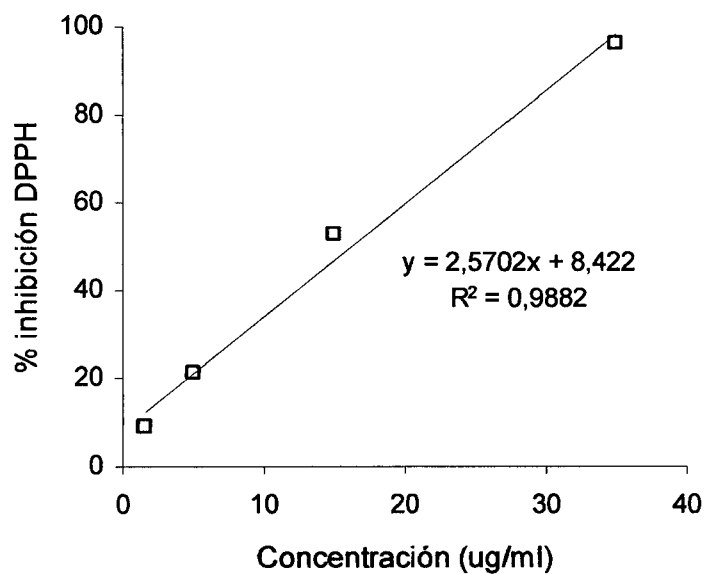


Figura 20. Porcentaje de inhibición de la reacción del radical DPPH frente a las diferentes concentraciones de la pulpa pintón de camu camu al 0 día.

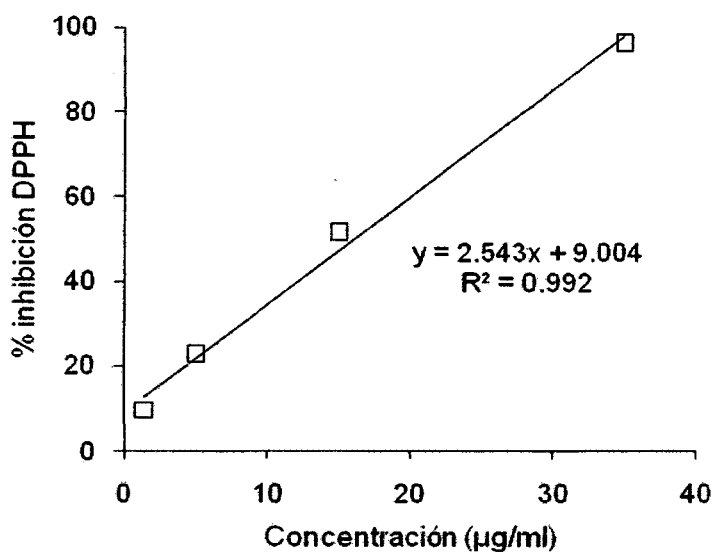


Figura 21. Porcentaje de inhibición de la reacción del radical DPPH frente a las diferentes concentraciones de la pulpa pintón de camu camu a los 90 días.

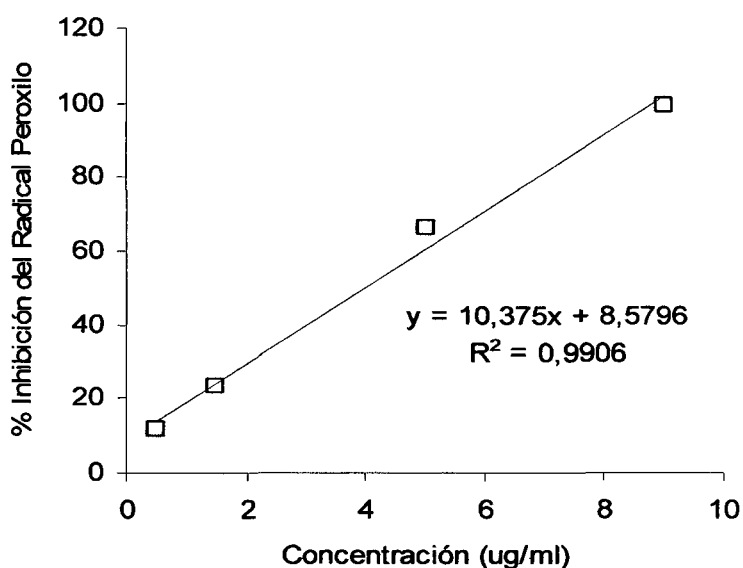


Figura 22. Porcentaje de inhibición de la reacción del radical peróxido frente a las diferentes concentraciones de la pulpa maduro de camu camu al 0 día.

