

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES
DE ESPINA AMARILLA (*Berberis laurina*) EN TRES
ESTADOS DE MADUREZ**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

TESISTAS:

Bach. TELLO MARCOS, Noemi

Bach. SOBRADO MIRAVAL, Zila

ASESOR:

Dr. VILLANUEVA TIBURCIO, Juan Edson

HUÁNUCO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A nuestros padres por la ayuda incomparable, por inculcarnos sus valores, por hacer de nosotros una mejor persona día a día, por estar en los buenos y malos momentos de nuestras vidas y darnos la mejor educación y enseñarnos que todas las cosas hay que valorarlas, trabajarlas y lucharlas para lograr los objetivos de la vida.

A nuestros familiares cercanos por su apoyo, comprensión, paciencia y cariño, por creernos y apoyarnos incondicionalmente.

AGRADECIMIENTO

- A Dios por darnos la oportunidad de vivir y por estar con nosotros en cada paso que damos, por iluminarnos nuestra mente y por haber puesto en nuestro camino a aquellas personas que han sido nuestro soporte y compañía durante todo el periodo de estudio y a nuestros padres por el apoyo que me brindaron en mi formación profesional.
- Nuestra eterna gratitud a nuestro Alma Mater, la Universidad Nacional Hermilio Valdizán, en cuyas aulas guardamos nuestros más secretos recuerdos y fue testigo de nuestra formación profesional, Facultad de ciencias Agrarias- Carrera Profesional de Ingeniería Agroindustrial.
- A los docentes de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, de la Facultad de Ciencias Agrarias, por sus enseñanzas y consejos que forjaron en mí, que fueron pilares fuertes en mí desarrollo profesional.
- A nuestro asesor, Dr. Villanueva Tiburcio, Juan E. por su generosidad y la oportunidad de realizar este trabajo al compartir su amplia experiencia y conocimiento con confianza y amistad.
- De la misma manera agradezco al Dr. Ángel David, Natividad Bardales; Mg. Roger Estacio Laguna, por las guías que nos otorgaron durante la investigación.
- Al Ing. César Cueto Rosales por compartir sus conocimientos en la experimentación del trabajo de investigación y a todos los ingenieros de la facultad que nos condujeron en nuestra vida universitaria.
- Finalmente, agradecemos a algunos familiares y amigos quienes colaboraron en este trabajo de investigación.

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo evaluar las propiedades antioxidantes de espina amarilla (*Berberis laurina*) en sus tres estados de madurez; referente a la caracterización físico química se determinaron por los métodos de la AOAC (1994, 1997, 2000 y 2016), en el caso de pH, sólidos solubles, acidez titulable, humedad, grasa y fibra estos varían de acuerdo al estado de madurez; respecto a ceniza, nitrógeno total y carbohidratos no están influenciados por su estado de madurez. En cuanto a los compuestos bioactivos, para el caso de antocianinas, no se detectó en estado verde ni en pintón con ningún tipo de extracto, mientras en estado maduro se ha obtenido con el extracto acuoso, etanólico y metanólica con $12,21 \pm 0,74$; $21,17 \pm 2,21$ y $24,93 \pm 5,04$ mg cianidina-3-glucósido/ 100 g de muestra respectivamente. En los polifenoles totales se obtuvo con alto contenido en estado maduro con extracto acuoso, etanólico y metanólica con $432,78 \pm 58,89$; $581,76 \pm 8,86$ y $898,92 \pm 96,79$ $\mu\text{g AGE/ g}$ de muestra respectivamente, mientras en estado verde y pintón fue mínimo; para el caso de ácido ascórbico (método de HPLC) no se detectó en ningún estado de madurez. La actividad antioxidante en la fruta de espina amarilla, con mayor contenido de actividad antioxidante expresados en trolox equivalente (TE) e IC_{50} , fue en el estado maduro con el extracto acuoso, etanólico y metanólica; para ABTS con $10,14 \pm 1,11$; $11,03 \pm 1,61$ y $15,06 \pm 1,07$ mg TE/ g de muestra así mismo referente al IC_{50} $0,40 \pm 0,06$; $0,33 \pm 0,02$ y $0,22 \pm 0,04$ mg/ mL. Para DPPH con $5,49 \pm 1,33$; $6,88 \pm 1,05$ y $8,12 \pm 0,89$ mg TE/ g de muestra y referente al IC_{50} $0,95 \pm 0,04$; $0,74 \pm 0,01$ y $0,71 \pm 0,01$ mg/ mL de muestra; como se evidencian estuvieron influenciados por el estado de madurez y el tipo de solvente a extraer. Se concluye que el estado maduro con el extracto de metanol mostró las concentraciones más elevadas en casi todo el análisis realizado.

Palabra clave: Antocianinas, polifenoles totales, vitamina C, DPPH, ABTS.

ABSTRACT

The research aimed to evaluate the antioxidant properties of yellow spine (*Berberis laurina*) in its three stages of maturity; Regarding the physical chemical characterization were determined by the methods of the AOAC (1994, 1997, 2000 and 2016), in the case of pH, soluble solids, titratable acidity, moisture, fat and fiber these vary according to the state of maturity; Regarding ash, total nitrogen and carbohydrates are not influenced by their state of maturity. As for the bioactive compounds, in the case of anthocyanins, it was not detected in the green state or on a board with any type of extract, while in the mature state it was obtained with the aqueous, ethanolic and methanolic extract with $12,21 \pm 0,74$; $21,17 \pm 2,21$ and $24,93 \pm 5,04$ mg cyanidine-3-glycoside / 100 g of sample respectively. In the total polyphenols, it was obtained with high content in the mature state with aqueous, ethanolic and methanolic extract with $432,78 \pm 58,89$; $581,76 \pm 8,86$ and $898,92 \pm 96,79$ $\mu\text{g AGE / g}$ of sample respectively, while in green and pinon state it was minimal; in the case of ascorbic acid (HPLC method) it was not detected in any state of maturity. The antioxidant activity in the yellowthorn fruit, with the highest antioxidant activity content expressed in equivalent trolox (TE) and IC50, was in the mature state with the aqueous, ethanolic and methanolic extract; for ABTS with $10,14 \pm 1,11$; $11,03 \pm 1,61$ and $15,06 \pm 1,07$ mg TE / g of sample also referring to IC50 $0,40 \pm 0,06$; $0,33 \pm 0,02$ and $0,22 \pm 0,04$ mg / mL. For DPPH with $5,49 \pm 1,33$; $6,88 \pm 1,05$ and $8,12 \pm 0,89$ mg TE / g sample and referring to IC50 $0,95 \pm 0,04$; $0,74 \pm 0,01$ and $0,71 \pm 0,01$ mg / mL of sample; As evidenced, they were influenced by the state of maturity and the type of solvent to be extracted. It is concluded that the mature state with the methanol extract showed the highest concentrations in almost all the analysis performed.

Keyword: Anthocyanins, total polyphenols, vitamin C, DPPH, ABTS.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. FUNDAMENTO TEÓRICO	3
2.1.1. Espina amarilla (<i>Berberis laurina</i>).....	3
2.1.2. Modificaciones Bioquímicas en la fisiología de la maduración.....	4
2.1.3. Antioxidantes.....	5
2.1.4. Compuestos fenólicos.....	7
2.1.5. Antocianinas.....	10
2.1.6. Actividad antioxidante.....	12
2.1.7. Vitamina C.....	15
2.2. ANTECEDENTES	17
2.3. HIPÓTESIS	22
2.3.1. Hipótesis general.....	22
2.3.2. Hipótesis específicas.....	22
2.4. VARIABLES	23
2.4.1. Variables Independientes (x).....	23
2.4.2. Variables Dependientes (y).....	23
2.4.3. Operacionalización de variables.....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	24
3.1.1. Tipo de investigación.....	24
3.1.2. Nivel de investigación.....	24
3.2. LUGAR DE EJECUCIÓN	24
3.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS	24
3.3.1. Población.....	24
3.3.2. Muestra.....	24

3.3.3.	Tipo de muestreo	25
3.3.4.	Unidad de análisis.....	25
3.4.	TRATAMIENTOS EN ESTUDIO	25
3.5.	PRUEBA DE HIPÓTESIS	25
3.5.1.	Diseño de la investigación.....	25
3.5.2.	Datos a registrar.....	26
3.5.3.	Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información	26
3.6.	MATERIALES Y EQUIPOS	27
3.6.1.	Materia prima	27
3.6.2.	Materiales, equipos y reactivos	28
3.7.	CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	30
3.7.1.	Caracterización de la materia prima	30
3.7.2.	Determinación de la característica química proximal en fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.....	32
3.7.3.	Evaluación del contenido de los compuestos bioactivos en espina amarilla en tres estados de madurez.....	32
3.7.4.	Evolución de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.....	34
IV.	RESULTADOS	37
4.1.	Caracterización de la materia prima	37
4.1.1.	Análisis físico morfológico de la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.....	37
4.1.2.	Caracterización fisicoquímica de la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.....	37
4.2.	Determinación de la característica química proximal en frutas de espina amarilla en sus tres estados de madurez.....	38
4.3.	Evaluación del contenido de los compuestos bioactivos en la fruta de espina amarilla en tres estados de madurez.	39
4.4.	Evaluación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.....	42
4.4.1.	Porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extractos acuosos, etanólico y metanólico de frutas de espina amarilla en sus tres estados de madurez.	42

4.4.2.	Actividad antioxidante por IC ₅₀ DPPH y ABTS frente a extractos acuosos, etanólico y metanólico en frutas de espina amarilla en sus tres estados de madurez.....	43
5.1.	De la caracterización de la materia prima	45
5.1.1.	Del análisis físico morfológico de la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.....	45
5.1.2.	De la caracterización fisicoquímica de fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez	45
5.2.	De la determinación de la característica química proximal en fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.....	47
5.3.	De la evaluación de los compuestos bioactivos en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.	49
5.4.	De la evaluación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez	52
5.4.1.	Del porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto metanólica, etanólico y agua en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.	52
5.4.2.	Actividad antioxidante por IC ₅₀ DPPH y ABTS frente a extracto acuoso, etanólico y metanólico en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.....	53
VI.	CONCLUSIONES	55
VII.	RECOMENDACIONES	56
VIII.	LITERATURA CITADA	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades organolépticas atribuidas a los compuestos fenólicos	8
Tabla 2. Contenido de antocianinas en diferentes bayas.....	11
Tabla 3. Estructura y sustituyente de las antocianinas	12
Tabla 4. Clasificación de los métodos para evaluar la actividad antioxidante...	15
Tabla 5. Se muestra la operacionalización de las variables en estudio	23
Tabla 6. Tratamientos de investigación	25
Tabla 7. Análisis físico morfológico en frutas de espina amarilla	37
Tabla 8. Caracterización fisicoquímica en frutas de espina amarilla.	38
Tabla 9. Característica proximal en la fruta de espina amarilla.	39
Tabla 10. Evaluación de los compuestos bioactivos en la fruta de espina amarilla	40
Tabla 11. Actividad antioxidante por DPPH y ABTS en frutas de espina amarilla.....	42
Tabla 12. Actividad antioxidante (IC ₅₀) frente al radical DPPH y catión ABTS.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y sustituyentes de las antocianinas.....	12
Figura 2. Estructura química del ácido ascórbico	16
Figura 3. Esquema experimental de la investigación.....	30
Figura 4. Diagrama para determinar el contenido de la propiedad antioxidante de la fruta de espina amarilla.....	31
Figura 5. Esquema experimental.....	36
Figura 6. La Cromatograma de análisis de vitamina C (254 nm) en frutas de espina amarilla, el área (pico) de vitamina C, según el método realizado, debería de mostrarse en el minuto cinco el cual no se observa en el cromatograma.....	40
Figura 7. A) Cromatograma con control de vitamina C, B) Cromatograma de extracto de fruta de espina amarilla, C) Cromatograma de extracto de fruta de espina amarilla más adicionado de ácido ascórbico.....	41

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el Perú posee una gran diversidad de recursos, tanto en la flora como en la fauna silvestres; la diversidad de pisos ecológicos ha permitido, a través de los milenios, la domesticación de numerosas especies nativas de plantas con una alta variabilidad genética; en algunos casos estos recursos no están siendo aprovechados en forma eficiente a pesar que poseen potencialidades agroindustriales (Zapata, 2001).

En los andes de nuestra Región - Huánuco la mayoría de los agricultores se dedican a cultivar cultivos conocidos que requieren cuidado permanente. Estos cultivos silvestres como la espina amarilla (*Berberis laurina*), es un arbusto que no es tan exigente para su producción, es originaria de la serranía de América del sur, cuyos frutos son pequeñas bayas carnosas, son ligeramente dulce, conteniendo muchas semillas y ricas en materia colorante. Es una especie con propiedades antirreumáticas, antiinfecciosas, antimicrobianas, depurativas, hepáticas y sedativas, pudiendo emplearse en diarreas bacterianas, enfermedad de gota, efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular, infecciones parasitarias intestinales e infecciones oculares. (Keller 2010; Carrere 2011)

Es necesario obtener datos sobre las propiedades antioxidantes de la fruta de espina amarilla (*Berberis laurina*) en sus tres estados de madurez, porque los productos vegetales poseen una variedad de compuestos químicos que actúan como agentes antioxidantes, inhibiendo la formación y el daño producido por radicales libres (Cerón 2010; Martínez 2015). Los antioxidantes son compuestos que prolongan la vida útil de los alimentos, protegiendo contra el deterioro causado por la oxidación, inhiben la propagación de radicales libres por eso son utilizados en los alimentos, los antioxidantes más comunes en vegetales son las vitaminas C y E, carotenoides, flavonoides y compuestos fenólicos (García *et al.*, 2001; Díaz Delgado 2010). Varios estudios permiten concluir que las antocianinas tienen una actividad antioxidante superior a la de la vitamina C y E; el interés por los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. (Sotacuro 2013; Arce *et al.*, 2016)

En ese sentido es importante evaluar la composición de los compuestos bioactivos que ayuda a identificar el contenido de los compuestos para el

beneficio de la salud. Y por otra parte como una alternativa realizar un manejo de producción e industrialización de la espina amarilla en la Provincia de Huamalíes, teniendo en cuenta que la localidad presenta las condiciones adecuadas para su producción, además no requiere muchos gastos a comparación de los otros cultivos. Así también se estaría incentivando a los agricultores que se dedican a sembrar la espina amarilla puesto que no es tan exigente.

Con este trabajo de investigación se pretende dar énfasis en las propiedades antioxidantes, asimismo se busca difundir conocimientos basados en el contenido de antocianinas, polifenoles totales y la vitamina C de la fruta de espina amarilla para ello se planteó los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Evaluar las propiedades antioxidantes de espina amarilla (*Berberis laurina*) en sus estados madurez.

Objetivo específico

- Determinar las características químicas proximales de espina amarilla (*Berberis laurina*) en sus tres estados de madurez.
- Evaluar la influencia del contenido de los compuestos bioactivos (la vitamina C, polifenoles totales y antocianinas) en espina amarilla (*Berberis laurina*) en tres estados de madurez.
- Evaluar la influencia de la actividad antioxidante por DPPH Y ABTS en espina amarilla (*Berberis laurina*) en tres estados de madurez (Verde, pintón y maduro).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1.1. Espina amarilla (*Berberis laurina*)

Carrere (2011) menciona que la espina amarilla es un arbusto de 1,5 – 3 m de altura. Se localiza en bordes de bosques ribereños, cumbres de quebradas, cerros chatos, cornisas areniscas y pequeños bosques de la serranía de América del Sur.

2.1.1.1. Origen

Keller (2010) menciona que es una especie nativa originaria de la región sur de Brasil, Argentina y Uruguay. Habita en bosques y montes serranos y es frecuente en las praderas rocosas o sedimentarias de casi todo el país; prefiere generalmente posiciones soleadas en los bordes exteriores de bosquecillos y el matorral.

2.1.1.2. Descripción botánica

Es una planta autóctona herbácea, pequeña, perenne, de tallos o pencas aplanadas, ovoidales; sus frutos son pequeñas bayas carnosas, que cuando están en el periodo de maduración son de color rojizo o vinoso, muy jugosos, de sabor ligeramente dulce, conteniendo muchas semillas ricas en materia colorante. Su raíz se caracteriza por su desarrollo longitudinal superficial (de 0,2 a 0,5 m. de profundidad), el tallo es de color amarillo verdoso; corteza guindo oscuro intenso de 8 a 10 mm de diámetro; de cuatro a seis semillas. (Rivera, 2016)

2.1.1.3. Usos posibles

La espina amarilla posee una serie de propiedades útiles; tales como su valor medicinal, como especie tintórea (para teñir de amarillo) y para la confección de licor, restando por confirmar sus posibles cualidades para la producción de miel (Carrere, 2011); así mismo posee gran valor ornamental tanto por su floración como por su fructificación vistosa (Keller, 2010; Carrere, 2011). Los frutos son comestibles y sus raíces utilizadas en la industria de los colorantes. (Keller, 2010)

2.1.1.4. Taxonomía

Según Arena *et al.*, (2018), la clasificación taxonómica de la espina amarilla es la siguiente:

Reino	:	<i>Plantae</i>
Filo	:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	:	<i>Ranunculales</i>
Familia	:	<i>Berberidaceae</i>
Género	:	<i>Berberis</i>
Especie	:	<i>Berberis laurina L.</i>

2.1.1.5. Propiedades medicinales

La espina amarilla es una especie con propiedades antirreumáticas, antiinfecciosas, antimicrobianas, depurativas, hepáticas y sedativas, pudiendo emplearse en diarreas bacterianas, infecciones parasitarias intestinales e infecciones oculares; Las especies del género *Berberis* se caracterizan por contener berberina. (Carrere 2011; Keller 2010)

Según Carrere (2011), las partes utilizadas de la espina amarilla son los frutos y la cáscara de la raíz para infecciones del aparato urinario, problemas del hígado y dispepsia. Para quemaduras leves se utiliza externamente el té de raíz, en tanto que las raíces se emplean en homeopatía para el tratamiento de gota, piedras de los riñones y reumatismo.

2.1.2. Modificaciones Bioquímicas en la fisiología de la maduración

El proceso de maduración puede entenderse como el conjunto de cambios que suceden generalmente luego que el crecimiento del fruto ha cesado y determina que adquiera la mejor calidad desde el punto de vista del consumidor.

Wills *et al.*, (1984) indican que las frutas climatéricas suelen alcanzar el estadio de plena madurez organoléptica después de haber entrado en el periodo climatérico, sin embargo, a otros sucesos iniciados por el etileno el consumidor lo asocia con la madurez.

En los cítricos la cantidad de ácidos libres aumenta al comenzar el crecimiento y luego permanece constante, pero la concentración en el zumo disminuye por dilución cuando el fruto aumenta de tamaño, los ácidos orgánicos generalmente decrecen durante la madurez. Los ácidos pueden considerarse como una fuente de reserva de energía del fruto y en consecuencia es de esperarse que decline durante la gran actividad metabólica que ocurre durante la maduración. El desarrollo del aroma es debido a la síntesis de muchos compuestos orgánicos volátiles durante la maduración. Los mayores cambios cuantitativos asociados con la maduración son generalmente el rompimiento de carbohidratos polímeros, especialmente de sustancias pépticas y hemicelulosas debilita las paredes celulares y las fuerzas cohesivas que mantienen las células unidas, siendo frecuente su casi total inversión de almidón a azúcar. Esto tiene doble efecto: de alterar el sabor y consistencia del producto. El incremento en azúcar hace al fruto más dulce y por consiguiente más aceptable. En los estados iniciales, la consistencia se hace más agradable, pero eventualmente la estructura del fruto se desintegra. Durante la maduración la protopéctina es degradada gradualmente en fracciones de menor peso molecular que son soluble en agua, la velocidad de degradación de las sustancias pépticas está directamente correlacionada con la del ablandamiento del fruto. (Flores,1994)

El pH del zumo aumenta a medida que el fruto alcanza la madurez, sin embargo, por efecto del tampón cítrico-citrato, la variación de los ácidos libres no da a grandes cambios de pH. (Yufer, 1997)

2.1.3. Antioxidantes

2.1.3.1. Definición

Los antioxidantes son moléculas que previenen o retardan la oxidación de otras moléculas mediante su capacidad de captar radicales libres oxidantes, principalmente de los ácidos grasos cuyas reacciones se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano, en el cual puede provocar alteraciones fisiológicas. (Zamora, 2007; Llimpe, 2017)

Una de las funciones de los antioxidantes es facilitar el uso fisiológico del oxígeno por parte de las mitocondrias celulares, ayudando a reducir los

efectos del estrés oxidativo y la falta de oxígeno, formando complejos que mitigan las reacciones productoras de radicales oxidantes también conocidos como radicales libres (moléculas inestables de alta energía con electrones desapareados en sus órbitas exteriores, que tienden a reaccionar con otros compuestos) y por consiguiente desempeñando una función fundamental en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. (Zamora, 2007)

Coronado *et al.*, (2015) menciona que las propiedades antioxidantes no sólo deben estudiarse por sus interacciones químico-biológicas, sino por su función en el deterioro oxidativo que afecta a los alimentos. Se utilizan en la industria alimentaria adicionados a las grasas u otros productos para retrasar los procesos de oxidación, en tanto previenen el comienzo de la rancidez oxidativa (grasas).

