

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



“CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE LOS FRUTOS LIOFILIZADOS DE LA *Opuntia ficus-indica* “TUNA ROJA, NARANJA Y VERDE”, AREQUIPA – 2019”

Tesis presentada por las Bachilleres:

Bernal Velarde, Carla Alejandra

Tunqui García, María Karina

Para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesora:

Mgter. Medina Pérez, Jeaneth Marisol

AREQUIPA – PERÚ

2020

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20180000049677

N° Trámite en Fac. 1769-2018

Fecha 16-11-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: **BERNAL VELARDE, Carla Alejandra**
TUNQUI GARCIA, Maria Karina

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LOS FRUTOS DE LA Opuntia ficus-indica (TUNA ROJA, TUNA BLANCA Y TUNA AMARILLA), AREQUIPA-2018"

DICTAMINADORES: 1) **Q. F. Juan Ramírez Orellana** 2) **Dra. Gaby Velasco Lozano**

DICTAMEN DE PLAN:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, sugerimos se cambie el título a: **"CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE LOS FRUTOS DE LA Opuntia ficus-indica (TUNA ROJA, BLANCA Y AMARILLA), AREQUIPA-2019"** después de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

Firmas

[Firmas manuscritas]

Fecha 15/4/19

ASESOR: **Mgter. Jeaneth Medina Pérez**

DICTAMEN DE ASESOR:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: **"CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE LOS FRUTOS DE Opuntia ficus-indica (TUNA ROJA, NARANJA Y VERDE), AREQUIPA -- 2019"** y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

Firma

[Firma manuscrita]

Fecha 29/08/19

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dra. Gaby Velasco Lozano**
- 2) **Q. F. Juan Ramírez Orellana**
- 3) **Mgter. Mocita De La Fuente Torres**

DICTAMEN DE BORRADOR:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, debiendo cambiar el título a: **"CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE LOS FRUTOS LIOFILIZADOS DE LA Opuntia ficus-indica "TUNA ROJA, NARANJA Y VERDE", AREQUIPA-2019"**, y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma

[Firmas manuscritas]

Fecha 17/12/19

JURADOS: Presidente

DRA. GABY VELASCO LOZANO

Vocal

Q. F. JUAN RAMIREZ ORELLANA

Secretario

MAG. MOCITA DE LA FUENTE TORRES

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 2020/04/10

Hora: 18.00

Local: C- 402 (SUM)

DECANO

[Firma manuscrita]

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a Dios por permitirme llegar a este momento de mi formación personal.

A mis padres Maribel y Rolando por brindarme su apoyo, por ser mi fortaleza y ejemplo de superación para llevar acabo mis sueños y metas sin dejarme rendir.

A José por su constante motivación y el apoyo incondicional que me ha brindado.

A mi familia porque siempre estuvieron conmigo en buenos y malos momentos.

CARLA

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a Dios por ser la luz que guío, guía y guiará mi camino y por permitirme llegar a este punto de mi formación profesional.

A mis padres Elber y Elvira por haberme brindado su comprensión y apoyo en todo el trayecto de mi formación profesional; por siempre creer en mí; por ser mi motor, motivo y ejemplo que me impulsa a superarme cada día, ya que ellos me enseñaron una gran lección de superación y sobre todo por el amor que me brindan.

A mi hermano Estiven por creer en mí, por sus palabras de aliento y por brindarme su amor y apoyo. A mi abuelita Alicia por su amor incondicional, por impulsarme a lograr mis metas y a mi bisabuelita Aurelia quien desde el cielo me protege e ilumina mi camino.

A Jhossef por su constante motivación, por el apoyo y sobre todo por su amor incondicional.

En especial a mi hijo Adrianito por llegar a mi vida y ser el impulso más grande para seguir luchando y no rendirme.

MARIA KARINA

AGRADECIMIENTOS

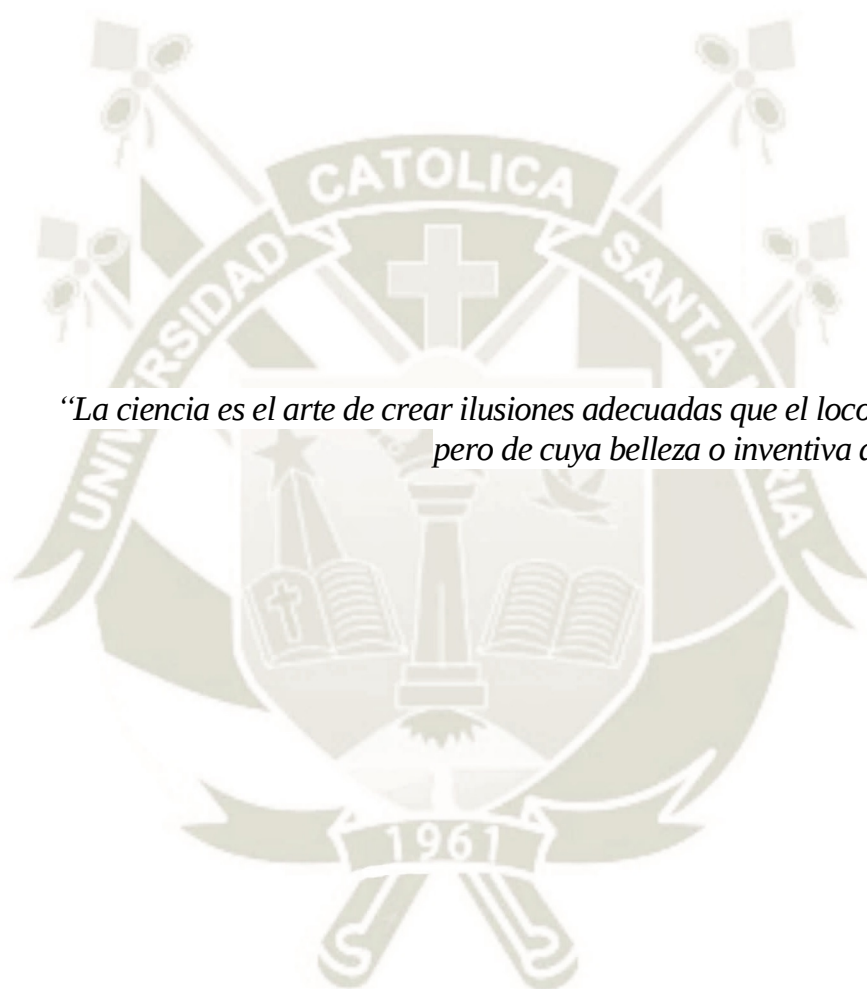
Nuestro agradecimiento incondicional a Dios por estar presente en cada momento de nuestra vida manifestando fortaleza, valor y amor.

A nuestros padres por apoyarnos y guiarnos en cada decisión y proyecto transmitiéndome fortaleza y sabiduría.

A nuestra asesora de tesis la Mgter. Jeaneth Marisol Medina Pérez, por brindarnos sus conocimientos, su apoyo y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A nuestros jurados el Dr. Juan Ramírez Orellana, Dra. Gaby Velasco Lozano y la Mgter Mocita de la Fuente Torres, por su valiosa opinión profesional en la revisión de este trabajo de investigación.

CARLA Y MARIA KARINA.



*“La ciencia es el arte de crear ilusiones adecuadas que el loco cree o arrebate,
pero de cuya belleza o inventiva disfruta el sabio”*

Carl Jung

ÍNDICE

RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	xv
HIPÓTESIS.....	xvii
OBJETIVOS.....	xviii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1. OPUNTIA FICUS-INDICA. (LINNEO) MILLER	1
1.1. Clasificación taxonómica	1
1.2. Sinonimia	1
1.3. Origen y distribución	2
1.4. Agroecología	2
1.5. Descripción botánica.....	3
1.6. Composición fitoquímica.....	4
2. ESTRÉS OXIDATIVO	5
2.1. Procesos oxido-reducción en la vida	5
2.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	6
2.3. Factores ambientales que generan estrés oxidativo	11
2.4. Enfermedades relacionadas al estrés oxidativo	14
3. ANTIOXIDANTES.....	17
3.1. Sistema de defensa antioxidante.....	17
3.2. Tipos de antioxidantes	19
3.3. Plantas como fuente potencial de antioxidantes	24
3.4. Métodos para determinar el efecto antioxidante	25
4. LIOFILIZACIÓN.....	27
CAPÍTULO II.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	28
2. MATERIALES	28
2.1. Material Vegetal	28

2.2.	Material de Laboratorio	28
2.3.	Reactivos	29
2.4.	Equipos	29
3.	MÉTODOS	29
3.1.	Recolección del Fruto	29
3.2.	Liofilización	30
3.3.	Preparación de los Extractos	30
3.4.	Determinación de la Capacidad Antioxidante	31
3.5.	Compuestos Fenólicos Totales	33
3.6.	Evaluación de Ácido Ascórbico	35
CAPÍTULO III.....		37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		37
1.	RECOLECCIÓN DE LOS FRUTOS	37
2.	LIOFILIZACIÓN	37
3.	PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS	40
4.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	40
4.1.	Método DPPH	40
5.	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	45
5.1.	Método Folin Ciocalteu	45
6.	EVALUACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO	48
6.1.	Método Volumétrico 2,6 diclorofenolindofenol	48
7.	COMPARACIÓN GLOBAL.....	51
CONCLUSIONES.....		57
SUGERENCIAS.....		58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		59
ANEXOS		65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Tipos de métodos in vitro para la determinación del efecto antioxidante ⁶¹	25
Tabla N° 2 Condiciones de liofilización de las muestras.....	30
Tabla N° 3 Preparación de estándares de trolox para el método DPPH.	32
Tabla N° 4 Preparación para la curva de calibración DPPH.....	32
Tabla N° 5 Preparación de los estándares de ácido gálico	34
Tabla N° 6 Preparación para la curva de calibración de Folin Ciocalteu	34
Tabla N° 7 Valores considerados en la liofilización de tuna.....	39
Tabla N° 8 Características organolépticas del mesocarpio de los frutos de <i>Opuntia ficus indica</i> “Tuna roja, naranja y verde”.....	39
Tabla N° 9 Calibración del método DPPH con estándares de trolox	40
Tabla N° 10 Capacidad antioxidante de la <i>Opuntia ficus indica</i> “Tuna roja, naranja y verde” por el método DPPH.....	42
Tabla N° 11 Inhibición del radical DPPH.....	43
Tabla N° 12 Capacidad antioxidante de la <i>Opuntia ficus indica</i> “Tuna roja, naranja y verde” por el método DPPH.....	44
Tabla N° 13 Calibración del método Folin Ciocalteu con estándares de ácido gálico	45
Tabla N° 14 Compuestos fenólicos de la <i>Opuntia ficus indica</i> “Tuna roja, naranja y verde” por el método Folin Ciocalteu	47
Tabla N° 15 Titulación por el método 2.6 diclorofenolindofenol con estándar de ácido ascórbico.	49
Tabla N° 16 Contenido de ácido ascórbico en <i>Opuntia ficus indica</i> “Tuna roja, naranja y verde”	50
Tabla N° 17 Resumen de resultados	51

Tabla N° 18 ANOVA Capacidad Antioxidante por el método DPPH en las tres variedades de tuna.....	52
Tabla N° 19 Test Tukey para Capacidad Antioxidante en tres variedades de tuna...	53
Tabla N° 20 ANOVA Polifenoles Totales por el método de Folin Ciocalteu en las tres variedades de tuna.	54
Tabla N° 21 Test Tukey para Polifenoles Totales en tres variedades de tuna	54
Tabla N° 22 ANOVA Ácido Ascórbico por el método 2.6 DCPIP en las tres variedades de tuna.....	55
Tabla N° 23 Test Tukey para Ácido Ascórbico en tres variedades de tuna	56



ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Frutos maduros e inmaduros, y flor que surge del cladodio de <i>Opuntia ficus-indica</i> (Linneo) Miller ⁶	3
Fig. 2 Las principales especies reactivas de oxígeno, sus orígenes potenciales y las vías de desintoxicación ²³	7
Fig. 3 Representación esquemática de producción del estrés oxidativo ²⁵	8
Fig. 4 Papel del estrés oxidativo en la carcinogénesis ⁴⁴	16
Fig. 5 Antioxidantes naturales separados en clases. Las palabras verdes representan antioxidantes exógenos, mientras que las amarillas representan antioxidantes endógenos ⁴⁹	19
Fig. 6 Principio del método DPPH ⁶³	26
Fig. 7 Principio del método DCPIP ⁶⁵	27
Fig. 8 Muestras de <i>Opuntia ficus indica</i> “Tuna roja, naranja y verde” recolectadas, las cuales fueron lavadas para su posterior almacenamiento.	37
Fig. 9 Cálculo del rendimiento de liofilización.....	38
Fig. 10 Muestras de <i>Opuntia ficus indica</i> “Tuna roja, naranja y verde”. Muestras en el liofilizador.....	38
Fig. 11 Estándares de trolox.	41
Fig. 12 Patrones de trolox tratados con DPPH.....	41
Fig. 13 Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por el método DPPH....	41
Fig. 14 Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por inhibición de DPPH	43
Fig. 15 Patrones de Ácido Gálico tratados con Folin Ciocalteu	46
Fig. 16 Gráfico de calibración para compuestos fenólicos por el método Folin Ciocalteu.....	46
Fig. 17 Titulación de ácido ascórbico con 2.6 DCPIP.....	49

Fig. 18 Comparación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH entre Tuna roja, naranja y verde.	52
Fig. 19 Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Folin Ciocalteu entre Tuna roja, naranja y verde.	53
Fig. 20 Comparación del contenido de ácido ascórbico por el método Volumétrico 2,6 DCIP entre la Tuna roja, naranja y verde.	55



RESUMEN

En el presente trabajo se determinó y comparó la capacidad antioxidante del mesocarpio de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” y el contenido de compuestos fenólicos y ácido ascórbico.