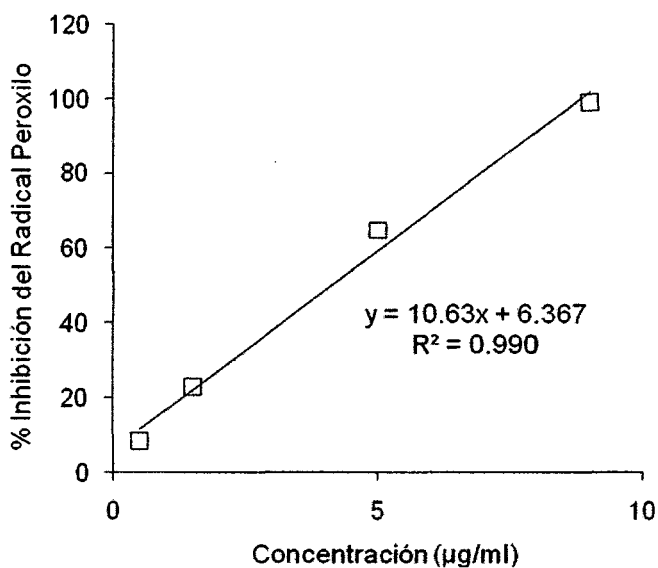


Figura 23. Porcentaje de inhibición de la reacción del radical peróxido frente a las diferentes concentraciones de la pulpa maduro de camu camu a los 90 días.

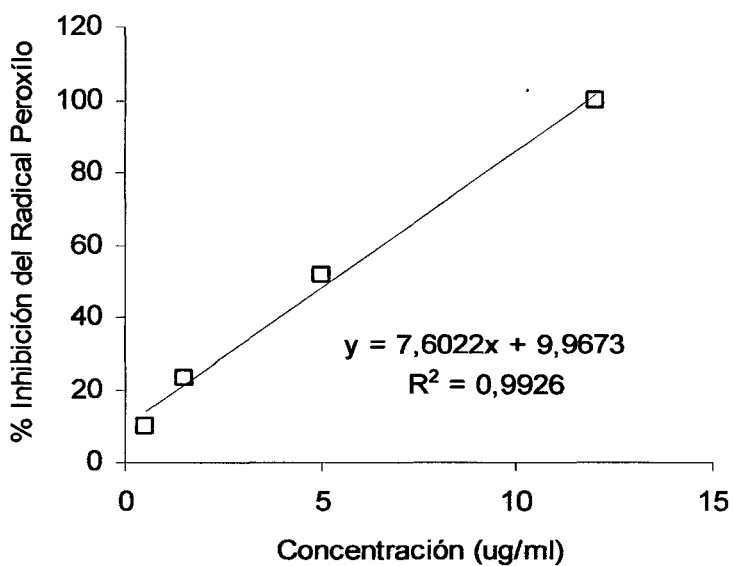


Figura 24. Porcentaje de inhibición de la reacción del radical peróxido frente a las diferentes concentraciones de la pulpa pintón de camu camu al 0 día.