2.1.3.2. Antioxidantes en los alimentos

En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes/antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológico, entre ellos los radicales libres son los principales agentes dañinos (Elejalde 2001; Mayor 2010; Quiñonez 2017). Por tanto, es de vital importancia el consumo de alimentos que contengan antioxidantes naturales y la posibilidad de la presencia del vino en la alimentación, cuyo etanol en cantidades adecuadas funcionará como antioxidante no enzimático, de esta manera se pueda mantener el equilibrio entre oxidantes/antioxidantes o incluso esté a favor de los antioxidantes. Además, si tenemos en cuenta que durante la vida se produce un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, y a medida que el individuo envejece dicho balance está a favor de los oxidantes, es de vital importancia el consumo de alimentos ricos en antioxidantes naturales para contrarrestarlos. (Elejalde 2001; Quiñonez 2017)

2.1.3.3. Fuentes naturales de los antioxidantes

Las plantas como fuentes de antioxidantes se pueden utilizar para la preservación del valor nutritivo previniendo el deterioro oxidativo de lípidos y para propósitos medicinales. La mayor parte de la capacidad antioxidante de los vegetales puede ser debida a los polifenoles que poseen características biológicas extensas y, particularmente, a su propiedad de secuestro de radicales libres. Los Antioxidantes como secuestradores de radicales libres consecuentemente es importante determinar la cantidad y especies de polifenoles en vegetales, frutos y tés. (Quiñonez, 2017)

Según Avello y Sulwalsky (2006), el problema para la salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos mayormente por las contaminaciones externas, así como la contaminación atmosférica y el humo de cigarrillos, son los que producen estos tipos de radicales libres en nuestro organismo. Los antioxidantes al colisionar con un radical libre le cede un electrón, se debilita su acción en algunos casos, como la vitamina E, puede regenerarse en su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran las reacciones químicas que utilizan a su vez reacciones con los radicales libres. Los antioxidantes se dividen en: Exógenos o antioxidantes, que ingresan a través de la cadena alimentaria; Endógenos que son sintetizados por la célula. (García *et al.*, 2001; Avello y Sulwalsky 2006)

2.1.4. Compuestos fenólicos

2.1.4.1. Definición

Son compuestos biosintetizados por las plantas (frutos, hojas, tallos, etc.), en los que ejercen una potente acción antioxidante necesaria para el funcionamiento de las células vegetales (Avello y Sulwalsky 2006; Martínez 2015). La principal característica estructural de los polifenoles es poseer uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a uno o más anillos bencénicos. Aunque son primariamente conocidos por sus propiedades antioxidantes, la mayor parte de los polifenoles exhibe, además, de otras

actividades biológicas potencialmente benéficas para la salud. (Leyva 2009; Sotero 2011; Martínez 2015)

Según Creus (2004); Paixão (2007), mencionan que los polifenoles se clasifican en compuestos no flavonoides (estilbenos, ácidos hidroxicinámicos y ácidos benzoicos) y compuestos flavonoides (flavonoles, flavonas, flavanoles e isoflavonas). Las uvas contienen compuestos no flavonoides principalmente en la pulpa, mientras que los compuestos flavonoides son ubicados en las pieles, semillas, y tallos.

Los compuestos fenólicos son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. (Creus 2004; Paixão 2007)

Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable (Creus, 2004). En la tabla 1 se muestra las propiedades organolépticas atribuidas a los compuestos fenólicos.

Tabla 1. Propiedades organolépticas atribuidas a los compuestos fenólicos

Color
Como las antocianidinas, responsables de los tonos rojos, azules y violáceos de muchas frutas, hortalizas y derivados: fresas, ciruelas, uvas, berenjena, col lombarda, rábano, vino tinto, etc.
Sabor amargo
Como las flavanonas de los cítricos (naringina del pomelo, neohesperidina de la naranja) o la oleuropeína en las aceitunas.
Astringencia
Como las proantocianidinas (taninos condensados) y los taninos hidrolizables, por ejemplo, en el vino.
Aroma
Fenoles simples como el eugenol en los plátanos.

Fuente: Tomada de Creus (2004)

Según Sotero (2011); Quiñonez (2017), los compuestos fenólicos o polifenoles, constituyen un grupo bastante amplio de sustancias químicas, que se caracterizan por presentar en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y abarcan a más de 8000 compuestos distintos y han demostrado poseer importante actividad antioxidante.

2.1.4.2. Fuentes principales

Los polifenoles están presentes en todo el reino vegetal, sus cantidades y tipos varían en función de la especie, variedad y parte del vegetal considerado (frutas, semillas, brotes, hojas, entre otros), horas de exposición solar, grado de maduración, condiciones de cultivo. Estos compuestos se hallan preferentemente en las capas más superficiales de verduras y frutas, para proteger de la oxidación los tejidos de las capas inferiores. (Creus 2004; Sanabria y Consuelo 2012)

Investigaciones científicas realizadas en frutas nativas peruanas y recursos vegetales promisorios como aguaymanto, papaya de monte, tomate de árbol y tuna roja, carambola, yacón, tumbo, camu camu, noni y guinda, demuestran que contienen una elevada cantidad de polifenoles, recomendándose el consumo de estos frutos promisorios en una alimentación saludable para una mejor calidad de vida. (Sanabria y Consuelo 2012)

2.1.4.3. Propiedad antioxidante

En el organismo, los radicales libres son bloqueados por un complejo sistema de defensa antioxidante de enzimas como: la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y antioxidantes no enzimáticos como: vitamina E, beta-caroteno, vitamina C, glutatión reducido, albumina, flavonoides, antocianinas y metales de transición como Se, Cu, Zn, entre otros, además de los polifenoles, que son sustancias responsables en gran medida de una enorme variedad de actividades biológicas atribuidas a frutas, verduras y plantas, o productos obtenidos a partir de las mismas (Cerón *et al.*, 2010; Figueroa *et al.*, 2011). Los polifenoles han reportado beneficio para la salud humana, especialmente en la prevención de enfermedades degenerativas, debido

a que estos poseen propiedades antioxidantes y capacidad de captar radicales libres, muchos de estos compuestos también podrían ofrecer algún grado de protección contra el Alzheimer. Potenciando en la dieta del consumo de frutas que impiden la acumulación de radicales libres que causan daño oxidativo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, asociados a diversas enfermedades cancerígenas, cardiovasculares. (Creus 2004; Sanabria y Consuelo 2012)

2.1.5. Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles, y sus espectros de color van del rojo al azul, presentándose también como una mezcla de ambos colores resultando de tonos de púrpura (violáceo). Muchas frutas, hortalizas, hojas y flores deben su atractiva coloración a estos pigmentos que se encuentran dispersas en las vacuolas celulares. (Toledo 2015; Arce *et al.*, 2016; Llimpe, 2017)

Actualmente, se conocen entre 20 antocianinas, siendo 6 de ellas los más importantes en la tecnología de alimentos: pelargonidina, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina. Es común que una misma antocianidina interaccione con más de una clase de carbohidrato para formar diferentes antocianinas; la pelargonidina es la que produce el color rojo escarlata de algunas flores y de las fresas; la delfinidina se encuentra en las berenjenas y la cianidina en col roja, higos, cerezas, ciruelas, y otros frutos. (Sotacuro 2013; Arce *et al.*, 2016); nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. (Ipanaqué, 2017)

Varios estudios permiten concluir que las antocianinas tienen una actividad antioxidante superior a la de la vitamina C y E. La estabilidad de las antocianinas ha sido un problema para la industria de alimentos, una vez que ellas interactúan con el ácido ascórbico, metales, azúcares, oxígeno, luz, temperatura y enzimas, produciendo polímeros y la degradación de los productos. (Toledo 2015; Arce *et al.*, 2016)

Las antocianinas representan el grupo más importante después de la clorofila, que es visible por el ojo humano. (Martínez 2015; Llimpe 2017)

El interés por los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorante alimenticio, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja estabilidad y la falta de disponibilidad de material vegetal limitan su aplicación comercial (Sotacuro 2013; Martínez 2015). El contenido de antocianinas en diferentes bayas se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Contenido de antocianinas en diferentes bayas

Baya	Antocianinas
Mora azul (mg/100g)	60-480
Frambuesa (mg/100g)	20-220
Arándano (mg/100g)	20- 360
Fresa (mg/100g)	10-80
Zarzamora (mg/100g)	183,63

Fuente: Adaptado de Sotacuro (2013)

La función más importante de las antocianinas es la percepción visible para la atracción de animales para propósitos de polinización y dispersión de semillas. Han sido identificadas en manzanas, cerezas, moras, col morada, uva, fresa, rábano, ciruela, rosas rojas y arándano, entre otros. Hasta ahora no hay reportes de la toxicidad de las antocianinas, por lo que se consideran inofensivas a la salud, siendo una alternativa potencial en la industria alimenticia como un aditivo seguro y efectivo. (Limpe, 2017)

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas conformadas por dos anillos aromáticos, A y B, unidos por una cadena de tres átomos de carbono. Variaciones estructurales del anillo B producen las seis antocianidinas conocidas (Zapata 2014; Martínez 2015). En la figura 1 y tabla 3, se puede apreciar la estructura elemental y sustituyentes de las antocianinas.

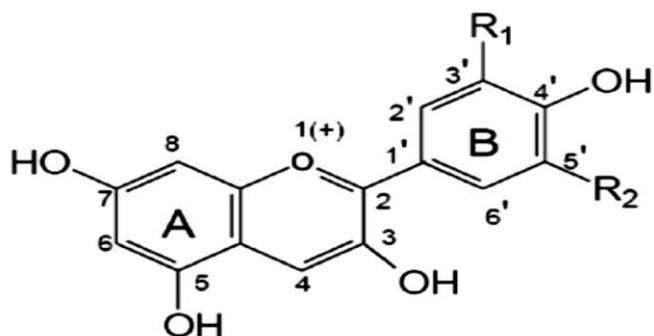


Figura 1. Estructura y sustituyentes de las antocianinas

Tabla 3. Estructura y sustituyente de las antocianinas

Aglicona	Espectro visible		Substitución λ máx (nm)
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCHE	OCH3	510 (azul-rojo)

Fuente: Zapata *et al.*, (2014)

2.1.6. Actividad antioxidante

Los productos vegetales poseen una variedad de compuestos químicos que actúan como agentes antioxidantes, inhibiendo la formación y el daño producido por radicales libres (Cerón 2010; Martínez 2015), que no sólo producen rancidez y pérdida de alimentos en su almacenamiento, sino que están asociados con enfermedades crónicas como el cáncer, Alzheimer, enfermedades cardiovasculares y están ligados al proceso de envejecimiento. Los antioxidantes son compuestos que prolongan la vida útil de los alimentos, protegiendo contra el deterioro causado por la oxidación, inhiben la propagación de radicales libres por eso son utilizados para prevenir el deterioro de los alimentos, los antioxidantes más comunes en vegetales son las vitaminas C y E, carotenoides, flavonoides y compuestos fenólicos. (García *et al.*, 2001; Díaz Delgado 2010)

La actividad antioxidante es la capacidad acumulativa de los componentes de un alimento de atrapar radicales libres. Los radicales libres tienen un

electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Figueroa *et al.*, 2011). Los radicales libres, producidos por el metabolismo celular normal, con el tiempo dañan el ADN y otras macromoléculas que originan enfermedades degenerativas, lesiones malignas y la muerte eventual de células vitales, que llevan al envejecimiento y la muerte; la acumulación de radicales libres es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que los neutralicen. El antioxidante, al chocar con el radical libre cede un electrón que oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. (Sotacuro 2013; Rojas 2014)

Los procesos oxidativos suponen transferencias de electrones, es decir, pérdidas de cargas negativas. En este proceso participan enzimas (catalasas y deshidrogenasas) que se encuentran en las mitocondrias y actúan en varias etapas de la cadena respiratoria, siendo un proceso habitual dentro del metabolismo celular. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño molecular, en membranas celulares y tejidos. (Figueroa *et al.*, 2011; Quiñonez 2017) El consumo de aceites vegetales hidrogenados, como los de la margarina, y ácidos grasos trans, como los de la carne y leche, también contribuyen al aumento de radicales libres. El resveratrol del vino o las isoflavonas de la soya son sólo algunos ejemplos de la reciente tendencia a buscar compuestos bioactivos en los alimentos. (Beltrán, 2010)

2.1.6.1. Medida de la actividad antioxidante

Los antioxidantes se usan en una gran cantidad de productos alimentarios. Su actividad está influida por la temperatura, composición del alimento, la estructura del alimento, y la disponibilidad del oxígeno. Además del procesamiento y las temperaturas a las que estos productos están expuestos, también varían los constituyentes de los alimentos como el agua, las proteínas, los carbohidratos, las vitaminas, los minerales y otros componentes, así como estructura física del alimento. La suma de todos estos factores puede provocar grandes cambios en la actividad

antioxidante en los diferentes alimentos. Los antioxidantes polares, como el ácido ascórbico o el trolox (un derivado soluble en agua del -tocoferol). (Osorio y Yessica, 2012)

2.1.6.2. Métodos de captación de radicales

El método TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), es un método que sirve para cuantificar la capacidad antirradical de los compuestos antioxidantes, es decir, sirve para cuantificar la captura de los radicales libres. El método TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), se genera un radical libre positivo, estable y es más reactivo que el DPPH, por lo que la reacción transcurre completamente en 1 minuto llamado ABTS (Acido 2, 2 - azinobis-(3 - etilbenzotioazolín- 6-ulfónico) mediante una reacción entre éste y el persulfato de potasio. A éste, se le añade el antioxidante que queremos estudiar, y comprobamos la disminución de la absorbancia de la muestra, ya que el ABTS posee un grupo cromóforo que observa la luz a 734 nm. Las condiciones para el empleo de los métodos de transferencia de electrón como el ABTS y DPPH, pueden variar de alguna u otra forma, (por ejemplo, el pH los solventes y la longitud de onda a la que se mide), dando diferentes resultados (Figuroa *et al.*, 2011; Londoño 2012; García, 2014). Sin embargo, son muy útiles para evaluar la actividad antioxidante de sustancias y alimentos que los contienen. Estos métodos pueden servir para evaluar si un proceso de elaboración de un alimento influye sobre la actividad antioxidante, además puede ser un indicativo del potencial antioxidante para su consumo. (Osorio y Yessica 2012; García, 2014)

La clasificación de los métodos para evaluar la actividad antioxidante acuerdo a las reacciones involucradas se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de los métodos para evaluar la actividad antioxidante

Mecanismos	Método
Transferencia de hidrogeno	a. TRAP (del inglés total radical trapping antioxidant parameter).
	b. ORAC (del inglés oxygen Radical Absorbance Capacity).
	c. Inhibición de la oxidación de las LDL (low-density lipoprotein)
Transferencia de un electrón	a. TEAC (del inglés Trolox equivalent antioxidant capacity)
	b. ABTS (ácido 2,2–azinobis (6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina))
	c. FRAP (del ingles ferric-reducing antioxidant power)
	d. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

Fuente: Tomado de Osorio y Yessica (2012)

2.1.7. Vitamina C

2.1.7.1. Definición

La vitamina C pura es un sólido blanco cristalino soluble en agua y en alcohol etílico su nombre químico se conoce como el ácido ascórbico; es un compuesto altamente polar, es un agente antioxidante necesario para la formación y mantenimiento adecuado del material intercelular; puede reducir la acción perjudicial de los radicales libres y coadyuva al mejoramiento de la absorción del hierro no hemínico (Díaz Delgado 2010; Londoño 2012). La carencia de esta vitamina, en los seres humanos, puede provocar hemorragias acompañada de una pobre cicatrización y lento proceso de curación de las heridas, así como anemia; su poder vitamínico radica en la prevención del escorbuto; sin la vitamina C el cuerpo no sería capaz de absorber componentes como el hierro y el ácido fólico (Díaz Delgado 2010; Sanabria y Consuelo 2012). Se encuentra casi exclusivamente en vegetales y frutas frescos y como es soluble en agua apenas se acumula en el organismo por lo que es importante un aporte diario. Es muy sensible a la luz, temperatura y oxígeno degradándose

fácilmente durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos.
(Bastías y Cepero 2016)

2.1.7.2. Fuentes principales

Las principales fuentes de vitamina C son las frutas, verduras y zumos varía de acuerdo al estado de madurez, siendo menor cuando están verdes, aumenta la cantidad cuando está en su punto de maduración y luego vuelve a disminuir. Tradicionalmente los alimentos ricos en vitamina C son las frutas del tipo cítrico: naranja, mandarina, pomelo, frutilla, mora, piña, limón, guayaba, melón y kiwi; vegetales como el tomate, brócoli, pimienta, espinaca y berro, así como también perejil y brotes de soya. Sin embargo, el camu - camu contiene más vitamina C que cualquier otra fruta, pues comparada con la naranja, el camu - camu proporciona 30 veces más vitamina C. (Avello y Suwalsky 2006; Sanabria y Consuelo 2012)

2.1.7.3. Estructura química de la vitamina C.

La vitamina C es una cetona cíclica que corresponde a la forma enólica de 3-ceto-1- gulofuranolactona; contiene un enol entre los carbonos 2-3 que le hace un agente ácido y muy reductor, por lo cual se oxida fácilmente. Este es un compuesto químicamente sencillo, aunque presenta una estructura atípica cuya fórmula empírica es $C_6H_8O_6$. Es un derivado lactónico del ácido hexurónico y se corresponde con una forma oxidada de la glucosa. En concreto es una cetolactona de seis átomos de carbono que muestra un anillo de lactona de cinco miembros y un grupo enediol bifuncional con un grupo carbonilo adyacente. El grupo enediol es esencial para su actividad biológica. (Díaz Delgado 2010; Barahona 2013)
En la figura 2 se muestra la estructura química del ácido ascórbico.

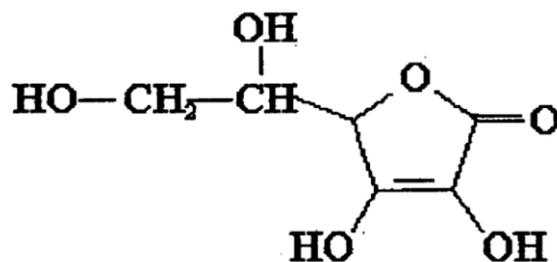


Figura 2. Estructura química del ácido ascórbico

2.1.7.4. Propiedades antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que tienen la propiedad de evitar o prevenir la oxidación con otras moléculas. En estas reacciones de oxidación, a veces, se producen radicales libres, especies muy oxidativas y que pueden dañar al organismo. La vitamina C es usada frecuentemente en los alimentos, constituyente uno de los agentes antioxidantes naturales más poderosos que desarrolla su acción en los compartimientos acuosos celulares. Se ha utilizado contra la oxidación en vinos, cerveza, frutas, vegetales, bebidas, carnes curadas y productos de pescado. La vitamina C ha sido reconocida por la Food and Drug Administration (FDA) como uno de los cuatro antioxidantes dietéticos, los otros tres son la vitamina E, la vitamina A cuyo precursor es el β - caroteno, y el selenio). Es una vitamina que el ser humano no puede sintetizar y necesariamente debe ingerirlo en su dieta. El consumo de una naranja mediana cubre casi el requerimiento diario de un adulto, aportando 45 mg. (Sanabria y Consuelo 2012; Bastías y Cepero 2016)

2.2. ANTECEDENTES

Beltrán (2010) en su investigación titulado “Evaluación de la actividad antioxidante en tres estadios de madurez del sauco (*Sambucus peruviana* L.)”. Se utilizó materia prima procedente del Distrito de Laraos, ubicado en la zona norte de la Provincia de Yauyos - Región Lima, a una altitud de 3564 m.s.n.m. Su objetivo fue evaluar las características fisicoquímicas, polifenoles, la actividad antioxidante en tres estadios de madurez. Los frutos recolectados fueron sometidos a selección y clasificación, lavado, pesado, secado en estufa a 50 °C por 96 horas, envasado y almacenado a temperatura ambiente. Los resultados indicaron que el mayor contenido de polifenoles del sauco se determinó en el estadio maduro 744,5 mg ácido gálico/100 g muestra, seguido del estadio verde 668,52 mg ácido gálico/100 g muestra y por último el estadio pintón 633,72 mg ácido gálico/100 g muestra; mientras que la mayor actividad antioxidante, expresada en porcentaje de inhibición de radicales libres, fue para el estadio verde (58,6 %), seguido del estadio maduro (54,6 %) y por último el estadio pintón (45,6 %). El diseño estadístico utilizado fue el Diseño

Completamente al Azar (DCA) con 3 repeticiones. Para la comparación de medias se empleó la prueba de Duncan al 5 % de nivel de significación. Asimismo, el sauco presentó características fisicoquímicas de acuerdo a los diferentes estadios de madurez. En el estadio verde se obtuvo para sólidos solubles 3,2 °Brix, pH 3,42 y acidez total 3,7 % (ácido cítrico). En el caso del estadio pintón se determinó para sólidos solubles 4,9 °Brix, pH 3,51 y acidez total 1,645 % (ácido cítrico). Finalmente, en el estadio maduro se registró para sólidos solubles 5,9 °Brix, pH 3,64 y acidez total 1,065 % expresado en ácido cítrico.

Rosales y Arias (2015) en su investigación titulado “Vitamina C y Parámetros Fisicoquímicos durante la Maduración de *Berberis lobbiana* “UNTUSHA”. Es un arbusto andino que produce varios compuestos nutritivos y bioactivos. Esta investigación se realizó para desarrollar el conocimiento relacionado a la vitamina C y parámetros fisicoquímicos durante la maduración. Las muestras fueron obtenidas de la flora silvestre de La Unión, Huánuco y analizado usando técnicas estándar. El contenido de vitamina C mostró una amplia variación con diferencias significativas en frutos ($p < 0,05$), y el estado maduro presentó el mayor contenido ($181,86 \pm 4,45$ mg/100 g de fruto). Los parámetros fisicoquímicos presentaron una amplia variación muy marcada en los frutos maduros ($p < 0,05$). Asimismo, se registró correlaciones positivas en el contenido de vitamina C, pH, sólidos solubles, glucosa, pero negativa en densidad de fruto y acidez titulable. En conclusión, *B. lobbiana* presenta una amplia variación en el contenido de vitamina C y en los parámetros fisicoquímicos de sus frutos, principalmente por la influencia de factores genéticos, propios de la maduración.