Se utilizaron frutos que se producen en el distrito la Joya, provincia de Arequipa, departamento de Arequipa, se analizó morfológicamente cada variedad de la Tuna en el herbario de la Universidad Nacional de San Agustín y se confirmó su pertenencia a la especie de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”, los cuales fueron liofilizados en el laboratorio de la Universidad Católica Santa María donde se obtuvo un extracto del fruto liofilizado por sonicación, posteriormente se determinó y comparó la capacidad antioxidante por el método DPPH; el contenido de compuestos fenólicos totales por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu y el contenido de ácido ascórbico por el método volumétrico 2.6 DCPIP.

Para la capacidad antioxidante se obtuvo un valor de 1281.5 mg TE/100 g de fruto liofilizado de tuna roja, 886.3 mg TE/100 g de fruto liofilizado de tuna naranja y 853.7 mg TE/100 g de fruto liofilizado de tuna verde; para el contenido de compuestos fenólicos se obtuvo un valor de 71 mg GAE/100 g de fruto liofilizado de tuna roja, 69 mg GAE/100 g de fruto liofilizado de tuna naranja y un valor de 55 mg GAE/100 g de fruto liofilizado de tuna verde; para el contenido de ácido ascórbico se obtuvo un valor de 31.25 mg AA/100 g de fruto liofilizado de tuna roja, 28.75 mg AA/100 g de fruto liofilizado de tuna naranja y un valor de 23.75 mg AA/100 g de fruto liofilizado de tuna verde.

La *Opuntia ficus indica* variedad roja, presenta una mayor capacidad antioxidante, un mayor contenido de compuestos fenólicos totales y ácido ascórbico a comparación con la *Opuntia ficus indica* variedad naranja y verde, procedentes de la Joya del departamento de Arequipa.

Palabras clave: *Opuntia ficus indica*, capacidad antioxidante, polifenoles totales, ácido ascórbico.

ABSTRACT

In this work the antioxidant capacity of *Opuntia ficus indica* mesocarp was determined and compared (red, orange and green prickly pear) and the content of phenolic compounds and ascorbic acid.

Fruits that are produced in the district of La Joya, province of Arequipa, department of Arequipa were used, each variety of the Tuna was analyzed morphologically in the herbarium of the National University of San Agustín and its belonging to the *Opuntia ficus indica* species was confirmed “Red, orange and green prickly pear”, which were lyophilized in the laboratory of the Santa María Catholic University where an extract of the lyophilized fruit was obtained by sonication, subsequently the antioxidant capacity was determined and compared by the DPPH method; the content of total phenolic compounds by the colorimetric method of Folin Ciocalteu and the content of ascorbic acid by the volumetric method 2.6 DCPIP.

For the antioxidant capacity, a value of 1281.5 mg TE/100 g of lyophilized fruit of red prickly pear, 886.3 mg TE/100 g of lyophilized fruit of orange prickly pear and 853.7 mg TE/100 g of lyophilized fruit of green prickly pear was obtained; for the content of phenolic compounds a value of 71 mg GAE/100 g of lyophilized fruit of red prickly pear, 69 mg GAE/100 g of lyophilized fruit of orange prickly pear and a value of 55 mg GAE / 100 g of lyophilized fruit of green prickly pear; for the ascorbic acid content, a value of 31.25 mg AA/100 g of lyophilized fruit of red prickly pear, 28.75 mg AA/100 g of lyophilized fruit of orange prickly pear and a value of 23.75 mg AA/100 g of lyophilized fruit of green prickly pear.

Red variety *Opuntia ficus indica*, has a greater antioxidant capacity, a higher content of total phenolic compounds and ascorbic acid compared to *Opuntia ficus indica* orange and green variety, coming from the Jewel of the department of Arequipa.

Keywords: *Opuntia ficus indica*, antioxidant capacity, total polyphenols, ascorbic acid.

INTRODUCCIÓN

Numerosas investigaciones han demostrado que el estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la homeostasis prooxidante y antioxidante que conduce a la generación de especies radicales tóxicas. Diversos tipos de estrés oxidativo en el organismo aeróbico dañan macromoléculas, como lípidos de membrana, proteínas y ADN, lo que provoca el desarrollo de diversos trastornos crónicos, como diabetes tipo 2, inflamación, envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y cáncer¹.

No obstante, los sistemas de defensa que funcionan en el cuerpo para prevenir los daños causados por los derivados reactivos del oxígeno se denominan sistemas de defensa antioxidantes. Los antioxidantes se dividen en dos grupos principales como antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los ejemplos de antioxidantes enzimáticos son superóxido dismutasa, citocromo oxidasa mitocondrial, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa, catalasa e hidropoxidasa. Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran el α -tocoferol (vitamina E) y el β -caroteno en la fase lipídica, y el ácido ascórbico soluble en agua (Vitamina C), melatonina, cisteína, ceruloplasmina, hemoglobina, bilirrubina, etc².

En la búsqueda de alternativas naturales que eviten el estrés oxidativo, ha habido una tendencia mundial hacia el uso de fitoquímicos naturales presentes en los recursos naturales, como frutas, verduras, semillas oleaginosas y hierbas, como antioxidantes. Los antioxidantes naturales se usan comúnmente en la ciencia médica tanto como medicinas tradicionales como productos industrializados, y existe evidencia de que estas sustancias pueden ejercer sus efectos antioxidantes dentro del cuerpo humano³.

Una de las alternativas naturales, es la *Opuntia ficus-indica* “Tuna”, una planta ampliamente cultivada en muchas regiones del mundo por sus frutos con un sabor agradable y con un alto contenido de minerales, vitaminas, fibra dietética y fitoquímicos; los cuales promueven la salud. Los efectos farmacológicos atribuidos a los frutos de esta planta incluyen: antígenotóxico, diurético, gastroprotector, hepatoprotector, neuroprotector, cardiotónico, laxante, antimicrobiano, etc⁴.

El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar la capacidad antioxidante del extracto de los frutos de la *Opuntia ficus-indica* de diferentes variedades: tuna roja, tuna naranja y tuna verde mediante métodos *in vitro*, con la finalidad de encontrar una nueva alternativa en la terapia antioxidante que brinde beneficios para la protección de la salud.



HIPÓTESIS

Existe antecedentes que las plantas dentro de su metabolismo originan una serie de metabolitos, algunos de ellos con propiedades medicinales y antioxidantes; es probable que, los extractos de los frutos de la *Opuntia ficus-indica* “tuna roja, naranja y verde” presenten compuestos vinculados a su capacidad antioxidante.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la capacidad antioxidante del fruto liofilizado de *Opuntia ficus-indica* “Tuna roja, naranja y verde”.

Objetivos Específicos

1. Liofilizar los frutos de *Opuntia ficus-indica* “Tuna roja, naranja y verde” y obtener un extracto por sonicación de los diferentes frutos liofilizados con etanol para DPPH y Folin Ciocalteu y solución acética metafosfórica para ácido ascórbico.
2. Determinar y comparar la capacidad antioxidante de los extractos de los frutos liofilizados de *Opuntia ficus-indica* “Tuna roja, naranja y verde” mediante el método DPPH.
3. Determinar y comparar el contenido de compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin Ciocalteu y el contenido de ácido ascórbico por el método volumétrico 2.6 DCPIP de los extractos de los frutos liofilizados de *Opuntia ficus-indica* “Tuna roja, naranja y verde”.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. *OPUNTIA FICUS-INDICA*. (LINNEO) MILLER

1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del material vegetal en estudio, según el Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS)⁵:

- Reino: *Plantae*
- Subreino: *Viridiplantae*
- Infrareino: *Streptophyta*
- Superdivisión: *Embryophyta*
- División: *Tracheophyta*
- Subdivisión: *Spermatophytina*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Superorden: *Caryophyllanae*
- Orden: *Caryophyllales*
- Familia: *Cactaceae*
- Género: *Opuntia* Miller
- Especie: *Opuntia ficus-indica* (Linneo) Miller⁵

1.2. Sinonimia

1.2.1. Sinonimia Científica

La *Opuntia ficus-indica* (Linneo) Miller presenta los siguiente sinónimos científicos: *Opuntia megacantha*, *Cactus ficus-indica* L., *Opuntia compressa*, *Platyopuntia cordobensis*, *Opuntia joconostle*, *Opuntia amyclaea*, *Opuntia undulata*, *Opuntia paraguayensis*, *Platyopuntia apurimacensis*⁵.

1.2.2. Sinonimia Vulgar

La *Opuntia ficus-indica* (Linneo) Miller se conoce comúnmente como: Tuna, Higuera Chumba, Higuera de Pala, Nopal, Nopal de Castilla, Nopal Pelón⁶.

1.3. Origen y distribución

La *O. ficus-indica* es un pariente cercano de un grupo de cactus arborescentes y opuntíoides del sur y centro de México; el núcleo de domesticación para esta especie está en el centro de México; y el concepto taxonómico de *O. ficus-indica* puede incluir clones derivados de múltiples linajes y, por lo tanto, ser polifilético⁷.

La *O. ficus-indica* es un cultivo de cactus domesticado desde hace mucho tiempo que juega un papel importante en las economías agrícolas en las zonas áridas y semiáridas del mundo. Existe evidencia relacionada con el uso de *Opuntia* como alimento humano hace al menos 9,000–1,200 años atrás. Los principales países productores de *Opuntia* son México, España, Italia, Marruecos, Argelia, Egipto, Arabia Saudita, Israel, Chile, Brasil, Turquía y el norte de África⁸. En el Perú, el uso de esta planta viene de épocas precolombinas con más de 11000 años de antigüedad. La tuna fue descrita por los cronistas, detallando el uso comestible de sus frutos y la presencia de cochinilla en la superficie de sus tallos⁹.

1.4. Agroecología

La *Opuntia ficus-indica*, se adapta a una variedad de condiciones climáticas, desde tropicales a subtropicales, semiáridas a áridas, de 0–600 a 2.600 m.s.n.m. Es reconocida como cultivo ideal para regímenes climáticos semiáridos y áridos, ya que es extremadamente resistente a la sequía y al calor. Debido al metabolismo del ácido crasuláceo, esta planta exhibe una alta eficiencia en el uso del agua con un potencial relativamente alto de producción de biomasa. Se ha informado que es cuatro o cinco veces más eficiente en la conversión de agua en materia seca que los pastos más eficientes. Algunas especies de *Opuntia*, incluida *O. ficus indica*, crecen rápidamente con rendimientos de fruta fresca de 8 000 a 12 000 kg/ha/año o más y una producción vegetativa de materia seca de 20 000 a 50 000 kg/ha/año¹⁰.

La *Opuntia ficus-indica* se encuentra en chaparrales costeros, matorrales, tierras áridas altas, cañones, laderas rocosas y orillas de los ríos. Prefiere una temperatura media anual de 18–26 °C, pero puede sobrevivir breves períodos de heladas de –2 °C a –3 °C, y una precipitación media anual de 150–600 mm. Se adapta bien a los suelos pobres, pero prospera mejor en suelos arenosos profundos o en suelos ligeramente ácidos y libres¹¹.

La planta es adversamente sensible a la acumulación de agua prolongada, ya que se deben evitar los suelos arcillosos mal drenados. Si el clima es muy seco, se toleran los suelos arcillosos. En áreas más húmedas, es preferible un pH más alto (cercano a neutral o ligeramente superior) mientras que en áreas secas se puede tolerar un pH más bajo. Además, crece a pleno sol y no requiere refugio del viento. El único requisito es plantarlo y dejarlo crecer solo, sin fertilizantes ni riego¹¹.

1.5. Descripción botánica

La *O. ficus-indica* es un arbusto extendido erecto de 3-5 m de altura, con un tronco corto y resistente de 30–45 cm de diámetro. Tallos opacos de color verde grisáceo, glabros que consisten en una serie de segmentos articulados carnosos, elípticos u ovados de 25–60 cm de largo, 20–40 cm de ancho. Areolas de 7-11 por fila diagonal a través del segmento medio del tallo, y ocasionalmente con espinas blancas o amarillentas. Hojas pequeñas, en forma de escamas producidas debajo de la areola. Flores, actinomorfas, bisexuales, grandes, de 6–7 cm de largo, 5–7 cm de diámetro.

Fruto de color blanco verdoso a amarillo, marrón amarillento o púrpura rojizo, según la variedad, carnosos, en forma de barril, de 5–10 cm de largo, 4–9 cm de diámetro, areolas 40–60 con mechones de cerdas de púas finas (**Fig. 1**). Sus frutos tienen una vida útil corta, que varía de 2 a 3 y hasta 4 semanas, lo que dificulta la comercialización y el almacenamiento a largo plazo. Semillas redondeadas, de 5 mm de diámetro, marrón pálido incrustadas en la pulpa carnosos de color rojo a blanco amarillento⁶.



Fig. 1. Frutos maduros e inmaduros, y flor que surge del cladodio de *Opuntia ficus-indica* (Linneo) Miller⁶.

1.6. Composición fitoquímica

En general, el fruto de la *O. ficus-indica* contiene aproximadamente 85% de agua, 15% de azúcar, 0.3% de cenizas y menos del 1% de proteínas. Su fruto no tiene un aroma distintivo, pero la pulpa es muy dulce, y el componente de azúcar es principalmente glucosa y fructosa (en cantidades similares). Esta fuente de energía en forma de azúcar es absorbida por el organismo y queda fácilmente disponible para la función cerebral y celular. Teniendo en cuenta el alto contenido de agua, esta fruta puede alcanzar un valor de 50 kcal/100 g. Las semillas representan aproximadamente el 10–15% de la pulpa comestible, seguido del pericarpio y el mesocarpio (36–48%), y la pulpa comestible (39–64%)¹².

