

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA DE
ALIMENTOS**



**“Cuantificación de ácido ascórbico por HPLC y
evaluación de la capacidad antioxidante en pulpa
fresca y concentrada de Taperibá (*Spondias cytherea***

***Sonn*)”**

TESIS

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Presentado por:

KAREM LILIANA GARCÍA VILLEGAS

PROMOCIÓN 2007 – II

Tingo María – Perú

2010

F60

G25

García Villegas, Karem L.

Cuantificación de Ácido Ascórbico por HPLC y Evaluación de la Capacidad Antioxidante en Pulpa Fresca y Concentrada de Taperibá (*Spondias cytherea* Sonn). Tingo María 2010

63 h.; 7 cuadros; 16 fgrs.; 67 ref.; 30 cm.

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

SPONDIAS CYTHEREA SONN / ANTIOXIDANTE / ACIDO ASCORBICO /
POLIFENOLES TOTALES / PULPA FRESCA / RADICALES LIBRES / TINGO
MARIA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUANUCO / PERU.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

Tingo María

FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

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

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

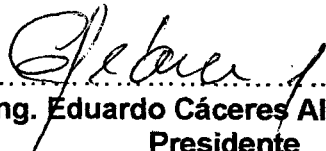
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 09 de Julio de 2010, a horas 7:00 p.m. en la Sala de Audiovisuales de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por la Bach. **GARCIA VILLEGAS, Karem Liliana**, titulada:

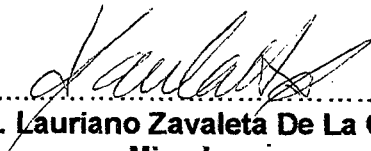
“CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR HPLC Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PULPA FRESCA Y CONCENTRADA DE TAPERIBÁ (*Spondias cytherea* Sonn)”

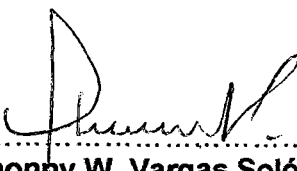
Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de **MUY BUENO** en consecuencia la Bachiller, queda apta para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con 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, 23 de Noviembre de 2010


.....
Ing. Eduardo Cáceres Almenara
Presidente


.....
Ing. Yolanda J. Ramírez Trujillo
Miembro


.....
Ing. Lauriano Zavaleta De La Cruz
Miembro


.....
Ing. Jhonny W. Vargas Solórzano
Asesor

DEDICATORIA

A Dios por ser la luz que me alumbra cada día, por ser amor y verdad.

A mis queridos padres Julian García Céspedes y Marianela Villegas de García, mi eterno agradecimiento por su ejemplo de trabajo, por su comprensión y abnegado esfuerzo que hicieron posible que llegara a ser una profesional.

A mis recordados y queridos abuelitos Lucas Villegas Chávez y Emilia Maraví Rodríguez, por estar siempre a mi lado.

A mis hermanos: Elaine, Christian y Melissa; por su comprensión y sus sabios consejos.

A mi hijito Lucas Julian; por ser la razón de mi vida con todo el amor del mundo.

AGRADECIMIENTO

Primero a Dios que me dio la fuerza para seguir adelante, a mis padres, hermanas(os), a mis abuelitos y a mi querido hijito, por su amor, apoyo y paciencia, porque siempre estuvieron durante todo el transcurso de mi carrera y a lo largo de mi vida.

Al Doctor: Manuel Sandoval Chacón y al ingeniero: Jhony Vargas Solórzano, por su enseñanza, amistad, orientaciones, sabios consejos y por confiarme la realización de esta investigación; por su buena disposición y colaboración con sus conocimientos y con el material bibliográfico y por su ayuda desinteresada durante el desarrollo de algunas de las técnicas empleadas en la realización de este trabajo.

A todos los docentes que aportaron en mi formación profesional y humana a lo largo de la carrera a: F. Mamani (Q.E.P.D.), M. Alcedo, Y. Ramírez; W. Paredes, R. Matos; P. Peláez, J. Castro, E. Cáceres, A. Carmona, A. Ortega, E. Ordoñez, M. Follegatti, J. Vargas, L. Zavaleta, R. Natividad, G. Daza, J. Basilio, C. Leandro Laguna, entre otros.

A los compañeros de estudio y amigos: Elaine, Gisela, Marielena, Carlos, Marco, Manuel, Felix, Victor, Jackeline, Carolina, Sandra, entre otros, por su

alegría y amistad entregadas, durante la ejecución de la tesis y a lo largo de estos años en la universidad.

Al resto de los integrantes de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias por contribuir en este proyecto y por hacer más amenos los días de trabajo.

A los señores: Carlos, Lucas, Juan, Aurelia, Celedonio, Concepción, Glelea, Diana, Zoila y Nidia, por su gran ayuda en esos pequeños, pero importantes detalles que facilitaron el trabajo en los diversos laboratorios y planta piloto.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Taperibá	3
2.1.1. Aspectos generales.....	3
2.1.2. Aspectos botánicos.....	3
2.1.3. El fruto.....	4
2.1.4. Usos.....	5
2.2. Concentración de alimentos.....	6
2.3. Radicales libres.....	7
2.4. Antioxidante.....	9
2.5. Polifenoles.....	13
2.6. Ácido ascórbico.....	14
2.7. Radical 1, 1 diphenyl -2- picrylhidrazyl (DPPH°).....	15
2.8. Radical 2,2 azinobis -3- ethylbenzotiazolina -6- acido sulfónico (ABTS°+).....	16
2.9. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC).....	17

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Lugar de ejecución.....	19
3.2. Materia en estudio	19
3.3. Equipos, materiales y reactivos.....	20
3.3.1. Equipos.....	20
3.3.2. Materiales.....	20
3.3.3. Reactivos y soluciones	21
3.4. Métodos de análisis	21
3.4.1. Caracterización químico proximal de la pulpa fresca de Taperibá	21
3.4.2. Cuantificación de ácido ascórbico	22
3.4.3. Cuantificación de polifenoles totales.	22
3.4.4. Determinación de la capacidad antioxidante	22
3.4.4.1.Prueba del radical DPPH	22
3.4.4.2.Prueba del radical ABTS ^o	23
3.5. Metodología experimental.....	23
3.5.1. Caracterización químico proximal de la pulpa fresca de Taperibá	23
3.5.2. Obtención de pulpa concentrada de Taperibá	23
3.5.3. Cuantificación de ácido ascórbico en pulpa fresca y concentrada de Taperibá.....	27
3.5.4. Cuantificación de polifenoles totales en pulpa fresca y concentrada de Taperibá	28

3.5.5. Determinación de la actividad antioxidante en pulpa fresca y concentrada de Taperibá.....	29
3.5.5.1. Radical 2,2-diphenyl-picrilhydrazyl (DPPH).....	29
3.3.5.2. Cation 2,2 azinobis (3-benzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS)	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. De las características fisicoquímicas de la pulpa fresca de Taperibá	33
4.2. De la obtención de la pulpa concentrada del Taperibá	38
4.3. De la cuantificación de ácido ascórbico en pulpa fresca y concentrada de Taperibá.....	41
4.4. De la cuantificación de polifenoles totales en la pulpa fresca y concentrada de Taperiba.....	44
4.5. De la capacidad antioxidante en pulpa fresca y concentrada de Taperibá	47
4.5.1. Radical 2,2 diphenyl-1-picrilhidrazyl (DPPH).....	47
4.5.2. Radical 2,2-azinobis (3-etilenbenzotiazolino-6 acido sulfónico) (ABTS).....	49
V. CONCLUSIONES.....	52
VI. RECOMENDACIONES.....	54
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Composición química y valor nutricional del fruto de Taperibá.....	5
2.	Valores de las características fisicoquímicas de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.....	33
3.	Contenido de ácido ascórbico en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.....	42
4.	Contenido de polifenoles totales en mgCAT/g en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá	45
5.	Actividad antioxidante en IC ₅₀ (ug/ml) en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá, frente al radical DPPH	47
6.	Actividad antioxidante en IC ₅₀ (ug/ml) en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá frente al radical ABTS.....	49
7.	Preparación de los estándares de (+) – catequin.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Diagrama de flujo para la obtención de pulpa de Taperibá.....	26
2.	Secuencia experimental para evaluar la actividad antioxidante de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá por el método del radical DPPH.....	30
3.	Secuencia experimental para evaluar la actividad antioxidante de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá por el método del radical ABTS°.....	32
4.	Flujograma y balance de materia para la obtención de pulpa fresca y concentrada de Taperibá.....	40
5.	Curva estándar del ácido ascórbico.....	41
6.	Cromatograma HPLC del estándar de ácido ascórbico.....	41
7.	Contenido de ácido ascórbico en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá	42
8.	Cormatograma HPLC de ácido ascórbico en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.....	43
9.	Curva estándar de catequina (CAT) para polifenoles.....	45
10.	Contenido de polifenoles totales en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.....	46

11.	Actividad antioxidante en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá, frente al radical DPPH	48
12.	Actividad antioxidante en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá, frente al radical ABTS ^o	50
13.	Inhibición del radical DPPH para la pulpa fresca de Taperibá	68
14.	Inhibición del radical DPPH para la pulpa concentrada de Taperibá.....	68
15.	Inhibición del radical ABTS para la pulpa fresca de Taperibá.....	69
16.	Inhibición del radical ABTS para la pulpa concentrada de Taperibá.....	69

RESUMEN

El Taperibá es un fruto nativo de la amazonia peruana, cuya producción no es tecnificada y su consumo es bajo. El propósito de esta investigación fue cuantificar el ácido ascórbico y evaluar la capacidad antioxidante en pulpa fresca y concentrada de Taperibá (*spondias cytherea son*). De los frutos maduros de Taperibá se obtuvo pulpa fresca y pulpa concentrada al vacío hasta eliminar el 40% de agua, a una temperatura de 50°C. El contenido de ácido ascórbico fue determinado por el método de HPLC en fase reversa, los polifenoles totales y la capacidad antioxidante por la inhibición de los radicales libres DPPH (radical 2, 2-diphenyl-picrilhydral) y ABTS^o (radical 2,2-azinobis 3-etilenobenzotiazolino-6 ácido sulfónico), fueron determinados por espectrofotometría. Se obtuvo un contenido de ácido ascórbico determinado en pulpa fresca 39,38 mgAA /100g y en pulpa concentrada 53,54 mgAA /100g. En cuanto al contenido de compuestos fenólicos totales usando el método Folin – Ciocalteu se determinó en pulpa fresca 384,73 mgCAT/100 g y 623,11 mgCAT/100 g en la pulpa concentrada. La capacidad antioxidante usando el radical DPPH expresado en coeficiente de inhibición IC₅₀, se obtuvo valores de 1288,88 µg/ml al analizar la pulpa fresca y un IC₅₀ de 415, 03 µg/ml en pulpa concentrada; mientras que con el radical ABTS se obtuvo un IC₅₀ 272,55 ± 1,26 µg/ml en pulpa fresca y 91,26 ± 3,55 µg/ml en pulpa concentrada. En conclusión, los resultados nos demuestran que la pulpa de Taperibá al ser concentrado aumenta el contenido de Acido ascórbico, compuestos fenólicos y la actividad antioxidante; dicha fruta puede ser empleada en la fabricación de concentrado de frutas utilizado en bebidas y para la industria de nutracéuticos.

I. INTRODUCCIÓN

La región amazónica cuenta con una variedad de frutas y vegetales con aceptación en el consumo, debido a que contienen propiedades benéficas para la salud; entre éstos frutos se encuentra el Taperibá (*Spondias cytherea* Sonn). Este fruto presenta propiedades funcionales que ayudan a combatir y prevenir múltiples enfermedades crónicas tales como el cáncer, problemas cardiovascular y aterosclerosis. Las principales fuentes de antioxidantes naturales se encuentran en los frutos, entre los principales compuestos antioxidantes de encuentran, la vitamina C, E, carotenos y otro bioquímicos (compuestos no nutritivos).

El fruto de Taperibá (*Spondias cytherea* Sonn), se encuentra en las zonas tropicales de selva alta en estado nativo y sin cuidados en su cultivo, no existiendo hasta el momento información de plantaciones tecnificadas, este fruto se produce una vez por año, pudiendo variar de época de acuerdo con las condiciones climáticas. Parte de su producción es utilizada en la fabricación de jaleas, licores, jugos, concentrados y pulpas.

La importancia de los antioxidantes en la salud humana, promueve la realización de investigaciones para conocer la actividad antioxidante de las antocianinas, fenoles y vitaminas antioxidantes presentes en las frutas frescas y procesadas.

En base a estos antecedentes, se plantearon los siguientes objetivos:

- _ Evaluar las Características fisicoquímicas de la pulpa fresca de Taperibá.
- _ Cuantificar el contenido de ácido ascórbico por HPLC en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.
- _ Cuantificar el contenido de polifenoles totales en pulpa fresca y concentrada de Taperibá.
- _ Determinar la capacidad antioxidante de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá medido por su capacidad de inhibir radicales libre 1,1 diphenil - 2 - picrylhidrazil (DPPH) y por la prueba de ABTS.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Taperibá

2.1.1. Aspectos generales

Especie nativa amazónica originaria de las Islas Sociedad y Fuji del Océano Pacífico, está adaptado a nuestra amazonia (CALZADA, 1993). Adaptada a las tierras bajas y cálidas de las regiones tropicales, crecen en regiones subtropicales cálidas donde no ocurren heladas (PHILLIPS *et al.*, 2009). Crece en zonas de vida natural, bosque húmedo tropical y bosque seco tropical (GUTIÉRREZ, 1969).

2.1.2. Aspectos botánicos

2.1.2.1. Morfología

Árbol mediano, con una altura de 5 hasta 15 m y de 2 – 3 m del tronco sin ramas. La copa es frondosa, de ramificación abundante que se inicia en el primer tercio del tronco, ramas delgadas que toman diversas disposiciones y las hojas se agrupan en la sección terminal de ellas (GUTIÉRREZ, 1969).

Las hojas son pinnadas con cuatro a doce pares de folíolos oblongo y uno terminal, los folíolos son de bordes recortados, miden de 6 a 16 cm de largo. El árbol parte del año esta defoliado (CALZADA, 1993).