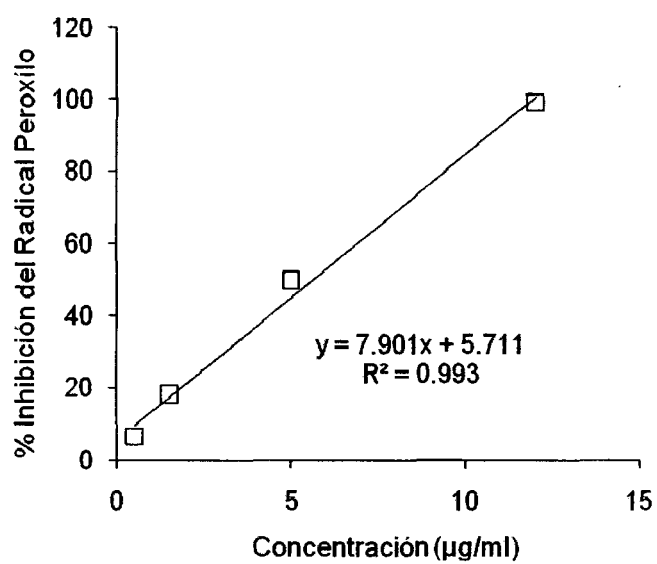


Figura 25. Porcentaje de inhibición de la reacción del radical peróxido frente a las diferentes concentraciones de la pulpa pintón de camu camu a los 90 días.

ANEXO - IV

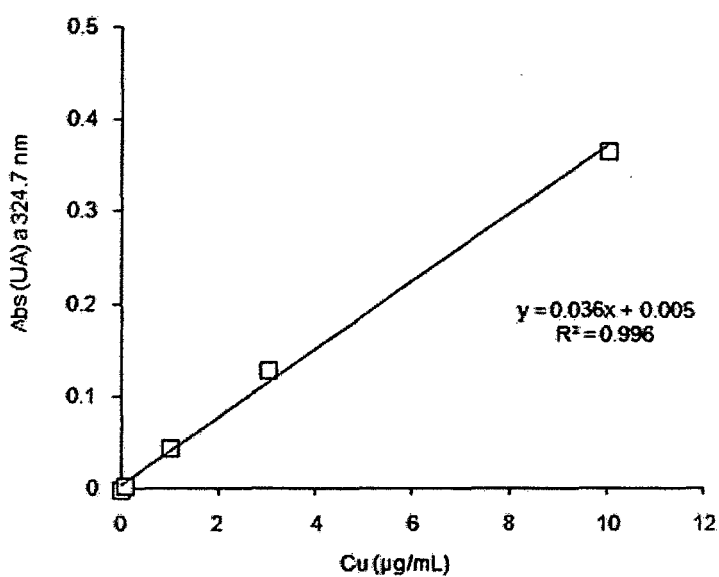


Figura 26. Curva patrón para la cuantificación de Cu por espectrofotometría de absorción atómica.

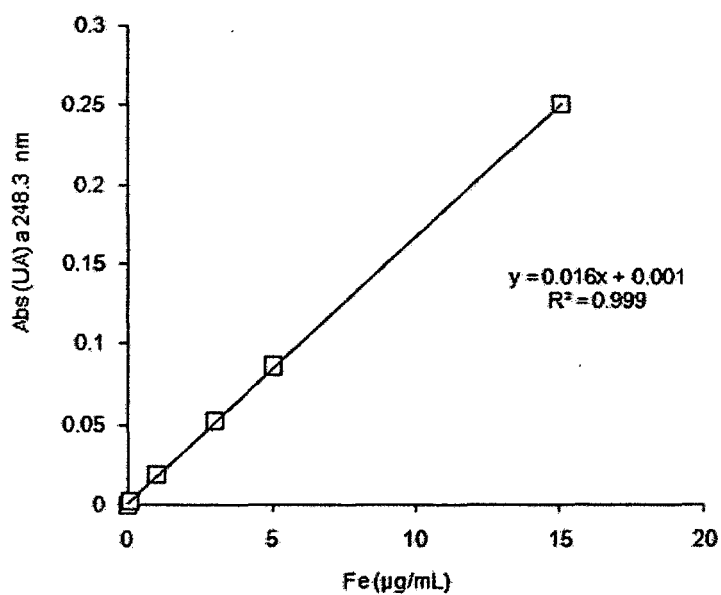


Figura 27. Curva patrón para la cuantificación de Fe por espectrofotometría de absorción atómica.