El fruto de *O. ficus-indica* es una buena fuente de minerales, en particular calcio, magnesio, potasio y fósforo. Además, exhibe un contenido de ácido ascórbico de 20–40 mg/100 g de peso fresco. Del mismo modo, presenta varios tipos de aminoácidos, por ejemplo, alanina, arginina, prolina, taurina y asparragina. Las vitaminas, como la vitamina C (ácido ascórbico), E, K y betacarotenos, también son componentes de este fruto¹³.

Los flavonoides son otro componente importante en los frutos de la *O. ficus-indica*, entre ellos tenemos al kaempferol, quercetina, narcisina, dihidrokaempferol, dihidroquercetina y eriodictiol¹⁴. Por otro lado, este fruto presenta betalaínas que son pigmentos rojos a violetas (betacianinas) y amarillos a naranjas (betaxantinas). La concentración de estos pigmentos es responsable de las diferencias e intensidad en los tipos de color del fruto, desde rojo intenso/violeta y variaciones de verde pálido a amarillo anaranjado. Por lo que, se debe tener en cuenta, que las concentraciones de estos componentes dependen del sitio de cultivo, el clima y la variedad¹⁵.

1.7. Usos y propiedades

Los cactus (*Opuntia*) han sido utilizados durante siglos como vegetales y medicamentos para tratar una variedad de dolencias y trastornos. Las propiedades nutricionales y medicinales de los cladodios frescos se conocen desde hace mucho tiempo. La corteza es un tónico y diurético, los frutos tienen propiedades refrescantes y tónicas, y los brotes jóvenes y el jugo lechoso son astringen. Medicinalmente, los componentes y extractos de tuna se han utilizado en tratamientos para la diabetes, el colesterol y la salud del sistema inmunitario. Los polisacáridos extraídos de *O. ficus-*

indica se han utilizado para tratar heridas y proteger el hígado de pesticidas organofosforados peligrosos. Las especies de *Opuntia* se han utilizado para proteger el tejido cerebral de la privación de glucosa y oxígeno y para tratar los efectos hipoglucémicos en pacientes diabéticos al devolver la glucosa en sangre a niveles normales¹⁶.

En la medicina china, el fruto de esta planta se usa para tratar la inflamación y el dolor y como agente de desintoxicación para las mordeduras de serpiente. Asimismo, los extractos de este fruto se han utilizado para evaluar efectos anticancerígenos¹⁶. Otros efectos farmacológicos atribuidos a los cladodios y frutos de esta planta incluyen: antioxidante, antienvenenoso, diurético, gastroprotector, hepatoprotector, neuroprotector, cardiotónico, laxante, antimicrobiano, etc⁶.

A pesar de los diversos usos indicados anteriormente y el hecho de que las hojas, flores, tallos y frutos son partes comestibles muy apreciadas en las especies de esta planta, el uso de *O. ficus-indica* se limita principalmente al consumo de fruta fresca en sus países de origen. La fruta generalmente se come fresca, aunque puede ser confitada o convertida en jugo y mermelada¹⁷.

2. ESTRÉS OXIDATIVO

2.1. Procesos oxido-reducción en la vida

Las primeras formas de vida evolucionaron en un entorno altamente reductor (reducción es la ganancia de e^-). Las células vivas generalmente se encuentran en un estado muy reducido incluso hoy en día, y si se oxidan (oxidación es la pérdida de e^-) es probable que mueran. Asimismo, el hecho de que las formas de vida sobrevivieron y se adaptaron en un ambiente altamente reductor sugiere que el estrés reductor no es un problema¹⁸.

La homeostasis de oxidación-reducción (redox), como el control del pH, es fundamental para la vida. Los procesos redox impregnan prácticamente todos los procesos fundamentales, desde la bioenergética hasta el metabolismo y las funciones vitales. Al igual que en la regulación ácido-base, el control espacio-temporal opera en diferentes puntos de ajuste, en varios compartimentos dentro y fuera de las células, una situación fisiológica o fisiopatológica dada se caracteriza por puntos de ajuste muy

diferentes de sistemas redox que operan simultáneamente. Las reacciones redox biológicas son múltiples y organizadas de acuerdo con los principios del Código Redox¹⁹.

El término "estrés oxidativo" se usa en toxicología para referirse a un rango de condiciones patológicas y reacciones que juntas constituyen una desviación de un estado reductor homeostático basal en la célula o el tejido. En consecuencia, la presencia de concentraciones elevadas de especies reactivas (típicamente, pero no exclusivamente, especies de oxígeno o nitrógeno) se toma como evidencia de estrés oxidativo. El estrés oxidativo también puede referirse a la formación de niveles aumentados de biomoléculas oxidadas, incluidas las macromoléculas como los ácidos grasos, las proteínas y los ácidos nucleicos, pero también péptidos o antioxidantes de bajo peso molecular como el glutatión, el ascorbato y el tocoferol²⁰.

El término estrés oxidativo también puede aplicarse a las reacciones químicas que implican la generación de estas biomoléculas oxidadas. Se ven ejemplos de esto en la oxidación de ácidos grasos o quinonas, que pueden involucrar reacciones de transferencia de electrones individuales, generando así radicales libres en reacciones que progresan a través de las etapas de iniciación, propagación y terminación²¹.

2.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El oxígeno presenta beneficios positivos y efectos secundarios potencialmente dañinos para los sistemas biológicos. La reactividad permite que el oxígeno participe en transferencias de electrones de alta energía y, por lo tanto, apoya la generación de grandes cantidades de adenosina-5-trifosfato (ATP) a través de la fosforilación oxidativa. Esto es necesario para permitir la evolución de organismos multicelulares complejos, pero también hace que sea susceptible de atacar cualquier molécula biológica, ya sea una proteína, un lípido o un ADN. En consecuencia, nuestro cuerpo está bajo ataque oxidativo constante de ROS²².

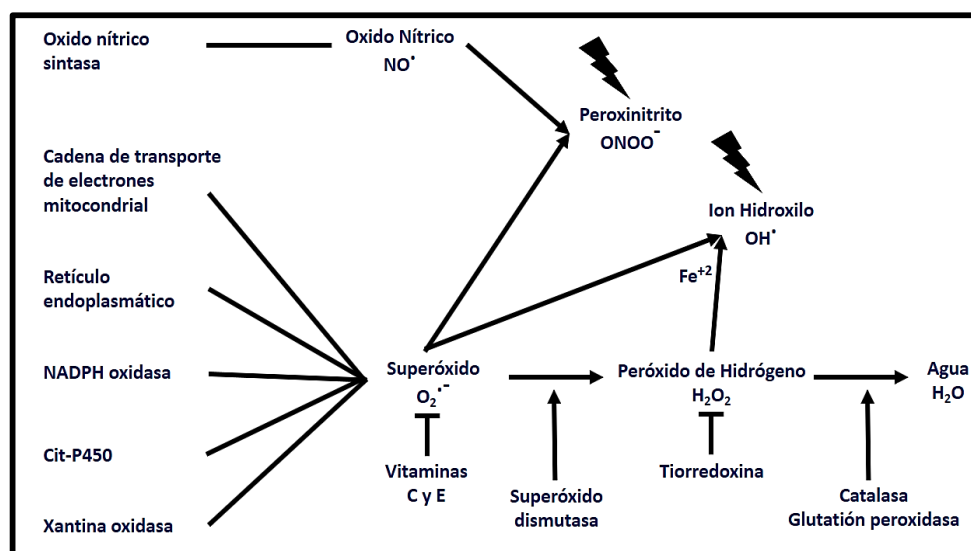


Fig. 2 Las principales especies reactivas de oxígeno, sus orígenes potenciales y las vías de desintoxicación²³.

El término "especies reactivas de oxígeno" se aplica tanto a los radicales libres como a sus intermedios no radicales. Los radicales libres se definen como especies que contienen uno o más electrones no apareados, y es esta capa de electrones incompleta la que confiere su alta reactividad. Los radicales libres se pueden generar a partir de muchos elementos, pero en los sistemas biológicos los más importantes son los que involucran oxígeno y nitrógeno (**Fig. 2**)²³.

En condiciones fisiológicas, el radical libre de oxígeno más común es el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), y las mitocondrias se consideran la fuente principal. La transferencia de electrones a lo largo de las enzimas de la cadena respiratoria no es totalmente eficiente, y la fuga de electrones hacia el oxígeno molecular, en particular de los complejos I y III, da como resultado la formación de $O_2^{\bullet-}$. La velocidad de formación está determinada por el número de electrones presentes en la cadena, por lo que se eleva en condiciones de hiperoxia y de glucosa elevada, como en la diabetes. En condiciones normales, el 2% del oxígeno consumido se convierte en $O_2^{\bullet-}$ en las mitocondrias en lugar de reducirse a agua (**Fig. 3**). Debido a su carga, $O_2^{\bullet-}$ es impermeable a la membrana, por lo que permanece dentro de la matriz mitocondrial²⁴.

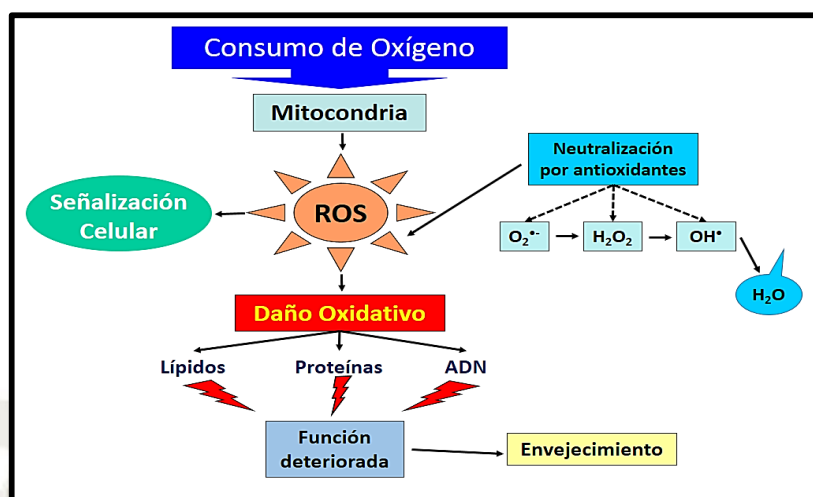


Fig. 3 Representación esquemática de producción del estrés oxidativo²⁵.

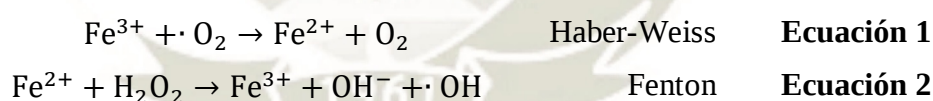
El superóxido es desintoxicado por las enzimas superóxido dismutasa, que lo convierten en peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno no es un radical libre, por lo que es menos reactivo que el $O_2^{\bullet-}$. Sin embargo, viene bajo el término de ROS ya que está íntimamente involucrado en la generación y desintoxicación de radicales libres. Como no es polar, es capaz de difundirse a través de las membranas celulares y organelas y, por lo tanto, actúa ampliamente como un segundo mensajero en las vías de transducción de señales. El peróxido de hidrógeno a su vez se desintoxica formando agua por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa. Es importante que las enzimas antioxidantes actúen en concierto, ya que un desequilibrio en las concentraciones de $O_2^{\bullet-}$ y peróxido de hidrógeno puede dar lugar a la formación del ion hidroxilo ($OH^{\bullet}$) mucho más peligroso. Esta reacción es catalizada por iones ferrosos libres en la reacción de Fenton. El ion hidroxilo reacciona con cualquier molécula biológica cercana. Debido a que es tan altamente reactivo, no se conoce un eliminador de $OH^{\bullet}$. Además, la generación excesiva de superóxido también puede conducir a interacciones con óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). El peroxinitrito es un poderoso prooxidante²³.

2.2.1. Fuentes de especies reactivas de oxígeno

2.2.1.1. Fuentes endógenas

Las ROS se producen a partir del oxígeno molecular como resultado del metabolismo celular normal. Las ROS se puede dividir en 2 grupos: radicales libres y no radicales. Las moléculas que contienen uno o más electrones no apareados y que dan reactividad a la molécula se llaman radicales libres. Cuando 2 radicales

libres comparten sus electrones no apareados, se crean formas no radicales. Los 3 ROS principales que tienen importancia fisiológica son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El anión superóxido se forma mediante la adición de 1 electrón al oxígeno molecular. Este proceso está mediado por nicotina adenina dinucleótido fosfato [NADPH] oxidasa o xantina oxidasa o por el sistema de transporte de electrones mitocondrial. El sitio principal para producir anión superóxido es la mitocondria. Normalmente, los electrones se transfieren a través de la cadena de transporte de electrones mitocondriales para reducir el oxígeno al agua, pero aproximadamente el 2% de todos los electrones se escapan del sistema y producen superóxido. La NADPH oxidasa se encuentra en leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos. Tras la fagocitosis, estas células producen una activación del superóxido que conduce a la actividad bactericida. El superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno por la acción de las superóxido dismutasas. El peróxido de hidrógeno se difunde fácilmente a través de la membrana plasmática. El peróxido de hidrógeno también es producido por la xantina oxidasa, amino oxidasa ácida y NADPH oxidasa y en peroxisomas por consumo de oxígeno molecular en reacciones metabólicas. En una sucesión de reacciones llamadas reacciones de Haber-Weiss y Fenton, el H_2O_2 puede descomponerse en $OH^{\cdot}$ en presencia de metales de transmisión²⁶.