Repo y Encina (2008) en su investigación titulado “Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas”. Su objetivo fue determinar el contenido de fibra cruda, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en las frutas nativas: tuna, aguaymanto, tomate de árbol y papaya de monte. En el tomate de árbol se destacó el contenido relativamente alto de fibra cruda 4,5 g/100

g de fruta. El tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) y el aguaymanto (*Physalis peruviana*) tuvieron mayor contenido de proteínas (1,9 g/100 g para ambos frutos) que las otras frutas estudiadas. En cuanto a compuestos fenólicos, la papaya de monte (*Carica pubescens*) es la fruta que presentó mayor contenido de estos compuestos (167 mg de equivalente ácido gálico/g de fruto). El contenido de betalaínas en tuna roja (*Opuntia ficus indica*) fue de 68,95 mg/1000 mL. El aguaymanto tuvo el mayor contenido de ácido ascórbico (43,3 mg/100g), seguido por la papaya de monte (31,41 mg/100 g) y el tomate de árbol seguida por la tuna roja 16,09 mg/100 g y 22,75 mg/100 g, respectivamente. El contenido de carotenoides fue mayor en el tomate de árbol (4 mg -caroteno/100 g) seguido por el aguaymanto con 2,64 mg caroteno/100 g. La tuna roja presentó una capacidad de inhibición del radical DPPH mucho mayor que las otras tunas estudiadas (77,65 %). Comparando las diferentes frutas en cuanto a capacidad antioxidante medido por el método del DPPH, fue el de la papaya de monte (1936 228 g equivalente trolox/ g de fruto); seguido por el tomate de árbol (853 52 g equivalente trolox/ g de tejido); y la mayor capacidad antioxidante medida por el método del ABTS fue el de la papaya de monte (214 171 g equivalente trolox/ g de fruto); seguido por el aguaymanto (1066 28 g equivalente trolox/ g de fruto). Finalmente, se concluyó que el estado de madurez influye en forma directamente proporcional al contenido de compuestos bioactivos en el aguaymanto, los que a su vez generan una mayor capacidad antioxidante en el fruto mientras más maduro esté la fruta.

Sanabria y Consuelo (2012) en su investigación titulado “Evaluación de vitamina c, polifenoles totales y capacidad antioxidante en dos estados de madurez del camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) de Mazamari – Satipo”. La materia prima procede del fundo “El Limón”, ubicado en el centro poblado de Santa Martha del distrito de Mazamari - provincia de Satipo. Para obtener los extractos del fruto, fueron sometidos a selección, clasificación, lavado, pesado, pelado, trozado y análisis. En la evaluación el contenido de vitamina C, polifenoles y capacidad antioxidante en los estados pintón y maduro; se utilizó el Diseño Completamente al Azar

(DCA). La composición fisicoquímica de los frutos de camu - camu en estado pintón fue: sólidos solubles 5,4 °Brix; pH 2,79 y acidez total 4,63 % y en estado maduro: sólidos solubles 6,0 °Brix, pH 3,35 y acidez total 4,38 %. Las composiciones proximales para el estado pintón son: humedad 80,55%, ceniza 0,35 %, proteína 1,52 %, grasa 0,23 %, fibra 0,19 % y carbohidratos 17,16 %; mientras que, el estado maduro fue: humedad 82,62 %, ceniza 0,29 %, proteína 1,47 %, grasa 0,40 %, fibra 0,20 % y carbohidratos 15,02 %. El mayor contenido de vitamina C se determinó en el estado maduro 3129,52 mg ácido ascórbico/100 g, seguido del estado pintón 3000,08 mg ácido ascórbico/100 g. La mayor cantidad de polifenoles totales en el estado maduro fue: 480,53 mg ácido gálico/ L, y del estado pintón 382,55 mg ácido gálico/ L. La mejor capacidad antioxidante, expresada en porcentaje de inhibición de radicales libres, fue para el estado maduro 89,87 %, y del estado pintón 78,46 %. Existe relación entre la vitamina C y capacidad antioxidante en dos estados de madurez, presentando el coeficiente de correlación $r = 0,965$ y $r = 0,8456$ respectivamente; en polifenoles totales y capacidad antioxidante el coeficiente de correlación $r = 1$ en sus dos estados de madurez.

Osorio y Yessica (2012) en su investigación titulado “Evaluación de actividad antioxidante y vitamina C en pulpa concentrada en dos estadios (fisiológicamente maduro y maduro) del fruto zarzamora (*Rubus sp.*). Procedente de la comunidad Tintay Punco, Tayacaja, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad antioxidante y el contenido vitamina C en dos estadios (fisiológicamente maduro (FM) y maduro(M)) en pulpa concentrada del fruto zarzamora, se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial (2 x 4), luego se calculó el ANVA para determinar la variabilidad de los tratamientos a un nivel de significación del 5 % de error y una prueba de comparaciones de medias de tukey. Así mismo, los frutos fueron lavadas seleccionadas, clasificadas y pulpeadas, se concentró a 20 Brix° a temperaturas de 50 °C, 60 °C y 70 °C en condiciones a vacío, se obtuvo pulpa concentrada evaluándose el contenido de actividad antioxidante y vitamina C. La evaluación de las

temperaturas de concentración se encontró diferencias significativas con un nivel de confianza de 95 % en los dos estados de madurez en los diferentes tratamientos. La actividad antioxidante en pulpa a la temperatura ambiente (20 °C) se obtuvo en estado fisiológicamente maduro y maduro los valores $568,04 \pm 15,42$ y $715,97 \pm 57,03$ expresado en mol eq-trolox/ mL de extracto respectivamente. A diferentes temperaturas (50, 60 y 70) de la pulpa concentrada en estado fisiológicamente maduro se obtuvo valores $534,44 \pm 10,51$; $312,79 \pm 9,179$ y $298,61 \pm 5,12$ respectivamente. En el estado maduro (50 °C, 60 °C y 70 °C) se obtuvo valores $709,90 \pm 3,16$; $674,43 \pm 3,52$ y $602,89 \pm 3,86$ respectivamente expresados en mol eq-trolox/ mL de extracto. El contenido de vitamina C en pulpa en el estado fisiológicamente maduro y maduro es de $30,39 \pm 0,22$ y $22,1591 \pm 0,27$ a temperatura ambiente (20 °C) y a diferentes temperaturas (50, 60 y 70) se obtuvo en los dos estados valores de $25,85 \pm 0,29$, $23,86 \pm 0,44$ y $20,45 \pm 0,32$ y $17,89 \pm 1,34$; $16,19 \pm 0,58$ y $14,20 \pm 0,22$ expresado en mg de ácido ascórbico/100 g de muestra respectivamente. Se evaluó la actividad antioxidante y el contenido de vitamina C a las diferentes temperaturas y se observó una mínima disminución de los compuestos estudiados en cada tratamiento y en cada estado de madurez, afirmando que la temperatura afecta a los contenidos del fruto estudiado, donde el mejor tratamiento es M1 (pulpa concentrada en estado maduro a la temperatura de 50 °C en la actividad antioxidante y FM1 (pulpa concentrada en estado fisiológicamente maduro a la temperatura de 50 °C, se encontró en su mayoría el contenido de vitamina C. Donde la variable dependiente (actividad antioxidante y vitamina C) es inversamente proporcional a la temperatura de concentración es decir a mayor temperatura menor contenido de vitamina C y actividad antioxidante, afirmando la hipótesis.

Llimpe (2017) en su trabajo de investigación “Estudio del contenido de antocianinas y capacidad antioxidante del fruto de macha macha (*vaccinium floribundum kunth*) durante la maduración”. Tuvo como objetivo evaluar el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante del fruto de Macha macha (*Vaccinium floribundum Kunth*) en tres estados

de maduración, una especie silvestre del Perú, cuyas potencialidades hasta ahora se desconocían. Se analizó el contenido de antocianinas totales por el método pH diferencial, y se halló 0,519; 4,242 y 10,532 mg de Cianidina/ g de muestra en estado verde, pintón y maduro, respectivamente. En estado maduro se presentó mayor contenido. La actividad antioxidante fue evaluada por el método radical DPPH, y se obtuvo valores de 569,3637; 550,1427 y 323,9630 $\mu\text{mol TE/ g}$ muestra en estado verde, pintón y maduro, respectivamente. El verde presentó una mayor capacidad antioxidante. El análisis de características fisicoquímicas del fruto de macha macha en estado maduro presento: pH 4,67, humedad 84,760 %, acidez (expresado como ácido cítrico) 0,028; grasa 0,536 %; proteína 0,897 %; cenizas 0,478 %; carbohidratos totales 13,329 %. Estos resultados revelan al fruto de macha macha como promisorio, para su aprovechamiento agroindustrial como fuente importante de antocianinas y antioxidantes.

2.3. HIPÓTESIS

2.3.1. Hipótesis general

- Si evaluamos los tres estados de madurez de la espina amarilla (*berberis laurina*) podremos determinar el mayor contenido de la propiedad antioxidante.

2.3.2. Hipótesis específicas

- Si determinamos la influencia de las características químicas proximales de espina amarilla (*Berberis laurina*) podremos encontrar el estado de madurez adecuado.
- Si evaluamos el contenido de los compuestos bioactivos (la vitamina C, polifenoles totales, y antocianinas) en espina amarilla (*Berberis laurina*) podremos encontrar el estado de madurez adecuado.
- Si evaluamos la influencia de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en espina amarilla (*Berberis laurina*) podremos encontrar el estado de madurez adecuado.

2.4. VARIABLES

2.4.1. Variables Independientes (x)

X₁: Estados de madurez

- X₁₁ = Verde
- X₁₂ = Pintón
- X₁₃ = Maduro

2.4.2. Variables Dependientes (y)

Y₁: Contenido de antocianina

Y₂: Contenido de Polifenoles Totales

Y₃: Contenido de Vitamina C

Y₄: Actividad antioxidante

2.4.3. Operacionalización de variables

En la Tabla 5 se muestra las variables, dimensiones e indicadores, para el estudio en el desarrollo de la investigación.

Tabla 5. Se muestra la operacionalización de las variables en estudio

VARIABLES	Dimensiones	Indicadores
VARIABLE INDEPENDIENTE Estado de madurez, estado de un fruto que ha completado su desarrollo.	Índice de madurez	- Verde - Pintón - Maduro
VARIABLE DEPENDIENTE Propiedad antioxidante, es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.	Análisis químico proximal Antocianinas Polifenoles Vitamina C Actividad antioxidante (DPPH y ABTS)	- Humedad - Proteína - Grasa - Ceniza - Fibra - Carbohidrato - mg de cianidina-3-glucósido/g de muestra - ug de AGE/g de muestra - Ácido Ascórbico - mg TE/g de muestra

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. Tipo de investigación

El tipo de investigación es aplicada y está orientada a la determinación del estado de madurez de la fruta de espina amarilla que presente mayor contenido de propiedad antioxidante en su composición.

3.1.2. Nivel de investigación

El nivel es experimental – explicativa, porque intencionalmente se manipula las variables independientes; midiendo sus efectos en la variable dependiente.

3.2. LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación se realizó en los ambientes del laboratorio de Físico-química y Análisis por Instrumentación de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial UNHEVAL.

3.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS

La población estuvo constituida por la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez del Distrito de Llata procedente de Centro poblado de Pampas del Carmen- caserío de Milpo que está ubicado a una altitud de 3480-3775 m.s.n.m.

3.3.1. Población

La población es homogénea y estuvo constituido por la fruta de espina amarilla (*Berberis lauriana*) procedente del caserío de Milpo perteneciente al Centro poblado de Pampas del Carmen, distrito de Llata provincia de Huamalíes.

3.3.2. Muestra

Se tomó muestras de 500 gramos de fruta de espina amarilla (*Berberis lauriana*) por cada tratamiento.

3.3.3. Tipo de muestreo

Es aleatorio porque tiene la misma probabilidad de ser elegida para formar parte de una muestra.

3.3.4. Unidad de análisis

Es la misma fruta de espina amarilla (*Berberis lauriana*).

3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

Se evaluó las propiedades antioxidantes de la fruta de espina amarilla en tres estados de madurez, obteniendo en total 3 tratamientos con tres repeticiones para cada uno como se observa en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6. Tratamientos de investigación

Tratamiento	Estado de madurez	Cantidad (g)
T ₁	Verde	500
T ₂	Pintón	500
T ₃	Maduro	500

3.5. PRUEBA DE HIPÓTESIS

En el estudio de estado de madurez.

Hipótesis nula

H₀: Los tres estados de madurez presentarán igual contenido de propiedad antioxidante en la fruta de espina amarilla.

$$H_0: T_1 = T_2 = T_3 = 0$$

Hipótesis alternativa

H₁: Al menos uno de los estados de madurez presentará mayor contenido de la propiedad antioxidante.

$$H_1: \text{Al menos un } T_i \neq 0$$

3.5.1. Diseño de la investigación

Para evaluar el contenido de la propiedad antioxidante de la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez, se utilizó ANOVA (análisis de varianza), para un diseño completamente al azar DCA y para

comparar las muestras; para aceptar o rechazar las hipótesis nulas se utilizó la prueba Tukey ($\alpha = 5 \%$) un nivel de confianza del 95 % (0,95).

Modelo estadístico

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : Valor de propiedad antioxidante obtenido en la j – ésima repetición de espina amarilla sometida al i – ésimo tratamiento, (estado de madurez).

μ : Efecto de la media poblacional.

T_i : Efecto del i -ésimo Tratamiento (estado de madurez).

E_{ij} : Efecto del error experimental.

3.5.2. Datos a registrar

De acuerdo a los objetivos y variables del estudio, se registraron las cantidades de materia prima a utilizarse, las características fisicoquímicas de la materia prima: Peso, calibre de las frutas, sólidos solubles, pH y acidez titulable.

En la evaluación de la propiedad antioxidante se evaluará el contenido de éste en la fruta de espina amarilla.

3.5.3. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información

Para la obtención y registro de datos se utilizaron formatos elaborados de acuerdo al estudio, memorias USB para el almacenamiento de datos, cuaderno de apuntes lápices, etc.

Para el procesamiento de la información o análisis estadístico, se utilizó programas como Excel 2016, STATGRAPHICS Centurion y entre otros programas estadísticos.

Técnicas de investigación documental o bibliográfica

Análisis documental: Permitted el análisis del material a estudiar, precisar desde un punto de vista formal y desde su contenido.

Análisis de contenido: Estudiar y analizar de una manera objetiva y sistemática el documento leído.

Fichaje: Nos permitió para registrar aspectos esenciales de los materiales leídos y que ordenadas sistemáticamente, nos servirán de valiosa fuente para elaborar el marco teórico.

Técnicas de campo

Observación: Técnica que permitió obtener información sobre la evaluación del contenido de la propiedad antioxidante en el fruto de espina amarilla.

Instrumento de investigación documental

- Fichas de investigación o documentación:
 - Comentario
 - Resumen
- Fichas de registro o localización
 - Bibliografías
 - Hemerografías
 - Internet

Instrumento de recolección de información en laboratorio

- Cuaderno de apuntes

3.6. MATERIALES Y EQUIPOS

3.6.1. Materia prima

Se utilizó el fruto de espina amarilla (*Berberis laurina*) en tres estados de madurez: verde, pintón y maduro procedente del caserío de Milpo perteneciente al Centro Poblado de Pampas del Carmen del Distrito de Llata, ubicado en la Provincia de Huamalíes - Región Huánuco.

Desinfectante químico

- Hipoclorito de sodio

3.6.2. Materiales, equipos y reactivos

Materiales

- Vaso de precipitación de 50, 100 y 250 mL
- Bureta de 25 mL
- Fiolas de 100 y 250 mL
- Filtros de jeringa PVDF hidrofílico de 0,22 μm
- Tips de 200 μL , 1000 μL ; cubetas de plástico para espectrofotómetro de 1,5 mL
- Papel tisú, rollos de papel toalla
- Balones de 50 mL
- Matraz Erlenmeyer de 100 y 250 mL
- Probeta de 250 mL
- Micro tubos de polipropileno
- Desecador
- Mechero bunsen
- Varillas y embudos
- Placas petri
- Crisoles de porcelana
- Mortero con pilón
- Pinzas de metal
- Papel filtro Whatman N° 1 y 2
- Racks para tips de 2-200 μL , 100-1000 μL

Equipos

- Espectrofotómetro UV/VIS-Genesys 10S (Thermo Electrón Corporación)
- Balanza analítica (AND-inside Super Hybrid Sensor- Mod. - HR-250 AZ)
- Centrífuga mini spin plus-ependorf, serie 5404ER928861.
- Estufa ECOCELL, temperatura máxima de 250 °C, tipo/modelo, LSIS-B2V/EC
- Horno mufla, SELECT-HORN- H.W. Kccel S.A.
- Digestor de proteínas (I-Fecator – KJELTEC SISTEM- 1002 *Distilling Unit*)

- Equipo de destilación semi-micro Kjeldahl (KJETEC SYSTEM-1002 Distilling Unit)
- Equipo de titulación
- Extractor Soxhlet – Behrotest
- Potenciómetro pHmetro SI Analytics-handylab pH 11.
- Refractómetro. Milwaukee – (MA871 refractometer 0 ot 85 %)
- Balanza analítica OHAUS-Adventurer –TM exactitud de 0.0001 g
- Balanza analítica M-power –sartorius, 0.0001 g
- Equipo HPLC (AUTOSAMPLER – 3950- KNALIER) para la determinación de Ácido ascórbico
- Micropipetas (ISOLAB de 20-200 μ L, 100-1000 μ L)

Reactivos

- Ácido sulfúrico al 1,25 %
- Ácido clorhídrico 0,05 N
- Hidróxido de sodio 0,1N y al 1,25 %
- Éter de petróleo 1L
- Fenolftaleína al 1 %
- Solución Buffer pH 4,0 y 7,0
- Etanol al 80 %
- Metanol Abs.
- Ácido meta fosfórico 50 g
- Folin-Ciocalteau
- Ácido gálico L
- Ferrocianuro de potasio
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)
- 2,2, –azinobis–3– etilenbenzotiazolino-6–ácido sulfónico) (ABTS⁺)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
- Persulfato de potasio QP Chemilab / Nacional
- Trolox y otros considerados en la metodología de análisis

3.7. CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El desarrollo de la investigación, estuvo enfocado en la evaluación de las propiedades antioxidantes de espina amarilla en sus tres estados de madurez, se agrupó en cuatro grupos o etapas para el desarrollo de la investigación, a continuación, se detalla el esquema experimental que se desarrolló, como se muestra en la figura 3.

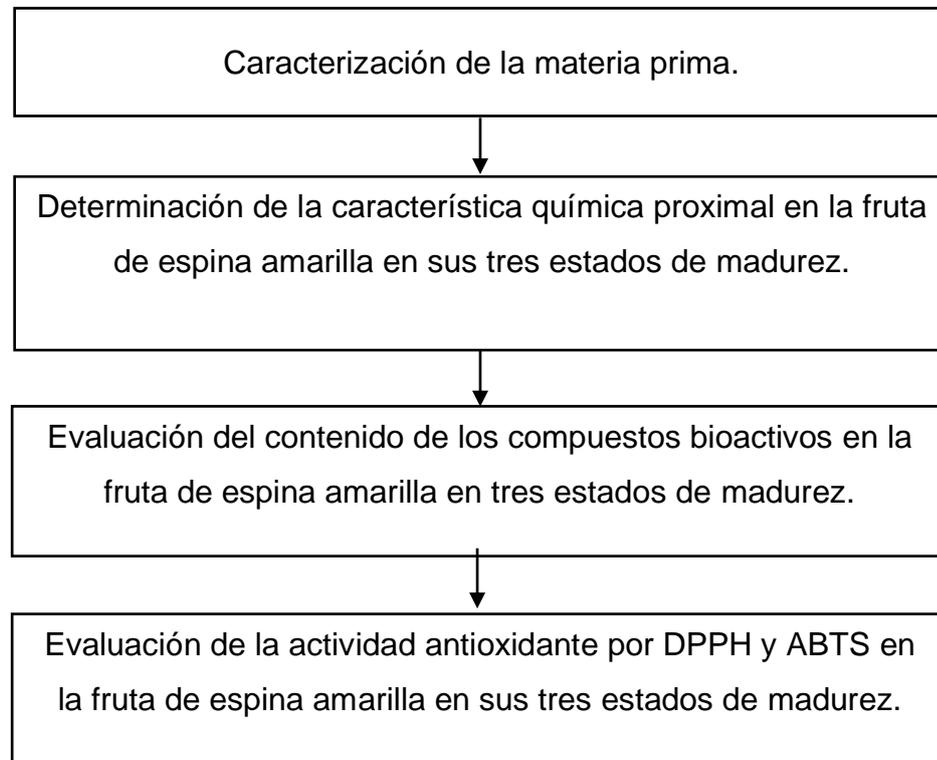


Figura 3. Esquema experimental de la investigación

3.7.1. Caracterización de la materia prima

Se realizó la caracterización física de la fruta de espina amarilla en tres estados de madurez con el siguiente diagrama de flujo, se muestra en la figura 4. Las descripciones se indican a continuación:

Recolección: Se recolectó manualmente las frutas de espina amarilla en tres estados de madurez (verde, pintón y maduro). Se utilizó guantes, oz; baldes de plástico de 3 L.

Selección y clasificación: Las frutas recolectadas fueron seleccionados separando aquellos que estaban golpeados o picados, y según el tamaño homogéneo. Se clasificó según el color, tamaño y estado de madurez.

Lavado: Esta operación se realizó por inmersión en agua clorada a temperatura ambiente, con la finalidad de eliminar partículas extrañas adheridas a la superficie de los frutos.

Pesado: Se pesó 500 g de frutas de espina amarilla por cada estado de madurez en estudio.

Extracción de semilla: Se separó las semillas de las frutas de la espina amarilla manualmente, obteniendo la pulpa y cascara.