2.1.2.2. Taxonomía

Calzada (1993), lo clasifica de la siguiente manera:

- **Nombre científico:**

Spondias cytherea Sonn. (*Spondias dulces* Forst F.)

- **Nombres comunes:**

Taperibá, manzana de oro, Ambarella, Jobo de la india, Ciruela dulce (cuba), cojote judío.

- **Familia:** ANARCARDIACEAE (Dicotiledonea)

2.1.3. El fruto

El fruto es una drupa elipsoidal de 5 – 10 cm de largo (casi como un huevo de gallina siendo el fruto más grande dentro del grupo *Spondias*), grisáceo o amarillo anaranjado a la madurez, con pulpa amarillo pálido, aromática y de sabor acidulado agradable. El endocarpio se proyecta en la pulpa (mesocarpio) en forma de prominencias longitudinales de las que salen fibras espinosas, duras y curvas; esta característica espinosa interna del fruto es una condición que limita la popularidad de su uso (WATSON, 1985). El endocarpio se divide en cinco celdas, alojándose una semilla en cada una de ellas, de color amarillo claro, de 1,8 cm. de longitud (GUTIÉRREZ, 1969).

En el cuadro 1, se indica la composición química y valor nutricional de la pulpa de Taperibá.

Cuadro 1. Composición química y valor nutricional del fruto de Taperibá

Componentes	100 g de pulpa
Energía, Kcal	56
Proteína, g	0,6
Grasa, g	0,3
Carbohidratos, g	14,2
Fibra, mg	0,6
Calcio, mg	39
Fósforo, mg	27
Hierro, mg	0,7
Retinol, mcg	0
Tiamina, mg	0,05
Riboflavina, mg	0,19
Niacina, mg	0,67
Acido ascórbico, mg	5,9

Fuente: CODEX (2005).

2.1.4. Usos

Se utiliza directamente como fruta fresca, en la preparación de jaleas, pastas, néctares, helados, bebidas refrescantes, licores caseros.

2.2. Concentración de alimentos

La concentración de un alimento consiste en reducir su contenido de agua. El grado de concentración se determina con el refractómetro y se expresa en °Brix. La concentración reduce los gastos de transporte y almacenaje del producto. Además facilita la conservación (MEYER,1996). Los métodos de concentración se realizan por evaporación al vacío y congelación. La evaporación consiste en eliminar el agua por ebullición. Este método se aplica, por ejemplo para producir el puré concentrado de tomate (MEYER, 1996).

Durante el concentrado por evaporación, puede ocurrir pérdida de compuestos nutricionales termosensibles, tales como la vitamina C. Para ello el proceso de evaporación al vacío, es una técnica que permite concentrar jugos o pulpas con menores pérdidas de nutrientes (RODRIGUES *et al.*, 2004).

Según el CODEX Alimentario 2005, se entiende por zumo o jugo concentrado de fruta, el producto al que se ha eliminado físicamente el agua en una cantidad suficiente para elevar el nivel de grados Brix al menos en un 50% más que el valor °Brix, establecido para el zumo o jugo reconstituido de la misma fruta. En la producción de zumo o jugo destinado a la elaboración de concentrados, se utilizan procedimientos adecuados, que podrán combinarse con la difusión simultánea con agua de pulpa y células y/o el orujo de fruta, siempre que los sólidos solubles de fruta extraídos con agua, se añadan al jugo primario en la línea de producción antes de proceder a la concentración. Los concentrados de zumos o jugos de fruta podrán contener componentes restablecidos de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles, elementos

todos ellos deberán obtenerse por procedimientos físicos adecuados y que deberán proceder del mismo tipo de fruta.

El jugo concentrado se utiliza en la elaboración de refrescos, jugos reconstituidos y jaleas. El producto concentrado, hasta un contenido en sólidos solubles de 65 °Brix, puede conservarse a temperatura ambiente. Productos concentrados a menos de 65 °Brix necesitan refrigeración.

Los jugos cítricos de manzana y de piña se concentran hasta los 60, 70 y 62 °Brix, respectivamente.

Para completar las pérdidas de aroma en el jugo reconstituido, éste se puede mezclar con 25% de jugo fresco; esto se practica en el caso de los jugos cítricos, en los que no se pueden recuperar esos aromas (MEYER, 1996).

2.3. Radicales libres

Un radical libre es una molécula o ión que tiene un electrón libre en su órbita exterior. Las partículas radicales son inestables y muy reactivas. (YUREKLI *et al.*, 2006).

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos ya que tienden a sustraer un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que lo cede se convierte a su vez en su radical libre por quedar con un electrón desapareado iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

La doctora Gerschman (1954), citado por GARCÍA *et al.*, (2001); sugirió que los radicales libres eran agentes patógenos y estableció en este trabajo 3 postulados básicos:

- Los radicales libres constituyen un mecanismo molecular común de daño, cuando los animales de experimentación son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radiaciones ionizantes.
- El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes produce efectos tóxicos.
- La producción de radicales libres es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis.

Las principales fuentes de radicales libres lo constituyen la mitocondria, algunos organelos que poseen vacuolas llamadas peroxisomas y leucocitos polimorfonucleares, que durante su metabolismo normal producen intermediarios parcialmente reducidos (RAPAPORT, 1993, DROST, 1996 y RODRÍGUEZ, 2001).

Los radicales libres son especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies de nitrógeno reactivo (RNS), participan el oxígeno y el nitrógeno para formar radicales libres como el radical hidroxilo (OH^\cdot), anión superóxido (O_2^\cdot), oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO^\cdot), ácido nitroso (HNO_2) el radical hipoclorito y varios peróxidos de lípidos (MAVI *et al.*, 2004).

2.4. Antioxidante

Antioxidante, es toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de este sustrato (GARCÍA *et al.*, 2001). Inactivan los radicales libres o inhiben su producción, cediendo un electrón al radical libre, oxidándose y transformándose en un radical libre débil que es inofensivo, en algunos casos puede llegar a regenerarse (STEPHENS *et al.*, 1996). No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan a su vez reacciones con los radicales libres (GARCÍA *et al.*, 2001).

Así cuando se incrementa la producción de radicales libres, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar el ambiente rédox intra o extracelular (VELÁSQUEZ *et al.*, 2004).

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, liberando electrones en la sangre que son captados por los radicales libres, manteniendo su estabilidad. Nuestro organismo esta constantemente luchando contra los radicales libres (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

Los antioxidantes son compuestos como ácidos fenólicos, polifenoles y flavonoides mientras que los radicales libres son aquellos como peróxidos, hidroperóxidos (PRAKASH, 2001).

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar e interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las

especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente-membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (VENEREO, 2002 y GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

Los antioxidantes que se encuentran normalmente en el organismo, se llaman endógenos y generalmente son sistemas enzimáticos, mientras que los antioxidantes exógenos son los que se ingieren con la dieta encontrándose en los alimentos como las frutas y verduras (ROBBINS, 1995, STEPHENS *et al.*, 1996, CARBONELL, 2001 y CAVIA, 2007).

2.4.1. Principales Antioxidantes

Los antioxidantes pueden dividirse en dos grupos: antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos (Martínez *et al.*, 2000).

2.4.1.1. Antioxidantes enzimáticos

Actúan a nivel intracelular conformadas por sistemas enzimáticos, que intervienen en la regulación de especies oxidantes indeseables como el superóxido y peróxidos antes que reaccionen e interaccionen con distintas biomoléculas induciendo daño (GONZALES *et al.*, 2000).

Principales antioxidantes endógenos y tipo de radical que neutralizan:

- **Superóxido dismutasa (SOD)**; su reacción: dismutación de O_2^- a H_2O , enzima intracelular o extracelular responsable de remover los radicales superóxido. Necesita la presencia de cobre, magnesio, hierro y zinc.

- **Catalasa (CAT)**; su reacción: conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2 , esta enzima presente en la peroxisomas remueve el peróxido de hidrogeno.

- **Glutación peroxidasa (GPX)**; su reacción: reducción de hidroperoxidos a expensas de Glutaciona reducida (GSH), esta enzima intracelular contiene selenio.

- **Glutación reductasa**; su reacción: reducción a Glutaciona oxidada (GSSG) a Gluglaciona reducida (GSH), este último necesario para la reacción catalizada por la glutación peroxidasa requiere NADPH, el cual es proporcionado por la vía de las pentosas fosfato (URBINA, 2008).

2.4.1.2. Antioxidantes no enzimáticos.

Transforman los radicales en sustancias menos agresivas (GUTIÉRREZ, 2002). Los antioxidantes exógenos, son los que se ingieren con la dieta encontrándose en diversos alimentos como las frutas y verduras (PINEDA, 2005).

Principales antioxidantes exógenos y tipo de radical que neutralizan

- **Vitamina C**; Antioxidante del plasma hidrosoluble, es un poderoso inhibidor de la oxidación de lípidos, regenera la vitamina E y es protector de los efectos del tabaco. Actúa específicamente con el radical superóxido aniónico y el radical hidroxilo (VELÁSQUEZ *et al.*, 2004).

Es un buen capturador de radicales libres (O_2^- , H_2O_2 , LOO^* y singulete) por su habilidad de secuestrar el oxígeno, evitando la oxidación del sistema. Presenta sinergismo con la vitamina E y es eficiente con elevados valores de oxígenos, es altamente biodisponible y uno de los antioxidantes celulares más importantes en medios acuosos (ARANCETA, 2006).

- **Vitamina E;** Principal antioxidante soluble de lípidos, previene la oxidación de grasas. Aumenta su acción en presencia de zinc. Actúa específicamente con el oxígeno singulete y el radical ácido graso poliinsaturado (VELÁSQUEZ *et al.*, 2004).

Según la AOAC, el término vitamina E, es genérico para todos los tocoferoles y tocotrienoles. El grupo tocoferol incluye, α -, β -, γ - y δ - tocoferol, aunque la forma más activa es el α - tocoferol. Su importancia radica en que mantiene la integridad de las membranas celulares gracias a su actividad antioxidante bloqueando las cadenas de radicales lipoperoxilo y formando el tocoferoxil radical, el cual es muy estable. El contenido de vitamina E de los alimentos se expresa como equivalentes de α tocoferol (ARANCETA, 2006).

- **Vitamina A;** La vitamina A, se puede encontrar en la naturaleza en diferentes formas activas (retinol, retinal, ácido retinoico o dehidrorretinol). La conversión de caroteno a retinol está influida por la concentración de retinol sérico, zinc y yodo, este último es necesario para la conversión de β -caroteno en vitamina A en humanos. Los carotenoides se

conocen también como provitamina A, y el β -caroteno es el más abundante y el más activo. La habilidad de estas estructuras para actuar como antioxidantes se basa en el bloqueo del radical ; en esta reacción la energía de excitación se transfiere desde el radical al caroteno, formándose un carotenoide triplete ; entonces la energía se disipa a través de interacciones rotacionales y vibracionales entre el carotenoide triplete y el solvente, por lo que el caroteno original se regenera (ARANCETA,2006).

2.5. Polifenoles

Constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8000 compuestos distintos (MARTÍNEZ *et al.*, 2000).

Son un conjunto heterogéneo de moléculas, que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (HERNANDEZ *et al.*, 2003).

Se originan principalmente a través de dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos . En la ruta del ácido shikímico se utilizan aminoácidos aromáticos como fenilalanina y tirosina para formar los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos y derivados, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). Por medio de la ruta de los poliacetatos se originan quinonas, xantonas, orcinoles, etc, aunque algunos compuestos fenólicos como los flavonoides (antocianidinas,

catequinas, ácido gálico e isoflavonas) se pueden formar a través de rutas mixtas que combinan la vía del shikimato y del acetato (PINEDA, 2005)

Su función principal en las plantas es de actuar como metabolitos esenciales frente al ataque de agentes patógenos, incluyendo bacterias, fungi y virus, así como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de estas (VILLANUEVA, 2003).

2.6. Ácido ascórbico

Es un compuesto altamente polar, por lo tanto, altamente soluble en agua, e insoluble en solventes no-polares. La vitamina C, actúa como agente reductor en reacciones de hidroxilación o reacciones de oxido-reducción (son reacciones donde ocurre transferencia de electrones entre especies, permitiendo la oxidación de una especie y llevando la otra especie a ser reducida). Es considerada como el agente reductor más reactivo que puede ocurrir en forma natural en el tejido viviente, también es considerada como nutriente esencial para el ser humano, ya que éste no puede sintetizarlo por sí sólo (Fennema, 1996, citado por SOTO, 2005).

A diferencia de la mayoría de los mamíferos, los seres humanos no poseen la habilidad de sintetizar su propia vitamina C. Esta vitamina debe ser obtenida a través de la dieta, ya que es considerada como un nutriente esencial en el sistema humano; esto debido a sus importantes roles en el funcionamiento de este sistema. Dentro de los roles que posee, se encuentra la síntesis de colágeno (componente estructural importante en los vasos sanguíneos, tendones, ligamentos y huesos). También juega un rol importante

en la síntesis de norepinefrina (crítico neurotransmisor para la función cerebral). Además, la vitamina C se requiere para la síntesis de carnitina (pequeña molécula esencial en el transporte de grasas a los organelos celulares llamados mitocondrias), para la conversión de energía (Mahan, y Arlin. 1992, citado por SOTO, 2005).

Estudios recientes también sugieren que la vitamina C está involucrada en el metabolismo de colesterol a ácidos biliares, lo cual a su vez tiene implicaciones en los niveles de colesterol en sangre y la incidencia de coleditiasis (cálculos o piedra en vesícula) (Simo, y Hudes. 2000, citado por SOTO, 2005).

La vitamina C también es considerada como un antioxidante altamente efectivo. Aún en cantidades pequeñas, esta vitamina puede proteger moléculas indispensables en el cuerpo, tales como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos (DNA y RNA). Ésta los protege de daños causados por radicales libres (moléculas altamente reactivas con oxígeno) o por especies de oxígeno reactivo que puede ser generado por el metabolismo normal o por exposición a toxinas y contaminantes (Ej. Fumar). La vitamina C también es capaz de regenerar otros antioxidantes presentes como por ejemplo la vitamina E (Carr. y Frei. 1999, citado por SOTO, 2005).