2.2.1.2. Fuentes exógenas

El humo de cigarrillo contiene muchos oxidantes y radicales libres y compuestos orgánicos, como el superóxido y el óxido nítrico. Además, la inhalación de humo de cigarrillo en el pulmón también activa algunos mecanismos endógenos, como la acumulación de neutrófilos y macrófagos, que aumentan aún más la lesión oxidante²⁷.

La exposición al ozono puede causar peroxidación lipídica e inducir la entrada de neutrófilos en el epitelio de las vías respiratorias. La exposición a corto plazo al ozono también provoca la liberación de mediadores inflamatorios, lactato

deshidrogenasa y albúmina. Incluso en sujetos sanos, la exposición al ozono causa una reducción en las funciones pulmonares²⁸.

La radiación ionizante, en presencia de O₂, convierte radicales hidroxilo, superóxido y radicales orgánicos en peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos. Estas especies de hidroperóxido reaccionan con iones metálicos activos, como Fe y Cu, a través de reacciones de Fenton y, por lo tanto, inducen estrés oxidativo. La 8-oxo-7,8-dihidroguanina es el principal producto de oxidación del ADN mediado por los rayos UVA formado por la oxidación de radicales hidroxilo²⁹.

Los iones de metales pesados, como hierro, cobre, cadmio, mercurio, níquel, plomo y arsénico, pueden inducir la generación de radicales reactivos y causar daño celular a través del agotamiento de las actividades enzimáticas a través de la peroxidación lipídica y la reacción con proteínas nucleares y ADN. Uno de los mecanismos más importantes de la generación de radicales libres mediados por los metales es a través de una reacción de tipo Fenton³⁰.

2.2.2. Acciones biológicas de especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidativo ocurre cuando el equilibrio entre antioxidantes y ROS se interrumpe debido al agotamiento de los antioxidantes o la acumulación de ROS. Cuando se produce estrés oxidativo, las células intentan contrarrestar los efectos oxidantes y restablecer el equilibrio redox mediante la activación o el silenciamiento de genes que codifican enzimas defensivas, factores de transcripción y proteínas estructurales. Una mayor producción de ROS en el cuerpo puede cambiar la estructura del ADN, dar como resultado la modificación de proteínas y lípidos, la activación de varios factores de transcripción inducidos por el estrés y la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias²⁶.

2.2.2.1. Efecto sobre el ADN

Las ROS pueden conducir a modificaciones de ADN de varias maneras, lo que implica la degradación de bases, roturas de ADN de cadena simple o doble, modificaciones en sus bases nitrogenadas, mutaciones, translocaciones y reticulación con proteínas. La mayoría de estas modificaciones de ADN son muy relevantes para la carcinogénesis, el envejecimiento y las enfermedades

neurodegenerativas, cardiovasculares y autoinmunes³¹. El ADN mitocondrial es particularmente vulnerable al ataque de ROS debido a su proximidad al sitio de generación superóxido de la cadena de transporte de electrones, la falta de protección de histonas y los pocos mecanismos de reparación que presenta³².

2.2.2.2. Efecto sobre los lípidos

Las ROS pueden inducir la peroxidación lipídica y alterar la disposición de la bicapa lipídica de la membrana que puede inactivar los receptores y enzimas unidos a la membrana y aumentar la permeabilidad del tejido. Los productos de la peroxidación lipídica, como el malondialdehído y aldehídos insaturados, son capaces de inactivar muchas proteínas celulares mediante la formación de proteínas cruzadas. Productos de peroxidación de lípidos, como isoprostanos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, se han utilizado como biomarcadores indirectos del estrés oxidativo³³.

2.2.2.3. Efecto sobre las proteínas

Las ROS pueden causar fragmentación de la cadena peptídica, alteración de la carga eléctrica de las proteínas, reticulación de proteínas y oxidación de aminoácidos específicos y, por lo tanto, aumentar la susceptibilidad a la proteólisis por degradación por proteasas específicas. Los residuos de cisteína y metionina en las proteínas son particularmente más susceptibles a la oxidación³⁴.

La oxidación de grupos sulfhídrido o residuos de metionina de proteínas causa cambios conformacionales y degradación de proteínas. Los aminoácidos, tanto libres como en proteínas, son un objetivo para el daño oxidativo. La oxidación directa de las cadenas laterales conduce a la formación de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas), y la prolina, la argenina, la lisina y la treonina son particularmente vulnerables al ataque³⁴.

2.3. Factores ambientales que generan estrés oxidativo

2.3.1. Contaminación

La contaminación del aire está presente en nuestra sociedad industrial moderna. Aunque se realizan esfuerzos continuos para disminuir la emisión de partículas, nos enfrentamos a varias sustancias particuladas, muchas de las cuales pueden inducir

estrés oxidativo. El cuarzo, el polvo de mina de carbón y el asbesto son partículas patógenas clásicas, el mecanismo más probable que subyace a sus efectos nocivos y proinflamatorios es el estrés oxidativo. Se presta cada vez más atención a otros contaminantes de gran interés para la ciencia ambiental, es decir, partículas de escape de diesel y humo de cigarrillo. Ambos contaminantes presentan una elevada complejidad, ya que no son solo sistemas de un solo componente sino mezclas de muchos componentes²¹.

El tejido objetivo primario de contaminación como fuente de estrés oxidativo ambiental es el tracto respiratorio, pero también se ha demostrado que las partículas inhaladas se trasladan a otros órganos, como el hígado. El interés creciente también se dirige a rutas alternativas de cómo las partículas pueden ingresar al cuerpo, por ejemplo, a través del tracto gastrointestinal o la piel³⁵.

2.3.2. Radiación Ultravioleta

La radiación UV llega a los seres vivos de fuentes naturales y artificiales. La principal fuente de UV es la irradiación solar, pero el uso de fuentes artificiales de UV para fines terapéuticos y para el estilo de vida está aumentando constantemente. La radiación UV se subdivide en tres bandas principales de UV: UV-C de longitud de onda más corta (100–280 nm), UV-B (280–315 nm) y UV-A (315–400 nm). La radiación solar generalmente se absorbe en la atmósfera superior, y solo parte de los rayos UV-B y UV-A alcanzan la superficie de la tierra. Por lo tanto, son de gran importancia como fuentes de estrés oxidativo ambiental³⁶.

Se sabe que la radiación UV-A y UV-B causan varios efectos biológicos a través de diferentes mecanismos, entre los cuales las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante. Se ha demostrado que tanto UV-A como UV-B conducen a daño oxidativo y producción de ROS. La acción de la radiación UV incluye la interacción directa de fotones con moléculas diana como el ADN, la generación de radicales libres reactivos y/o ROS y la generación de moléculas proinflamatorias que inducen la producción fisiológica de ROS. El tejido objetivo primario para la irradiación UV es la piel, aunque la influencia de ROS inducida por radiación no ionizante como la UV en las enfermedades oftalmológicas degenerativas está recibiendo mayor atención³⁶.

2.3.3. Radiación Infrarroja

La radiación infrarroja es otra banda de ondas de radiación no ionizante. La región IR se divide en IR-A (760–1440 nm), IR-B (1440–3000 nm) e IR-C (3000 nm – 1 mm). La principal fuente de radiación IR es el sol, pero los emisores IR artificiales están ganando importancia constantemente. En comparación con la radiación UV, solo se han realizado pocas investigaciones en el campo del estrés oxidativo inducido por IR. Si bien la energía de los fotones del IR es menor que la de los rayos UV, la cantidad total de energía transferida por el sol contiene aproximadamente 54% de IR mientras que los rayos UV solo representa el 7%. La mayor parte de la radiación IR se encuentra dentro de la banda IR-A. La radiación IR produce un daño en la piel similar al daño inducido por los rayos UV, ya que la radiación IR es capaz de inducir una producción de ROS³⁷.

2.3.4. Radiación Ionizante

La radiación ionizante es altamente energética, radiación de onda extremadamente corta. La radiación ionizante involucra los efectos secundarios de los rayos X utilizados para el diagnóstico hasta el tratamiento de las consecuencias de un posible ataque nuclear o accidente. La mayoría de los efectos biológicos de la radiación ionizante están mediados por especies reactivas de oxígeno. El ROS generado principalmente es el radical hidroxilo, un radical altamente reactivo, generalmente de corta vida y reacción rápida con un rango difusor muy limitado³⁸.

2.3.5. Nutrición

La nutrición es un factor que gana cada vez más importancia en términos de estrés oxidativo. Además de los efectos protectores conocidos de una nutrición saludable, también puede ser responsable del aumento del estrés oxidativo. La nutrición no es estrictamente una noxa ambiental en sí misma, sino que representa una mezcla de varias noxas (por ejemplo: isótopos radiactivos, partículas, óxidos nítricos). Las prenoxas, principalmente menos o no peligrosas, pueden ser modificadas por el organismo, a través del sistema citocromo P450 y representan un factor importante en el estrés oxidativo inducido por la nutrición. Tal modificación, como en el metabolismo xenobiótico, podría conducir a posibles fuentes de estrés oxidativo³⁹.

2.4. Enfermedades relacionadas al estrés oxidativo

2.4.1. Desórdenes neurológicos

La evidencia concluyente sugiere que el estrés oxidativo es uno de los principales contribuyentes a la fisiopatología de una variedad de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Huntington, la discinesia tardía, la epilepsia y las enfermedades agudas del sistema nervioso central, como las lesiones de la médula espinal y/o trauma cerebral. El cerebro humano es vulnerable al estrés oxidativo debido a muchos hechos como el metabolismo de las catecolaminas; la disminución de antioxidantes; la presencia de metales de transición; la ocurrencia de trauma/lesión cerebral; el cerebro es un órgano que requiere más oxígeno y expresa bajos niveles de enzimas antioxidantes, que contribuyen a la formación de ROS. Como consecuencia del desequilibrio redox en el cerebro, una de las estructuras más afectadas es la membrana lipídica⁴⁰.

2.4.2. Síndrome metabólico

Síndrome metabólico es un término que designa un grupo de problemas de salud a menudo asociados con el estilo de vida moderno, que incluyen obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia, intolerancia a la glucosa y presión arterial alta. El estrés oxidativo está relacionado con el síndrome metabólico de varias maneras: el H_2O_2 promueve la señalización de la insulina, y se asocia con una mayor resistencia a la insulina; el anión superóxido se genera por la estimulación con angiotensina de NADPH y el receptor de angiotensina II/ angiotensina II tipo I, que desempeña un papel crítico en el control de la presión arterial; la hiperglucemia conduce a la sobreproducción de superóxido por la cadena de transferencia de electrones mitocondrial, activando el estrés oxidativo; la elevada cantidad de lipoproteína de baja densidad (LDL) y la baja cantidad de lipoproteína de alta densidad (HDL) se correlacionan con el estrés oxidativo⁴¹.

2.4.3. Aterosclerosis

La aterosclerosis se define como una enfermedad arterial caracterizada por placas fibrosas y ricas en colesterol. La progresión de la aterosclerosis causa obstrucción del flujo sanguíneo, hemorragia debido a la ruptura y trombosis que conduce a accidentes cerebrovasculares o infartos de miocardio. Muchos factores de

riesgo están asociados con el desarrollo de la aterosclerosis, los más conocidos son la elevada cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en suero, la baja cantidad de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en suero, diabetes, hipertensión, tabaquismo, envejecimiento y estrés oxidativo. Durante la oxidación de LDL, un proceso progresivo y muy importante para el comienzo de la formación de placa ateromatosa, el colesterol es blanco de oxidantes, que generan una variedad de oxiesteroles. Asimismo, cada vez hay más pruebas de que la reversión del estrés oxidativo con antioxidantes puede reducir el grado de lesión isquémica miocárdica y disfunción cardíaca.⁴²

2.4.4. Infecciones

Los efectos patológicos de NO y $O_2^{\bullet-}$ en la infección por virus están en claro contraste con sus efectos antimicrobianos beneficiosos en infecciones bacterianas y fúngicas. En las infecciones por virus, NO y $ONOO^{\bullet-}$, causan daño oxidativo inespecífico en el tejido infectado por el virus, lo que lleva a varios eventos patológicos. Se ha informado estrés oxidativo inducido por virus durante las infecciones con el virus de inmunodeficiencia humana, el virus de la influenza, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus del dengue y otros. El virus de la influenza es probablemente la homeostasis redox moduladora de patógenos mejor caracterizada. La producción de ROS inducida por la gripe se ha asociado con respuestas inmunitarias e inflamatorias del huésped, así como con la modulación de la replicación viral. Los radicales de oxígeno y sus derivados son reconocidos como mediadores principales de la lesión pulmonar inducida por el virus de la influenza⁴³.

2.4.5. Cáncer

Muchas vías de señalización que regulan el metabolismo de ROS también están relacionadas con la tumorigénesis. Sin embargo, las ROS también puede promover la formación de tumores al inducir mutaciones de ADN y vías de señalización prooncogénicas. A niveles moderados, las ROS inducen la expresión de genes sensibles al estrés, que a su vez desencadenan la expresión de proteínas que proporcionan señales de supervivencia, como el transportador de glucosa GLUT1 y el factor de crecimiento endotelial vascular. A niveles bajos y moderados, las ROS pueden actuar como moléculas de señalización que sostienen la proliferación y

diferenciación celular y activan vías de supervivencia sensibles al estrés, estimulando la fosforilación de la proteína quinasa C, la proteína quinasa B, etc⁴³.