Análisis: Se cogió la cantidad necesaria de pulpa y cascara fresca de la fruta espina amarilla para realizar los análisis de vitamina C, polifenoles, capacidad antioxidante y antocianina.

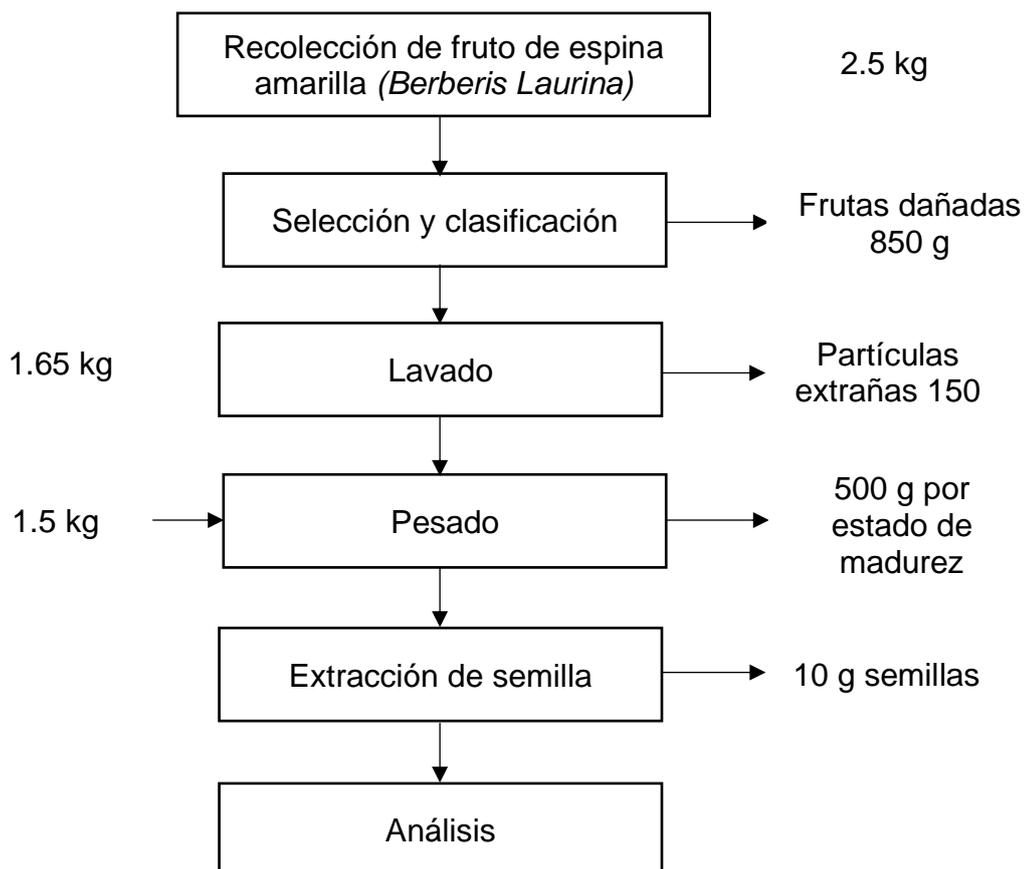


Figura 4. Diagrama para determinar el contenido de la propiedad antioxidante de la fruta de espina amarilla

- ❖ **Sólidos solubles:** Método refractométrico de lectura directa y expresado en grados Brix. (AOAC, 2000)
- ❖ **pH:** Método potenciométrico de medida directa. (AOAC, 1997)

- ❖ **Acidez titulable:** Método de titulación con NaOH 0,1 N hasta llegar un pH de 8 y expresado en ácido cítrico. (AOAC, 2005)

3.7.2. Determinación de la característica química proximal en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez

- ❖ **Humedad:** Método gravimétrico basado en la pérdida de peso de una muestra sometida en la estufa a 100 °C por 6 horas hasta obtener peso constante. (AOAC, 2000)
- ❖ **Ceniza:** Por incineración de la muestra en la mufla a 550 °C por 4 horas para quemar todo el material orgánico, con el método de AOAC (2000).
- ❖ **Nitrógeno total:** Método semi-micro Kjendahl, utilizando el factor de conversión 6,25. (AOAC, 1994)
- ❖ **Grasa:** Método de Soxhelt, usando Eter de petróleo para extraer la grasa de una muestra previamente desecada. (AOAC,2000)
- ❖ **Fibra:** Hidrólisis ácida y básica (AOAC, 2016), digestión acida y alcalina de la muestra obteniendo un residuo indigerible y sales que con calcinación posterior se determina la fibra cruda que es cuantificada gravimétricamente.
- ❖ **Carbohidratos:** Por diferencia. (AOAC, 2016)

3.7.3. Evaluación del contenido de los compuestos bioactivos en espina amarilla en tres estados de madurez

3.7.3.1. Cuantificación de antocianinas totales por el método del pH diferencial

La cuantificación de antocianinas totales se realizó por el método de pH diferencial descrito por Rapisarda *et al.*, (2000)

Cuantificación de antocianinas totales. La concentración de antocianinas se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$C(\text{mg/L}) = (A_{pH=1.0} - A_{pH=4.5}) * 482.82 \left(\frac{1000}{24825} \right) * DF$$

Dónde:

- 484,82 es la masa molecular de la cianidína-3-glucósido
- 24825 es la absortividad molar a 510 nm

- a pH = 1,0; pH = 4,5 es la corrección de la formación de productos de degradación
- DF es el factor de dilución

3.7.3.2. Cuantificación de polifenoles totales mediante el método de azul de prussian

La cuantificación de polifenoles totales por el método de azul de prusian descrito por Margraf *et al.*, (2015)

Curva de calibración

1. Se preparó una solución Stock de 1 mg/mL de ácido gálico.
2. Se colocó en un tubo de ensayo 400 μ L de ácido gálico (Sol. De trabajo de 1 hasta 10 μ g/mL), se adicionó 400 μ L de solución A, luego se adicionó 400 μ L de solución B. Transcurrido 15 minutos se transfirió a las cubetas de poliestireno y leer a Abs. a 725 nm. El blanco se realizó empleando las mismas proporciones, pero en lugar de soluciones de trabajo se usó agua destilada (los valores de Abs. registrados en el espectrofotómetro, se calibró a cero).
3. Mediante ARLn de las Abs Vs Concentración de ácido gálico, se obtuvo la ecuación de la curva de calibración.

3.7.3.3. Cuantificación de ácido ascórbico por cromatografía líquida de alta eficiencia

La cuantificación de ácido ascórbico por el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), descrito por Pertuzatti *et al.*, (2015) cuya metodología fue la siguiente:

Se preparó una solución de ácido metafosfórico al 4,5 %.

La fase móvil se preparó con ácido acético en agua ultrapura (concentración de 0,1 %) de porosidad por 47 mm de diámetro; esta fase móvil se preparó para bombear el HPLC.

Preparación de muestras

Se pesó 2 g de muestra, de la siguiente manera; V=2,0035 g, P=2,0041 g y M=2,0038 g, luego a cada muestra se añadió 10 mL de ácido metafosfórico al 4,5%, luego se homogenizó y se puso en la cámara de refrigeración por un tiempo de una 1 hora protegido de la luz, luego se

colocó en microtubos de 1,5 mL, de inmediato se llevó a centrifugar (10000 rpm, 5min, 4 °C). Por último, se transfirió a viales de 1,5 mL.

Condiciones de separación y cuantificación

1 µL de la muestra, descrito previamente, se inyectó en el sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Se empleó un detector de arreglo de diodos (DAD), con longitud de onda a 254 nm. La fase móvil consistió en agua ultrapura con 0,1% de ácido acético, con un flujo de 0,8 mL/min (tiempo de análisis 10 min). Los datos fueron adquiridos y procesados utilizando el software Clarity Chrom. Los picos se identificaron comparando el tiempo de retención de los estándares de ácido L-ascórbico. La cuantificación de la vitamina C se evaluó de acuerdo con la curva de calibración estándar externo de L-ácido ascórbico. Los resultados se expresaron en µg AA/ g de muestra.

3.7.4. Evolución de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en la fruta de espiná amarilla en sus tres estados de madurez

3.7.4.1. Evaluación de actividad antioxidante por el método del radical DPPH

La evaluación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH, descrito por Brand-Williams *et al.*, (1995) cuya metodología fue la siguiente:

Procedimiento

- a. Preparación de soluciones de trabajo. Se preparó las siguientes soluciones:
 - 100 mL de 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (100 µM) se diluyó en metanol.
 - Se ajustó la absorbancia en un rango de 0,9-1,2
 - Soluciones de trabajo de ácido ascórbico a concentraciones de 2,5 – 20,0 mg/100 mL
 - Se preparó soluciones de trabajo de Trolox 0 – 20 µM
- b. Curva estándar. Se hizo reaccionar 50 µL de solución de trabajo o muestra con 950 µL de DPPH (100 µM) por 30 minutos en oscuridad, la absorbancia se registró a 517 nm.

Mediante ARLn de las Abs Vs Concentración de ácido ascórbico, se obtuvo la ecuación de la curva de calibración.

Nota: Para la actividad antioxidante por DPPH, en forma general se hizo unas tres lecturas por cada muestra, todo ello después de haber permanecido en oscuridad por 30 min.

3.7.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante método del ABTS

La evaluación de la actividad antioxidante por el método del ABTS descrito por Fellegri *et al.*, (1999) cuya metodología fue la siguiente:

Metodología

Preparación de soluciones de trabajo. Se prepararon las siguientes soluciones:

- Stock de ABTS⁺ (se mezcló 5 mM de ABTS en agua con 88 µL de persulfato de potasio a 140 mM; se dejó a temperatura ambiente por 12 – 16 horas antes de uso, protegido de la luz).
- Solución de trabajo de ABTS⁺, se diluyó el stock en 70 mL de etanol (se ajustó la Abs = 0,9 -1,2 a 734 nm).
- Se preparó soluciones de trabajo de ácido ascórbico a concentraciones de 2,5 – 20,0 mg/100 mL.
- Soluciones de trabajo de Trolox 0 – 20 µM
- a. Curva estándar. Se hizo reaccionar 50 µL de solución de trabajo o muestra con 950 µL de ABTS⁺ (diluido) por 10 minutos en oscuridad, la absorbancia se registró a 734 nm.
- b. Coeficiente de inhibición (IC₅₀) Se evaluó mediante un análisis de regresión de inhibición versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50 % del radical ABTS⁺. Se hizo reaccionar 50 µL de muestra con 950 µL de ABTS⁺, la absorbancia se registró a 734 nm, a intervalos de 30 segundos durante 10 minutos. El porcentaje de inhibición del radical ABTS se calculó de la siguiente manera:

$$\%INH_{ABTS} = \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} \times 100$$

Dónde:

Abs_f es la absorbancia del radical ABTS⁺ al final de la reacción

Abs_i es la absorbancia del radical al inicio de la reacción.

El valor de IC₅₀, se obtuvo, reemplazando 50 en el eje de Y, en la ecuación que se obtuvo al final de procesar los datos (Y = ax + b).

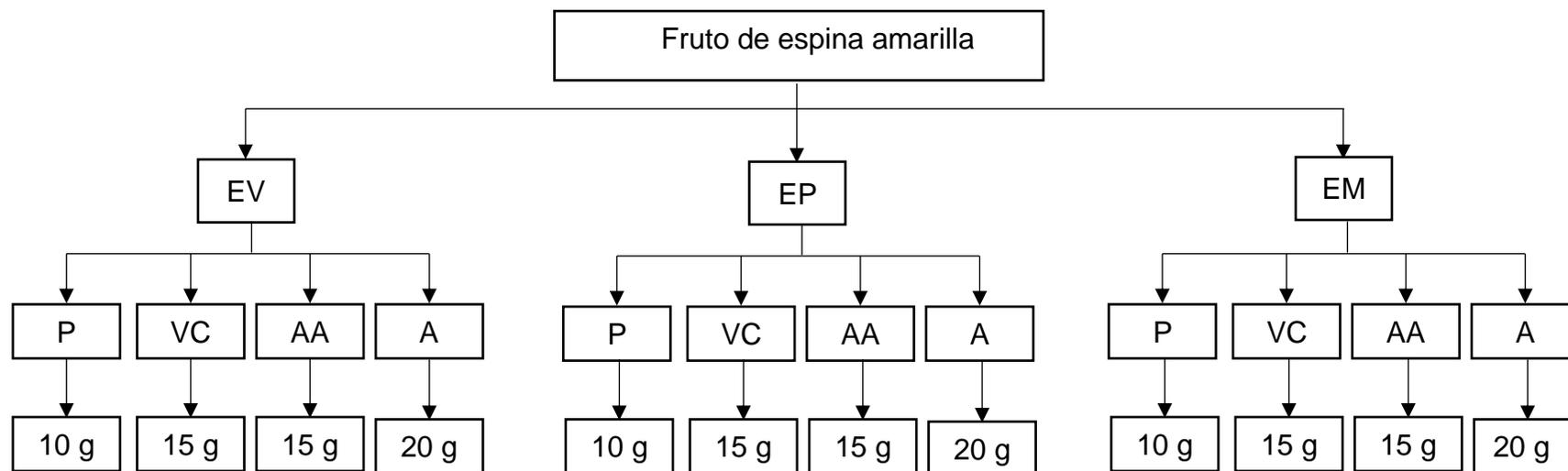


Figura 5. Esquema experimental

Leyenda:

EV = Estado verde

EP = Estado pintón

EM = Estado maduro

P = Polifenoles

VC = Vitamina C

AA =Actividad antioxidante

A = Antocianina

IV. RESULTADOS

4.1. Caracterización de la materia prima

4.1.1. Análisis físico morfológico de la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez

Las características físicas morfológicas de la fruta de espina amarilla (*Berberis laurina*) se efectuó sobre la fruta seleccionada según su estado de madurez que se reportan en la Tabla 7.

Para el caso de peso, diámetro ecuatorial y longitud (anexo 1a), se observa que la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05; lo que nos indica que hay diferencia significativa según su estado de madurez.

Tabla 7. Análisis físico morfológico en frutas de espina amarilla

Características evaluadas	Estados de madurez		
	Verde	Pintón	Maduro
Peso (g)	0,31 ± 0.068 ^c	0,41 ± 0,077 ^b	0,55 ± 0,080 ^a
Diámetro ecuatorial (mm)	7,21 ± 0,60 ^c	8,04 ± 0,68 ^b	9,01 ± 0,72 ^a
Longitud (mm)	7,8 ± 0,66 ^c	8,28 ± 0,60 ^b	8,68 ± 0,65 ^a

Cada valor representa la media ± la desviación estándar (n=100). Medias con diferente letra en forma horizontal son significativamente diferentes (p<0,05).

Los pesos de los frutos se incrementan a medida que se produce el proceso de maduración, es así que los resultados en estado verde, pintón y maduro fueron 0,31 g; 0,41 g y 0,55 g.

La longitud y diámetro ecuatorial de los frutos, igualmente se incrementa a medida que se produce la maduración, es así que el diámetro ecuatorial de los frutos en estado verde 7,21 mm, del pintón 8,04 mm y el maduro 9,01 mm.

4.1.2. Caracterización fisicoquímica de la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez

En la tabla 8 se presentan los valores con su correspondiente desviación estándar de los resultados de la caracterización fisicoquímica (°Brix, pH, acidez titulable e índice de madurez) de la fruta de espina amarilla en tres estados de madurez.

Para el caso de pH, sólidos solubles, acidez titulable e índice de madurez (anexos 1b, 1c, 1d, 1e), se observa que la probabilidad o el valor de P es

menor a 0,05; lo que indica que hay diferencia significativa, donde se evidencia que la fruta de espina amarilla, varían respecto a sus estados de madurez (verde, pintón y maduro), en cuanto a su pH ($3,18 \pm 0,03$; $3,27 \pm 0,05$; $3,55 \pm 0,06$), °Brix ($6,07 \pm 0,90$; $9,1 \pm 0,50$; $13,26 \pm 2,34$), acidez titulable ($1,15 \pm 0,91$; $1,06 \pm 0,50$; $0,96 \pm 2,34$) e índice de madurez ($5,28 \pm 0,75$; $8,62 \pm 0,56$; $13,85 \pm 2,67$).

Tabla 8. Caracterización fisicoquímica en frutas de espina amarilla.

Característica fisicoquímica	Estados de madurez		
	Verde	Pintón	Maduro
Sólidos solubles (°Brix)	$6,07 \pm 0,91^b$	$9,1 \pm 0,50^b$	$13,26 \pm 2,34^a$
pH	$3,18 \pm 0,03^b$	$3,27 \pm 0,05^b$	$3,55 \pm 0,06^a$
Acidez titulable (%)	$1,15 \pm 0,01^c$	$1,06 \pm 0,02^b$	$0,96 \pm 0,02^a$
Índice de madurez	$5,28 \pm 0,75^c$	$8,62 \pm 0,56^b$	$13,85 \pm 2,67^a$

Se presentan promedios \pm SD (n=3). Letras diferentes en líneas horizontales indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2. Determinación de la característica química proximal en frutas de espina amarilla en sus tres estados de madurez

En la Tabla 9 se presentan los valores con su correspondiente desviación estándar de los resultados de la determinación de la característica química proximal en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.

Para el caso de humedad, grasa y fibra (anexos 2a, 2c, 2e), se observa que la probabilidad o el valor de P fue menor a 0,05; lo que indica que hay una diferencia significativa donde se evidencian que la fruta de espina amarilla varían según su estado de madurez (verde, pintón y maduro) en cuanto a la humedad fue (80,98 %; 77,69 % y 73,96 %), grasa (1,44 %; 1,21 % y 0,63 %) y fibra (0,67 %; 0,58 % y 0,50 %).

Para el caso de ceniza, nitrógeno total y carbohidratos (anexos 2b, 2d, 2f), se observa que la probabilidad o el valor de P es mayor a 0,05; indica que no hay diferencia significativa entre los estados de madurez (verde, pintón y maduro) en cuanto a la ceniza fue (0,57 %; 1,76 % y 2,69 %), nitrógeno total (13,13 %; 13,76 % y 15,42 %), carbohidratos (3,87 %; 5,59 % y 7,30 %).

Tabla 9. Característica proximal en la fruta de espina amarilla.

Análisis proximal	Estados de madurez		
	Verde	Pintón	Maduro
Humedad %	80,98 ± 0,86 ^c	77,69 ± 1,08 ^b	73,96 ± 0,86 ^a
Ceniza %	0,57 ± 0,06 ^a	1,76 ± 0,32 ^a	2,69 ± 1,68 ^a
Grasa %	1,44 ± 0,15 ^b	1,21 ± 0,13 ^b	0,63 ± 0,22 ^a
Nitrógeno total %	13,13 ± 1,74 ^a	13,76 ± 2,24 ^a	15,42 ± 2,64 ^a
Fibra cruda %	0,67 ± 0,05 ^b	0,58 ± 0,07 ^a	0,50 ± 0,06 ^a
Carbohidratos %	3,87 ± 1,83 ^a	5,59 ± 3,34 ^a	7,30 ± 0,07 ^a

Cada valor representa la media de tres repeticiones ± la desviación estándar, Medias con diferentes letras en horizontal son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.3. Evaluación del contenido de los compuestos bioactivos en la fruta de espina amarilla en tres estados de madurez

Los compuestos bioactivos en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez con tres tipos de solventes (agua, etanol y metanol) se muestra en la Tabla 10 los resultados de la evaluación de los compuestos bioactivos en frutas de espina amarilla en sus tres estados de madurez.

Para el caso de antocianinas no se detectó en estado verde ni en pintón con ninguno de los extractos, mientras que en estado maduro se ha obtenido con los extractos acuosos, etanólico y metanólico. Anexo (3a) se observa que la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05, lo que indica que hay una diferencia significativa entre los solventes en estado maduro. Para el caso de polifenoles con extracto acuoso, etanólico y metanólico (anexos 3b, 3c y 3d), se observa que la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05, lo que indica que hay una diferencia significativa entre los estados de madurez de la fruta.

Tabla 10. Evaluación de los compuestos bioactivos en la fruta de espina amarilla

Compuestos bioactivos	Solvente	Estado de madurez		
		Verde	Pintón	Maduro
Antocianinas (mg cianidina-3- glucosido/100 g de muestra)	Agua	ND	ND	12,21 ± 0,74 ^{ay}
	Etanol	ND	ND	21,17 ± 2,21 ^{ax}
	Metanol	ND	ND	24,93 ± 5,04 ^{ax}
Polifenoles µg AGE/g de muestra	Agua	69,66 ± 1,00 ^{bz}	104,49 ± 3,02 ^{bz}	432,78 ± 58,89 ^{ay}
	Etanol	106,58 ± 6,64 ^{cy}	172,15 ± 9,56 ^{by}	581,76 ± 38,86 ^{ay}
	Metanol	204,86 ± 13,30 ^{bx}	248,32 ± 10,49 ^{bx}	898,92 ± 96,79 ^{ax}
Vitamina C		ND	ND	ND

Cada valor representa la media de tres repeticiones ± la desviación estándar, Medias con diferente letra en horizontal (a, b, c) y vertical (x, y, z) son significativamente diferentes ($p < 0,05$). ND: No detectado.

Para el caso de la vitamina C (anexos 3e, 3f y 3g) no se detectó en ninguno de sus estados de madurez en la fruta de espina amarilla como se muestra en la figura 6 la Cromatograma de análisis de vitamina C.