2.7. Radical 1,1 diphenyl -2- picrylhidrazyl (DPPH°)

El DPPH° es un reactivo muy usual para investigar la actividad de inhibición de radicales libres de los polifenoles (YILDIRIM, 2001). El mecanismo

de reacción consiste en sustraer un átomo de hidrogeno de un fenol donador para dar diphenylpicrylhydrazyl y un radical fenoxil (LEBEAU *et al.*, 2000).

La reacción involucra un cambio de color de violeta a amarillo que fácilmente puede ser monitoreada la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH[•], por antioxidantes. (BRAND- WILLIAMS *et al.*, 1995). El radical fenoxil puede sufrir posteriores reacciones tales como el acoplamiento y fragmentación, que resultan en productos complejos y que modifica la reacción valores del coeficiente de inhibición del 50% del radical IC₅₀ por la alteración de la estequiometría (LEBEAU *et al.*, 2000).

El IC₅₀ es un parámetro que describe en forma global la reacción con el radical proporcionando en forma limitada del mecanismo de reacción (ESPIN *et al.*, 2000). Esto permite diferenciar a los compuestos de acuerdo a su reactividad intrínseca (LEBEAU *et al.*, 2000).

2.8. Radical 2`2 azinobis -3- ethylbenzotiazolina -6- acido sulfónico (ABTS^{o+})

El ABTS (verde – azul como catión ABTS^{o+}), es un radical cromógeno estable, fácil de usar, tiene un elevado nivel de sensibilidad y permite analizar un gran número de muestras en tiempo relativamente corto (KIM *et al.*, 2002).

ARNOA (2000), menciona que la química de reacción del ABTS^{o+} en las pruebas, involucra una disminución en la intensidad del color del ABTS^{o+} de verde – azul a blanco – transparente, por efecto de la inhibición del antioxidante.

2.9. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Es la técnica de separación mas ampliamente utilizada en separaciones analíticas, 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. (HORIE y KOHATA 2000). En alimentos es utilizado como un método confirmatorio para la determinación de aditivos contaminantes y compuestos naturales (BOSANOVA y BRANDSTETEROVÁ, 2000). Para la cuantificación de estos compuestos se utiliza estándares específicos para cada uno de ellos (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:

- Una bomba que consta de dispositivos de alta tecnología que tiene por función de entregar la fase móvil a través del sistema, a un flujo variado (0,1 a 10 mL/min.) en cantidades exactas y de manera precisa, compuesto por dispositivos resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o teflón).
- Un sistema de inyección, el fin del proceso de inyección es introducir la muestra en un reservorio sujeto a la acción de la bomba para luego ser llevado a la columna.
- La columna es considerada como una herramienta para la separación

de las moléculas presentes en la muestra que está siendo analizada.

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

- El detector por lo general es ultravioleta (UV) o visible (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.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se ejecutó entre los meses de Mayo a Noviembre del 2008, en los ambientes del Centro de Investigaciones de Productos Naturales de la Amazonia Peruana (CIPNA) que pertenece al Centro de Investigaciones para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonia (CIDBAM) de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS). Este centro superior de estudios se encuentra ubicado a 665 m.s.n.m a 09° 17' 08" de Latitud Sur, a 75° 59' 52" de Longitud Oeste en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco; presenta una temperatura y humedad relativa promedio de 24 °C y 89%, respectivamente.

3.2. Materia en estudio

Fruto de Taperibá (*Spondias cytherea* Sonn), obtenido de un lote de cultivo de Taperibá ubicado en la zona de Aguaytía, se recibió la cantidad necesaria para las pruebas y almacenó descartando las dañadas, las verdes y sobremaduras. Se colocó en bolsas de 1 Kg para posteriormente realizar el proceso de pulpeado.

3.3. Equipos, materiales y reactivos

3.3.1. Equipos

- Equipo de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), marca Shimadzu Scientific, MD, USA; las características de la bomba, horno de columna, detector, controlador fueron de los siguientes modelos: LC-10ATVP, PHENOMENEX GEMINI/C-18/110A/5um/ 250 X 46,0 MM, CTO - 10 AS VP, UV-VIS SPD-10AVVP, SCL-10AVP respectivamente. El inyector manual Reodine de una capacidad de 20 ul.

- Balanza analítica marca Sartorius (USA) con una sensibilidad de 0,0001 g.

- Espectrofotómetro de absorción molecular marca Termo Electrón Corporation, modelo genesys-6.

- pHmetro
- Pulpeadora o majador marca KAMPLEX tipo Ep-9 con juego.
- Desionizador de agua marca Easy Pure II RF/UV.
- Baño María Modelo YCW-OLOE GEMMYCO.
- Rotavapor Modelo R-300.
- Vortex marca Genie 2 Scientific Industries.
- Centrifuga

3.3.2. Materiales.

- Matraces de 100 y 250 ml
- Vasos de precipitación de 50 ml
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Micropipetas de 10-100 ul y 100-1000 ul

- Cubetas de poliestireno (1 cm x 1cm x 4,5 cm)
- Fiolas de 10, 25 y 50 ml
- Papel filtro
- Agua blanda
- Puntas para micropipeta
- Gradilla
- Microtubos
- Microjeringas (50 μ L)
- Microfiltros de membrana de nylon, de 0,2 μ m marca Gelman

3.3.3. Reactivos y soluciones

2,2 diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH; Sig,ma Aldrich, USA), 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6- ácido sulfónico) (ABTS; Sigma Aldrich, USA), Carbonato de sodio (Na_2CO_3). Ácido ascórbico (Scharlau, UE), fosfato de potasio dihidrogenado (Scharlau, UE), acido orthofosfórico (Scharlau, UE), ácido sulfúrico (Merck KgaA), metanol grado HPLC (Fisher ChemAlert Guide), (+)- catequin 1 Mm (Sigma Aldrich, USA), etanol (Merck KgaA), Solución de fenol de Folin- Ciocalteu (Sigma Aldrich, USA), Carbonato de sodio (Scharlau, EU).

3.4. Métodos de los análisis

3.4.1. Caracterización químico proximal de la pulpa fresca de Taperibá

- Humedad, método gravimétrico N° 950.46 AOAC (1995).
- Proteínas, método de Biuret, adaptado para alimentos por

Asquieri, 2008.

- Grasa, método de Bligh Dyer (1959).
- Cenizas, según A. O. A. C. (1995), método N° 923,03.
- Fibra, método N° 930.20 (AOAC, 1995).
- pH: método 11.032 (AOAC, 1997)
- Carbohidratos totales, por diferencia
- Sólidos solubles totales, método refractométrico reportado por Mitcham, Cantwell y Kader *et al.*, 2000.
- Acidez titulable, método volumétrico

3.4.2. Cuantificación de ácido ascórbico

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Gokmen *et al.*, (2001).

3.4.3. Cuantificación de polifenoles totales

Se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, modificado por Sandoval *et al.*, (2001).

3.4.4. Determinación de la capacidad antioxidante

3.4.4.1. Prueba del Radical DPPH

Se utilizó el método descrito por Brand-Williams *et al.*, (1995) modificado por SANDOVAL *et al.*, (2001).

3.4.4.2. Prueba del radical ABTS°

Se desarrolló según la metodología desarrollada por RE *et al.*, 1999 y descrita por KUSKOSKI *et al.*, 2005.

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Caracterización químico proximal de la pulpa fresca de Taperibá

Según los métodos indicados en el ítem 3.4.1

3.5.2. Obtención de pulpa concentrada de Taperibá

Para la obtención de la pulpa concentrada de Taperibá, se procedió con las operaciones indicadas en la figura 1, que se describen a continuación.

- Recepción

Los frutos de Taperibá se recepcionarán en jabas de polietileno para evitar daño durante el transporte de la zona de Aguaytía a la ciudad de Tingo María.

- Selección

En esta operación se eliminaron las frutas en mal estado o sobre maduras. Sólo se trabajó con frutas en estado maduro.

- Pesado

Se utilizó aproximadamente 6300 Kg de Taperibá, de los cuales durante el proceso se separó para la pulpa fresca y pulpa concentrada.

- Lavado

Los frutos fueron lavados con agua blanda con el fin de eliminar las impurezas adheridas a la fruta.

- Pelado

Se realizó de forma manual, debido a que este fruto presenta una corteza semi-rugosa.

- Pulpeado

Una vez pelados los frutos, se procedió al pulpeado, para esta operación se utilizó un tamiz fino de 1mm de luz. Los frutos fueron ligeramente trozados, para que la operación sea más eficiente, por medio del tamiz se separaron las semillas y partes leñosas. Parte de esta pulpa fresca se separó, se envasó en bolsas de polietileno forradas de papel aluminio y se almacenó a T° de congelación (-20 °C).

- Tamizado

Una vez pulpeado, la pulpa pasa por una operación de tamizado, esto con la finalidad de refinarla más.

- Concentrado

Se procedió a concentrar la pulpa refinada empleando el rotavapor al cual se adaptó una bomba de vacío, se añadió 200 g de pulpa al balón, este balón está inclinado en un ángulo de 30-35° aproximadamente, el cual rota para homogenizar la muestra y ayudar a la transferencia de calor. Se eliminó hasta un 40% de agua a una temperatura de 50°C y una presión de vacío de 24 pulg-Hg según la lectura del vacuómetro.

- Envasado

La pulpa concentrada fue envasada en bolsas de polietileno, selladas con selladora manual y cubiertas con papel aluminio.

- Almacenado

La pulpa fresca y concentrada protegida de la luz con papel aluminio se almacenó a temperatura de congelación de -20°C .

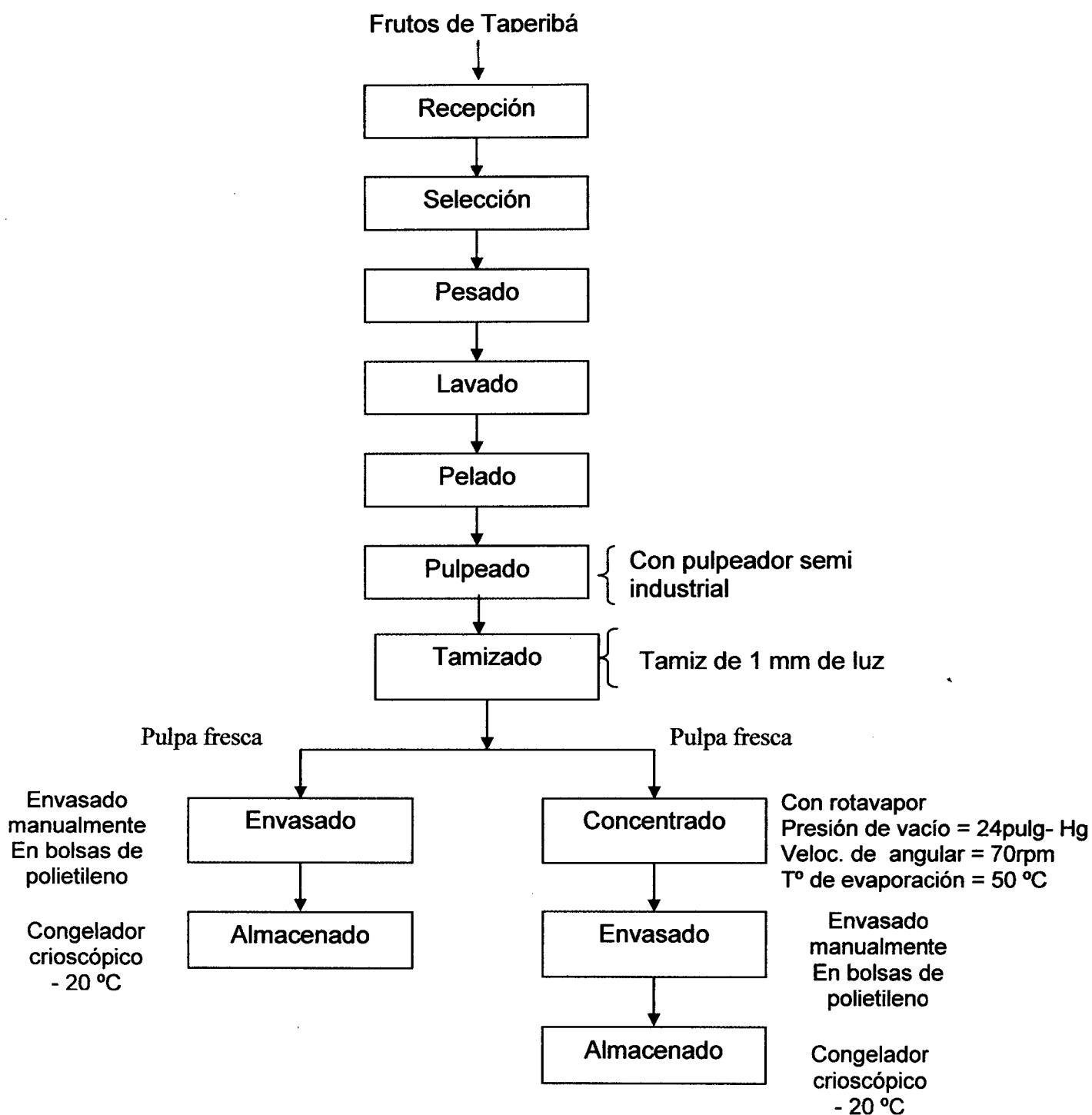


Figura 1. Diagrama de flujo para la obtención de pulpa de Taperibá.

3.5.3. Cuantificación de ácido ascórbico de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá

3.5.3.1. Determinación de la curva patrón

El HPLC, utilizó como fase móvil una solución a 0,2 M de KH_2PO_4 ajustado a un pH de 2,4 con H_3PO_4 y a una tasa de flujo de 0,5 ml/min. La medición fue a una longitud de onda de 254 nm.

Se calibró, preparando una curva estándar de ácido ascórbico (AA), el estándar se disolvió en H_2O destilada desionizada (dd) microfiltrada. Se preparó un stock de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, disolviendo 10 mg de AA en 100 ml de agua dd y microfiltrada. A partir del stock se prepararon soluciones de concentraciones 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que fueron usados para levantar la curva estándar. Después de la inyección de cada concentración del estándar, se registró con exactitud y precisión el tiempo de retención (t_R), mili absorbancia (mUA) y el área debajo la curva (A_c).