La regulación del estrés oxidativo es un factor importante no solo para el desarrollo de tumores sino también para las respuestas a las terapias contra el cáncer. Como los altos niveles de ROS son dañinos para las células, el estrés oxidativo puede tener un efecto supresor de tumores. Esto imparte presión sobre las células cancerosas para que se adapten desarrollando mecanismos antioxidantes fuertes. Pero a pesar de tener un sistema antioxidante mejorado, las células cancerosas mantienen niveles de ROS más altos que las células normales. A niveles altos, ROS puede causar daño a las macromoléculas, incluido el ADN; induce la activación de la proteína quinasa C, desencadenando la senescencia; y/o causar permeabilización de las mitocondrias, lo que lleva a la liberación de citocromo C y apoptosis. Además, como se observa en la **Fig. 4** el estrés oxidativo puede actuar en múltiples etapas del proceso del cáncer desde la formación de la célula mutada (iniciación) hasta la promoción de la célula mutada (proliferación celular) y la eventual formación de la neoplasia (progresión)⁴⁴.

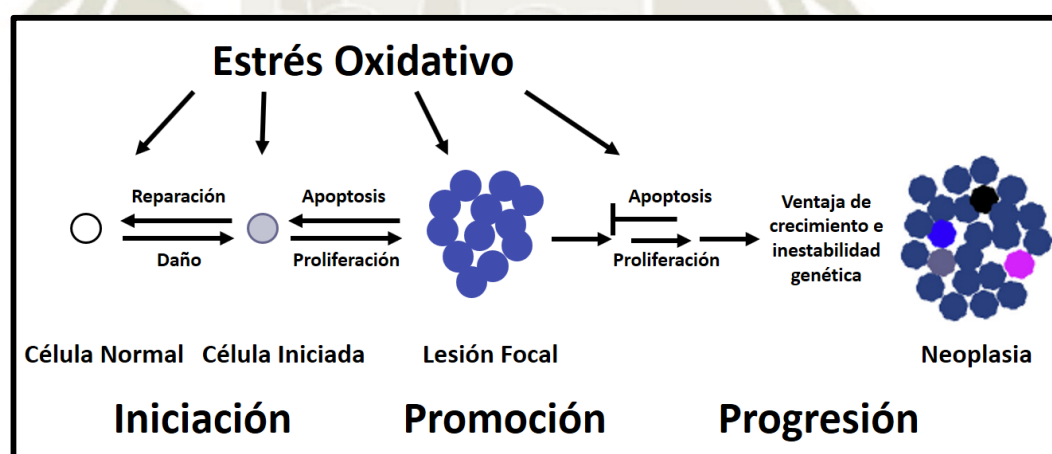


Fig. 4 Papel del estrés oxidativo en la carcinogénesis⁴⁴.

2.4.6. Inflamación

La inflamación representa un proceso biológico fundamental que se encuentra en el primer plano de una gran cantidad de afecciones patológicas agudas y crónicas. Las redes inflamatorias complejas, que involucran innumerables componentes celulares y humorales, organizan aspectos críticos de enfermedades tan diversas como

infarto de miocardio, diabetes, artritis reumatoide, sepsis, cáncer o enfermedad de Alzheimer, por nombrar solo algunas. La inflamación se produce en respuesta a cualquier alteración de la integridad del tejido, a fin de restaurar la homeostasis del tejido mediante la inducción de diversos mecanismos de reparación. La regulación adecuada de estos mecanismos es esencial para prevenir la amplificación incontrolada de la respuesta inflamatoria inicial y un cambio desde la reparación de tejidos hacia el daño colateral y el desarrollo de la enfermedad⁴⁵.

2.4.7. Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso intrínsecamente complejo que se manifiesta dentro de un organismo a niveles genéticos, moleculares, celulares, de órganos y sistemas. Aunque los mecanismos fundamentales aún no se conocen bien, un creciente cuerpo de evidencia apunta hacia las especies reactivas de oxígeno (ROS) como uno de los principales determinantes del envejecimiento. La "teoría del estrés oxidativo" sostiene que una acumulación progresiva e irreversible del daño oxidativo causado por ROS impacta en aspectos críticos del proceso de envejecimiento y contribuye a una función fisiológica deteriorada, una mayor incidencia de enfermedades y una reducción en la vida útil. Si bien no está claro si las especies reactivas derivadas de las moléculas de oxígeno son la causa principal del envejecimiento en las especies de mamíferos, existe una evidencia sustancial de una variedad de especies que demuestran que el daño oxidativo *in vivo* está altamente correlacionado con el envejecimiento biológico⁴⁶.

3. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es cualquier sustancia que a baja concentración retrasa la oxidación de proteínas, carbohidratos, lípidos y ADN⁴⁷.

3.1. Sistema de defensa antioxidante

El sistema de defensa antioxidante tiene el objetivo principal de mantener el proceso oxidativo dentro de los límites fisiológicos y sujeto a regulación evitando que el daño oxidativo se propague, culminando en un daño irreparable sistémico. El sistema de defensa antioxidante de primera línea incluye enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx); y a minerales como Se, Cu, Zn, etc. Estas enzimas actúan a través de mecanismos de prevención y/o control de la

formación de radicales libres y especies no radicales, involucradas con el inicio de reacciones en cadena que culminan en la propagación y la amplificación del proceso y, en consecuencia, la aparición de daño oxidativo. Las enzimas CAT y GPx actúan con el mismo propósito, para prevenir la acumulación de peróxido de hidrógeno. Tal acción integrada es de gran importancia, ya que esta especie reactiva a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, con la participación de metales de hierro y cobre, culmina en la generación de radicales $\text{OH}\cdot$ contra los cuales no hay defensa del sistema enzimático. La segunda línea de defensa antioxidante incluye al glutatión (GSH), vitamina C, albúmina, vitamina E, carotenoides, flavonoides, etc. La tercera línea de defensa antioxidante incluye un complejo grupo de enzimas para la reparación de ADN dañado, proteínas dañadas, lípidos oxidados y peróxidos. Ejemplos: lipasa, proteasa, enzimas reparadoras de ADN, transferasas, metionina sulfóxido reductasa, etc⁴⁸.

Existe un componente celular conservado para la respuesta al estrés oxidativo, que está constituido por más de 100 genes responsables de la desintoxicación y la producción de proteínas antioxidantes. La primera línea de defensa antioxidante contra las toxinas exógenas incluye las enzimas involucradas en el metabolismo de las fases I y II. El Cit-P450 es una superfamilia de enzimas hemo-tioladas con más de 2000 miembros. Las enzimas del Cit-P450 que pertenecen a las familias 1, 2 y 3 son responsables de metabolizar hasta el 90% de los medicamentos⁴⁸.

El glutatión es el principal tampón redox de tiol celular en las células y se sintetiza en el citosol a partir de L-glutamato, L-cisteína y glicina. El glutatión reducido participa en una gran cantidad de reacciones desintoxicantes que forman disulfuro de glutatión, que se convierte de nuevo en glutatión reducido por la acción de la glutatión reductasa a expensas de NADPH ²³.

3.2. Tipos de antioxidantes

3.2.1. Antioxidantes naturales

3.2.1.1. Antioxidantes enzimáticos

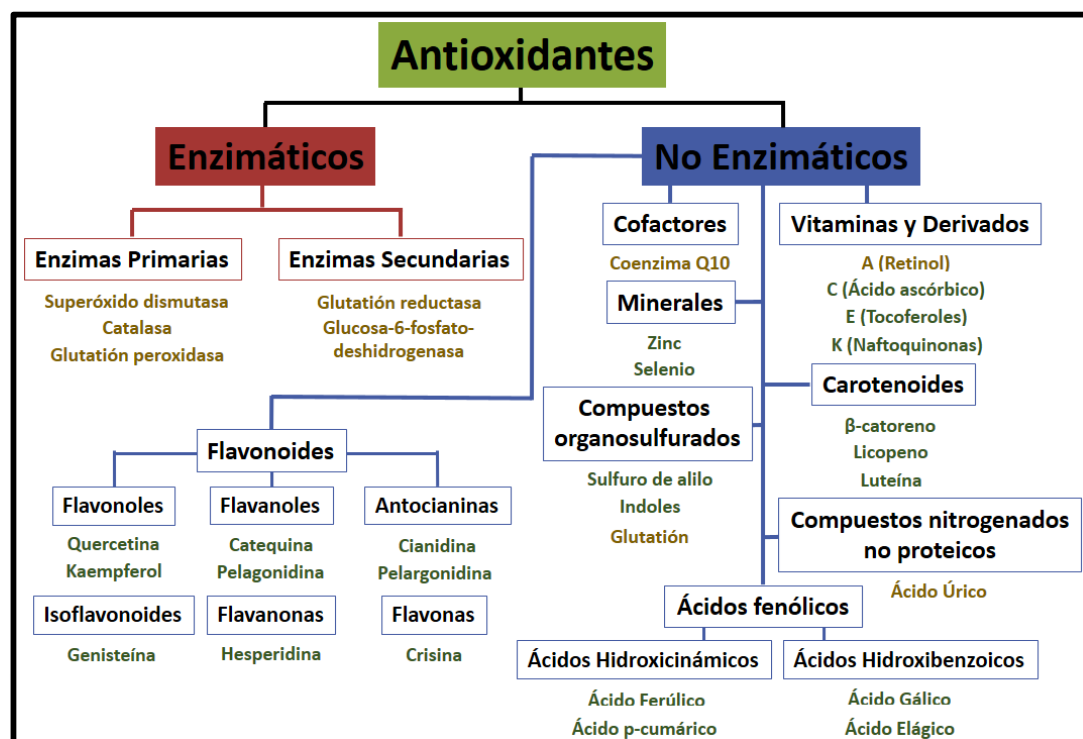


Fig. 5 Antioxidantes naturales separados en clases. Las palabras verdes representan antioxidantes exógenos, mientras que las amarillas representan antioxidantes endógenos⁴⁹.

El sistema antioxidante humano se divide en dos grupos principales, antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos (**Fig. 5**). En cuanto a los antioxidantes enzimáticos, se dividen en defensas enzimáticas primarias y secundarias. Con respecto a la defensa primaria, se compone de tres enzimas importantes que evitan la formación o neutralizan los radicales libres: glutación peroxidasa, que dona dos electrones para reducir los peróxidos formando selenoles y también elimina los peróxidos como sustrato potencial para la reacción de Fenton; catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular y tiene una de las mayores tasas de rotación conocidas por el hombre, permitiendo que solo una molécula de catalasa convierta 6 mil millones de moléculas de peróxido de hidrógeno; y finalmente, la superóxido dismutasa convierte los aniones

superóxido en peróxido de hidrógeno como un sustrato para la catalasa. La defensa enzimática secundaria incluye glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La glutatión reductasa reduce el glutatión (antioxidante) de su forma oxidada a su forma reducida, recicándolo para continuar neutralizando más radicales libres. Estas dos enzimas no neutralizan los radicales libres directamente, pero tienen papeles de apoyo para los otros antioxidantes endógenos⁴⁹.

3.2.1.2. Antioxidantes no enzimáticos endógenos

La vitamina A o retinol es un carotenoide producido en el hígado y resulta de la descomposición del β -caroteno. Hay alrededor de una docena de formas de vitamina A que pueden aislarse. Se sabe que tiene un impacto beneficioso en la piel, los ojos y los órganos internos. Lo que confiere la actividad antioxidante es la capacidad de combinarse con radicales peroxilo antes de que propaguen la peroxidación a los lípidos⁵⁰.

La coenzima Q10 está presente en todas las células y membranas; Desempeña un papel importante en la cadena respiratoria y en otros metabolismos celulares. La coenzima Q10 actúa evitando la formación de radicales peroxilo lipídicos, aunque se ha informado que esta coenzima puede neutralizar estos radicales incluso después de su formación. Otra función importante es la capacidad de regenerar la vitamina E⁵¹.

El ácido úrico previene la sobreproducción de oxidantes oxo-hem que resultan de la reacción de la hemoglobina con peróxidos. Por otro lado, también previene la lisis de los eritrocitos por peroxidación y es un potente eliminador de oxígeno singlete y radicales hidroxilo⁵².

El glutatión (GSH) es un tripéptido (γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina) endógeno que protege las células contra los radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno o un electrón. Es el antioxidante más importante de bajo peso molecular sintetizado en las células. El grupo sulfhídrido (-SH) de la cisteína está involucrado en reacciones de reducción y conjugación que generalmente se consideran las funciones más importantes del GSH. Estas reacciones proporcionan los medios para la eliminación de peróxidos y muchos compuestos xenobióticos⁵³.

3.2.1.3. Antioxidantes no enzimáticos exógenos

A pesar de su notable eficiencia, el sistema antioxidante endógeno no es suficiente, y los humanos dependen de varios tipos de antioxidantes que están presentes en la dieta para mantener las concentraciones de radicales libres en niveles bajos⁴⁹.

Las vitaminas C y E son nombres genéricos para el ácido ascórbico y los tocoferoles. El ácido ascórbico incluye dos compuestos con actividad antioxidante: el ácido L-ascórbico y el ácido L-deshidroascórbico que se absorben a través del tracto gastrointestinal y se pueden intercambiar enzimáticamente *in vivo*. El ácido ascórbico es eficaz para eliminar el anión radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el oxígeno singlete y el óxido de nitrógeno reactivo. La vitamina E se compone de ocho isoformas, con cuatro tocoferoles (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol) y cuatro tocotrienoles (α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol y δ -tocotrienol). El α -tocoferol es la isoforma más potente y abundante en los sistemas biológicos. La vitamina E detiene la peroxidación lipídica al donar su hidrógeno fenólico a los radicales peroxilo formando radicales tocoferoxilo que, a pesar de ser también radicales, no reaccionan y no pueden continuar la reacción en cadena oxidativa. La vitamina E es el único antioxidante que es soluble en lípidos y rompe cadenas; y se encuentra en el plasma, los glóbulos rojos y los tejidos, lo que le permite proteger la integridad de las estructuras lipídicas, principalmente las membranas⁵⁴.