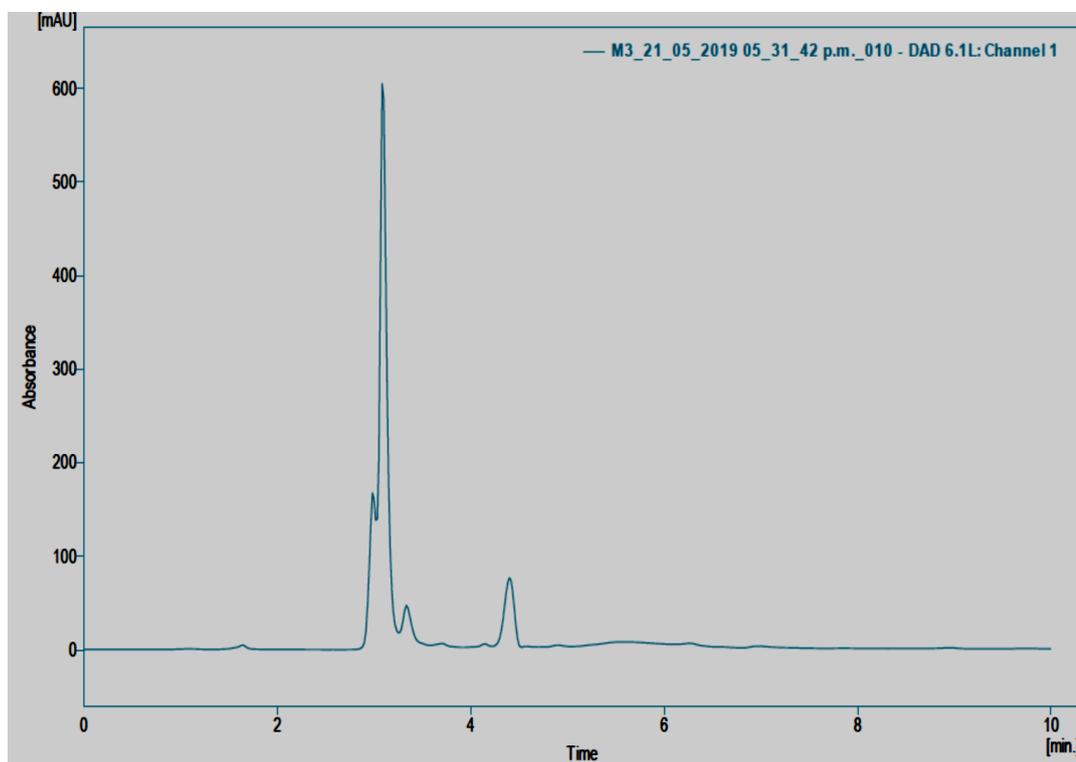


Figura 6. La Cromatograma de análisis de vitamina C (254 nm) en frutas de espina amarilla, el área (pico) de vitamina C, según el método realizado, debería de mostrarse en el minuto cinco el cual no se observa en el Cromatograma.

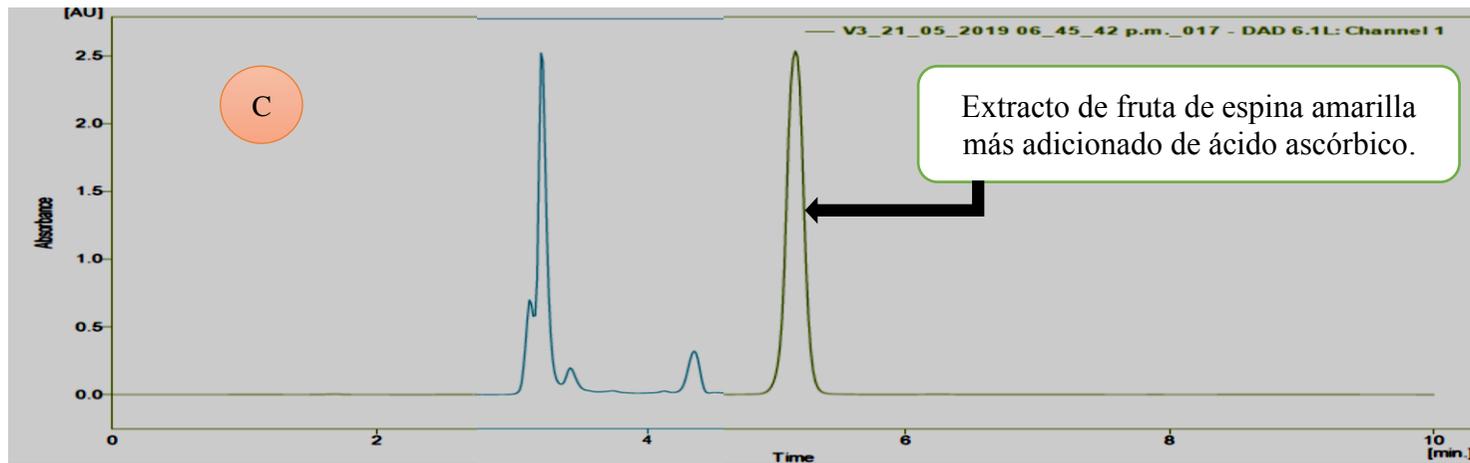
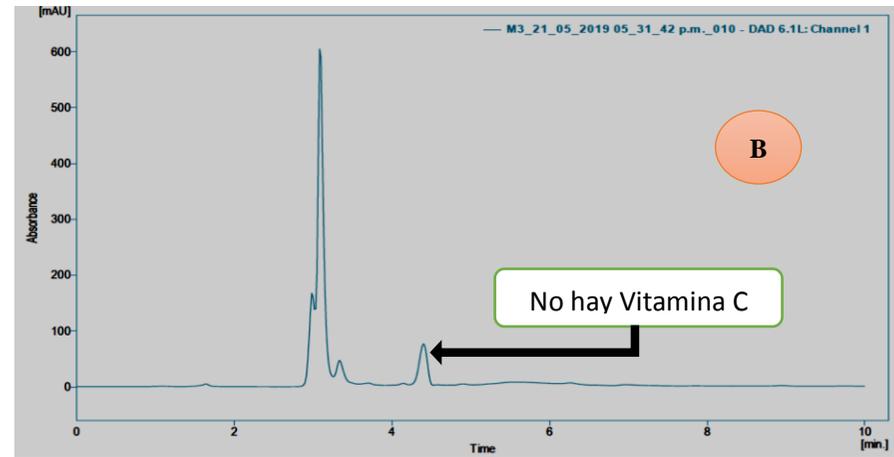
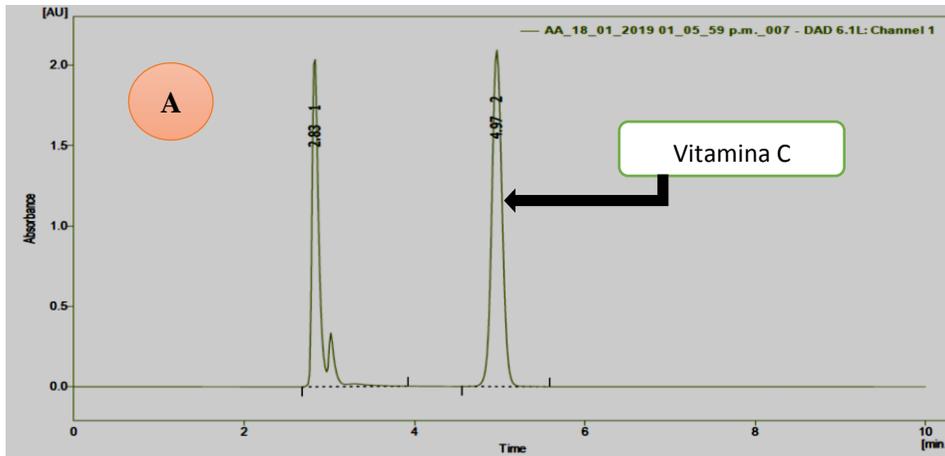


Figura 7. A) Cromatograma con control de vitamina C, B) Cromatograma de extracto de fruta de espinaca amarilla, C) Cromatograma de extracto de fruta de espinaca amarilla más adicionado de ácido ascórbico.

4.4. Evaluación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez

La actividad antioxidante por DPPH y ABTS en frutas de espina amarilla en sus tres estados de madurez se evaluaron en dos formas; el primero: porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto acuoso, etanólico y metanólico, segundo: actividad antioxidante por IC₅₀ DPPH y ABTS frente a extracto acuoso, etanólico y metanólico en fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez.

4.4.1. Porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extractos acuosos, etanólico y metanólico de la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez

El porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto acuoso, etanólico y metanólico, en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez, expresados en mg de trolox equivalentes/ g de muestra; los resultados se muestran en la Tabla 11, las medias con sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 11. Actividad antioxidante por DPPH y ABTS en frutas de espina amarilla

Compuestos bioactivos	Solvente	Estado de madurez		
		Verde	Pintón	Maduro
Actividad antioxidante por DPPH (mg TE/ g de muestra)	Agua	1,30 ± 0,31 ^{by}	0,73 ± 0,10 ^{by}	5,49 ± 1,33 ^{ay}
	Etanol	1,89 ± 0,13 ^{by}	0,91 ± 0,09 ^{by}	6,88 ± 1,05 ^{ayx}
	Metanol	3,36 ± 0,52 ^{bx}	1,68 ± 0,47 ^{bx}	8,12 ± 0,89 ^{ax}
Actividad antioxidante por ABTS (mg TE/ g de muestra)	Agua	1,53 ± 0,07 ^{by}	1,39 ± 0,36 ^{by}	10,14 ± 1,11 ^{ay}
	Etanol	3,32 ± 0,14 ^{bx}	2,62 ± 0,11 ^{bx}	11,03 ± 1,61 ^{ay}
	Metanol	3,36 ± 0,34 ^{bx}	2,64 ± 0,03 ^{bx}	15,06 ± 1,07 ^{ax}

Cada valor representa la media de tres repeticiones ± la desviación estándar. Medias con diferente letra en horizontal (a, b, c) y vertical (x, y, z) son significativamente diferentes (p<0,05).

Para el caso de actividad antioxidante por DPPH y ABTS (anexo 4a, 4b), en la cual, el estado maduro extrajo mayor contenido de antioxidantes con el solvente metanol frente a los solventes de etanol y agua con 8,12± 0,89 y 15,06 ± 1,07 mg TE/ g de muestra frente a (6,88 ± 1,05 y 11,03 ± 1,61 mg TE/ g de muestra); (5,49 ± 1,33 y 10,14 ± 1,11 mg TE/ g de muestra) respectivamente. Mientras en el estado verde y pintón tuvieron un mínimo contenido de antioxidantes con solvente metanol (3,36 ± 0,52 y 3,36 ±

0,34 mg TE/ g de muestra); ($1,68 \pm 0,47$ y $2,64 \pm 0,03$ mg TE/ g de muestra); etanol ($1,89 \pm 0,13$ y $3,32 \pm 0,14$ mg TE/ g de muestra); ($0,91 \pm 0,09$ y $2,62 \pm 0,11$ mg TE/ g de muestra) y agua ($1,30 \pm 0,31$ y $1,53 \pm 0,07$ mg TE/ g de muestra); ($0,73 \pm 0,10$ y $1,39 \pm 0,36$ mg TE/ g de muestra). En cuanto al método ABTS fue superior al método DPPH con $15,06 \pm 1,07$ mg TE/ g de muestra frente a $8,12 \pm 0,89$ mg TE/ g de muestra, respectivamente en estado maduro.

4.4.2. Actividad antioxidante por IC₅₀ DPPH y ABTS frente a extractos acuosos, etanólico y metanólico en frutas de espina amarilla en sus tres estados de madurez

La actividad antioxidante expresado como IC₅₀ de DPPH y ABTS frente a extractos acuosos, etanólico y metanólica, en frutas de espina amarilla en sus tres estados de madurez se muestra en la Tabla 12, las medias con sus respectivos desviación estándar.

Para el caso de actividad antioxidante por IC₅₀ DPPH (anexo 4c), la inhibición fue mayor en estado maduro con el extracto metanólico frente a los extractos de etanol y agua con $0,71 \pm 0,01$ mg/ mL de muestra frente a $0,74 \pm 0,01$ y $0,95 \pm 0,04$ mg/ mL de muestra. Se evidencia que presentó mínimo secuestro de radical sintético en estado verde y pintón con la extracción acuosa ($7,73 \pm 0,29$ y $6,54 \pm 0,87$ mg/ mL), con la extracción etanólica ($4,26 \pm 0,21$ y $5,67 \pm 0,56$ mg/ mL) y con la extracción metanólica ($2,76 \pm 1,00$ y $3,95 \pm 0,60$ mg/ mL); la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05; lo que indica que hay diferencia significativa entre el estado maduro, verde y pintón; con respecto a estos dos estados no hay diferencia significativa estadísticamente.

Tabla 12. Actividad antioxidante (IC₅₀) frente al radical DPPH y catión ABTS.

Compuestos bioactivos	Solvente	Estado de madurez		
		Verde	Pintón	Maduro
IC ₅₀ DPPH (mg/mL de muestra)	Agua	6,54 ± 0,87 ^{cy}	7,73 ± 0,29 ^{bz}	0,95 ± 0,04 ^{ay}
	Etanol	4,26 ± 0,21 ^{cx}	5,67 ± 0,56 ^{by}	0,74 ± 0,01 ^{ax}
	Metanol	2,76 ± 1,00 ^{bx}	3,95 ± 0,60 ^{bx}	0,71 ± 0,01 ^{ax}
IC ₅₀ ABTS (mg/mL de muestra)	Agua	3,08 ± 0,09 ^{cy}	4,08 ± 0,34 ^{by}	0,40 ± 0,06 ^{ay}
	Etanol	1,84 ± 0,41 ^{bx}	3,20 ± 1,23 ^{bxy}	0,33 ± 0,02 ^{axy}
	Metanol	1,70 ± 0,61 ^{bx}	1,89 ± 0,13 ^{bx}	0,22 ± 0,04 ^{ax}

Cada valor representa la media de tres repeticiones ± la desviación estándar. Medias con diferente letra en horizontal (a, b, c) y vertical (x, y, z) son significativamente diferentes (p<0,05).

Para el caso de actividad antioxidante por IC₅₀ ABTS (anexo 4d), la inhibición fue mayor en estado maduro con el extracto metanólico frente a los extractos de etanol y agua con 0,22 ± 0,04 mg/ mL de muestra frente a 0,33 ± 0,02 y 0,40 ± 0,06 mg/ mL de muestra. Se evidencia que presentó mínimo secuestro de radical sintético en estado verde y pintón con la extracción acuosa (3,08 ± 0,09 y 4,08 ± 0,34 mg/ mL), con la extracción etanólica (1,84 ± 0,41 y 3,20 ± 1,23 mg/ mL) y con la extracción metanólica (1,70 ± 0,61 y 1,89 ± 0,13 mg/ mL) respectivamente; la probabilidad o el valor de P es menor a 0,05; lo que indica que hay diferencia significativa entre el estado maduro con los estados verde y pintón; con respecto a estos dos estados no hay diferencia significativa estadísticamente.

V. DISCUSIÓN

5.1. De la caracterización de la materia prima

5.1.1. Del análisis físico morfológico de la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez

En la Tabla 7 referente a las características físicas morfológicas en la fruta de espina amarilla, se observa el incremento en peso, longitud y diámetro ecuatorial a medida que se produce la maduración.

Los pesos de las frutas en estado verde, pintón y maduro fueron: $0,31 \text{ g} \pm 0,07$; $0,41 \text{ g} \pm 0,08$ y $0,55 \text{ g} \pm 0,08$. Según Tapia (2018) concluyen que el peso del fruto varía según su tamaño el cual aumenta hasta alcanzar la madurez.

La longitud y diámetro ecuatorial de la fruta de espina amarilla, igualmente se incrementa a medida que se produce la maduración, así que el diámetro ecuatorial de las frutas en estado verde, pintón y maduro fueron 7,21 mm; 8,04 mm y 9,01 mm respectivamente. Según Tapia (2018), que el tamaño final depende del alto grado de la humedad que proporciona el riego y las lluvias.

Según Rivera (2016), la espina amarilla es un arbusto de tallo color amarillo verdoso; y el fruto de corteza guindo oscuro intenso de 8 a 10 mm de diámetro; de cuatro a seis semillas. Por lo que se puede contrastar el diámetro está dentro del rango en el estado maduro con $9,01 \text{ mm} \pm 0,72$.

Mamani (2017) menciona que la maduración es la secuencia de cambios en color, olor, sabor y textura. Los cambios asociados con la maduración implican pérdida de clorofila, aparición de otros pigmentos, cambios en la acidez, astringencia y dulzor, cambios en el contenido de ácido, fenoles, azúcares y compuestos volátiles y cambios en la textura del fruto, los cuales se pudieron evidenciar en las muestras de la fruta de espina amarilla investigada.

5.1.2. De la caracterización fisicoquímica de fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez

En la Tabla 8 referente a la caracterización fisicoquímica en la fruta de espina amarilla se puede observar los valores en sus diferentes estados de madurez.

Para el caso de sólidos solubles, en el estado verde, pintón y maduro fue $6,07 \pm 0,90$; $9,1 \pm 0,50$ y $13,26 \pm 2,34$ Brix° en fruta de espina amarilla desarrollado en el rango altitudinal de 3480 - 3775 m.s.n.m.

Según Rosales y Arias (2015), en su investigación untusha (*Berberis lobbiana*) obtuvieron valores de sólidos solubles (°Brix) en estado verde, pintón, maduro y sobre maduro (5,81; 7,44; 10,82; 9,08) el rango altitudinal fue de 3224 m.s.n.m, por lo que considera que los resultados podrían variar ampliamente, debido a diferentes periodos de cosecha, y por la influencia de factores genéticos y ambientales.

Beltrán (2010) menciona que los sólidos solubles en los frutos es el transporte de azúcar desde las hojas y sitios de reserva. Por tal motivo, la pulpa presenta monosacáridos como glucosa y fructuosa y la cantidad de sólidos solubles de la pulpa de una fruta depende del índice del grado de madurez de la misma. Según Flores (1994), los mayores cambios cuantitativos asociados con la maduración son generalmente el rompimiento de carbohidratos, siendo frecuente su casi total inversión de almidón a azúcar, esto tiene doble efecto de alterar el sabor y consistencia del producto; también el incremento de azúcar hace que al fruto sea más dulce y por consiguiente más aceptable para su consumo.

El porcentaje de acidez total en fruta verde fue el más elevado con $1,15 \pm 0,91$ en el caso de pintón fue de $1,06 \pm 0,50$ y en maduro es más bajo con $0,96 \pm 2,34$. Según Beltrán (2010) y Flores (1994), mencionan que la cantidad de ácidos libres aumenta al comenzar el crecimiento y luego permanece constante, los ácidos orgánicos generalmente decrecen durante la madurez, esto es una característica que sucede en la mayoría de los frutos.

Rosales y Arias (2015) encontraron valores de acidez en el fruto de untusha en estado 1,98 verde; 1,88 pintón; 1,56 maduro y sobre maduro 1,49; por lo que considera que, en la mayoría de las frutas, el contenido de ácidos orgánicos disminuye durante y después del proceso de maduración.

Beltrán (2010) señala que el contenido de ácidos es un requisito importante de calidad y en frutas cítricas dulces, durante su época normal de cosecha, varían desde 1 % al inicio de la temporada hasta 2,5 % al final de la misma. Sin embargo, la tasa de ácidos en el fruto maduro sigue siendo alta.

Los resultados de pH obtenido en fruta de espina amarilla fueron de $3,18 \pm 0,03$; $3,27 \pm 0,05$ y $3,55 \pm 0,06$ en estado verde, pintón y maduro respectivamente, comparando con el sauco (3,42; 3,51; 3,64) verde, pintón y maduro respectivamente, se puede observar que los resultados de la fruta de espina amarilla, son similares a las del fruto del sauco.

Comparando con los resultados de Rosales y Arias (2015) en el fruto de untusha en estado verde fue 2,22, pintón 2,80, maduro 3,37 y sobre maduro 3,47 se observa que hay una mínima diferencia quizás debido al tipo de especie y altitud de zona de producción de la planta.

Según Beltrán (2010), señala que la determinación del pH en la fruta es muy importante, ya que mediante éste parámetro se puede conocer el estado de madurez y el grado de deterioro. El pH se estabiliza durante la madurez de la pulpa, disminuyendo en los estadíos más avanzados de sobre madurez; por lo tanto, se considera una fruta muy ácida de acuerdo a las tablas de clasificación de alimentos.

5.2. De la determinación de la característica química proximal en fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez

En la Tabla 9 se muestra la característica proximal que se realizó a la fruta de espina amarilla en tres estados de madurez. Se observa que en porcentaje de humedad hay diferencia significativa en los tres estados de madurez, en grasa y fibra en el estado verde y pintón no mostró diferencia significativa, con respecto al estado maduro hubo diferencia significativa.

Beltrán (2010) en su investigación obtuvo en sus resultados en caso de humedad en sus tres estadíos de madurez verde, pintón, maduro (88,2 %; 88,72 % y 92,35 %) respectivamente, estas bayas procedentes de un rango altitudinal de 3300-3600 m.s.n.m. En comparación con los resultados obtenidos en fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez fue menor (80,98 %; 77,69 % y 73,96%) en verde, pintón, maduro respectivamente, con el rango altitudinal de 3480 - 3775 m.s.n.m. Según Sanabria y consuelo (2012), explican que la disminución en el contenido de humedad se debe a que durante la maduración existen pérdidas de agua en forma de vapor a través de rutas primarias tales como estomas y cutícula, fenómenos conocidos como traspiración.

Según Beltrán (2010), indica que el contenido de humedad depende tanto de la zona (manejo agronómico y condiciones ecológicas), procedencia y mes de realización de la cosecha. Asimismo, manifiesta que el contenido de humedad en diferentes frutos tiene una estrecha relación con la humedad ambiental. La composición química de las frutas fluctúa dentro de amplios límites, dependiendo en buena medida de la variedad, características del año, abonado, origen, edad, momento de recolección y almacenado.