3.5.3.2. Cuantificación de ácido ascórbico

Las muestras de pulpa fresca y concentrada de Taperibá, fueron separadas en alícuotas de 1,5 ml en microtubos de 1,5 ó 2 ml, que fueron centrifugadas a 10 000 rpm/5 min a una temperatura de 4°C, luego de ser centrifugada se separó el sobrenadante y se microfiltró con membranas de Nylon de 0,2 μm para inyectarse al HPLC.

Con la ecuación obtenida en la curva, al graficar mUA vs. Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$), se estimó la cantidad de ácido ascórbico en mgAA/100g de pulpa fresca y concentrada.

3.5.4. Cuantificación de polifenoles totales en pulpa fresca y concentrada de Taperibá

3.5.4.1. Determinación de la curva patrón

Se preparó las soluciones stocks de 20 por ciento Na_2CO_3 y 10mM -catequin en 10 ml de metanol. A partir del stock catequina, se preparó concentraciones de 300, 1000, 3000 y 10000 $\mu\text{g/ml}$. (Anexo I). A cada tubo se agregó 1,58 ml de agua destilada desionizada (H_2O dd) y 20 μl de cada estándar de catequina. Se homogenizó y se agregó 100 μl de solución Folin-Ciocalteu. Se volvió a homogenizar y se incubó por 1 min a temperatura ambiente, se neutralizó la reacción adicionando 300 μl de Na_2CO_3 al 20 por ciento y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente para su completa reacción. Las lecturas en el espectro UV-VIS se realizaron a 700 nm. Con las lecturas de las absorbancias versus concentración se construyó la curva patrón.

3.5.4.2. Cuantificación de polifenoles

Se siguió la metodología utilizada para levantamiento de la curva patron. En cuanto a las muestras se realizaron las diluciones necesarias con el objetivo de que la absorbancia se ubique en el rango de la curva estándar.

Las absorbancias registradas de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá, se reemplazaron en la ecuación de la curva estándar, obteniendo la cantidad de polifenoles expresados en mgCAT/g.

3.5.5. Determinación de la actividad antioxidante de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.

3.5.5.1. Radical 2,2-diphenyl-picrilhydrazyl (DPPH)

Esta prueba se fundamenta en la reducción del radical DPPH mediante un donador de hidrógeno que procedería de los tipos de extractos evaluados. Se hizo reaccionar 975 μ l del radical DPPH con 25 μ l de la muestra analizada en el espectrofotómetro a una absorbancia máxima de 515 nm, el cambio de coloración de azul a amarillo es un indicativo de la completa reducción del radical DPPH (SANDOVAL *et al.*, 2001). Los resultados se reportaron en función al Coeficiente de Inhibición (IC50) expresado en μ g/ml.

Para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el radical DPPH, se procedió como se muestra en la figura 2.

Las muestras de pulpa fresca y concentrada de Taperibá fueron separadas en microtubos de 2ml, centrifugadas a 10000 rpm/5min, separado el sobrenadante en microtubos y vueltos a centrifugar a 10000 rpm/5min. Con este sobrenadante se prepararon las soluciones de trabajo a concentraciones de 1,2; 4; 12; 40 mg/mL para la pulpa fresca de Taperibá y 0,4; 1,2; 4; 12 mg/ml de pulpa concentrada de Taperibá.

A partir de estas concentraciones se tomó 25 μ L y se hizo reaccionar con 975 μ L con radical DPPH (100 μ M). El radical DPPH inicia una decoloración de violeta a amarillo inmediatamente después de reaccionar con la muestra, se dio lectura de la absorbancia a 515 nm cada 15 s por 5 min. A

medida que hay mayor secuestro de los radicales por un antioxidante, la absorbancia disminuye.

El porcentaje de inhibición se obtuvo al restar la unidad menos el dato final de la corrida de una concentración, todo esto dividido con el promedio de las lecturas de la solución patrón en este caso el DPPH y así cada una de las concentraciones de las muestras de pulpa fresca y concentrada de Taperibá, fue utilizado para determinar el coeficiente de inhibición (IC_{50}) para el radical DPPH. Este coeficiente indica la cantidad de pulpa fresca y concentrada de Taperibá en $\mu\text{g/ml}$, requerido para inhibir el 50% del radical libre DPPH.

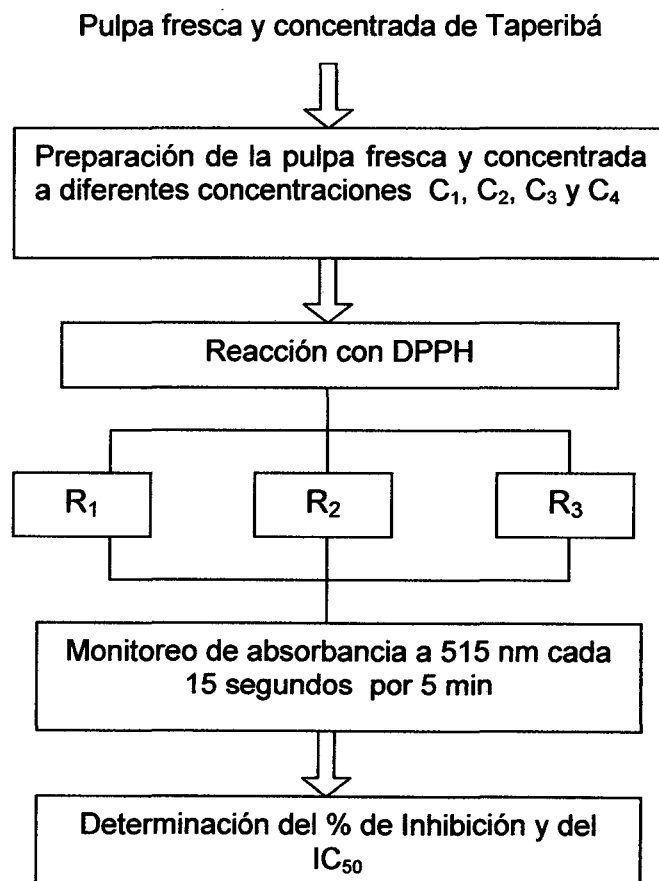
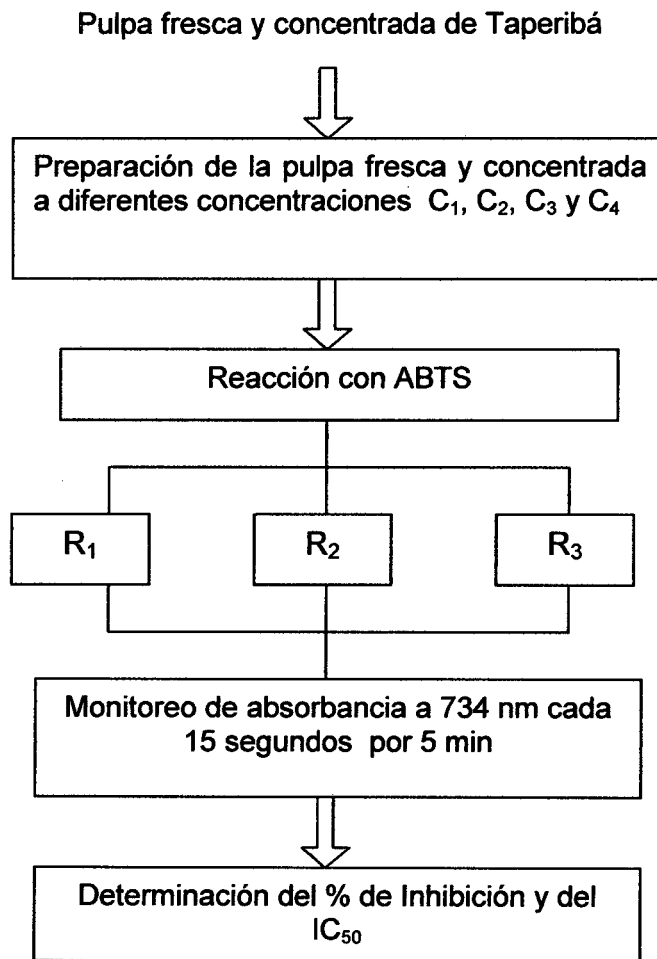


Figura 2. Secuencia experimental para evaluar la actividad antioxidante de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá por el método del radical DPPH

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

El radical $ABTS^{\circ+}$ se obtiene tras la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente (25 °C) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical $ABTS^{\circ}$, se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 (\pm 0,1) a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80 por ciento, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20uL de la muestra. 980 uL de dilución del radical $ABTS^{\circ}$, como se muestra en la figura 3 paso a paso.

Para la preparación de la muestra se separaron en microtubos 2ml de pulpa fresca y concentrada de Taperibá, se centrifugó a 10000 rpm/5min, se separó el sobrenadante en microtubos y se volvió a centrifugar a 10000 rpm/5min, y del sobrenadante se preparó la soluciones de trabajo para la pulpa fresca 1,5; 5; 15; 50 mg/mL y para la pulpa concentrada: 0,15; 0,5; 1,5; 5 mg/mL. Se procedió a reaccionar 20 μ L de cada una de las concentraciones con 980 μ L $ABTS^{++}$, hasta que se obtuvo 20-80% de inhibición. Los resultados fueron expresados en términos de CI_{50} en μ g/mL (RE *et al.*, 1999).



Leyenda: Ci: (i = 1,2,3 y 4) : Concentraciones (ug/ml)
 Ri: (i = 1,2 y 3) : Repeticiones

Figura 3. Secuencia experimental para evaluar la actividad antioxidante de pulpa fresca y concentrada de taperibá por el método del radical ABTS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. De las características fisicoquímicas de la pulpa fresca de Taperibá

En el cuadro 2, se presentan los valores porcentuales de los diversos componentes de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.

Cuadro 2. Valores de las características fisicoquímicas de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.

Determinaciones	Pulpa fresca	Pulpa concentrada
Humedad (%)	85,45 ± 0,7	*
Proteína (%)	0,58 ± 0,02	*
Grasa (%)	0,35 ± 0,01	*
Carbohidratos (%)	9,2 ± 0,26	*
Fibra (%)	0,57 ± 0,01	*
Ceniza (%)	0,45 ± 0,01	*
°Brix	9,63 ± 0,15	12,1 ± 0,36
Ph	3,53 ± 0,06	4 ± 0,1
Acidez (%)	3,4 ± 0,05	5,6 ± 0,03

(¹) Estos valores representan el promedio ± desviación estándar de tres repeticiones. (* No se determinó.

Los frutos luego de su cosecha experimentan ligera pérdida de humedad, ya que la diferencia de presión de vapor entre el fruto y ambiente es mínima

(87,45% de humedad del fruto contra 83,5% promedio de humedad relativa del ambiente). Puede decirse que estos frutos experimentan ligera pérdida de agua por transpiración (PEREIRA DA COSTA *et. al.*, 2003).

De acuerdo a lo observado en el cuadro 2, la pulpa fresca de Taperibá tiene un porcentaje de humedad de $85,45 \pm 0,7\%$, no encontrándose diferencia con lo reportado por CALZADA, (1962), quien determinó un 87% de humedad en la pulpa de Taperibá. La mayoría de la frutas entre ellas: Naranja, Limón, Mandarina, Piña, Manzana y Uva, se caracterizan por tener un alto contenido de humedad que oscila entre 81 a 90%. Las frutas amazónicas como el Noni (*Morinda citrifolia L.*) contiene un 84,9% de humedad según lo reportado por SULLON (2009); Carambola en estado maduro un 91,16% de humedad (DAVILA Y CHIRE, 2008).

En la pulpa concentrada no se evaluó, debido a que en el momento de la concentración se evaporó un 40 % de agua.

El contenido de proteína en pulpa fresca de Taperibá fue de 0,58%; GUTIÉRREZ (1969), determinó en la pulpa de Taperibá un 0,6 % de proteína; dicho resultado guarda relación con lo reportado en este estudio. En diversas frutas tales como: naranja, uva, piña, mandarina, manzana y limón, el contenido de proteína varía de 0,3 a 1%, encontrándose la pulpa fresca de Taperibá dentro de este rango.

En cuanto al contenido de grasa se obtuvo un 0,35%; CALZADA, (1962), determinó en la pulpa de Taperibá un 0,3% de grasa; comparando con lo obtenido, no existe diferencia significativa entre los resultados.

Se obtuvo un 0,57% de fibra en pulpa fresca de Taperibá. CALZADA, (1962) y GUTIÉRREZ, (1969), reportaron un 0,6% de fibra en pulpa de Taperibá, no existiendo mucha diferencia con lo obtenido en esta investigación; otras frutas como Tuna verde contiene un 3,7% según REPO Y ENCINA (2008) y en Noni 4,97% de fibra GARCIA (2009); al ser comparado estas frutas con la pulpa de Taperibá, el contenido de fibra es significativamente bajo, ya que en el proceso de obtención de la pulpa se eliminó la cáscara, se sabe que el mayor contenido de fibra en las frutas se encuentra en la cáscara.

GUTIERREZ (1969), reportó para el caso de cenizas un 0,4% en pulpa de Taperibá, acercándose a lo determinado en el presente estudio (0,45% de cenizas).

El contenido de carbohidratos en pulpa de Taperibá fue de 9,2%, cuando se habla de carbohidratos se refiere a los insolubles (lignina, celulosa, hemicelulosa y almidón) y los solubles (glucosa, fructosa, sacarosa, ácidos orgánicos). SULLON, (2009) determinó en el Noni 3,62% de carbohidratos.

CUNHA (2001), reporta para el género *Spondias mombin* L. que este fruto almacena carbohidratos bajo la forma de almidón, y a través de la transformación del almidón en azúcares solubles, los frutos se hacen más

dulces después de la cosecha. La reducción más acentuada en el contenido de almidón ocurre al final de la maduración, por ello recomiendan para la industria de pulpa o zumo que el fruto esté completamente maduro para recolectarlo, caso contrario ocurrirá interferencia del almidón en el sabor o en el proceso.