La vitamina K es un grupo de compuestos liposolubles, esenciales para la conversión postraducciona de glutamatos unidos a proteínas en γ -carboxiglutamatos en diversas proteínas diana. La estructura de 1,4-naftoquinona de estas vitaminas confiere el efecto protector antioxidante. Las dos isoformas naturales de esta vitamina son K₁ y K₂⁵⁵.

Los flavonoides son un grupo antioxidante de compuestos integrado por flavonoles, flavanoles, antocianinas, isoflavonoides, flavanonas y flavonas. Las propiedades antioxidantes se confieren a los flavonoides por los grupos hidroxilo fenólicos unidos a las estructuras del anillo y pueden actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, extintores de oxígeno singlete, eliminadores de radicales superóxido e incluso como quelantes de metales. También activan

enzimas antioxidantes, reducen los radicales α -tocoferol (tocoferoxilos), inhiben las oxidasas y aumentan los niveles de ácido úrico y moléculas de bajo peso molecular. Algunos de los flavonoides más importantes son catequina, galato de catequina, quercetina y kaempferol⁵⁶.

Los ácidos fenólicos están compuestos de ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos. Son ubicuos para el material vegetal y a veces se presentan como ésteres y glucósidos. Tienen actividad antioxidante como quelantes y eliminadores de radicales libres con un impacto especial sobre los radicales hidroxilo, peroxilo y aniones superóxido. Uno de los compuestos más estudiados y prometedores en el grupo hidroxibenzoico es el ácido gálico, que también es el precursor de muchos taninos, mientras que el ácido cinámico es el precursor de todos los ácidos hidroxicinámicos⁵⁷.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales que son sintetizados por plantas y microorganismos, pero no por animales. Se pueden separar en dos grandes grupos: los hidrocarburos carotenoides conocidos como los carotenos que contienen grupos terminales específicos como el licopeno y el β -caroteno; y los carotenoides oxigenados conocidos como xantofilas, como la zeaxantina y la luteína. La principal propiedad antioxidante de los carotenoides se debe al extinguimiento del oxígeno singlete, que produce carotenoides excitados que disipan la energía recién adquirida a través de una serie de interacciones rotacionales y vibratorias con el solvente, volviendo así al estado no excitado y permitiéndoles apagar especies más radicales. Esto puede ocurrir mientras los carotenoides tienen enlaces dobles conjugados dentro. Los únicos radicales libres que destruyen completamente estos pigmentos son los radicales peroxilo⁵⁸.

Los minerales solo se encuentran en pequeñas cantidades en los animales y son una pequeña proporción de antioxidantes en la dieta, pero juegan un papel importante en su metabolismo. En cuanto a la actividad antioxidante, los minerales más importantes son el selenio y el zinc. El selenio se puede encontrar tanto en formas orgánicas (selenocisteína y selenometionina) como inorgánicas (selenita) en el cuerpo humano. No actúa directamente sobre los radicales libres, pero es una parte indispensable de la mayoría de las enzimas antioxidantes (metaloenzimas, glutatión peroxidasa, tioredoxina reductasa) que no tendrían ningún efecto sin ella.

El zinc es un mineral que es esencial para diversas vías en el metabolismo. Al igual que el selenio, no ataca directamente a los radicales libres, pero es bastante importante en la prevención de su formación. El zinc induce la producción de metalotioneína que es un eliminador del radical hidroxilo. Finalmente, el zinc también compite con el cobre para unirse a la pared celular, disminuyendo así una vez más la producción de radicales hidroxilo⁵⁹.

3.2.2. Antioxidantes sintéticos

Para tener un sistema estándar de medición de la actividad antioxidante para comparar con los antioxidantes naturales e incorporarlo a los alimentos, se han desarrollado antioxidantes sintéticos. Estos compuestos puros se agregan a los alimentos para que puedan soportar diversos tratamientos y condiciones, así como para prolongar la vida útil. El objetivo principal de los antioxidantes sintéticos es la prevención de la oxidación de los alimentos, especialmente los ácidos grasos. Hoy en día, casi todos los alimentos procesados tienen antioxidantes sintéticos incorporados, que según los informes son seguros, aunque algunos estudios indican lo contrario. El hidroxitolueno butilado (BHT) y el hidroxianisol butilado (BHA) son los antioxidantes químicos más utilizados. La terc-butilhidroquinona (TBHQ) estabiliza y preserva la frescura, el valor nutritivo, el sabor y el color de los productos alimenticios para animales. El galato de octilo se considera seguro para usar como aditivo alimentario porque después del consumo se hidroliza en ácido gálico y octanol, que se encuentran en muchas plantas y no representan una amenaza para la salud humana⁴⁹.

3.2.3. Prooxidantes

Los antioxidantes juegan un papel vital en las vías metabólicas y protegen las células, pero recientemente la evidencia conflictiva ha obligado a la comunidad académica a profundizar en el papel de los antioxidantes y prooxidantes. Estos últimos se definen como sustancias químicas que inducen estrés oxidativo, generalmente a través de la formación de especies reactivas o mediante la inhibición de los sistemas antioxidantes. Los radicales libres se consideran prooxidantes, pero sorprendentemente, los antioxidantes también pueden tener un comportamiento prooxidante⁴⁹.

La vitamina C se considera un antioxidante potente e interviene en muchas reacciones fisiológicas, pero también puede convertirse en un prooxidante. Esto sucede cuando se combina con hierro y cobre reduciendo Fe^{3+} a Fe^{2+} (o Cu^{3+} a Cu^{2+}), lo que a su vez reduce el peróxido de hidrógeno a radicales hidroxilo. También se sabe que el α -tocoferol es un antioxidante útil y poderoso, pero en altas concentraciones puede convertirse en un prooxidante debido a su mecanismo antioxidante. Cuando reacciona con un radical libre, se convierte en un radical, y si no hay suficiente ácido ascórbico para su regeneración permanecerá en este estado altamente reactivo y promoverá la autooxidación del ácido linoleico⁴⁹.

3.3. Plantas como fuente potencial de antioxidantes

La naturaleza es siempre una fuente importante y rica de innumerables ingredientes que pueden servirse como agentes promotores de la salud. Muchas de estas fuentes naturales incluyen frutas, verduras, hierbas, especias y hongos comestibles usados habitualmente que pueden ser parte de una dieta de rutina. Además de eso, hay una gran lista de plantas medicinales que tienen un gran potencial para mejorar la salud. Uno de los efectos más beneficiosos de estas fuentes naturales se debe a sus posibles propiedades antioxidantes. En cuanto a la capacidad antioxidante, los investigadores han centrado sus estudios para explorar las fuentes más potenciales junto con sus ingredientes activos. Los investigadores han agregado algunas fuentes marinas como algas y pastos marinos también en la lista de estas fuentes naturales⁶⁰.

Los antioxidantes exógenos se derivan principalmente de alimentos y plantas medicinales, como frutas, verduras, cereales, champiñones, bebidas, flores, especias y hierbas medicinales tradicionales. Además, las industrias que procesan subproductos agrícolas también son fuentes potencialmente importantes de antioxidantes naturales. Estos antioxidantes naturales de materiales vegetales son principalmente polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, lignanos y estilbenos), carotenoides (xantofilas y carotenos) y vitaminas (vitamina E y C)⁶⁰.

3.4. Métodos para determinar el efecto antioxidante

La actividad antioxidante no debe concluirse con base en un solo modelo de prueba antioxidante. Y en la práctica se llevan a cabo varios procedimientos de prueba *in vitro* para evaluar las actividades antioxidantes con las muestras de interés. En la Tabla N°1 se señalan los métodos *in vitro* para determinar el efecto antioxidante según el modo de reacción⁶¹.

Tabla N° 1 Tipos de métodos *in vitro* para la determinación del efecto antioxidante⁶¹.

Tipo de Método	Ensayo
Método de acuerdo a la transferencia de átomos de hidrogeno (HAT)	Capacidad de absorción del radical de oxígeno (ORAC)
	Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)
	Inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)
	Inhibición de la oxidación de ácido linoleico
Método de acuerdo a la transferencia de un solo electrón (SET)	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)
	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)
	N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)
	Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)
	Poder de reducción antioxidante de hierro (FRAP)

3.4.1. Método DPPH

El ensayo de eliminación de radicales 1,1-difenil-2-picrilidracilo (DPPH) fue descrito por primera vez en 1958 por Blois⁶² y luego fue modificado ligeramente por numerosos investigadores. Es uno de los ensayos antioxidantes más utilizados para muestras de plantas. DPPH es un radical libre estable que reacciona con compuestos que pueden donar un átomo de hidrógeno. Este método se basa en la eliminación de DPPH mediante la adición de una especie radical o un antioxidante que decolora la solución de DPPH (**Fig. 6**). La actividad antioxidante se mide luego por la disminución de la absorción cercana a 515 nm. En este método, se prepara una solución de DPPH en metanol, y se agrega esta solución a la muestra diluida en metanol. Minutos después, se mide la absorbancia a aproximadamente 515 nm. Una gran disminución en la absorbancia de la mezcla de reacción indica una significativa actividad de eliminación de radicales libres del compuesto o elevada actividad antioxidante⁶³.

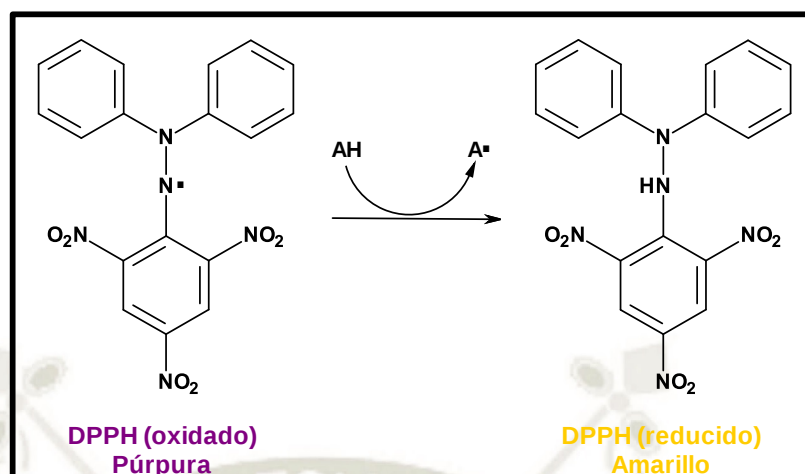


Fig. 6 Principio del método DPPH⁶³.

3.4.2. Método de Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar el contenido total de fenoles. La muestra se mezcla con el reactivo Folin-Ciocalteu previamente diluido con agua ultrapura. Se deja reposar la solución durante un determinado tiempo a temperatura ambiente antes de agregar una solución saturada de carbonato de sodio. Se deja reposar la solución mezclada durante varios minutos antes de medir la absorbancia a 760 nm. El ácido gálico se utiliza como estándar para la curva de calibración. El contenido total de compuestos fenólicos se expresa como equivalentes de ácido gálico mM (GAE) por litro de muestra (mM/L)⁶⁴.

3.4.3. Método DCPIP

El ácido ascórbico (vitamina C) puede ser determinado químicamente en el laboratorio basándose en su fuerte capacidad reductora. La cuantificación de vitamina C en el alimento es dada por la cantidad de ácido L- dehidroascórbico. El método volumétrico recomendado por la AOAC es la titulación con el indicador redox 2,6-diclorofenolindofenol (**Fig. 7**). El análisis implica la oxidación del ácido ascórbico con un colorante redox, como el 2,6-diclorofenolindofenol (azul en medio básico y rojo en medio ácido), el cual se reduce en presencia de un medio ácido⁶⁵.

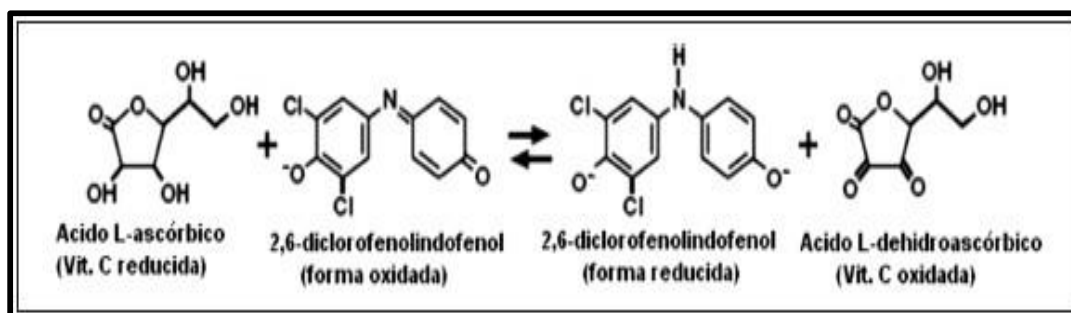


Fig. 7 Principio del método DCPIP⁶⁵.

4. LIOFILIZACIÓN

La liofilización es un proceso de secado en el que el agua se sublima del producto después de que se congela. Inicialmente se realiza una sublimación (secado primario) y luego una desorción (secado secundario). Es un proceso de secado aplicable a la fabricación de ciertos productos farmacéuticos y biológicos que son termolábiles o inestables en soluciones acuosas durante períodos prolongados de almacenamiento, pero que son estables en estado seco⁶¹.