El resultado en porcentaje de grasa obtenido en fruta de espina amarilla fue de 1,44 %; 1,21 % y 0,63% en estado verde, pintón y maduro respectivamente, por lo que Sanabria y Consuelo (2012) explican que el contenido lipídico de las frutas suele hallarse por debajo del 1 % y varía con según el producto; su valor nutritivo no deriva sólo de las grasas que constituyen una fuente energética, sino también del hecho de que el organismo requiere pequeñas cantidades de ácidos grasos insaturados. Beltrán (2010) indica que la mayor cantidad de grasas se concentra en las semillas y en menor cantidad en las otras partes del fruto.

Para el caso de fibra se determinó 0,67 %; 0,58 % y 0,50 % en estado verde, pintón y maduro respectivamente. Según Sanabria y Consuelo (2012), se refieren que el contenido de fibra de las frutas frescas se encuentra ordinariamente entre 0,7 a 4,7%. Las frutas con menor contenido en agua, o cuya porción comestible contienen semillas, ofrece valores de fibra elevada; Sin embargo, argumenta que los valores estarían influenciados por factores genéticos.

En cuanto al porcentaje de nitrógeno total fue de 13,13 %; 13,76 %; y 15,42 % en estado verde, pintón y maduro respectivamente, considerando que la fruta de espina amarilla contiene alto contenido de nitrógeno total. Según Bravo *et al.*, (2016), indican que la hoja de arracacha tiene 24,54 % de nitrógeno total haciendo una comparación estaría cercano a los datos obtenidos.

Los valores de carbohidratos fueron de 3,87 %; 5,59 % y 7,30 % en estado verde, pintón y maduro. Según Sanabria y consuelo (2012), indican que el contenido de hidratos de carbono varía notablemente durante la maduración; los azúcares abundan en la fruta plenamente madura, lo cual

coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, que además es respaldado por Repo y Encina (2008) quienes mencionan que las frutas, en general, son fuentes importantes de carbohidratos.

5.3. De la evaluación de los compuestos bioactivos en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez

En la Tabla 10 se muestra el contenido de antocianinas evaluados por el método pH diferencial, la extracción se realizó con tres tipos de solventes (agua, etanol y metanol) con fines comparativos. En la Tabla mencionada se observa que en los estados de madurez verde y pintón no se detectó la presencia de antocianinas, mientras que en el estado maduro se obtuvo los siguientes resultados $12,21 \pm 0,74$; $21,17 \pm 2,21$ y $24,93 \pm 5,04$ mg cianidina-3-glucosido/100 g con los solventes agua, etanol y metanol respectivamente, de los resultados obtenidos, se puede decir que los solventes alcohólicos extrajeron mayor cantidad de antocianinas con respecto al agua, deduciendo que las antocianinas fueron poco polares.

García (2008) menciona que el agua en general no es tan eficiente en penetrar en los compartimientos donde el pigmento se encuentra depositado dentro del tejido; el alcohol puede disolver muchos lípidos de las membranas celulares y permitir la salida del pigmento además inhibe la acción de muchas enzimas degradativas.

Según Zapata *et al.*, (2014), en su investigación determinaron una alta concentración de antocianinas en los arándanos frescos obteniendo $92,1 \pm 2,8$ mg cianidina-3-glucósido/100 g, además menciona que el carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en variados solventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y grupos acilos, además de factores como la temperatura y la luz.

Del Carpio (2009) en su investigación en los frutos de *berberis boliviana* Lechler obtuvo una concentración de antocianinas en peso de 7 g /100 g de fruto seco separado de las semillas de *berberis boliviana* Lechler, sabiendo que los frutos frescos presentan un contenido de humedad de

56,30 %, y realizaron una aproximación del contenido de antocianinas en tejido epidérmico fresco, siendo de 1500 mg/100 g de frutos.

Según Llimpe (2017), menciona que, debido a la poca solubilidad de las antocianinas en agua, éstas no se encuentran de manera libre en la naturaleza, sino en su forma glicosilada (antocianidinas). En esta estructura encontramos que el grupo hidroxilo de la posición 3 está siempre glicosilada, lo que le dará estabilidad y solubilidad al cromóforo. Así mismo en su investigación de macha macha (*Vaccinium floribundum* Kunth) en sus tres estados de madurez obtuvo 51,9; 424,2 y 1053,2 mg cianidina/ g muestra en frutas verde, pintón y maduro respectivamente. Asimismo, hace comparación con los diferentes frutos del mismo género como: Mora azul (*Vaccinium (different sub-genera)*) de 60-480 mg/ 100 g de muestra, Arándano americano (*Vaccinium myrtilus*, L) de 300-600 mg/ 100 g de muestra, Arándano (*Vaccinium oxycoccus*, L) de 20-360 mg/ 100 g de muestra, Arándano rojo (*Vaccinium vitis-idaea*, L) de 35-170 mg/ 100 g de muestra.

Según Rafael (2017), en su investigación del maíz morado con extracto acuoso y etanol 20 % fue 5,70 y 8,38 mg de antocianinas/g muestra la concentración es más alto que de la fruta de espina amarilla la diferencia sería debido a que pertenecen a distintas familias.

Los resultados del contenido de polifenoles totales fueron expresados en $\mu\text{g AGE/g}$ muestra, en estado verde, pintón y maduro con solvente de agua fueron $69,66 \pm 1,00$; $104,49 \pm 3,02$ y $432,78 \pm 58,89$; con etanol fue de $106,58 \pm 6,64$; $172,15 \pm 9,56$ y $581,76 \pm 8,86$; con metanol se obtuvo $204,86 \pm 13,30$; $248,32 \pm 10,49$ y $898,92 \pm 96,79$.

Sanabria y Consuelo (2012) mencionan que el contenido de polifenoles totales en camu camu en sus dos estados de madurez en el estado maduro fue: 480,53 mg ácido gálico/L, y del estado pintón 382,55 mg ácido gálico/L por lo que hay una diferencia con respecto a la fruta de espina amarilla.

Según, Muñoz *et al.*, (2015), manifiestan que el comportamiento de los solventes se puede explicar considerando que, en la extracción de los fenoles a partir de material vegetal, el tipo de disolvente empleado determina el tipo de compuestos a extraer, la capacidad de extracción de compuestos fenólicos es mayor dependiendo de la polaridad del disolvente.

En este sentido, el haber obtenido la mayor concentración de compuestos fenólicos con el metanol y etanol, revela que existe una variedad de compuestos fenólicos que son más solubles en este tipo de disolventes. Esto es propuesto, teniendo en cuenta que los flavonoides se caracterizan por ser compuestos polifenólicos y solubles en agua.

Según Beltrán (2010), señala que la composición de los frutos depende de algunos factores como las condiciones climáticas (lluvias, disponibilidad de nutrientes del suelo, variación de la temperatura), tratamiento del cultivo, localización geográfica, aplicación de pesticidas y almacenamiento, dichos factores podrían intervenir en la presencia o ausencia de diversos metabolitos y/o sustancias activas.

Repo y Encina (2008) afirman que la madurez influye directamente en los compuestos bioactivos, dado que surgen procesos de biosíntesis, generando mayor contenido de compuestos fenólicos. Este comportamiento se puede atribuir al proceso de maduración, pues se refieren que la presencia del etileno, conocido como una hormona de maduración, provoca cambios en la composición, por lo que en los frutos maduros se favorece un aumento en la concentración polifenólica, ya que la cantidad de polifenoles totales varía según el grado de madurez de la fruta.

Almeida (2012) menciona que el extracto colorante sólido proveniente de los granos y de las corontas analizadas en base seca que obtuvo fue de 193,8 y 277,34 mg AGE/ g de muestra.

Para el caso de vitamina C no se detectó en ningún estado de madurez, se realizó con el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es más factible que con otros métodos. Según Rosales y Arias (2015), en su investigación *untusha (berberis lobbiana)* reportó el contenido de vitamina C con 70,14; 114,50; 181,86; 169,25 mg/100 g en estado verde, pintón, maduro y sobre maduro respectivamente, el método utilizado en su investigación fue espectrofotometría de absorción molecular, utilizando colorante de diclorofenolindofenol, como se sabe el diclorofenolindofenol, reacciona cambiando su coloración frente a diversos ácidos orgánicos, quizás por ello exista diferencia con los resultados obtenidos en la

investigación, ya que el HPLC, separa el metabolito de interés y lo cuantifica de forma independiente.

5.4. De la evaluación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS en la fruta de espinaca amarilla en sus tres estados de madurez

La actividad antioxidante por DPPH y ABTS en la fruta de espinaca amarilla en sus tres estados de madurez se discutió en las dos formas; el primero, porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto metanólico, etanólico y agua, el segundo, actividad antioxidante en términos de IC₅₀ DPPH y IC₅₀ ABTS frente a extracto metanólico, etanólico y agua.

5.4.1. Del porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS por extracto metanólico, etanólico y agua en la fruta de espinaca amarilla en sus tres estados de madurez.

Para el caso de actividad antioxidante expresado en (mg TE/ g de muestra) determinado por DPPH, en estado verde, pintón y maduro con solvente agua fueron $1,30 \pm 0,31$; $0,73 \pm 0,10$ y $5,49 \pm 1,33$ mg TE/ g; con etanol se obtuvo $1,89 \pm 0,13$; $0,91 \pm 0,09$ y $6,88 \pm 1,05$ mg TE/ g; con metanol $3,36 \pm 0,52$; $1,68 \pm 0,47$ y $8,12 \pm 0,89$ mg TE/ g.

Según Llimpe (2017), indica que la actividad antioxidante en macha macha por DPPH obtuvo 177,5850; 129,0650 y 49,3709 $\mu\text{mol TE/ g}$ peso muestra en verde, pintón y maduro respectivamente. En mora y uva en estado maduro fueron 4,3 y 7,0 $\mu\text{mol TE/ g}$ peso muestra respectivamente.

Según Repo y Encina (2008), mencionan que la capacidad antioxidante de papaya de monte por método de DPPH fue 1936 228 g equivalente trolox/ g de fruto; seguido por el tomate de árbol (853 52 g equivalente trolox/ g de tejido); y la mayor capacidad antioxidante medida por el método del ABTS fue el de la papaya de monte (214 171 g equivalente trolox/ g de fruto); seguido por el aguaymanto (1066 28 g equivalente trolox/ g de fruto), concluyendo que el estado de madurez influye en forma directamente proporcional al contenido de compuestos bioactivos.

Los resultados de actividad antioxidante determinado por ABTS expresado en (mg TE/ g de muestra) en estado verde, pintón y maduro con solvente

agua fueron $1,53 \pm 0,07$; $1,39 \pm 0,36$ y $10,14 \pm 1,11$, con etanol se obtuvo $3,32 \pm 0,14$; $2,62 \pm 0,11$ y $11,03 \pm 1,61$; con metanol $3,46 \pm 0,24$; $3,32 \pm 0,14$ y $15,06 \pm 1,07$.

Zapata *et al.*, (2014), indican que la actividad antioxidante por método de DPPH y ABTS en arándano fueron 706 ± 35 y 798 ± 55 (mg EAA/100 g de fruto)

Según Osorio y Yessica (2012), la actividad antioxidante en pulpa de zarzamora (sin efecto de temperatura) por ABTS obtuvo un valor de $568,04 \pm 15,42$ en el estado fisiológicamente maduro y en estado maduro $715,97 \pm 57,03$ ($\mu\text{moleq-trolox/ mL}$ de extracto en la muestra), también indica que los metabolitos no son los únicos que aportan en la actividad antioxidante sino también depende de los microambientes como componentes habituales de los alimentos, como proteínas y agua en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios.

Según Beltrán (2010), en su investigación reportó los valores de actividad antioxidante del sauco $112,1 \text{ mg/100 g}$ y $22,5 \mu\text{m TE/ g}$, por lo que explica que la capacidad antioxidante de un alimento se debe a la actividad antioxidante de sus diferentes compuestos bioactivos, entre los cuales tenemos a los compuestos fenólicos, carotenos, antocianinas, ácido ascórbico. Por lo tanto, se puede afirmar que principalmente los polifenoles totales presentes en los frutos aportan su potencial antioxidante, existiendo a su vez un efecto sinérgico entre estos fitoquímicos que conforman el fruto.

5.4.2. Actividad antioxidante por IC₅₀ DPPH y ABTS frente a extracto acuoso, etanólico y metanólico en la fruta de espina amarilla en sus tres estados de madurez

Para el caso de actividad antioxidante por IC₅₀ DPPH, expresados en mg/mL de muestra en sus tres estados de madurez con los solventes de agua, etanol y metanol; los resultados obtenidos con agua fue $(6,54 \pm 0,87)$ verde, $(7,73 \pm 0,29)$ pintón, $(0,95 \pm 0,04)$ maduro; con etanol se obtuvo $(4,26 \pm 0,21)$ verde, $(5,67 \pm 0,56)$ pintón, $(0,74 \pm 0,01)$ maduro; con metanol $(2,76 \pm 1,00)$ verde, $(3,95 \pm 0,60)$ pintón, $(0,71 \pm 0,01)$ maduro; como se observa en la Tabla 12, que mostró diferencia significativa entre

maduro-pintón y maduro-verde y no hubo diferencia significativa en estado verde-pintón esto sucedió con los solventes (agua y metanol) en caso de etanol en los tres estados de madurez hubo en estado pintón diferencia significativa, podemos afirmar que el mejor IC₅₀ DPPH lo presentó la fruta en estado maduro extraído con los tres solventes.

En cuanto a actividad antioxidante por IC₅₀ ABTS, expresados en mg/ mL de muestra; los resultados obtenidos con agua fueron (3,07 ± 0,09) verde, (4,08 ± 0,34) pintón, (0,4 ± 0,06) maduro; con etanol se obtuvo (1,84 ± 0,41) verde, (3,19 ± 1,23) pintón, (0,33 ± 0,02) maduro; con metanol (1,70 ± 0,61) verde, (1,89 ± 0,13) pintón, (0,22 ± 0,04) maduro; como se muestra en la Tabla 12, se observa que existe diferencias significativas, según el estado de madurez de la fruta de espina amarilla.

Sotero et al., (2009) mencionan que el IC₅₀ se define como la concentración de aditivo que produce 50 % de inhibición en el daño oxidativa. También en su trabajo de investigación obtuvieron los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante por secuestro del radical DPPH y determinación del IC₅₀ en camu - camu los mejores resultados de IC₅₀ se presentan en la cáscara y pulpa de camu - camu con 146,94 µg/ mL y 167,67 µg/ mL, respectivamente.

Según Osorio y Yessica (2012) mencionan en la pulpa concentrada de camu-camu 1,75 ± 0,02 µg/ mL en estado maduro y en la cáscara de camu - camu 8,30 µg/ mL siendo el mejor la pulpa de camu – camu, en comparación con la fruta de espina amarilla por método de DPPH 0,71 mg/ mL y por ABTS 0,22 mg/ mL.

Ataurima e Inca (2014) indican que el IC₅₀ mide la efectividad de un compuesto para inhibir una actividad biológica y/o bioquímica. Ellos investigaron y midieron la concentración de los extractos vegetales necesarios para disminuir en un 50 % la concentración inicial de los radicales libres (DPPH⁺ y ABTS⁺), teniendo en cuenta que a menor valor de IC₅₀ es mayor la actividad antioxidante.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y resultados de la investigación se llegó a las siguientes conclusiones

- La caracterización física morfológica en la fruta de espina amarilla (*Berberís laurina*) en cuanto a su peso y diámetro ecuatorial va aumentando a medida que se produce el proceso de maduración, en cuanto a su longitud no varía mucho. En la caracterización físico química en sus tres estados de madurez, para el caso de pH, sólidos solubles, acidez total y humedad varían según el estado de madurez; pero en ceniza, grasa, nitrógeno total, fibra y carbohidratos no varía entre el estado verde y pintón, estos dos con respecto al estado maduro si varían.
- Los compuestos bioactivos en la fruta de espina amarilla (*Berberís laurina*) en sus tres estados de madurez en cuanto a antocianinas no se detectó en estado verde y pintón solo en estado maduro se hizo la extracción con los solventes; agua, etanol y metanol obteniendo mayor cantidad con el solvente metanol; en el caso de polifenoles totales se encontró en los tres estados de madurez también se hizo con los tres solventes (agua, etanol y metanol), así mismo también con el solvente metanol en estado maduro resulto con mayores cantidades de extracción, por lo general el estado de madurez están influenciadas en todas ellas y el ácido ascórbico (vitamina C) no se detectó en ningún estado de madurez.
- La actividad antioxidante por DPPH y ABTS, referente al porcentaje de secuestro del radical DPPH y catión ABTS con el extracto de agua, etanol y metanol en la fruta de espina amarilla (*Berberís laurina*) en sus tres estados de madurez varía de acuerdo al proceso de maduración y varía de acuerdo al solvente a extraer, por otra parte en cuanto a actividad antioxidante por IC₅₀ DPPH y ABTS frente a extractos de agua, etanol, metanol en la fruta de espina amarilla (*Berberís laurina*) en sus tres estados de madurez, también están influenciados por su estado de madurez.

VII. RECOMENDACIONES

Se plantea las siguientes recomendaciones:

- Realizar estudios de las propiedades fisicoquímicas de la fruta de espina amarilla en sus diferentes estados de madurez diferenciándolos por lugar de procedencia.
- Se recomienda hacer trabajo de investigación sobre elaboración de productos alimenticios de fruto de espina amarilla y evaluar sus características nutricionales.
- Se recomienda a los agricultores que desconocen sobre dicho producto, que pongan énfasis en cuanto al cultivo sabiendo que la fruta de espina amarilla en cuanto a antocianinas, polifenoles totales, actividad antioxidante, contienen una cantidad considerable y sabiendo que estos compuestos bioactivos son beneficiosos para la salud al ingerirlos.

VIII. LITERATURA CITADA

- Almeida Gudiño, J. F. (2012). Extracción y caracterización del colorante natural del maíz negro (*Zea mays L.*) y determinación de su actividad (Tesis de Licenciatura. Quito: 2012.).
- Arce Saavedra, T., Castañeda, L., Raúl, R., Mendiola Céspedes, A. R., y Domínguez Baldoceña, B. (2016). Cinética de degradación de la antocianina y estudio reológico de jugo concentrado de uva Isabella (*Vitis labrusca*).
- Arena, M. E., Lencinas, M. V., y Radice, S. (2018). Variability in floral traits and reproductive success among and within populations of *Berberis microphylla* G. Forst., an underutilized fruit species. *Scientia horticultrae*, 241, 65-73.
- Ataurima, A., Mercedes, I., Inca, V., y Steffani, L. (2014). Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos del fruto de *Physalis peruviana* "aguaymanto" de diferentes lugares geográficos del Perú.
- Avello, M., y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* (Concepción), (494), 161-172.
- Barahona Calle, V. C. (2013). Evaluación de la Actividad Antioxidante y Valor Nutraceútico de las Hojas y Frutos de la Guanábana (*Annona muricata*) (Bachelor's thesis). (Escuela Superior Politécnica de Chimborazo)
- Bastías, J. M., y Cepero, Y. (2016). La vitamina C como un eficaz micronutriente en la fortificación de alimentos. *Revista chilena de nutrición*, 43(1), 81-86.
- Beltrán Chávez, M. C. (2010). Evaluación de la actividad antioxidante en tres estadios de madurez del sauco (*sambucus peruviana l.*) De nor Yauyos-Lima.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bravo, J., Cueto, C., Valle, A., Salvador, I., Godoy N. y Villanueva, J. (2016). Evaluación de Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante en hojas de Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*).

- Carrere, R. (2011). La espinilla amarilla (*Berberis laurina*): un arbusto típico uruguayo. Consultado en línea 2019. http://www.guayubira.org.uy/monte/Espina_Amarilla.pdf.
- Cerón, I., Higuera, J., y Cardona, C. (2010). Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*, 5(2011).
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., y Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212.
- Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. *Offarm*, 23(6).
- Del Carpio, C. (2009). Caracterización De Las Antocianinas De Los Frutos De *Berberis Boliviana Lechler*. Food Science y Technology Department, The Ohio State University, 110, 43210-1007. *Rev. Soc. Quím. Perú*. 75 (1).
- Díaz Delgado, M. D. G. (2010). Cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (*Psidium Guajava L.*) fresca y tratada térmicamente.
- Elejalde Guerra, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. In *Anales de medicina interna* (Vol. 18, No. 6, pp. 50-59), June. Arán Ediciones, SL.
- Fellegrini, N., Ke, R., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). [34] Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2, 2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 379-389). Academic Press.
- Figuerola, R., Tamayo, J., González, S., Moreno, G., y Vargas, L. (2011). Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cáscara de pitahaya (*Hylocereus undatus*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12(1), 44-50.
- Flores, G. (1994). Manejo postcosecha de frutas y hortalizas en Venezuela (No. C022. 042). Unellez.
- García Bacallao, L., Vicente García Gómez, L., Rojo Domínguez, D. M., y Sánchez García, E. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 20(3), 231-235.
- García Vargas, M. (2008). Cuantificación de la actividad antioxidante en dos estadios de madurez de la carambola (*Averrhoa carambola L.*).