Se determinó mayor acidez titulable en la pulpa concentrada en comparación con la pulpa fresca, 5,6% y 3,4% respectivamente. Frutos nativos como Acerola estudiada por BRASIL *et al.* (2008), obtuvieron en la pulpa fresca 0,97% y en concentrada 3,46% ; CALVAY, (2009), determinó en pulpa fresca y concentrada de Camu camu en estado maduro 3,10% y 4,64% respectivamente. Los resultados obtenidos coinciden con los datos reportados, en cuanto al aumento de acidez de las pulpas concentradas respecto a la pulpa fresca, esto se debe al proceso de concentrado, que al eliminarse agua de la pulpa, aumenta el contenido de sólidos solubles; por consiguiente el contenido de ácidos orgánicos se eleva.

El contenido de sólidos solubles, medido en °Brix, es un parámetro que se emplea para identificar el estado de maduración de frutos, y en la industria de zumos, este atributo es un indicativo importante del rendimiento del proceso (CUNHA, 2001). El Taperibá, a pesar de ser un fruto muy aromático, no se consideraría entre los más dulces, ya que de acuerdo con estos autores, el contenido de sólidos solubles en una fruta del mismo género (*Spondias mombin* L.), se considera dulce cuando la pulpa contiene alrededor de 12°Brix.

En los resultados obtenidos se observa un notable aumento en el contenido de sólidos solubles en la pulpa concentrada de Taperibá, durante el proceso de concentración se trabajó con una temperatura de ebullición de 50°C aplicando vacío ($P_{\text{vacío}} = 24\text{pulg-Hg}$). Durante el proceso de concentrado puede que ocurra una hidrólisis parcial de los azúcares no reductores como la sacarosa, en medio ácido.

CALVAY (2009), obtuvo en la pulpa concentrada de Camu camu pinton y maduro 11,93 y 15,60 °Brix, respectivamente. Los resultados obtenidos en pulpa fresca de Taperibá fue de $9,63 \pm 0,15$ °Brix y en la pulpa concentrada $12,1 \pm 0,36$ °Brix.

En el cuadro de resultados también se observa el valor del pH en pulpa fresca de Taperibá ($3,53 \pm 0,06$) y en pulpa concentrada ($4 \pm 0,1$). El valor se incrementa durante el proceso de concentrado, lo mismo ocurre con lo reportado por CALVAY (2009), quien determinó en pulpa fresca de Camu camu en estado maduro un pH de $2,36 \pm 0,05$ y en pulpa concentrada en estado maduro un pH de $2,83 \pm 0,02$.

SITI *et al.* (2004), evaluaron algunas propiedades fisicoquímicas de *Spondias cytherea* Sonn., reportando que el pH y los sólidos solubles se incrementan con la maduración del fruto. También mencionan que los frutos maduros son significativamente menos ácidos que los frutos verdes y pintones. Con respecto a algunos macrocomponentes, reportan un contenidos de: grasa, 0,34 – 0,53%, proteína total (1,76 – 2,33%), cenizas totales (6,23 – 6,78%) y,

fibra dietética total que fue menor en frutas maduras ($17,20\% \pm 3,49$, en base seca). Otros análisis reportados son el contenido de Vitamina C ($4,65 \pm 0,27$ a $5,86 \pm 0,73$ mg/100 g) y el contenido de pectina soluble en agua (PSA) que en frutas maduras contribuye a la consistencia de la fruta, puesto que, con el avance de la madurez, ocurre una disminución de la firmeza del fruto. Estos valores difieren porque la toma de muestra del análisis es diferente. SITI *et al.*, (2004), analizó el fruto íntegro en tanto que en la presente investigación se empleó la pulpa.

4.2. De la obtención de la pulpa concentrada de Taperibá

La pulpa concentrada de Taperibá se obtuvo según lo indicado en el flujograma de la figura 3; realizándose un control de peso en cada operación durante todo el proceso, el cual se presenta en el balance de materia de la figura 4.

La concentración de los distintos compuestos fenólicos y la actividad antioxidante total en los concentrados de frutas estudiados son superiores a los datos reportados para la fruta fresca o para confituras, el cual se debe al procesado tecnológico de concentración y a la reducción porcentual del contenido de agua en el producto con respecto a la fruta de partida (GARCIA *et al.* 2002). ACEVEDO *et al.* (2005), menciona que los jugos de Lima Rangpur pueden ser concentrados por evaporación hasta un 40% a temperaturas del orden de $40-50^{\circ}\text{C}$, sin que se afecten marcadamente las propiedades fisicoquímicas. GARCIA *et al.* (2002), recomienda después de la evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de Uva y frutas rojas, que los

concentrados de frutas rojas podrían ser materia prima adecuada para la elaboración de alimentos funcionales ricos en antioxidantes naturales, cuyo consumo a largo plazo pudiera tener efectos preventivos frente a enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

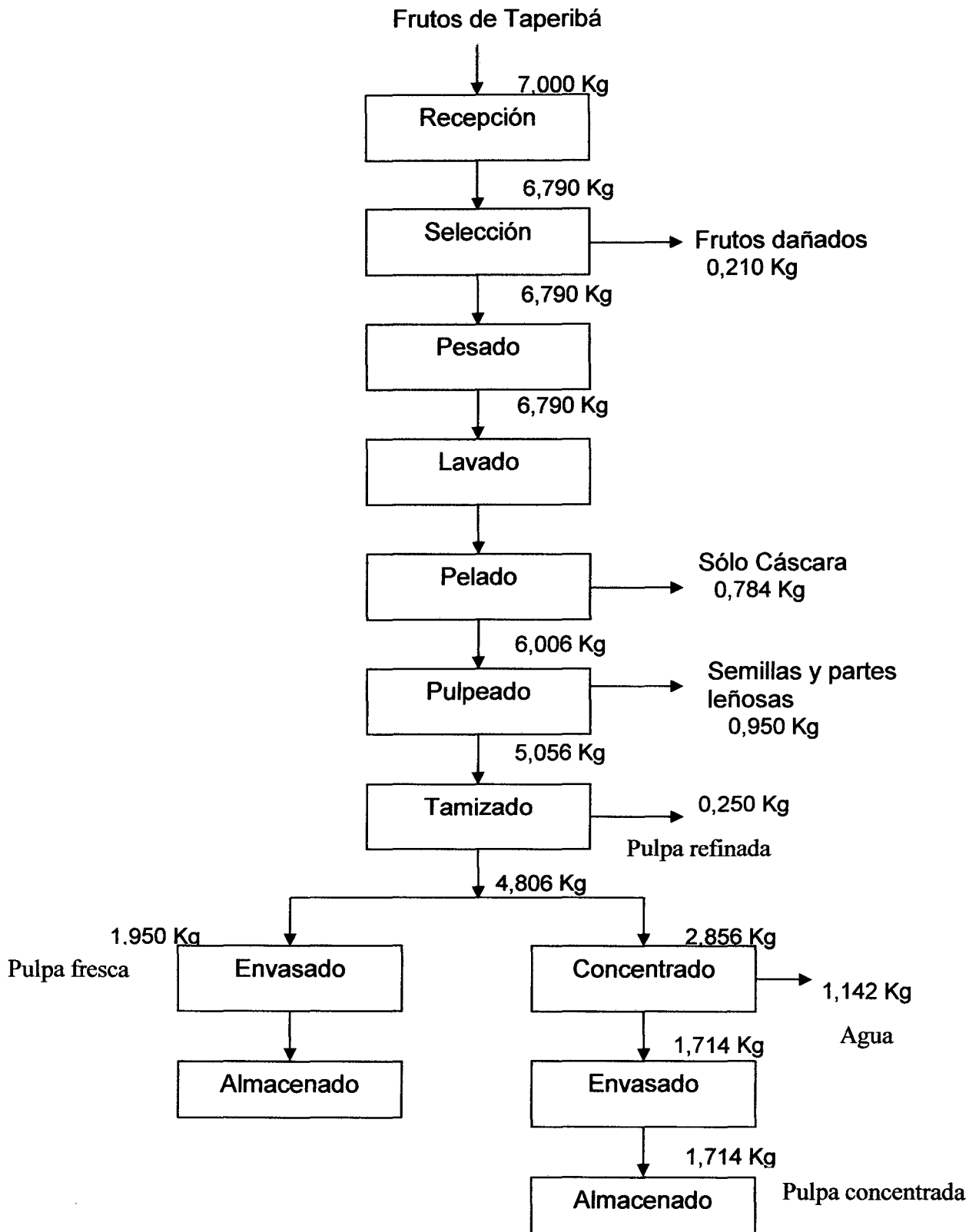


Figura 4. Flujograma y balance de materia para la obtención de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá

4.3. De la cuantificación de ácido ascórbico en pulpa fresca y concentrada de Taperibá

En la figura 5. Se muestra la curva estándar obtenida con el estándar de AA a concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 ug/ml, y en la figura 6 se muestra el cromatograma HPLC, obtenido al inyectar 20 µl de AA a 50 µg/ml.

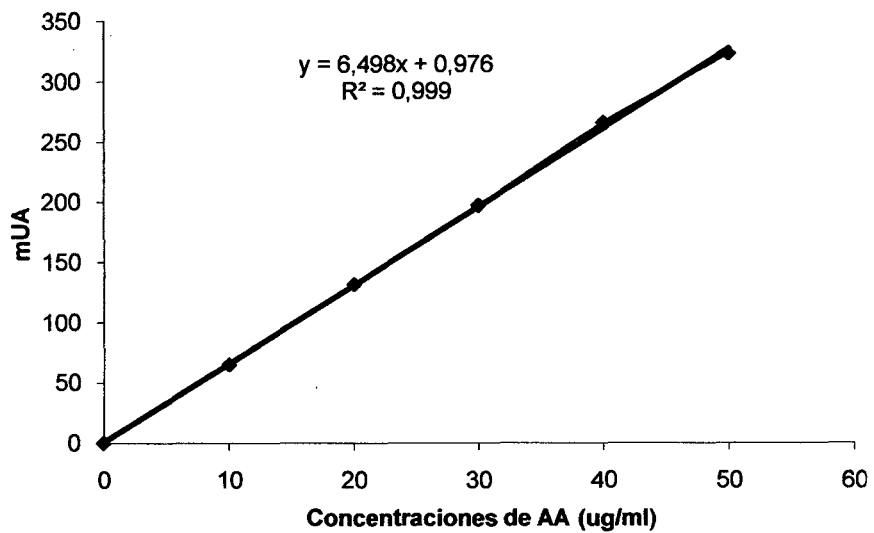


Figura 5. Curva estándar de ácido ascórbico

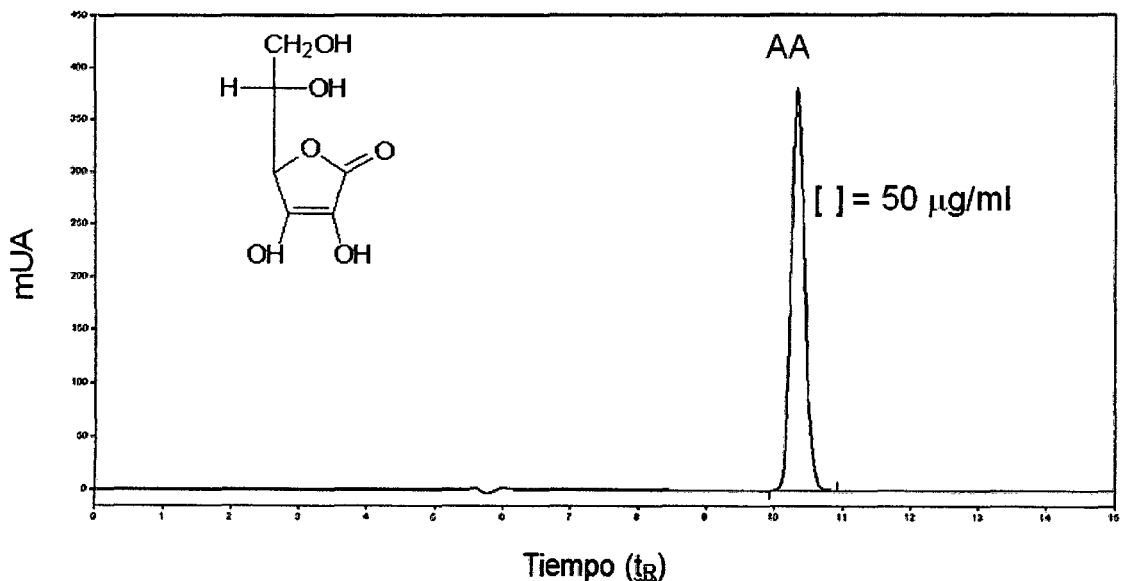


Figura 6. Cromatograma HPLC, estándar de ácido ascórbico

En el cuadro 3, se muestran los resultados del contenido de ácido ascórbico en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.

Cuadro 3. Contenido de ácido ascórbico en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.

Tratamientos	mg de AA/100g muestra
Pulpa fresca de Taperibá (PFT)	39,38 ± 1,21
Pulpa concentrada de Taperibá (PCT)	53,54 ± 1,37

Los valores representan el promedio ± ES, n=3.

En la figura 7, se muestra gráficamente los resultados, observándose un notable aumento de ácido ascórbico en la pulpa concentrada respecto a la pulpa fresca, esto debido al proceso de concentrado al que fue sometida la pulpa.

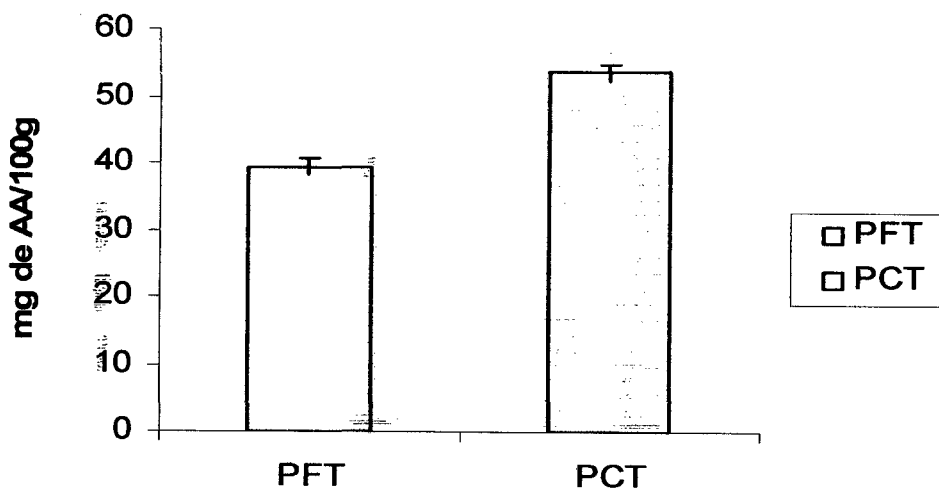


Figura 7. Contenido de ácido ascórbico en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.