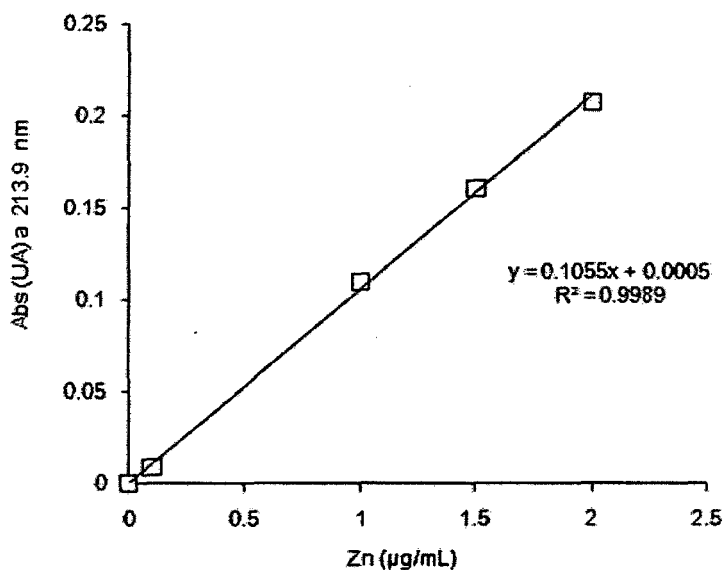


Figura 28. Curva patrón para la cuantificación de Zn por espectrofotometría de absorción atómica.