El principio involucrado en la liofilización es un fenómeno llamado sublimación, donde el agua pasa directamente del estado sólido (hielo) al estado de vapor sin pasar por el estado líquido. La sublimación del agua puede tener lugar a presiones y temperaturas por debajo del punto triple, es decir, 4.579 mm de Hg y 0.0099 grados °C. El material a secar primero se congela y luego se somete a alto vacío al calor (por conducción o radiación o por ambos) de modo que el líquido congelado se sublima dejando solo componentes sólidos y secos del líquido original. El vacío acelera la sublimación. El gradiente de concentración de vapor de agua entre el frente de secado y el condensador es la fuerza impulsora para la eliminación de agua durante la liofilización. El principio de secado por congelación/sublimación se basa en este hecho físico⁶¹.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Investigación del Proyecto Mercurio Pabellón H-202, de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

2. MATERIALES

2.1. Material Vegetal

- *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”

2.2. Material de Laboratorio

- Fiolas 2, 5, 10, 25 mL
- Pipetas graduadas de 1,2,5 y 10 mL
- Frascos ámbar
- Beakers de 10, 50 y 100 mL
- Embudos pesa muestra
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Bagueta
- Tubos Falcon
- Micropipetas 20 - 200 μ L
- Micropipetas 100 - 1000 μ L
- Micropipetas 25 - 250 μ L
- Propipetas
- Tubos Falcon
- Gradilla para tubos de ensayo
- Tips para micropipetas
- Papel Aluminio
- Espátula
- Papel filtro

2.3. Reactivos

- Etanol 96 % ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$) (DIPROQUIM)
- Reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) P.A.(Calbiochem)
- Reactivo Trolox P.A. (Calbiochem)
- Carbonato de Sodio P.A. (Na_2CO_3)
- Ácido Gálico P.A. ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$)
- Reactivo de Folin Ciocalteu P.A. (Merck)
- Ácido Ascórbico P.A($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Sigma)
- Ácido Metafosforico P.A (HPO_3)
- Ácido Acético P.A ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)
- 2,6-Diclorofenolindofenol ($\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Cl}_2\text{NNaO}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
- Agua Destilada (H_2O)

2.4. Equipos

- Liofilizador modelo Triad “LABCONCO”
- Balanza analítica Sartorius
- Sonicador (Branson 2510 – E)
- Espectrofotómetro (CARY60 UV – VIS, Agilent Technologies)
- Centrífuga (Hettich zentrifugen EBA20)
- Microcelda de cuarzo (90 μL)

3. MÉTODOS

3.1. Recolección del Fruto

Se realizó en el mes de abril del 2019 en el distrito la Joya, provincia de Arequipa, departamento de Arequipa. Los criterios de inclusión para su selección fueron: consistencia firme, color, peso aproximado de 200 g. Adquiriéndose 1 Kg de cada fruto de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” que fueron almacenados a una temperatura de 4 °C hasta su liofilización.

3.2. Liofilización

Los frutos de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” se lavaron, pelaron y licuaron. Se procedió a colocar los licuados en frascos ámbar, a cada frasco se le llenó 5 mL del licuado, y se trasladaron a la bandeja del liofilizador modelo Triad “LABCONCO” en el laboratorio H -203 de la UCSM. Como se observa en el anexo I y II.

Los frutos liofilizados fueron colocados en bolsas de propileno con cierre hermético agregando bolsas de silica gel para evitar la humedad, estos fueron almacenados a una temperatura de 4° C hasta su uso. Las condiciones experimentales de liofilización se presentan en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2 Condiciones de liofilización de las muestras

Proceso	Rampa	Temperatura	Tiempo
Pre freeze	-	-	8 horas
Seg. 1	0.50 °C / min	-25 °C	10 horas
Seg. 2	0.50 °C / min	-5 °C	12 horas
Seg. 3	0.50 °C / min	15 °C	9 hora

Fuente: Elaboración propia

3.3. Preparación de los Extractos

Se pesó 1 g de muestra de cada uno de los frutos liofilizados, se colocó en un tubo Falcon, se agregó 3 mL de etanol al 96 %, se procedió a sonicar por 15 min y luego se centrifugó a 5000 RPM X 10 min, se separó el sobrenadante en una fiola de 10 mL, se repitió este proceso 3 veces recolectando los 3 sobrenadantes y finalmente se enrasó a 10 mL con etanol al 96 % para luego poder realizar los análisis de DPPH, compuestos fenólicos totales. Para el análisis del ácido ascórbico se cambió etanol al 96 % por solución acética metafosfórica. Como se observa en el anexo III.

3.4. Determinación de la Capacidad Antioxidante

Para la determinación de la capacidad antioxidante del fruto *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” se utilizó el método espectrofotométrico: DPPH. Como se observa en el anexo IV.

3.4.1. Método DPPH

Este método se basa en la eliminación de DPPH mediante la adición de una especie radical o un antioxidante que decolora la solución de DPPH. La actividad antioxidante se mide luego por la disminución de la absorción cercana a 515 nm. En este método, se prepara una solución de DPPH en metanol, y se agrega esta solución a la muestra diluida en metanol. Minutos después, se mide la absorbancia a aproximadamente 515 nm⁵⁷.

Una gran disminución en la absorbancia de la mezcla de reacción indica una significativa actividad de eliminación de radicales libres del compuesto o elevada actividad antioxidante⁶³. El tiempo estimado para que se dé la reacción es de 30 minutos a oscuridad, posteriormente se lee su absorbancia a 515 nm.

3.4.1.1. Preparación del Radical DPPH

Se preparó una solución madre de DPPH con una concentración de 304 μM en etanol al 96 %, para ello se pesó 3 mg del reactivo DPPH y se enrasó en una fiola de 25 mL, protegiéndose de la luz.

3.4.1.2. Preparación de la solución Stock De Trolox

Se preparó una solución stock de trolox con una concentración de 1598 μM en etanol al 96 %, para ello se pesó 4 mg del reactivo y se enrasó en una fiola de 10 mL. A partir de la solución stock se prepararon estándares de trolox de 20-100 μM en fiolas de 2 mL como se presenta en la Tabla N° 3.

Tabla N° 3 Preparación de estándares de trolox para el método DPPH.

Estándar	Vol. de solución Stock Trolox (μL)	Concentración (μM)
1	25	20
2	50	40
3	75	60
4	100	80
5	125	100

Fuente: Elaboración propia

3.4.1.3. Preparación para la Curva de Calibración

Se preparó 5 patrones en fioas de 5 mL agregando 1.2 mL de estándares preparados a partir de la solución stock de trolox, 1.5 mL de radical DPPH y enrasando con etanol 96 % hasta 5 mL como se presenta en la Tabla N° 4, se dejó reposar a oscuridad por 30 min y luego se procedió a leer a una longitud de onda de 515 nm en el espectrofotómetro.

Tabla N° 4 Preparación para la curva de calibración DPPH

Patrones	Concentración (μM)	Estándares (mL)	DPPH (mL)	Etanol (mL)
1	20	1.2	1.5	2.3
2	40	1.2	1.5	2.3
3	60	1.2	1.5	2.3
4	80	1.2	1.5	2.3
5	100	1.2	1.5	2.3
Blanco 1	-	-	2.5	2.5
Blanco 2	-	-	-	5

Fuente: Elaboración propia

Preparación de las muestras, se trató las muestras de los extractos de la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” obtenidos mediante sonicación como se describe en el apartado 3.3. Se preparó las muestras por triplicado para cada fruto liofilizado agregando 200 uL de extracto, 1.5 mL DPPH y se enrasó a 5 mL con etanol 96 %.

3.5. Compuestos Fenólicos Totales

Para la determinación de los compuestos fenólicos totales del fruto *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” se utilizó el método colorimétrico: Folin Ciocalteu.

3.5.1. Método Folin Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar el contenido total de fenoles. La muestra se mezcla con el reactivo Folin-Ciocalteu previamente diluido con agua ultrapura. Se deja reposar la solución durante un determinado tiempo a temperatura ambiente antes de agregar una solución saturada de carbonato de sodio. Se deja reposar la solución mezclada durante varios minutos antes de medir la absorbancia a 760 nm. El ácido gálico se utiliza como estándar para la curva de calibración⁵³.

3.5.1.1. Solución de Carbonato de Sodio

El carbonato de sodio se llevó a desecar a la mufla durante 24 hrs a una temperatura de 70 °C, posteriormente se preparó una solución al 20 % de carbonato de sodio anhidro, para ello se pesó 2 g de reactivo que posteriormente se pasó a una fiola 10 mL y se enrasó con H₂O destilada.

3.5.1.2. Solución Stock de Ácido Gálico

Se preparó una solución de 100 mg/L, para ello se pesó 2.5 mg de ácido gálico, el cual se disolvió en 1 mL de etanol al 96 % y se enrasó en una fiola de 25 mL con H₂O destilada. A partir de la solución madre se preparó 5 estándares a diferentes concentraciones entre 2 a 10 mg/L y se enrasó en fioles de 2 mL con H₂O destilada, como se presenta en la Tabla N° 5.

Tabla N° 5 Preparación de los estándares de ácido gálico

Concentración (mg/L)	Vol. de sol madre (μL)	Vol. Final (mL)
2	40	2
4	80	2
6	120	2
8	160	2
10	200	2

Fuente: Elaboración propia

3.5.1.3. Preparación para la Curva de Calibración

Se preparó 5 patrones en fioles de 2 mL, agregándose estándares a partir de la solución madre de ácido gálico, H₂O, reactivo Folin Ciocalteu y se dejó reposar durante 5 min en oscuridad, luego se agregó carbonato de sodio al 20 % y se enrasó a 2 mL con H₂O destilada, como se presenta en la Tabla N° 6. Se dejó reposar durante 2 hrs en oscuridad. Se centrifugó a 60 RPM durante 15 min y se procedió a leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

Tabla N° 6 Preparación para la curva de calibración de Folin Ciocalteu

Patrones	Concentración (mg/L)	Vol. de estándares (μL)	H₂O (μL)	Rx Folin Ciocalteu (μL)	Carbonato de Sodio 20 % (μL)
1	2	80	420	200	800
2	4	100	400	200	800
3	6	120	380	200	800
4	8	140	360	200	800
5	10	160	340	200	800
Blanco	0	0	1000	200	800

Fuente: Elaboración propia

Preparación de las muestras, se trató las muestras de los extractos de la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” obtenidos mediante sonicación como se describe en el apartado 3.3. Se preparó las muestras por triplicado para cada fruto liofilizado agregando 420 μL de H_2O , 200 μL de reactivo Folin Ciocalteu, carbonato de sodio 800 μL y el extracto 200 μL enrasando en fioles de 2 mL.

3.6. Evaluación de Ácido Ascórbico

Para la evaluación de ácido ascórbico del fruto *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” se utilizó el Método Volumétrico 2.6 diclorofenolindofenol.

3.6.1. Método Volumétrico 2.6 Diclorofenolindofenol

El ácido ascórbico (vitamina C) puede ser determinado químicamente en el laboratorio basándose en su fuerte capacidad reductora. La cuantificación de vitamina C en el alimento es dada por la cantidad de ácido L- dehidroascórbico. El análisis implica la oxidación del ácido ascórbico con un colorante redox como el 2,6-diclorofenolindofenol (azul en medio básico y rojo en medio ácido), el cual se reduce en presencia de un medio ácido⁶⁵.

3.6.2. Preparación del Reactivo 2.6 Diclorofenolindofenol

Se preparó el reactivo 2.6 diclorofenolindofenol a una concentración de 0.05 % para ello se pesó 50 mg del 2.6 diclorofenolindofenol, se enrasó en una fiola 100 ml con agua destilada y finalmente se filtró.

3.6.3. Preparación del Estándar de Ácido Ascórbico

Se preparó el estándar de ácido ascórbico con una concentración al 0.01 %, para ello se pesó 10 mg de ácido ascórbico el cual se enrasó en una fiola de 10 mL con una solución acética metafosfórica (ácido acético al 80 % y ácido metafosfórico al 2 %).

3.6.4. Determinación del ácido ascórbico

En un vaso de precipitado se colocó 2 mL del estándar de ácido ascórbico y se tituló con el reactivo 2.6 diclorofenolindofenol al 0.05 %, hasta que se obtuvo una

coloración rosada débil y persistente durante 5 segundos bajo agitación. Se realizó este proceso por triplicado.

Preparación de las muestras, se trató las muestras de los extractos de la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” obtenidos mediante sonicación como se describe en el apartado 3.3 cambiando etanol por solución acética metafosfórica. Se preparó las muestras por triplicado para cada fruto liofilizado colocando 2 mL de extracto en un vaso de precipitado más 2 mL de la solución acética metafosfórica, se tituló con 2.6 diclorofenolindofenol al 0.05 %, hasta que se obtuvo una coloración rosada débil y persistente durante 5 segundos bajo agitación.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RECOLECCIÓN DE LOS FRUTOS

Se recolectó frutos de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” (mostrados en la Figura 8) en el mes de abril del 2019 en el distrito la Joya, provincia de Arequipa, departamento de Arequipa. Los frutos recolectados tenían consistencia firme, color rojo, naranja y verde, con un peso aproximado de 200 g cada una, se adquirió 1 kg de *opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” que fueron almacenados a una temperatura de 4 °C hasta antes de su liofilización.



Fig. 8 Muestras de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” recolectadas, las cuales fueron lavadas para su posterior almacenamiento.