En la figura 8, se muestra el cromatograma HPLC, obtenido al inyectar la pulpa fresca A y concentrada B de Taperibá

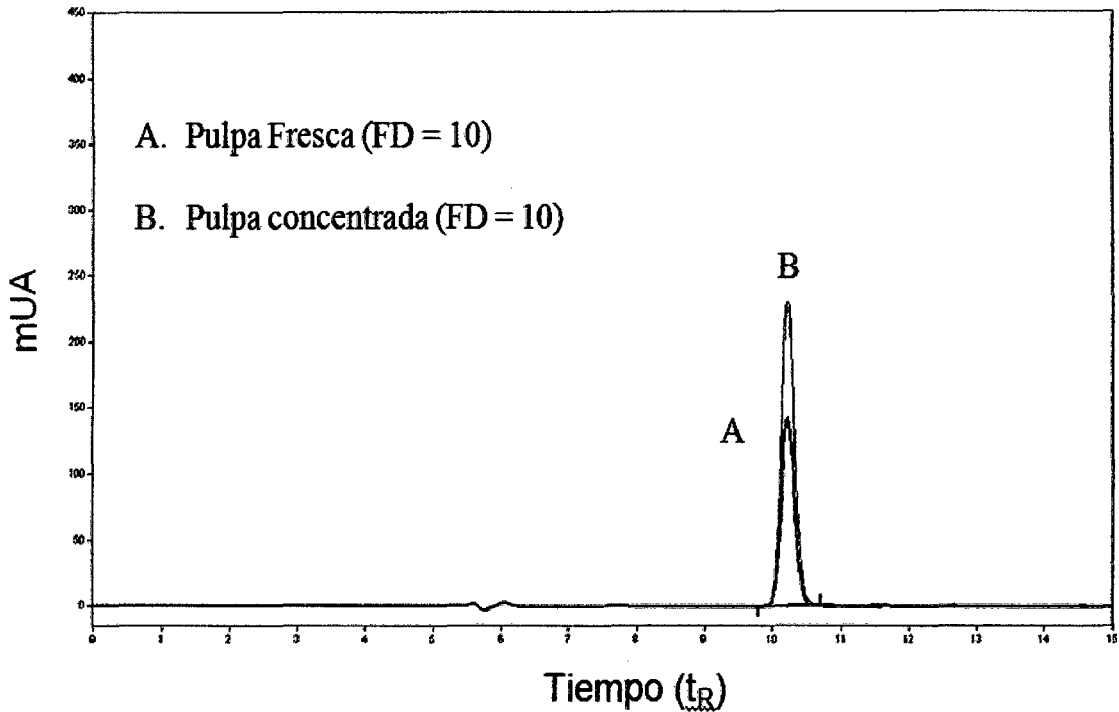


Figura 8. Cromatograma HPLC, A. pulpa fresca de Taperibá y B. pulpa concentrada de Taperibá con un FD (factor de dilución) = 10. Muestra representativa de n =3.

Es muy variada y bien conocida la actividad biológica de la vitamina C en el ser humano, y como la mayoría de los nutrientes, debería ser preservada poniendo especial importancia en las operaciones y procesos involucrados en los distintos métodos de conservación (PIRONE *et al.* 2002).

Según la diferencia de medias (Prueba de t, anexo II), existe diferencia altamente significativas ($P < 0,05$), en el contenido de ácido ascórbico en pulpa fresca y pulpa concentrada de Taperibá. La pulpa concentrada de Taperibá presentó el mayor contenido de ácido ascórbico (53,54 mgAA/100g), respecto a la pulpa fresca de Taperibá (39,38 mgAA/100g).

CALVAY (2009), menciona que la pulpa concentrada de Camu camu en estado maduro posee un contenido de ácido ascórbico de $2848,68 \pm 64,22$ mgAA/100g, Mientras que BRASIL *et al.* (2008), al concentrar la pulpa de Acerola (*Malpighia amarginata* DC.), partiendo de pulpa con 6,0 °Brix y 612,08 mgAA/100g y obtuvo una pulpa concentrada con 38,0 °Brix y con 2112,28 mgAA/100g.

PIRONE *et al.* (2002), menciona que los frutos de Rosa mosqueta se caracterizan, entre otros, por su alto contenido en vitamina C o ácido ascórbico, entre 500 y 2,200 mg por 100 g de fruta fresca según la fecha de recolección, el grado de maduración, las condiciones climáticas imperantes y la zona de donde se obtiene.

REPO Y ENCINA (2008), reportó en su estudio que el mayor contenido de ácido ascórbico lo tuvo el Aguaymanto ($43,3 \pm 0,5$ mg ácido ascórbico/100 g muestra); seguido por la Papaya de monte ($31,41 \pm 1,3$ mg ácido ascórbico/100 g muestra); la Tuna roja ($22,75 \pm 0,6$ mg ácido ascórbico/100 g muestra) y finalmente el Tomate de árbol ($16,09 \pm 1,6$ mg ácido ascórbico/100 g muestra)

Esta vitamina es muy sensible a diversas formas de degradación. Entre los numerosos factores que pueden influir en los mecanismos degradativos se pueden citar la temperatura, la concentración de sal y azúcar.

4.4. Del contenido de polifenoles totales en pulpa fresca y concentrada de Taperibá

En la figura 9, se muestra la curva patrón obtenida con el estándar de Catequina (CAT) a concentraciones de 3, 10, 30 y 100 µg/ml.

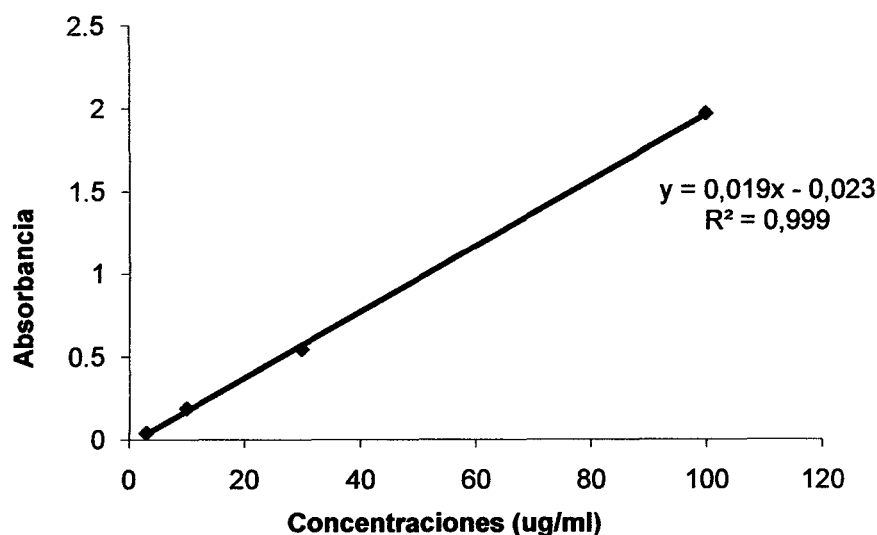


Figura 9. Curva estándar de catequina (CAT), para polifenoles totales

En el cuadro 4. Se muestran los resultados del contenido de polifenoles totales.

Cuadro 4. Contenido de polifenoles totales en mgCAT/g en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá

Tratamientos	mg de CAT/g
Pulpa fresca de Taperibá (PFT)	384,73 ± 8,49
Pulpa concentrada de Taperibá (PCT)	623,11 ± 6,62

Los valores representan el promedio ± ES, n=3.

En la figura 10, se muestra el resultado gráficamente y se puede observar la diferencia significativa (según la prueba de t, anexo III), existente entre la pulpa fresca y la pulpa concentrada de Taperibá.

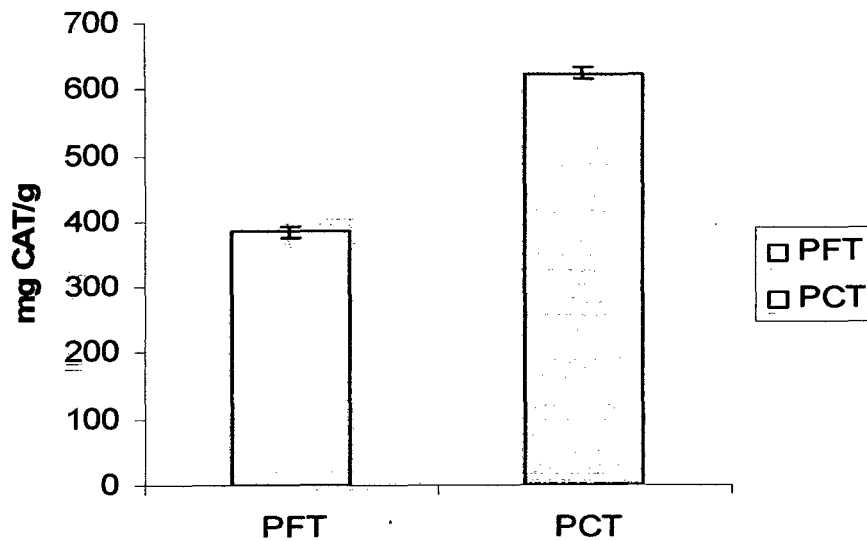


Figura 10. Contenido de polifenoles totales en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá

Los polifenoles son poderosos antioxidantes que mejoran las defensas naturales del organismo y lo protegen contra el daño celular que causa que el cuerpo se deteriore y desarrollen síntomas de enfermedad. La principal fuente de compuestos fenólicos son las frutas y vegetales los cuales contienen en abundancia.

Como se muestra en el cuadro 4, la pulpa concentrada de Taperibá presentó mayor contenido de polifenoles (623,11 mgCAT/g) y el menor (384,73 mgCAT/g) corresponde a pulpa fresca, el cual guarda relación con lo indicado por CARRION Y ORDOÑEZ (2009), quienes reportaron en pulpa fresca de Taperibá un $181,2 \pm 2$ mgCAT/ml. Así como SULLÓN (2009), determinó en el jugo de Noni un $232,413 \pm 6,76$ mgCAT/100ml.

CALVAY (2009) determinó en el concentrado de Camu Camu en estado maduro un contenido de polifenoles totales de $50,23 \pm 1,09$ mgCAT/g.

MARIÑAS (2010) determinó en la pulpa madura de Camu camu un $791,14 \pm 2,56$ mg AGE $\times 100g^{-1}$ de polifenoles totales, utilizando como patrón el ácido gálico.

MARQUINA *et al.*, (2008), mencionan que durante la transformación de la pulpa de Guayaba en mermelada, se redujo el contenido de polifenoles totales presente en la pulpa en un factor mayor de cinco, por lo que se recomienda consumir la pulpa de fruta en lugar de la mermelada, a fin de aprovechar los polifenoles contenidos en la fruta.

4.5. De la capacidad antioxidante en pulpa fresca y concentrada de Taperibá

4.5.1. Radical 2,2 diphenyl-1-picrilhidrazyl (DPPH)

En el cuadro 5, se muestran los resultados obtenidos de IC₅₀, en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá, con el radical DPPH.

Cuadro 5. Actividad antioxidante en IC₅₀ ($\mu g/ml$) en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá, frente al radical DPPH.

Tratamientos	IC ₅₀ ($\mu g/ml$)
Pulpa fresca de Taperibá (PFT)	$1288,88 \pm 46,17$
Pulpa concentrada de Taperibá (PCT)	$415,03 \pm 5,19$

Los valores representan el promedio \pm ES, n=3. IC₅₀: coeficiente de inhibición.

En la figura 11. Se muestra gráficamente los resultados del IC₅₀ en pulpa fresca y concentrada de Taperibá.

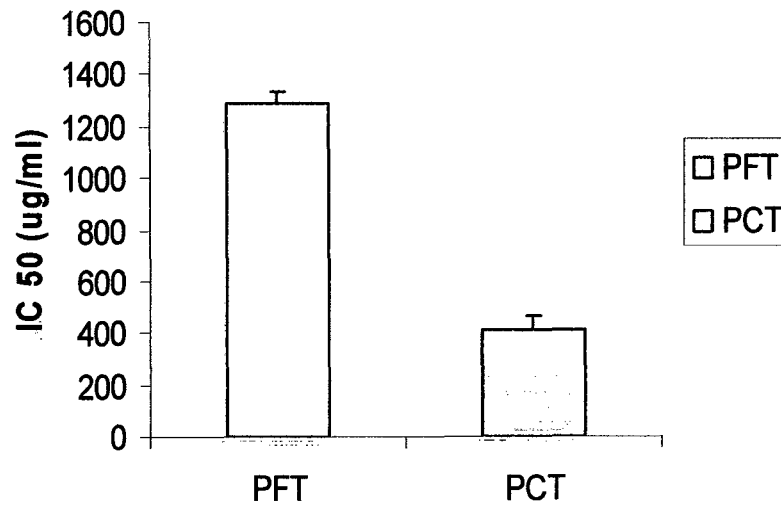


Figura 11. Actividad antioxidante (IC₅₀) en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá, frente al radical DPPH.

En el cuadro 5, el mejor efecto antioxidante según la prueba de t, ANEXO IV, al comparar los tratamientos se encontró diferencias significativa ($P < 0,05$), en pulpa concentrada de Taperibá con un IC₅₀ de 415,02 µg/ml y el menor efecto antioxidante correspondiente a la pulpa fresca de Taperibá con un IC₅₀ de 1288,88 µg/ml; CALVAY (2009), menciona que bajos valores en el coeficiente de inhibición (IC₅₀), reflejan mayor actividad para inhibir los radicales libres. Según los resultados obtenidos de IC₅₀, calculados mediante el porcentaje de inhibición del radical DPPH existe diferencias altamente significativas entre la pulpa fresca y concentrada de Taperibá.