- García, C. A. M. (2014). Identificación de flavonoides con actividad antioxidante presentes en *Alchornea coelophylla* (Euphorbiaceae) (Doctoral dissertation, Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Química Industrial).
- Heras, I., Alvis, A., y Arrazola, G. (2013). Optimización del proceso de extracción de antocianinas y evaluación de la capacidad antioxidante de berenjena (*Solana melonera* L.). *Información tecnológica*, 24(5), 93-102.
- Ipanaqué Zapata, A. D. (2017). Parámetros físicos-químicos para la obtención de extractos de maíz morado y propuesta de diseño de planta.
- Keller, H. A. (2010). La presencia en Argentina de *Berberis laurina* Billb. (Berberidaceae), una especie de uso múltiple. *Kurtziana*, 35(1), 9-13.
- Leyva, D. (2009). Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca. Tesis.
- Llimpe, P. (2017). Estudio del contenido de antocianinas y capacidad antioxidante del fruto de macha macha (*Vaccinium floribundum* kunth) durante la maduración.
- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.
- Mamani, V. (2017). Evaluación de maduración y características sensoriales en post cosecha de tuna variedad amarilla (*Opuntia ficus indica*) en condiciones de almacenamiento en el Centro Poblado de San Cristóbal, Región Moquegua.
- Margraf, T., Karnopp, A. R., Rosso, N. D., & Granato, D. (2015). Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. *Journal of food science*, 80(11), C2397-C2403.
- Martínez, A. C. (2015). Determinación de Polifenoles Totales, Actividad Antioxidante y Antocianinas de Jugo de Murtilla (*Ugni molinae* Turcz) Obtenido por Condensación de Vapor (Doctoral dissertation, Universidad Austral de Chile).
- Muñoz, W., Chavez, W., Pabón, L. C., Rendón, M. R., Patricia-Chaparro, M., y Otálvaro-Álvarez, Á. M. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con

- actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*).
Revista CENIC. Ciencias Químicas, 46, 38-46.
- Osorio, A., y Yessica, A. (2012). Evaluación de actividad antioxidante y vitamina C en pulpa concentrada en dos estadios (fisiológicamente maduro y maduro) del fruto zarzamora (*Rubus* sp.).
- Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J. C., y Câmara, J. S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105(1), 204-214.
- Pertuzatti, PB, Sganzerla, M., Jacques, AC, Barcia, MT y Zambiasi, RC (2015). Contenido de carotenoides, tocoferoles y ácido ascórbico en maracuyá amarillo (*Passiflora edulis*) cultivado bajo diferentes sistemas de cultivo. *LWT-Food Science and Technology*, 64 (1), 259-263.
- Quiñonez Quispe, S. (2017). Caracterización y determinación del contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del fruto de Sanke (*corryocactus brevistylus*). Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial.
- Rafael Sánchez, E. (2017). Extracción y cuantificación de antocianinas de maíz morado (*Zea mays* L.) utilizando dos solventes a diferentes temperaturas y tiempos de extracción.
- Rapisarda, P., Fanella, F., & Maccarone, E. (2000). Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2249-2252.
- Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins.
- Repo de Carrasco, R., y Encina Zelada, C. R. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74(2), 108-124.
- Rivera Trucios, F. (2016). Las Cadenas Productivas del ayrampo y el Desarrollo Sostenible de las Poblaciones alto Andinas del Distrito de Huancavelica – Periodo 2013. Tesis para optar grado de doctor en medio ambiente y desarrollo sostenible.
- Rojas, N. (2014). Ensayo biodirigido del extracto etanólico del fruto *Cocos nucifera* con actividad antioxidante (Doctoral dissertation).

- Rosales Laguna, D. D., y Arias Arroyo, G. (2015). Vitamina C y parámetros fisicoquímicos durante la maduración de *Berberis lobbiana* "Untusha". *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(1), 63-75.
- Sanabria, C., y Consuelo, M. (2012). Evaluación de vitamina C, polifenoles totales y capacidad antioxidante en dos estados de madurez del camu camu (*myrciaria dubia* HBK Mc Vaugh) de Mazamari-Satipo.
- Sotacuro De La Cruz, R. (2013). Caracterización fisicoquímico y concentración de antocianinas en el fruto de lacca lacca (*gaultheria glomerata* (cav.) sleumer).
- Sotero Solis, V., Silva Doza, L., García de Sotero, D., e Imán Correa, S. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa, cáscara y semilla del fruto del camu camu (*Myrciaria dubia* HBK). *Revista de la sociedad química del Perú*, 75(3), 293-299.
- Sotero, V., Maco, M., Vela, J., Merino, C., Dávila, É., y García, D. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia Sterculiaceae. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(1), 66-74.
- Tapia Quispe, T. D. (2018). Evaluación del perfil de color, características fisicoquímicas y capacidad antioxidante de tres estados de madurez comercial del aguaymanto (*Physalis peruviana* L.).
- Toledo Zumaeta, J. (2015). Estudio del arte de los colorantes naturales.
- Wills, R. H., Lee, T. H., Mc Glasson, W. B., Hall, E. G., y Graham, D. (1984). *Fisiología y manipulación de fruta y hortalizas*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza- España.
- Yufera, E. (1997). *Química de los alimentos*. Edit. Síntesis S.A. Madrid-España
- Zamora, J. D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*, 34(1), 17-26.
- Zapata Acha, S. (2001). Posibilidades y potencialidad de la agroindustria en el Perú en base a la biodiversidad y los bionegocios.
- Zapata, L., Heredia, A. M., Quinteros, C. F., Malleret, A. D., Clemente Polo, G., y Carcel Carrión, J. A. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, docencia y tecnología*, 25(49), 166-192.

Anexos

Registro de datos de la morfología de espina amarilla

N°	Peso			Diámetro Ecuatorial y Longitud (mm)					
	Verde	Pintón	Maduro	Verde		Pintón		Maduro	
				D	L	D	L	D	L
1	0.33	0.38	0.73	7.6	8.9	8	8.2	10	9.5
2	0.41	0.5	0.59	7.9	8.8	8.7	9.1	9.8	8.6
3	0.38	0.5	0.77	7.5	7.2	8.9	9	9.8	8.9
4	0.39	0.42	0.6	8.2	8.4	8.3	8.1	10.1	9.1
5	0.44	0.44	0.53	7.4	8.4	8	7.9	9.5	8
6	0.37	0.21	0.63	7.8	8.1	6.2	6.8	9.2	9.5
7	0.4	0.47	0.78	7.3	8.1	8.5	8.7	10.3	9.6
8	0.34	0.61	0.63	7.5	7.4	9.1	9.5	10	9.5
9	0.34	0.47	0.53	7.7	8.7	9	9.1	9	8.7
10	0.44	0.61	0.67	7.9	9	8.2	8.9	10.4	9.4
11	0.39	0.47	0.69	7.4	8.6	7.6	8.6	10	9.5
12	0.38	0.46	0.68	7.7	8.2	8.8	8.3	10.3	10.2
13	0.4	0.42	0.64	7.6	8.7	8.3	8.1	9	9.7
14	0.5	0.46	0.49	7.7	8.5	8.4	8.7	8.9	9.5
15	0.38	0.39	0.52	6.3	7.3	9.2	8.7	8.2	8.8
16	0.24	0.43	0.49	7.2	7.8	8.3	9.1	8.3	8.9
17	0.38	0.6	0.52	7.3	8.1	8.1	8.2	8.9	8.5
18	0.35	0.46	0.49	6.6	6.9	7.3	8.3	8.7	8.3
19	0.29	0.39	0.53	6.8	7.3	8.3	7.7	10	9.3
20	0.28	0.43	0.53	7.7	8.4	7.9	8.3	10.3	9.1
21	0.35	0.6	0.72	9.3	9.1	9.1	8.7	8.1	9.2
22	0.52	0.46	0.61	8.1	8.7	8.9	9.1	9.9	8.3
23	0.44	0.4	0.5	6.7	7.8	8.8	9.2	9.7	9
24	0.46	0.38	0.67	8.4	8.3	9	8.9	9.4	10
25	0.3	0.36	0.65	7.7	8	9.6	9.1	9.7	8.8
26	0.35	0.36	0.64	7.7	7.9	8.8	8.6	7.5	8
27	0.33	0.51	0.62	7.1	8	7.9	8.5	8.5	8.8
28	0.31	0.5	0.52	7.4	7.1	7.3	8.1	8.1	7.5
29	0.3	0.45	0.52	7.9	8	8.7	8.8	9.7	9.2
30	0.38	0.59	0.47	6.9	7.6	7	8.5	9.6	9.3
31	0.33	0.53	0.56	7.7	7.8	7.9	8.4	9.3	8.1
32	0.35	0.48	0.67	7.8	9.5	7.9	7.4	8.8	8.6
33	0.42	0.52	0.52	9.1	9.6	7.6	8	9.1	9.8
34	0.54	0.41	0.55	7.4	8.2	9.1	8.7	9.1	8.4
35	0.32	0.48	0.56	7.4	7.9	7.6	8.5	8.1	8.6
36	0.28	0.43	0.58	7	8.3	7.5	8.3	9.8	9.2
37	0.32	0.46	0.46	7.5	8.1	8.8	9.3	10.1	8.7
38	0.34	0.37	0.65	7.8	8.3	8.5	9.2	9.7	9.2
39	0.31	0.33	0.61	6.6	7.4	8.4	8.7	8.9	7.6

40	0.21	0.49	0.71	6.6	6.9	8.4	8.2	9.4	9.2
41	0.24	0.38	0.56	7.1	7.4	9.7	8.7	8.2	9.6
42	0.29	0.36	0.57	7.1	8.3	8.6	8.9	9.1	8.4
43	0.28	0.57	0.54	7.3	7.8	8	8.3	9.3	9.5
44	0.31	0.49	0.58	7.7	8.2	8.4	7.9	9.7	8.3
45	0.36	0.42	0.59	7	9	7.7	8.3	9.4	9.8
46	0.37	0.39	0.55	8.2	7.5	8.7	8.2	8.9	9.1
47	0.34	0.44	0.53	6.9	8	8.7	8.8	10	9.4
48	0.3	0.4	0.55	7.8	8.2	8.6	8.9	10.1	8.5
49	0.32	0.35	0.56	6.9	7.5	7.4	7.7	9.7	8.2
50	0.29	0.43	0.51	7.3	7.9	7.8	8.8	8.8	8.1
51	0.33	0.4	0.54	7.1	8.1	8.2	8.9	7.7	8
52	0.3	0.5	0.46	5.5	6.4	7.9	8.1	8.5	8.9
53	0.2	0.37	0.45	6	7.6	8.4	7.7	9	9
54	0.19	0.44	0.47	7.3	8.6	7.6	8	8.2	6.7
55	0.35	0.45	0.55	7.3	7.8	7.3	7.6	9.2	7.9
56	0.33	0.46	0.54	7.2	7	8.1	7.1	8.7	8.3
57	0.33	0.45	0.61	7.4	8	7.3	8.6	8.4	9.1
58	0.32	0.38	0.54	7.2	8.4	7.5	7.8	9.3	8.4
59	0.31	0.31	0.63	7.4	7.7	7.9	8	8.2	8.3
60	0.3	0.35	0.54	7.1	7.6	7.6	7.4	9.2	8.7
61	0.28	0.36	0.46	6.8	7.8	7.1	7.3	8.6	8.9
62	0.3	0.34	0.64	6.6	7.5	7.6	7.3	8.8	9.3
63	0.25	0.36	0.46	6.7	7.2	7.6	7.3	9.2	7.8
64	0.25	0.36	0.64	7.1	7.3	8.8	7.7	9.3	8.5
65	0.25	0.29	0.58	8	8.4	7	8.1	9.3	8.6
66	0.35	0.32	0.61	6.9	7.8	7.8	8.1	9.2	9
67	0.28	0.43	0.53	5.8	6	8.7	7.8	8.8	7.9
68	0.23	0.35	0.53	6.8	7.6	7.6	8	9	8.4
69	0.27	0.42	0.55	7.5	7.6	8.3	8.7	9.8	8.7
70	0.32	0.43	0.63	7.4	7	8.2	8.7	9	7.9
71	0.26	0.39	0.45	7.2	7.6	6.4	8.4	8.4	8.6
72	0.31	0.46	0.53	6.1	7.1	7.3	6.8	9.5	7.6
73	0.24	0.46	0.49	6.8	7.7	6.8	8.2	8.1	8.6
74	0.28	0.34	0.51	7.1	7.6	7.3	7.7	8.9	8.7
75	0.3	0.34	0.6	6.9	7.8	8.3	9.9	8.4	8.8
76	0.31	0.3	0.55	7.2	7.6	6.7	8.3	9.3	8.1
77	0.29	0.29	0.59	6.7	7.4	6.6	7.8	8.3	8.4
78	0.23	0.36	0.5	7.4	8.1	7.7	8.3	9.1	9.4
79	0.33	0.46	0.58	6.6	7.3	7.4	8.3	9.3	7.7
80	0.23	0.29	0.5	6.7	7.7	8	8.1	8.8	9.3
81	0.25	0.36	0.55	7.4	7.2	8.1	7.3	9	9
82	0.26	0.46	0.57	6.7	7.5	8	7.8	8.8	9.3
83	0.27	0.29	0.56	7.2	7.8	7.8	8.2	9.4	8.3
84	0.28	0.35	0.54	7	8.2	8	8.4	8	7.7

85	0.24	0.39	0.43	6.8	6.7	7.5	7.6	7.9	8
86	0.26	0.42	0.46	6.7	7.2	8.4	8.2	7.9	7.6
87	0.28	0.37	0.41	7.5	6.7	8.1	8	7.8	8.4
88	0.24	0.35	0.42	6.7	7.1	9	8.1	9.1	8.3
89	0.26	0.41	0.52	6.2	6.7	7.3	7.7	9	8.3
90	0.28	0.38	0.5	6.8	7	8	8.5	7.5	8
91	0.29	0.36	0.38	7.6	6.9	7.8	9.2	8.9	9.2
92	0.26	0.34	0.54	6.6	8.6	7.8	7.5	7.4	8
93	0.21	0.38	0.39	7.2	6.6	7.1	7.8	9.2	8.8
94	0.25	0.39	0.55	7.3	7.1	8.4	9	8	8.7
95	0.29	0.3	0.44	6.8	7.6	8.1	8.4	8.5	9
96	0.28	0.38	0.44	7.1	7.8	8.7	8.4	8.4	8.8
97	0.21	0.37	0.52	7.4	7.2	8.1	7.6	9.7	8.2
98	0.26	0.37	0.58	7	7.7	7.9	8.1	8.1	7.7
99	0.27	0.26	0.47	6.6	7.2	7.6	7.7	7.8	7.7
100	0.32	0.44	0.48	6.2	7.4	8	9	8.9	8.7

Anexo 1a. Análisis físico morfológico

Tabla ANOVA para peso por estado de madurez

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.88883	2	1.44441	255.15	0.0000
Intra grupos	1.68131	297	0.00566096		
Total (Corr.)	4.57013	299			

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Estado Madurez	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
V	100	0.3147	X	M – P	*	0.1409	0.0251497
P	100	0.4129	X	M – V	*	0.2391	0.0251497
M	100	0.5538	X	P – V	*	0.0982	0.0251497

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para diámetro ecuatorial por estado madurez

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	162.502	2	81.251	182.20	0.0000
Intra grupos	132.447	297	0.44595		
Total (Corr.)	294.949	299			

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Estado de Madurez	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
V	100	7.211	X	M – P	*	0.97	0.223218
P	100	8.042	X	M – V	*	1.801	0.223218
M	100	9.012	X	P – V	*	0.831	0.223218

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para longitud por estado madurez

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	40.3142	2	20.1571	49.98	0.0000
Intra grupos	119.775	297	0.403285		
Total (Corr.)	160.09	299			

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Estado Madurez	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
V	100	7.786	X	M – P	*	0.397	0.212272
P	100	8.285	X	M – V	*	0.896	0.212272
M	100	8.682	X	P – V	*	0.499	0.212272

* indica una diferencia significativa.

Anexo 1b. Análisis estadístico para pH

Datos registrados

Tratamientos	pH	°Brix	Acidez total	Índice de madurez
VERDE	3.14	6.9	1.15	5.99
	3.20	6.2	1.16	5.35
	3.19	5.1	1.14	4.49
PINTON	3.23	8.6	1.06	8.14
	3.32	9.1	1.07	8.49
	3.25	9.6	1.04	9.23
MADURO	3.58	12.8	0.96	13.33
	3.48	11.2	0.98	11.48
	3.60	15.8	0.94	16.74

ANOVA para pH por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.232156	2	0.116078	47.06	0.0002
Intra grupos	0.0148	6	0.00246667		
Total (Corr.)	0.246956	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para pH

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
V	3	3.17667	X	M – P	*	0.286667
P	3	3.26667	X	M – V	*	0.376667
M	3	3.55333	X	P – V		0.09

* indica una diferencia significativa.

Anexo 1c. Análisis estadístico para sólidos solubles

Tabla ANOVA para °Brix por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	78.4022	2	39.2011	18.02	0.0029
Intra grupos	13.0533	6	2.17556		
Total (Corr.)	91.4556	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para °Brix

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
V	3	6.067	X	M – P	*	4.16667	3.69519
P	3	9.1	X	M – V	*	7.2	3.69519
M	3	13.27	X	P – V		3.03333	3.69519

* indica una diferencia significativa.

Anexo 1d. Análisis estadístico para acidez titulable

Tabla ANOVA para acidez titulable por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0541556	2	0.0270778	110.77	0.0000
Intra grupos	0.00146667	6	0.000244444		
Total (Corr.)	0.0556222	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para acidez titulable

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
M	3	0.96	X	M – P	*	-0.0966667	0.0391689
P	3	1.05667	X	M – V	*	-0.19	0.0391689
V	3	1.15	X	P – V	*	-0.0933333	0.0391689

* indica una diferencia significativa.

Anexo 1e. Análisis estadístico para Índice de Madurez

Tabla ANOVA para índice de madurez por estado madurez

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	112.033	2	56.0164	21.02	0.0019
Intra grupos	15.9919	6	2.66531		
Total (Corr.)	128.025	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para índice de madurez

Estado Madurez	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Verde	3	5.27667	X	M – P	*	5.23	4.09002
Pitón	3	8.62	X	M – V	*	8.57333	4.09002
Maduro	3	13.85	X	P – V		3.34333	4.09002

* indica una diferencia significativa.

Datos registrados de análisis proximales en porcentaje

Tratamientos	Humedad	Ceniza	Grasa	Nitrógeno total	Fibra cruda	Carbohidratos
VERDE	81.33	0.51	1.59	14.81	0.68	1.77
	81.61	0.63	1.30	11.33	0.62	5.13
	80.00	0.59	1.43	13.26	0.71	4.71
PINTON	78.94	2.02	1.17	15.86	0.64	2.01
	77.09	1.41	1.35	14.02	0.51	6.13
	77.03	1.86	1.10	11.40	0.60	8.61
MADURO	73.55	0.87	0.39	17.97	0.56	7.23
	73.38	3.02	0.69	15.60	0.45	7.31
	74.95	4.18	0.82	12.70	0.48	7.36

Anexo 2a. Análisis estadístico para Humedad

Tabla ANOVA para humedad por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	74.0145	2	37.0072	41.72	0.0003
Intra grupos	5.32247	6	0.887078		
Total (Corr.)	79.337	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para humedad

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
M	3	73.96	X	M – P	*	-3.72667	2.35957
P	3	77.6867	X	M – V	*	-7.02	2.35957
V	3	80.98	X	P – V	*	-3.29333	2.35957

* indica una diferencia significativa.

Anexo 2b. Análisis estadístico para ceniza

Tabla ANOVA para ceniza por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.73492	2	3.36746	3.45	0.1008
Intra grupos	5.8629	6	0.97715		
Total (Corr.)	12.5978	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para ceniza

Muestra	Caso	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
V	3	0.57566	X	M – P		0.927333	2.47647
P	3	1.762	X	M – V		2.11367	2.47647
M	3	2.68933	X	P – V		1.18633	2.47647

* indica una diferencia significativa.

Anexo 2c. Análisis estadístico para grasa**Tabla ANOVA para grasa por muestra**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.03387	2	0.516933	17.96	0.0029
Intra grupos	0.172733	6	0.0287889		
Total (Corr.)	1.2066	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para grasa

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
M	3	0.63333	X	M – P	*	-0.573333	0.425074
P	3	1.20667	X	M – V	*	-0.806667	0.425074
V	3	1.44	X	P – V		-0.233333	0.425074

* indica una diferencia significativa.

Anexo 2d. Análisis estadístico para nitrógeno total**Tabla ANOVA para nitrógeno total por muestra**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.40349	2	4.20174	0.84	0.4773
Intra grupos	30.0597	6	5.00996		
Total (Corr.)	38.4632	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para nitrógeno total

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
V	3	13.133	X	M – P		1.66333	5.60749
P	3	13.76	X	M – V		2.29	5.60749
M	3	15.4233	X	P – V		0.626667	5.60749

* indica una diferencia significativa.

Anexo 2e. Análisis estadístico para fibra**Tabla ANOVA para fibra por muestra**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0450667	2	0.0225333	6.92	0.0276
Intra grupos	0.0195333	6	0.00325556		
Total (Corr.)	0.0646	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para fibra

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
M	3	0.496667	X	M – P		-0.086667	0.142943
P	3	0.583333	XX	M – V	*	-0.173333	0.142943
V	3	0.67	X	P – V		-0.086667	0.142943

* indica una diferencia significativa.

Anexo 2f. Análisis estadístico para carbohidratos

Tabla ANOVA para carbohidrato por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	19.4041	2	9.70203	1.97	0.2197
Intra grupos	29.5179	6	4.91966		
Total (Corr.)	48.922	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para carbohidratos

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
V	3	3.2	X	M – P		1.79333	5.55673
P	3	5.00333	X	M – V		3.59667	5.55673
M	3	6.79667	X	P – V		1.80333	5.55673

* indica una diferencia significativa.