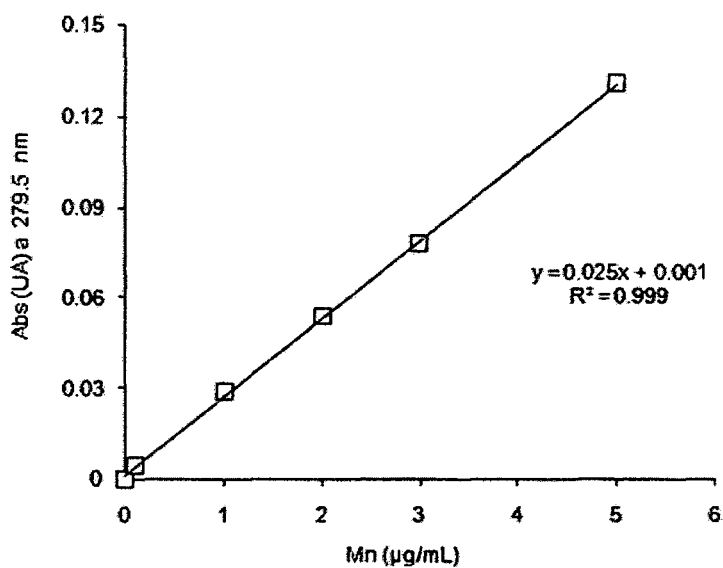
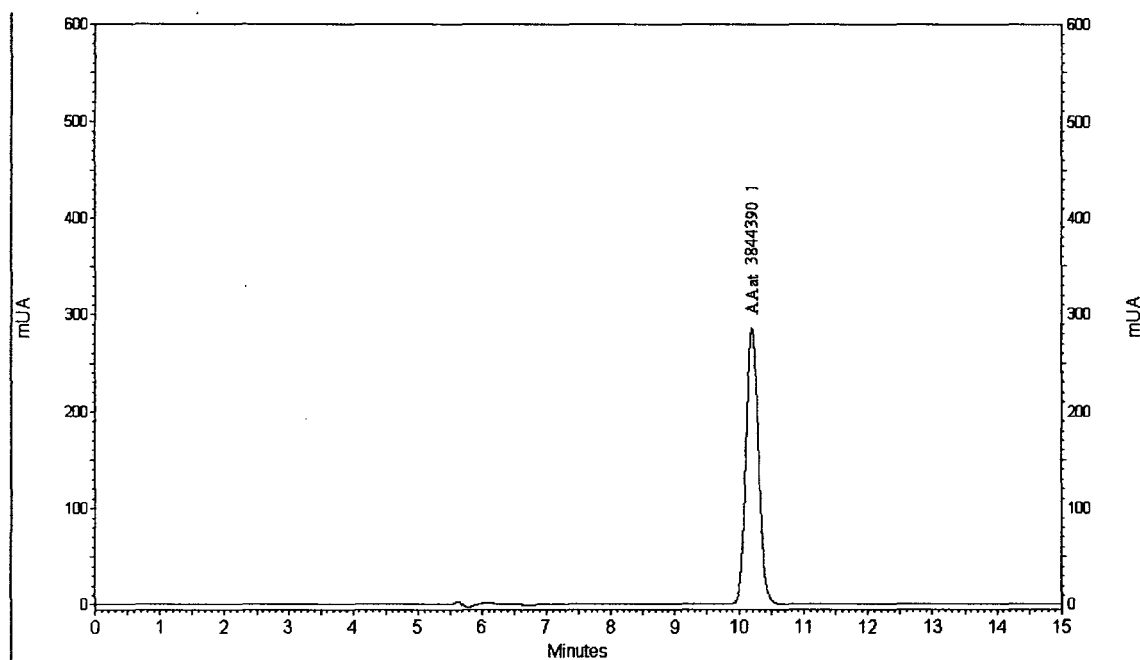
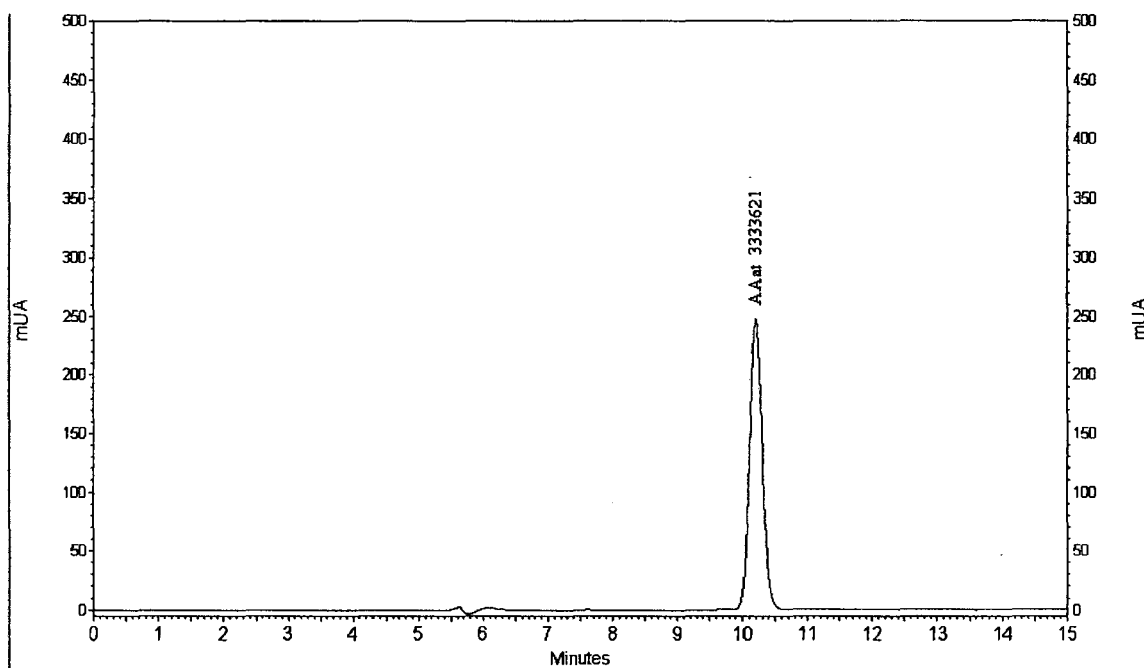


Figura 29. Curva patrón para la cuantificación de Mn por espectrofotometría de absorción atómica.

ANEXO – V



(A)



(B)

Figura 30. Cromatograma del ácido ascórbico, detectado mediante el Software de interfase CLASS – VP del HPLC en pulpa maduro (A) y pintón (B) de Camu camu.