La capacidad antioxidante de un alimento se debe a la actividad antioxidante de sus diferentes compuestos, entre los cuales están los compuestos fenólicos, carotenos, antocianinas, ácido ascórbico, etc. Las frutas

son una de las principales fuentes de compuestos antioxidantes como lo demuestra CALVAY (2009), en la pulpa concentrada de camu camu en estado maduro y a los 60 días de almacenamiento, reportó un IC_{50} de 5,85 $\mu\text{g/ml}$. SULLÓN (2009), determinó en jugo de noni en tres estados de madurez, que la mayor actividad antioxidante fue en el estado maduro con un IC_{50} de 149,475 $\mu\text{g/ml}$.

RAMADAN (2008), evaluó el potencial antioxidante total de zumos, bebidas frías y bebidas calientes determinadas mediante ensayo *in vitro* con DPPH, teniendo como resultado: en el jugo de Uva tinto 17,4 +/- 0,03 y 36,3 +/- 0,04 en jugo de Mango.

MARIÑAS (2010), determinó en su investigación en pulpa madura de Camu camu una gran capacidad antioxidante, (IC_{50} 7,43 \pm 0,09 $\mu\text{g} / \text{mL}$).

4.5.2. Radical 2,2-azinobis (3-etilenobenzotiazolino-6 ácido sulfónico) (ABTS)

En el cuadro 6. Se muestran los resultados de la Actividad antioxidante en IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá, frente al radical ABTS.

Cuadro 6. Actividad antioxidante en IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá, frente al radical ABTS.

Tratamientos	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Pulpa fresca de Taperibá (PFT)	272,55 \pm 1,26 ^a
Pulpa concentrada de Taperibá (PCT)	91,26 \pm 3,55 ^b

Los valores representan el promedio \pm ES, n=3. IC_{50} : coeficiente de inhibición.

En la figura 12, se muestra gráficamente la actividad antioxidante en IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) en pulpa fresca y concentrada de Taperibá.

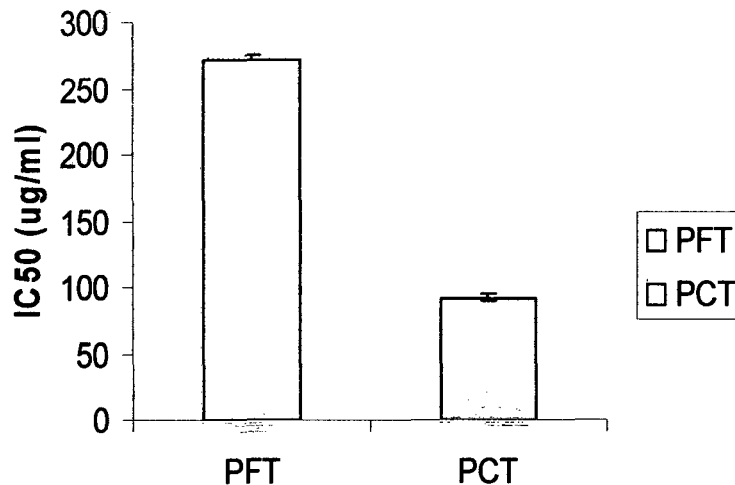


Figura 12. Actividad antioxidante (IC_{50}), en la pulpa fresca y concentrada de Taperibá, frente al radical $ABTS^{\circ+}$

El radical $ABTS^{\circ+}$ es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable

Los resultados de la evaluación de la capacidad secuestrante del catión $ABTS^{\circ+}$ se observan en la figura 12, comparando los resultados mediante la prueba de t y comparando las medias ($p < 0,05$) ANEXO V, se encontró que la pulpa concentrada de Taperibá ejerció mayor efecto sobre la capacidad de inhibir el catión $ABTS^{\circ}$ IC_{50} , reportando como resultado IC_{50} 91,26 $\mu\text{g/ml}$, existiendo una diferencia significativa con la pulpa fresca IC_{50} 272,55 $\mu\text{g/ml}$. SULLON (2009), determinó en Noni en estado maduro, una actividad antioxidante utilizando el radical $ABTS^{\circ+}$ de IC_{50} $186,961 \pm 1,22$. MARIÑAS (2010), determinó en pulpa de Camu camu un IC_{50} $2,95 \pm 0,06$,

pudiendo notar una diferencia significativa con respecto a la pulpa concentrada de Taperibá, esto debido al alto contenido de ácido ascórbico presente en el camu camu.

Sin embargo se puede observar, que el coeficiente de inhibición (CI_{50}), mediante método el catión $ABTS^{•+}$, es uno de los más rápidos, originando resultados reproducibles y coherentes. Además, el ABTS presenta importantes ventajas; muestra varios máximos de absorción y una buena solubilidad. El ABTS y DPPH presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también eletroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH sólo puede disolverse en medio orgánico. El radical $ABTS^{•+}$ tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y a los objetivos planteados en este estudio se puede concluir lo siguiente:

- Las características fisicoquímicas de la pulpa fresca de Taperibá fueron: $85,45 \pm 0,7\%$ de humedad, $0,58 \pm 0,02\%$ de proteína, $0,35 \pm 0,01\%$ de grasa, $9,2 \pm 0,26\%$ de carbohidratos, $0,57 \pm 0,01\%$ de fibra, $0,45 \pm 0,01\%$ de ceniza.
- Se obtuvo pulpa fresca y concentrada de Taperibá, siguiendo las operaciones: recepción, empleando jabas de polipropileno; selección se eliminaron las sobremaduras y se trabajó con frutos maduros; lavado manual por inmersión; pulpeado usando el pulpeador con tamiz 1 mm de luz; concentrado, se eliminó un 40% de agua en el rotavapor a 50°C con 70 rpm de velocidad angular del balón y 24 pulg-Hg de presión de vacío; envasado en bolsa de polietileno y almacenado a congelación (-20°C).
- El contenido de ácido ascórbico en pulpa fresca fue $39,38 \pm 1,21\%$ mgAA/100g y en pulpa concentrada $53,54 \pm 1,37\%$ mgAA/100g.

- La pulpa concentrada de Taperibá presentó mayor contenido de polifenoles totales ($623,11 \pm 6,62$ mgCAT/g), que la pulpa fresca ($384,73 \pm 8,49$ mgCAT/g).
- La pulpa concentrada de Taperibá presentó mayor actividad antioxidante con un IC_{50} de $415,02 \pm 5,19$ μ g/ml, mientras que en pulpa fresca un IC_{50} de $1288,88 \pm 46,17$ μ g/ml, empleando el radical DPPH, mientras que empleando el radical ABTS se obtuvo como resultado en pulpa concentrada de Taperibá (IC_{50} $91,26 \pm 3,55$ μ g/ml) y en pulpa fresca (IC_{50} de $272,55 \pm 1,26$ μ g/ml),

VI. RECOMENDACIONES

Teniendo como base los resultados de esta investigación, se recomienda lo siguiente:

- Fomentar el consumo de este fruto empleando mezclas de pulpas para incrementar su capacidad antioxidante, y aprovechar sus características sensoriales tales como sabor y aroma.

- Elaborar e Identificar los parámetros tecnológicos de productos a base de pulpa concentrada de Taperibá como bebidas, jaleas y mermeladas a escala industrial.

- Realizar estudios de actividad antioxidante, polifenoles totales y ácido ascórbico, con la pulpa concentrada de Taperibá a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento, esto para estimar la pérdida de sus componentes bioactivos durante el almacenamiento.

- Realizar estudios de actividad antioxidante, cuantificación de taninos y compuestos bioactivos en la cascara y semilla del Taperibá.

- Promover el cultivo tecnificado del Taperibá en la zona, con fines a industrializarse y obtener pulpa concentrada para exportación.

**ASCORBIC ACID QUANTIFICATION BY HPLC AND EVALUATION
OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY IN FRESH AND CONCENTRATE PULP
TAPERIBÁ (*SPONDIAS CYTHEREA SONN*)**

ABSTRACT

Taperibá is a native fruit in the Peruvian Amazon, which is not tech production and consumption is low. The purpose of this research was to quantify and evaluate ascorbic acid antioxidant capacity in fresh pulp and concentrated Taperibá (*spondias cytherea son*). Of the ripe fruit of Taperibá was obtained fresh pasta and pasta concentrated under vacuum to remove the 40% wáter, to 50 °C temperature. Ascorbic acid content was determined by the method of reverse phase HPLC, total Polyphenols and antioxidant by inhibiting free radical DPPH (radical 2, 2-diphenyl-picrilhydrayl) and ABTS ° (2.2-azinobis radical etilenobenzotiazolino-6 3-sulfonic acid) were determined by Spectrophotometry. Was obtained ascorbic acid content in fresh pulp 39.38 mgAA/100g and concentrated pulp 53.54 mgAA/100g. Regarding the total Phenolic content using Folin - Ciocalteu was determined in fresh pulp 384.73 mgCAT/100g and concentrated pulp 623.11 mgCAT/100g. The antioxidant capacity using the DPPH radical inhibition coefficient expressed as IC₅₀ values obtained 1288.88 mg / ml to examine the fresh pulp and an IC₅₀ of 415, 03 mg/ml in concentrated pulp; while the ABTS radical was obtained an IC₅₀ 272.55 ± 1.26 mg/ml in fresh pulp and 91.26 ± 3.55 mg/ml in concentrated pulp. In conclusion, the results show us that the pulp to be concentrated Taperibá increases the content of ascorbic acid, Phenolic compounds and antioxidant activity, this fruit can be used for the manufacture of concentrated fruit used for beverages and for industrial Nutraceuticals

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, B.; AVANZA, J. 2005. Concentración por evaporación de jugos de lima Rangpur. Laboratorio de Tecnología Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. UNNE.
- A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. Washington. U.S.A.
- A.O.A.C. 1997. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. Washington. U.S.A.
- ASQUIERI, E. 2008. Curso internacional a nivel de post grado denominado "TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS EN ALIMENTOS". Universidad Nacional Agraria de la Selva, del 19 al 23 de mayo del 2008, Tingo María.
- ARANCETA, J. 2006. Frutas, verduras y salud. Masson S. A. Barcelona España. 268p.
- ARNOA, M. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidants activity using chromogen radicals: A practical case. Viewpoint of Food Science and Technology. 11: Pg. 419 – 421.
- AVELLO, M.; SUWALSKY, M. 2006. Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. Universidad de Concepción. Honduras. 1-6 p.

- BLIGH, E; DYER, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*; 37:911-917.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss Technol.* 28: 25-30.
- BRASIL, I; TELES, K.; OLIVEIRA, G.; MAIA, G.; FIGUEIREDO, R. 2008. Physicochemical changes during extraction and concentration of acerola juice (*Malpighia emarginata* DC.) using pectinases and clarifying agents. *Braz. J. Food technol., campinas.*
- BOSANOVA, L.; BRANDSTETEROVÁ, E. 2000. Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A.* 880, 149-168
- CALVAY, H. 2009. Evaluación de la capacidad antioxidante pulpa concentrada de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh) en dos estados de madurez en Tingo Maria.
- CARBONELL, F. 2001. Estrés oxidativo y riesgo cardiovascular. *Boletín Secf.* 4: 120.
- CARRION, J.; ORDOÑEZ, E.; REATEGUI D. 2009. Determinación de la actividad antioxidante, polifenoles y vitamina C en Araza (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh), Guanabana (*Annona muricata* L.), Guayaba (*Psidium guajava* L.), Maracuya (*Pasiflora edulis* Sims), Papaya (*Carica papaya* L), Carambola (*Averrhoa carambola* L.), Taperibá (*Spondias bombín* L) y Lima (*Citrus limetta*)

- CAVIA, M.; LÓPEZ, A.; HERNANDO, B.; LÓPEZ, A.; GARCÍA-GIRÓN, C.; COMA, M. y MUÑIZ, P. 2007. Estado redox celular y cáncer: influencia sobre el tratamiento con citostáticos. *Electrón. J. Biomed.* 2007(2): 51-55.
- CALZADA, J.; 1962. 143 Frutales nativos amazónicos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Pg. 83 – 84.
- CODEX ALIMENTARIO. 2005. Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas .CODEX STAN 247-2005.p.21
- CUNHA, H.; ELESBÃO, R.; CORDEIRO, A.; HERBSTER, C.; COSTA, N. 2001. Calidad de frutas nativas de latinoamérica para industria: jobo (*Spondias mombin* LE) Agroindústria Tropical, CP 3761, 60.511-110, Fortaleza, CE, Brasil.
- DAVILA R.; CHIRE T. 2008. Determinación de taninos, vitamina C y capacidad antioxidante en diferentes estados de madurez de los frutos de carambola (*Averrhoa carambola* L.). Tesis con para grado de magister. Universidad Nacional Agraria a la Molina.
- DROST, T. 1996. Radicales libres en biología y medicina: una breve revisión. *Rev. Cub. Med. Milit.* 2: 44-57.
- ESPIN, J.; SOLER – RIVAS, C.; WICHERS, H.; GARCIA – VIGUERA, C. 2000. Anthocyanin – based: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food chem.* Pg. 1588 – 1591.
- GARCÍA A.; PERIAGO M.; VIDAL M.; CANTOS E. 2002. Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de uva y frutas rojas. Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Área de Conocimiento de Nutrición y Bromatología. Facultad de

Veterinaria, Murcia. 103-114.

GARCIA E. 2009. Determinación de la difusividad térmica en pulpa de noni (*morinda citrifolia*, l), en función de la temperatura. Facultad de industrias alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Pg. 47 – 51.

GARCIA, L., ROJO, D., SANCHEZ, E. 2001. Planta con propiedades Antioxidantes. Rev. Cubana invest. Biomédica 20(3):231-5p.

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 (2000) 309–316.

GONZALES – TORRES, M. 2000. ; BETANCOURT- RULE, M. 2000. Daño oxidativo y antioxidante. Bioquímica. 3 - 9 p.

GUITIERREZ, A.; 1969. Especies frutales nativos de la selva del Perú, estudio botánico y de propagación por semillas. Lima. Pg. 71 – 77.

GUTIÉRREZ, A.; LEDESMA, L.; GARCÍA, I.; GRAJALES, O. 2007. Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. Rev Cubana Salud Pública. 33(1): 1-7

GUTIERREZ, M. 2002. Té polifenoles y protección a la salud. Instituto superior de ciencias medicas.