Registro de datos de compuestos bioactivos

Tratamientos	Antocianina mg cianidina-3- glucosido/100g de muestra			Polifenoles µg AGE/g de muestra			Vitamina C
	Agua	Etanol	Metanol	Agua	Etanol	Metanol	
VERDE	ND	ND	ND	69.88	99.55	196.54	ND
	ND	ND	ND	68.57	107.46	197.85	ND
	ND	ND	ND	70.54	112.74	220.20	ND
PINTON	ND	ND	ND	101.86	162.71	245.47	ND
	ND	ND	ND	103.83	171.93	239.55	ND
	ND	ND	ND	107.78	181.82	259.95	ND
MADURO	11.48	20.72	20.72	385.06	571.87	909.35	ND
	12.96	23.54	23.56	414.68	548.80	990.08	ND
	12.16	19.19	30.51	498.61	624.61	797.33	ND

Anexo 3 a. Análisis estadístico para antocianina estado maduro

Tabla ANOVA para antocianina por solvente

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	256.444	2	128.222	12.49	0.0073
Intra grupos	61.5736	6	10.2623		
Total (Corr.)	318.017	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para antocianina estado maduro

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Agua	3	12.2	X	Agua etanol	- *	-8.95	8.0253
Etanol	3	21.15	X	Agua-metanol	*	-12.73	8.0253
Metanol	3	24.93	X	Etanol-etanol		-3.78	8.0253

* indica una diferencia significativa.

Anexo 3b. Análisis estadístico para polifenoles

Tabla ANOVA para polifenoles por estado de madurez (Agua)

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	240847.	2	120423.	103.85	0.0000
Intra grupos	6957.77	6	1159.63		
Total (Corr.)	247805.	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para polifenoles

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Verde	3	69.664	X	Maduro pintón	- *	328.294	85.3122
Pintón	3	104.491	X	Maduro verde	- *	363.121	85.3122
Maduro	3	432.785	X	Pintón verde	-	34.8273	85.3122

* indica una diferencia significativa.

Anexo 3c. Análisis estadístico para polifenoles (Etanol)

Tabla ANOVA para polifenoles por estado de madurez

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	397865.	2	198932.	362.69	0.0000
Intra grupos	3290.91	6	548.484		
Total (Corr.)	401156.	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para polifenoles

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Verde	3	106.58	X	Maduro-pintón	*	409.603	58.672
Pintón	3	172.15	X	Maduro verde	- *	475.174	58.672
Maduro	3	581.76	X	Pintón verde	- *	65.5707	58.672

* indica una diferencia significativa.

Anexo 3d. Análisis estadístico para polifenoles

Tabla ANOVA para polifenoles por estado de madurez (Metanol)

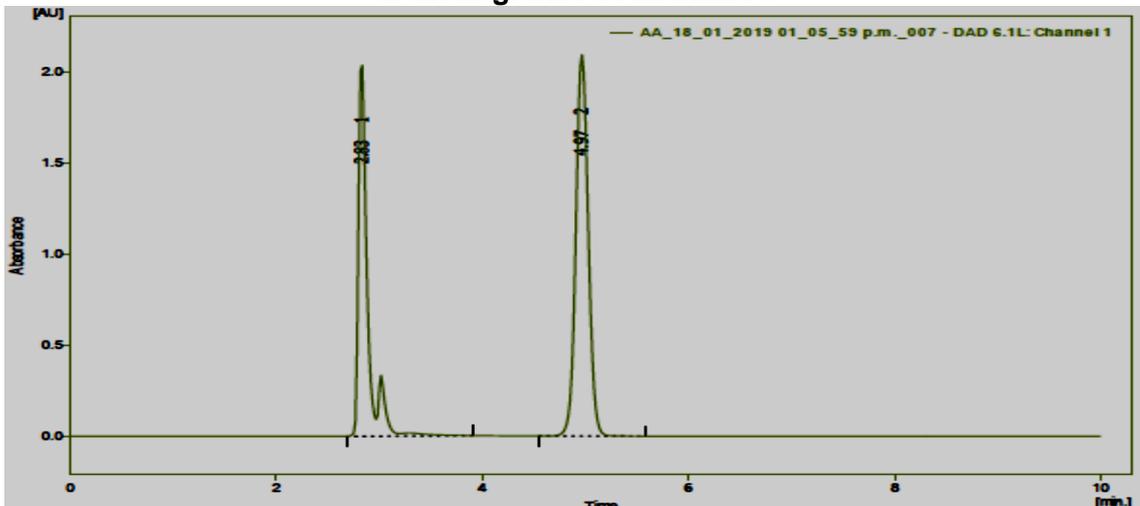
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	906885.	2	453442.	140.88	0.0000
Intra grupos	19312.2	6	3218.71		
Total (Corr.)	926197.	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para polifenoles

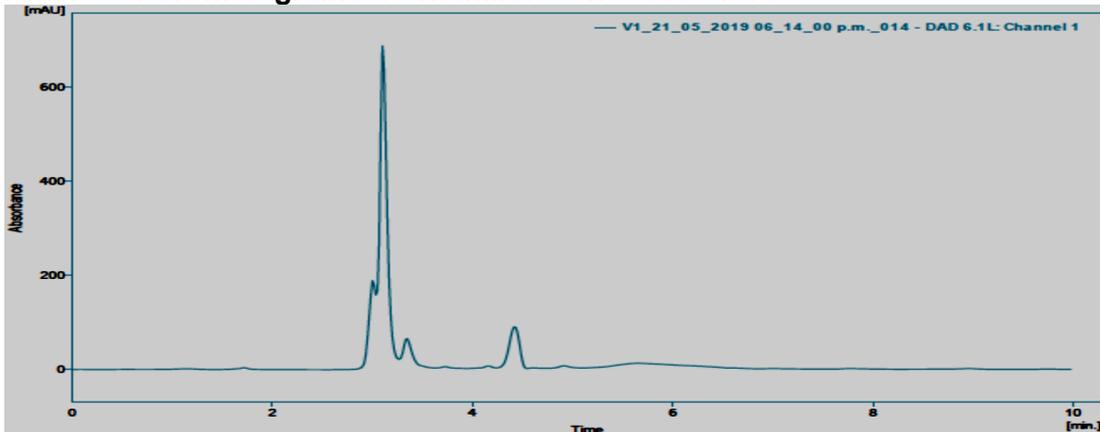
Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Verde	3	204.862	X	Maduro-pintón	*	650.599	142.132
Pintón	3	248.322	X	Maduro-verde	*	694.059	142.132
Maduro	3	898.92	X	Pintón-verde	-	43.46	142.132

* indica una diferencia significativa.

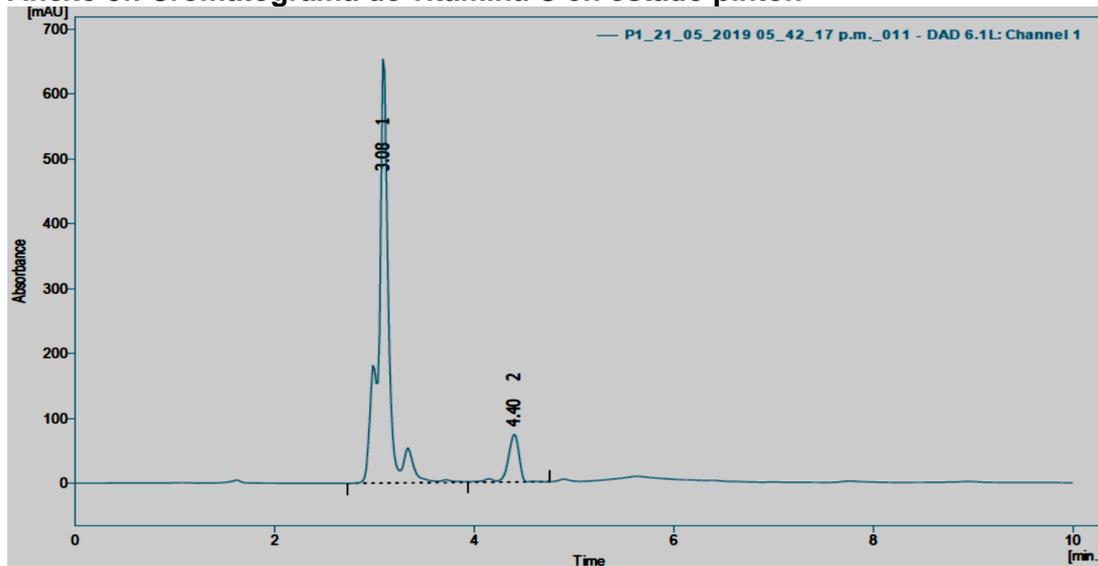
Cromatograma de vitamina C



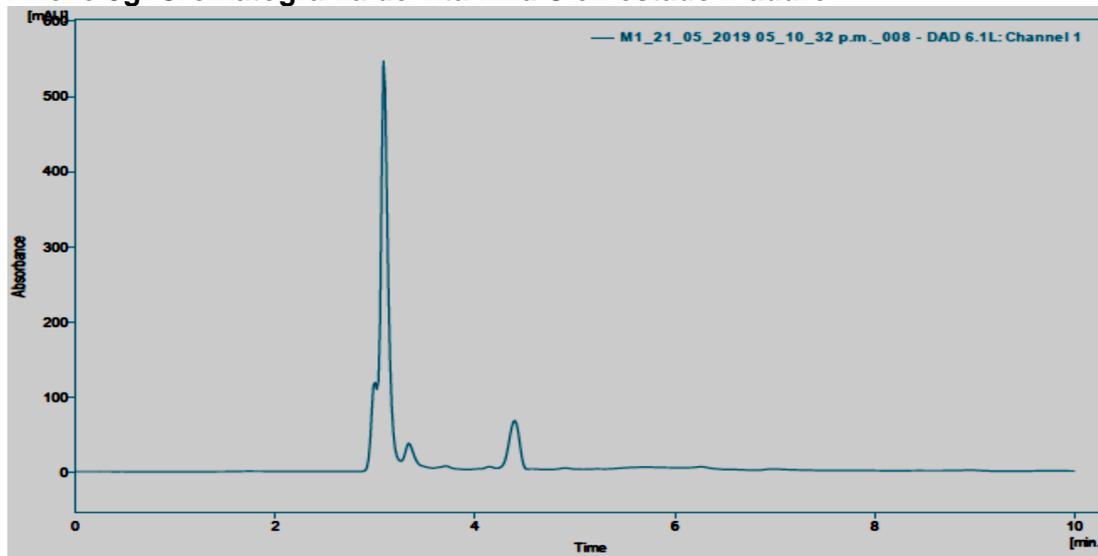
Anexo 3e. Cromatograma de vitamina C en estado verde



Anexo 3f. Cromatograma de vitamina C en estado pintón



Anexo 3g. Cromatograma de vitamina C en estado maduro



Datos registrados Actividad antioxidante por método de DPPH y ABTS

Tratamientos	Actividad antioxidante por DPPH (mg TE/g de muestra)			Actividad antioxidante por ABTS (mg TE/g de muestra)		
	Agua	Etanol	Metanol	Agua	Etanol	Metanol
VERDE	1.47	1.94	3.40	1.59	3.19	3.31
	1.49	1.75	3.86	1.55	3.46	3.72
	0.94	2.00	2.83	1.45	3.31	3.04
PINTON	0.82	0.98	1.32	1.60	2.58	2.66
	0.62	0.95	2.21	0.97	2.54	2.60
	0.75	0.80	1.51	1.60	2.75	2.65
MADURO	3.97	7.99	8.87	8.97	9.17	16.09
	6.01	5.91	8.35	11.17	12.01	13.96
	6.48	6.75	7.14	10.27	11.90	15.13

Anexo 4a. Análisis estadístico para actividad antioxidante por DPPH

Tabla ANOVA para Act. Antiox. DPPH por estado de madurez (Agua)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	40.479	2	20.2395	32.16	0.0006
Intra grupos	3.77607	6	0.629344		
Total (Corr.)	44.255	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para Act. Antiox.

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Pinton	3	0.73	X	maduro – pinton	*	4.75667	1.58496
Verde	3	1.3	X	maduro – verde	*	4.18667	1.58496
Maduro	3	5.4867	X	pinton – verde		-0.57	1.58496

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Act. Antiox. DPPH por estado de madurez (Etanol)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	61.5211	2	30.7605	82.30	0.0000
Intra grupos	2.24253	6	0.373756		
Total (Corr.)	63.7636	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para Act. Antiox.

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Pintón	3	0.91	X	Maduro– pintón	*	5.97333	1.22143
Verde	3	1.8967	X	Maduro– verde	*	4.98667	1.22143
Maduro	3	6.8833	X	Pintón – verde		-0.98667	1.22143

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Act. Antiox. DPPH por estado de madurez (Metanol)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	66.9331	2	33.4665	78.82	0.0000
Intra grupos	2.54767	6	0.424611		
Total (Corr.)	69.4808	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para Act. Antiox.

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Pintón	3	1.68	X	maduro – pinton	*	6.44	1.30188
Verde	3	3.3633	X	maduro – verde	*	4.75667	1.30188
Maduro	3	8.12	X	pinton – verde	*	-1.68333	1.30188

* indica una diferencia significativa.

Anexo 4b. Análisis estadístico para actividad antioxidante por ABTS

Tabla ANOVA para Act. Antiox. ABTS por estado de madurez (Agua)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	150.598	2	75.2992	166.00	0.0000
Intra grupos	2.72167	6	0.453611		
Total (Corr.)	153.32	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para Act. Antiox.

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Pinton	3	1.39	X	maduro – pinton	*	8.74667	1.3456
Verde	3	1.53	X	maduro – verde	*	8.60667	1.3456
Maduro	3	10.1367	X	pinton – verde		-0.14	1.3456

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Act. Antiox. ABTS por estado de madurez (Etanol)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	130.494	2	65.247	74.73	0.0001
Intra grupos	5.23833	6	0.873056		
Total (Corr.)	135.732	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para Act. Antiox.

Nivel	Caso	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Pintón	3	2.6233	X	maduro – pintón	*	8.40333	1.86679
Verde	3	3.32	X	maduro – verde	*	7.70667	1.86679
Maduro	3	11.037	X	pintón – verde		-0.696667	1.86679

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Act. Antiox. ABTS por estado de madurez (Metanol)

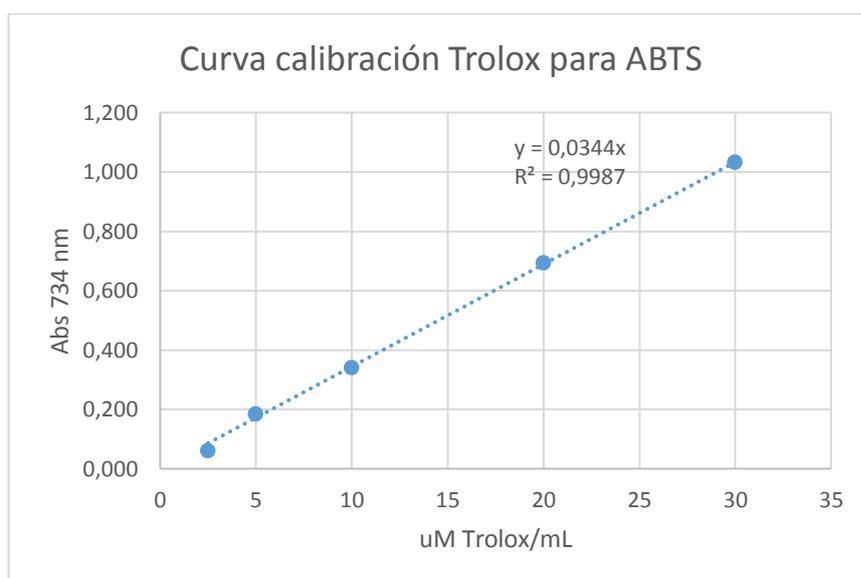
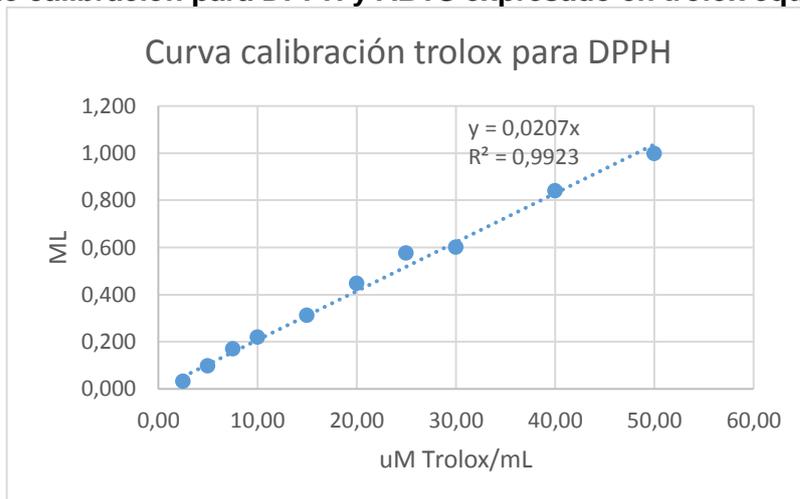
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	292.634	2	146.317	379.31	0.0000
Intra grupos	2.31447	6	0.385744		
Total (Corr.)	294.948	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para Act. Antiox.

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Pinton	3	2.63667	X	maduro – pinton	*	12.4233	1.24086
Verde	3	3.32	X	maduro – verde	*	11.74	1.24086
Maduro	3	15.06	X	pinton – verde		-0.683333	1.24086

* indica una diferencia significativa.

Curva de calibración para DPPH y ABTS expresado en trolox equivalente.



Datos registrados de actividad antioxidante por IC₅₀ DPPH y ABTS

Tratamientos	Actividad antioxidante por IC ₅₀ DPPH (mg/mL de muestra)			Actividad antioxidante por IC ₅₀ ABTS (mg/mL de muestra)		
	Agua	Etanol	Metanol	Agua	Etanol	Metanol
VERDE	5.81	4.45	3.70	3.18	1.39	1.61
	7.51	4.03	1.71	3.01	1.95	1.15
	6.31	4.30	2.88	3.03	2.19	2.35
PINTON	7.94	5.60	4.60	3.75	2.61	1.98
	7.86	5.15	3.43	4.05	2.37	1.96
	7.39	6.27	3.82	4.43	4.61	1.74
MADURO	0.95	0.76	0.70	0.45	0.34	0.25
	0.99	0.74	0.72	0.33	0.31	0.17
	0.91	0.74	0.71	0.42	0.35	0.24

Anexo 4c. Análisis estadístico para actividad antioxidante por IC₅₀ DPPH

Tabla ANOVA para IC₅₀ por solventes (Verde)

Fuente	Suma Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	21.742	2	10.871	18.03	0.0029
Intra grupos	3.61773	6	0.602956		
Total (Corr.)	25.3598	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para IC₅₀ DPPH

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MeOH	3	2.7633	X	EtOH - H2O	*	-2.28333	1.94534
EtOH	3	4.26	X	EtOH - MeOH		1.49667	1.94534
H2O	3	6.5433	X	H2O - MeOH	*	3.78	1.94534

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para IC₅₀ por solventes (Pintón)

Fuente	Suma Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	21.4882	2	10.7441	42.36	0.0003
Intra grupos	1.52167	6	0.253611		
Total (Corr.)	23.0098	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para IC₅₀ DPPH

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MeOH	3	3.95	X	EtOH - H2O	*	-2.05667	1.26164
EtOH	3	5.6733	X	EtOH - MeOH	*	1.72333	1.26164
H2O	3	7.73	X	H2O - MeOH	*	3.78	1.26164

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para IC₅₀ por solventes (Maduro)

Fuente	Suma Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.100289	2	0.0501444	82.05	0.0000
Intra grupos	0.00366667	6	0.000611111		
Total (Corr.)	0.103956	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para IC₅₀ DPPH

Solventes	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MeOH	3	0.71	X	EtOH - H2O	*	0.203333	0.0619315
H2O	3	0.746	X	EtOH - MeOH	*	0.24	0.0619315
EtOH	3	0.95	X	H2O - MeOH		0.0366667	0.0619315

* indica una diferencia significativa.

Anexo 4b. Análisis estadístico para actividad antioxidante por IC₅₀ ABTS

Tabla ANOVA para IC₅₀ por solventes (Verde)

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.4094	2	1.7047	9.41	0.0141
Intra grupos	1.0874	6	0.181233		
Total (Corr.)	4.4968	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para IC₅₀ ABTS

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
EtOH	3	1.70333	X	EtOH - H ₂ O	*	-1.37	1.06652
MeOH	3	1.84333	X	EtOH - MeOH		-0.14	1.06652
H ₂ O	3	3.07333	X	H ₂ O - MeOH	*	1.23	1.06652

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para IC₅₀ por solventes (Pintón)

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7.24002	2	3.62001	6.60	0.0306
Intra grupos	3.2928	6	0.5488		
Total (Corr.)	10.5328	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para IC₅₀ ABTS

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MeOH	3	1.89333	X	EtOH - H ₂ O		-0.88	1.85592
EtOH	3	3.19667	XX	EtOH - MeOH		1.30333	1.85592
H ₂ O	3	4.07667	X	H ₂ O - MeOH	*	2.18333	1.85592

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para IC₅₀ por solventes (Maduro)

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0496889	2	0.0248444	11.96	0.0081
Intra grupos	0.0124667	6	0.00207778		
Total (Corr.)	0.0621556	8			

Tukey HSD (95.0% de confianza) para IC₅₀ ABTS

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MeOH	3	0.22	X	EtOH - H ₂ O		-0.06667	0.114196
EtOH	3	0.3333	XX	EtOH - MeOH		0.11333	0.114196
H ₂ O	3	0.4	X	H ₂ O - MeOH	*	0.18	0.114196

* indica una diferencia significativa.

Panel fotográfico

1. Recolección de la materia prima



2. Selección y clasificación



3. Pesado y extracción de semilla



4. Caracterización de la espina amarilla en sus tres estados de madurez ❖ Análisis morfológico



❖ **Determinación de pH**



❖ **Determinación de °Brix**



❖ **Determinación de acidez**



❖ **Índice de madurez**



5. Caracterizaciones proximales
❖ **Determinación de humedad**



❖ **Determinación de ceniza**



❖ **Determinación de grasa**



❖ **Determinación de fibra**



6. Determinación de los compuestos bioactivos

❖ Cuantificación de antocianina



❖ Cuantificación de polifenoles totales



❖ Cuantificación de vitamina C



7. Evaluación de capacidad antioxidante por método DPPH Y ABTS