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

HORIE, H.; KOHATA, K. 2000. Analysis of tea components by high

performance liquid chromatography and high – performance capillary electrophoresis. J. Chrom A: 881: 4725 – 4738.

KIM, D.; LEE, CH.; LEE, K.; LEE, H. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J. Agric. Food Chem. 5: 2A – E.

KUSKOSKI, E.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A.; MANCINI-FILHO J.; FETT, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Universidad de Sevilla, Departamento de Química Analítica y Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia– Sevilla, España.

LEBEAU, J.; FURMAN, C.; BERNIER, J.; DURIEZ, P.; TEISSIER, E.; COLLETE, N. 2000. Antioxidant properties of di – tert – butylhydroxylated flavonoids. Free Rad. Biol & Med. Pg. 900 – 912.

MARIÑAS, M. 2010. Conservación de la pulpa de camu camu tratado por ultrasonido y estudio de sus componentes bioactivos.

MARTÍNEZ, I.; PERIAGO, M. 2000 Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta .Unidad Docente de Bromatología e Inspección de Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus Universitario de Espinardo, Murcia, España. 5 – 15 p.

MARQUINA V.; ARAUJO L.; RUÍZ J.; RODRÍGUEZ-MALAVÉ A.; VIT P. 2008. Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.) Facultad de Farmacia y

Bioanálisis, Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

- MAVI, A.; TERZÍ, Z.; OZGEN,U.; YILDIRIM, A.; COSKUN, M. 2004. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea*(apiaceae),*sedum sempervivoides*(Crassulaceae), *Malva neglecta*(Malvaceae), *Cruciata taurina*(rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia*(rosaceae), *Galium verum* Subs.*verum*(rubiaceae),*Urtica dioic* (urticaceae).*Biol.Pharm.Bull.*27(5)702-705.
- MEYER, M. 1996. Elaboración de frutas y hortalizas. Edit. Trillas (73 -76) p.
- MITCHAM, E.; CANTWELL, M.; KADER, A. 1996. Methods for determining quality of fresh commodities. *Perishables Handling Newsletter*, n. 85, p. 1-5,
- NIELSEN, S. 1998. *Food analysis 2^{da}*. Edic. Edit. Services Ruthbloom. Usa pp 487 – 526.
- PEREIRA, N.; QUEIROZ, A.; ELESBÃO R.; CUNHA H.; CORDEIRO DE OLIVEIRA A. 2003. Armazenamento de cajá (*Spondias mombin* L.) em refrigeração sob atmosfera modificada. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 47:234-235.
- PHILLIPS, R.; CAMPBELL, C.; BALERDI, C.; CRANE, J. 2009. Las Ciruelas en Florida. Universidad de Florida – USA.
- PINEDA, A. 2005. Determinación de las propiedades antioxidantes de variedades de injerto (*Pouteria viridis*) que se cultivan en tres regiones de guatemala. Trabajo Profesional Para Optar el Título de química bióloga. Universidad de guatemala. 79 p.

- PIRONE B.; OCHOA M.; KESSELER A.; MICHELIS A. 2002. Evolución de la concentración de ácido ascórbico durante el proceso de deshidratación de frutos de la rosa mosqueta (*Rosa eglantheria L.*). Facultad de Ingeniería – Universidad Nacional del Comahue. 31 (1): 85-98
- PRAKASH, A. 2001. Antioxidant Activity. Medallion laboratories Analytical Progress .Minnesota. 1-6 p.
- RAPAPORT, S. 1993. Introducción a la Hematología. 2 ed. Fontan F trad.
- RAMADAN M. 2008. Total antioxidant potential of juices, beverages and hot drinks consumed in Egypt screened by DPPH *in vitro* assay Biochemistry Department, Faculty of Agriculture, Zagazig University, Zagazig 44511, Egypt
- REPO, R.; ENCINA, C. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Rad. Biol. Med. v. 26, p. 1231-1237 p.
- REVISTA PERUANA DE CARDIOLOGÍA., 2000. Alimentos en el Perú (tablas II).Julio - Diciembre.
- ROBBINS, S. 1995. Patología funcional y estructural. 5 ed. México: Mc Graw Hill Interamericana. XIV. 1533p. (p. 4,13-14.)
- RODRIGUES, R.; MENEZES, H.; CABRAL, C.; DORNIER, M.; RIOS,G.; REYNES,M. 2004. Evaluacion of reverse osmosis and osmotic

evaporation to concentrate cau camu juice (*Myrciaria dubia*). Journal of food Engineering.

RODRÍGUEZ, P. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo.

Rev Cub. Med. Milit. 30(1):15-20

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F. 2001. Técnicas de Investigación para determinar la Actividad Antioxidativa y Antiinflamatoria de Planta Medicinales de la Amazonia.

SITI I.; NORAYATI I.; MOHD M.; HANISAH A. 2004. Some physical and chemical properties of ambarella (*Spondias cytherea* Sonn.) at three different stages of maturity. J. of Food Composition and Analysis. Nov. 2004, Vol. 106 Issue 3, p1202-1207, 6p.

SOTO, J. 2005 . Detección de Fitoquímicos, contenido de Vitamina C y Ácido fólico en Chironja (*Citrus sinensis x Citrus paradisi*) injertada en diferentes patrones de cítrica .Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Puerto Rico.

STEPHENS, C., *et al.* 1996 .Cambridge heart antioxidant study (CHAOS). Lancet. 1996; 347: 781.

SULLON, J. 2009. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la capacidad antioxidante del noni en tres estados de madurez en Tingo Maria. Facultad de ingeniería de industrias alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la selva.

URBINA, A. 2008. Nuevo papel de los radicales libres del oxígeno en el ejercicio: ¿otra paradoja?. Col. Méd. 39(3):266-275.

- VASQUEZ C.; CALA M.; MIRANDA I.; TAFURT G.; MARTINEZ M.; STASHENKO E. 2007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *salvia sochensis*, *bidens reptans* y *montanoa ovalifolia*. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia. P. 205.
- VELÁSQUEZ, P.; PRIETO, G.; CONTRERAS, P. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75 julio-setiembre. Mexico. 37-43p.
- VENEREO, J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar. *Rev Cubana Med Milit.* 31(2):126-33.
- VILLANUEVA, J. 2003. Antiocianina, Ácido Ascórbico, Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante en la Cáscara de Camu Camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh H.B.K.). Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentaria. Tingo María- Perú. Pág. 47.
- YILDIRIM, A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activity of *rumex crispus* L. Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 49: Pg. 4063 – 4089.
- YUREKLI A.; OZKAN M.; KALKAN T.; SAYBASILI H. 2006. GSM base station electromagnetic radiation and oxidative stress in rats. *Electromagnetic Biology and Medicine* 25:177-188.
- WATSON, E.; 1985. Cultivos tropicales adaptados a la selva alta peruana particularmente al Alto Huallaga. Fondo del libro, banco agrario del Perú. Pg. 320 – 323.

ANEXO

Anexo I.

Cuadro 7 .Preparación de los estándares de (+) - catequin

Niveles	Cat (μM)	V_{met} (μl)	V_{cat} (μl)	V_f
0	0	1000	0	1000
1	100	990	10	1000
2	300	970	30	1000
3	1000	900	100	1000
4	3000	700	300	1000
5	10000	0	1000	1000

Donde:

V_{met}: Volumen en μl de metanol.

V_{cat}: Volumen en μl de 10 mM (+)-Catequin (estándar).

V_F : Volumen final.

Anexo II

Comparación de medias del análisis de ácido ascórbico de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá (Evaluado con Statgraphics)

95,0% intervalo de confianza para la media de PFT: 36,7167 +/- 12,6162

95,0% intervalo de confianza para la media de PCT: 53,54 +/- 3,41576

95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:

Suponiendo varianzas iguales: -16,8233 +/- 8,43423

Contraste t de comparación de medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: t = -5,53805 P-Valor = 0,00519704

Anexo III.

Comparación de medias del análisis de polifenoles totales de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá

95,0% intervalo de confianza para la media de PFT: 384,73 +/- 21,0843

95,0% intervalo de confianza para la media de PCT: 623,117 +/- 20,124

95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:

Suponiendo varianzas iguales: -238,387 +/- 18,808 [-257,195,-219,579]

Contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: t = -35,1909 P-Valor = 0,00000389127

Anexo IV.

Comparación de medias del análisis de la capacidad antioxidante de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá

Con el radical DPPH

95,0% intervalo de confianza para la media de PFT: 1288,88 +/- 114,681

95,0% intervalo de confianza para la media de PCT: 415,027 +/- 27,7481

95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:

Suponiendo varianzas iguales: 873,853 +/- 76,1377 [797,716,949,991]

Contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: t = 31,8661 P-Valor = 0,00000578073

Anexo V.

Comparación de medias del análisis de la capacidad antioxidante de la pulpa fresca y concentrada de Taperibá

Con el radical ABTS

95,0% intervalo de confianza para la media de PFT: 272,547 +/- 8,8404

95,0% intervalo de confianza para la media de PCT: 91,2567 +/- 3,04389

95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:

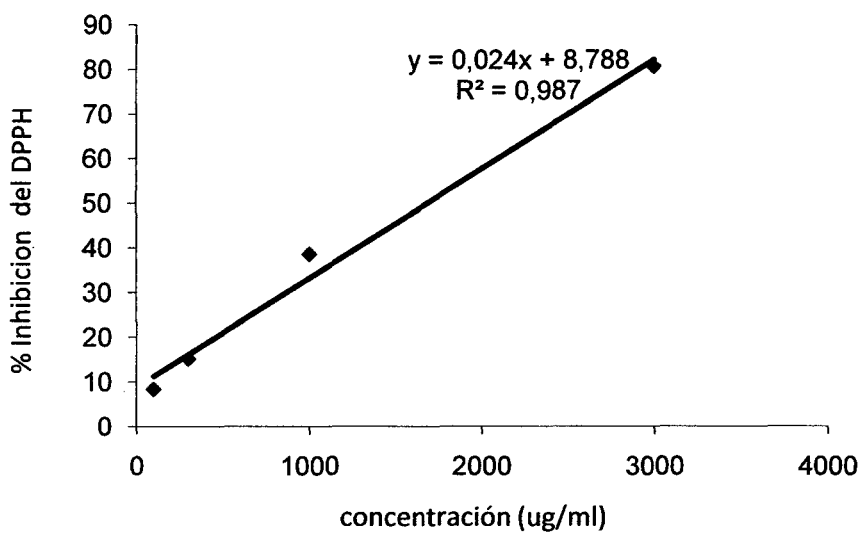
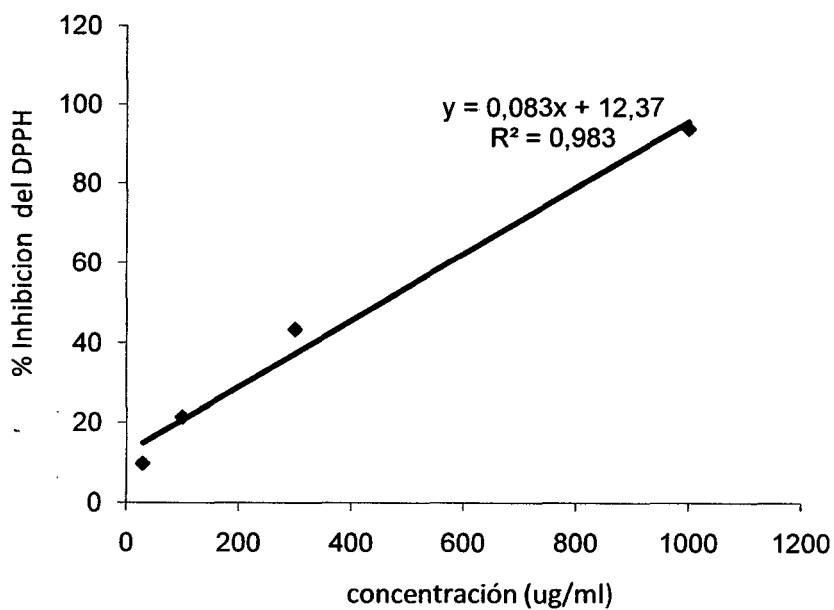
Suponiendo varianzas iguales: 181,29 +/- 6,03329

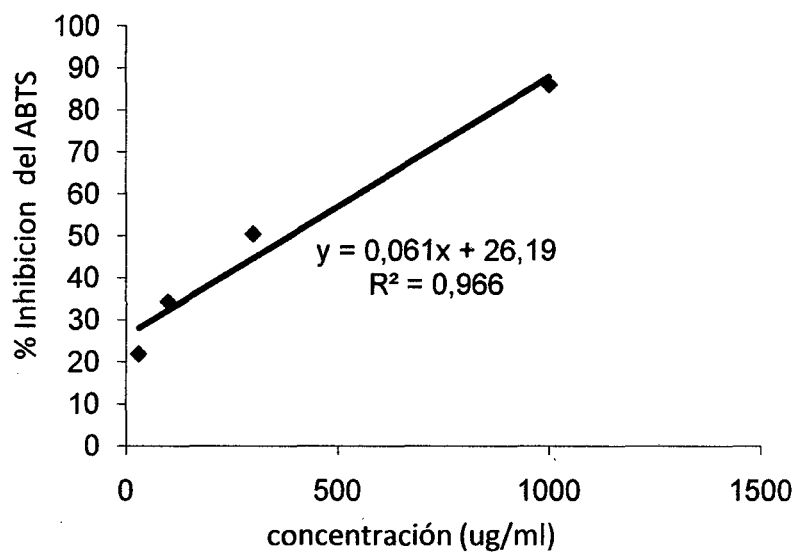
Contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: t = 83,4276 P-Valor = 1,23735E-7

Anexo VI**Figura 13.** Inhibición del radical DPPH para la pulpa fresca de Taperibá**Anexo VII.****Figura 14.** Inhibición del radical DPPH para la pulpa concentrada de Taperibá.

Anexo VIII**Figura 15.** Inhibición del radical ABTS para la pulpa fresca de Taperibá**Anexo IX.****Figura 16.** Inhibición del radical ABTS para la pulpa concentrada de Taperibá