2. LIOFILIZACIÓN

Posterior al proceso de liofilización de las muestras de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” se observó que los frascos con el liofilizado se encontraron completamente cerrados y al pesar el frasco este tenía un peso menor al peso inicial antes de liofilizar, luego se abrió el frasco para verificar el estado de la muestra, el cual tenía un aspecto compacto de sabor dulce y con el color característico de cada variedad (rojo, naranja y verde).

En la Figura 9 se presenta la ecuación que define el cálculo de % de rendimiento de las muestras liofilizadas de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”.

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = 100 \times \frac{\text{Peso de muestra seca}}{\text{Peso de muestra fresca}}$$

Fig. 9 Cálculo del rendimiento de liofilización

En la Figura 10 se observan las muestras de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” colocadas en viales color ámbar, las cuales se encuentran dentro del liofilizador donde uno de los viales contiene el sensor de temperatura, el cual mide la temperatura en el que se encuentra la muestra.



Fig. 10 Muestras de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”. Muestras en el liofilizador.

En la Tabla N° 7 se presenta el valor promedio del peso de la muestra fresca y muestra seca de cada variedad de tuna, obteniendo el porcentaje de rendimiento para cada fruto, donde se observa que el % de rendimiento es bajo y similar para las tres variedades de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”, lo cual significa que los tres frutos tienen un alto contenido de agua.

Tabla N° 7 Valores considerados en la liofilización de tuna.

Muestra	Casos	Promedio Muestra Fresca (g)	Promedio Muestra Liofilizada (g)	% de Rendimiento
T. Roja	20	5.2655	0.7267	13.81 +/- 0.98
T. Naranja	20	5.1389	0.7140	13.96 +/-1.03
T. Verde	20	5.3389	0.7526	14.17 +/-0.74

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N° 8 se describe las características organolépticas del mesocarpio de los frutos de la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” liofilizada. Donde cada fruto mantenía su color, olor y sabor con un aspecto compacto por la eliminación de agua.

Tabla N° 8 Características organolépticas del mesocarpio de los frutos de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”.

Muestra	Color	Olor	Aspecto	Sabor
Tuna Roja	Roja	<i>Sui generis</i>	Compacto	Dulce
Tuna Naranja	Naranja	<i>Sui generis</i>	Compacto	Dulce
Tuna Verde	Verde	<i>Sui generis</i>	Compacto	Dulce

Fuente: Elaboración propia

Una vez terminado el estudio organoléptico de las muestras liofilizadas estas fueron conservadas en bolsas de propileno con cierre hermético a una temperatura de 4 °C, hasta su posterior uso.

3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se pesó 1g de muestra de cada uno de los frutos liofilizados, se colocó en un tubo Falcon, se agregó 3 mL de etanol al 96 %, se procedió a sonicar por 15 min y luego se centrifugó a 5000 RPM X 10 min, se separó el sobrenadante en una fiola de 10 mL, se repitió este proceso 3 veces recolectando los 3 sobrenadantes y finalmente se enrasó a 10 mL con etanol al 96 %.

Para los métodos DPPH y Folin Ciocalteu la extracción se realizó con etanol al 96 %. En el caso de la Determinación de ácido ascórbico la extracción se realizó con una solución acética metafosfórica.

4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

4.1. Método DPPH

Se preparó las soluciones de reactivos y estándares de calibración como está descrito en el apartado 3.4.1.1 y 3.4.1.2, cuyas concentraciones y absorbancias se presentan en la Tabla N° 9.

Tabla N° 9 Calibración del método DPPH con estándares de trolox

Concentración (μM)	Absorbancia			Promedio	DE	CV%
	Rep. 1	Rep.2	Rep.3			
20	0.9740	0.9734	0.9741	0.9738	0.0004	0.04
40	0.8673	0.8667	0.8665	0.8668	0.0004	0.05
60	0.7321	0.7316	0.7312	0.7316	0.0005	0.07
80	0.6465	0.6468	0.6468	0.6467	0.0002	0.03
100	0.5173	0.5177	0.5175	0.5175	0.0002	0.04

DE: Desviación estándar. CV %: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N° 9 se presentan los valores de absorbancia de la curva de calibración de trolox a 515 nm realizadas por triplicado, además de su desviación estándar y coeficiente de variación porcentual.



Fig. 11 Estándares de trolox.



Fig. 12 Patrones de trolox tratados con DPPH

En la Figura 11 se observa la solución stock de trolox que tiene una concentración de 1598 μM del cual se prepararon 5 estándares a diferentes concentraciones (20-100 μM). En la Figura 12 se observa los 5 patrones que fueron llevados al espectrofotómetro a una longitud de 515 nm dando las absorbancias de la curva de calibración de trolox.

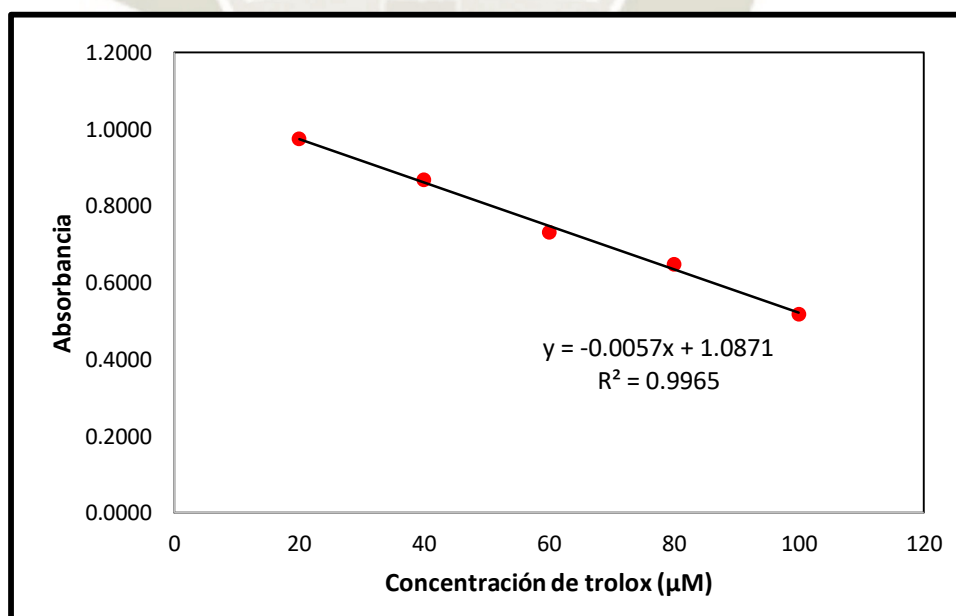


Fig. 13 Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por el método DPPH

En la Figura 13 se observa el grafico de calibración a partir de la concentración y la absorbancia promedio de los estándares de trolox, donde se observa una linealidad y un valor de R de 0.9965 cercano a la unidad, lo que indica una proporcionalidad entre la concentración de trolox y la absorbancia.

Una vez que se obtuvo la curva de calibración que demostró la linealidad y proporcionalidad de nuestro método se procedió a tratar las muestras de los extractos de la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” obtenidos mediante sonicación, como se describe en el apartado 3.3. De este modo se obtuvo lecturas de absorbancia y se interpoló la concentración de trolox utilizando la ecuación de regresión lineal mostrada en la Figura 13. Los datos respectivos para evaluar la capacidad antioxidante de la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” se presentan en la Tabla N° 10.

En la Tabla N° 10 se presenta las absorbancias de cada variedad de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”, con las cuales se logró obtener la concentración de cada una de ellas que están expresadas en μM de Trolox.

Tabla N° 10 Capacidad antioxidante de la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” por el método DPPH.

Muestra	Absorbancia			Promedio	DE	CV%	Concentración μM Trolox
	Rep.1	Rep.2	Rep.3				
T. Roja	0.7818	0.7870	0.7778	0.7822	0.0046	0.59	51.20
T. Naranja	0.8855	0.8621	0.8642	0.8706	0.0129	1.48	35.41
T. Verde	0.8780	0.8781	0.8777	0.8779	0.0002	0.02	34.11

DE: Desviación estándar. CV %: Coeficiente de variación porcentual

Fuente: Elaboración propia

En Tabla N° 11 se presenta la inhibición del radical DPPH el cual se realizó con un análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de DPPH de los estándares respecto a la concentración de los mismos, considerando como 100 % al blanco de absorbancia 1.6423.

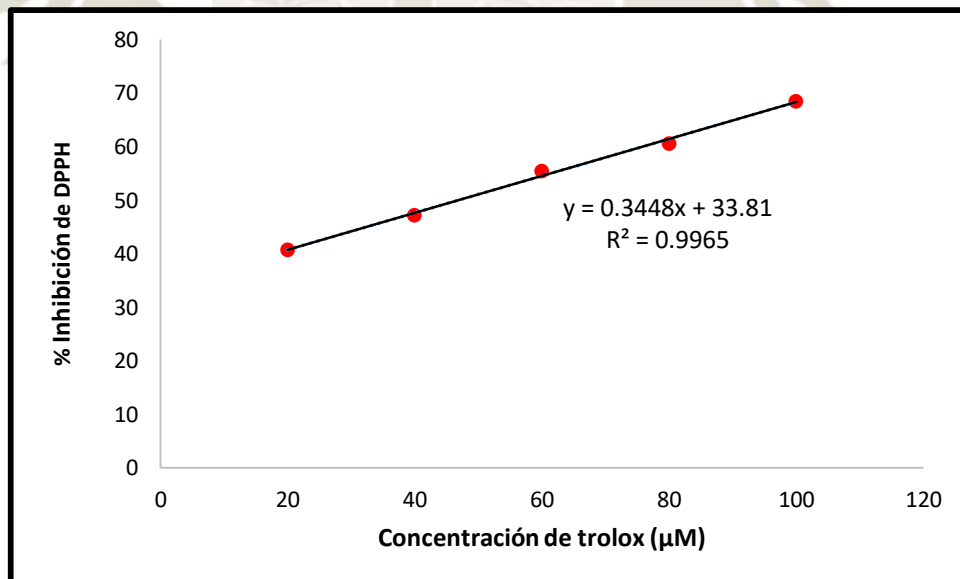
Tabla N° 11 Inhibición del radical DPPH

Concentración μM	Promedio de absorbancia	DE	% Inhibición DPPH
20	0.9738	0.0004	40.71
40	0.8668	0.0004	47.22
60	0.7316	0.0005	55.45
80	0.6467	0.0002	60.62
100	0.5175	0.0002	68.49
Abs. blanco		1.6423	

DE: Desviación estándar

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 14 se presenta el gráfico de calibración a partir de la concentración y el porcentaje de inhibición del radical DPPH de los estándares de trolox calculados.


Fig. 14 Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por inhibición de DPPH

En la Tabla N° 12 se presenta el porcentaje de inhibición del radical DPPH utilizando la ecuación de regresión lineal presentada en la Figura 14 donde se interpoló la concentración de trolox de las muestras de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”.

Tabla N° 12 Capacidad antioxidante de la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” por el método DPPH

Muestras	% Inhibición DPPH			Promedio	DE	CV%
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
T. Roja	52.40	52.08	52.64	52.37	0.28	0.53
T. Naranja	46.08	47.51	47.38	46.99	0.79	1.68
T. Verde	46.54	46.53	46.56	46.54	0.02	0.04

DE: Desviación estándar. CV %: Coeficiente de variación porcentual

Fuente: Elaboración propia

La capacidad antioxidante y porcentaje de inhibición del radical DPPH para la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” que se obtuvo fue: Para la tuna roja 51.20 μ M trolox (52.37 %), tuna naranja 35.41 μ M trolox (46.99 %) y tuna verde 34.11 μ M Trolox (46.54 %). Los cuales fueron expresados en mg TE/100 g de fruto liofilizado obteniéndose 1281.5 mg TE/100 g de fruto liofilizado para tuna roja, 886.3 mg TE/100 g de fruto liofilizado para tuna naranja y 853.7 mg TE/100 g de fruto liofilizado para tuna verde, que se muestran en la Tabla N° 17, donde la tuna roja tuvo mayor capacidad antioxidante que la tuna naranja y tuna verde por el método de DPPH.

Carrasco y colaboradores determinaron que la mayor capacidad antioxidante medida por el método del DPPH fue el de la papaya de monte (1936 ± 228 mg equivalente trolox/100 g de tejido); seguido por el tomate de árbol (853 ± 52 mg equivalente trolox/100 g de tejido); el aguaymanto (729 ± 98 mg equivalente trolox/100 g de tejido) y finalmente la tuna roja (482 ± 35 mg equivalente trolox/100 g de tejido)⁷⁶. Al comparar las concentraciones se puede observar que la tuna roja procedente de la Joya tiene mayor capacidad antioxidante que la tuna determinada por Repo y colaborador; también se puede observar que las tres variedades de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” procedentes de la Joya tienen una mayor capacidad antioxidante comparado con el aguaymanto determinado por Repo y colaborador.

Muñoz y colaboradores realizaron estudios de diferentes frutos con el método DPPH presentando para el camu-camu 2766.20 mg/100 g, tumbo serrano 1030.69 mg/100 g, guinda 129.65 mg/100 g, noni 87.10 mg/100 g, yacon 55.56 mg/100 g, carambola 20.02 mg/100 g, tomate de árbol 22.27 mg/100 g, aguaymanto 22.27 mg/100 g, tumbo costeño 1.25 mg/100 g⁷⁹. Al comparar las concentraciones se puede observar que las tres variedades de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” procedentes de la Joya tienen menor capacidad antioxidante comparado con el camu-camu, sin embargo, la tuna roja es mayor que el tumbo serrano y las tres variedades de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” procedentes de la Joya tienen mayor capacidad antioxidante comparado con la guinda, noni, yacon, carambola, tomate de árbol, aguaymanto y tumbo costeño.

5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

5.1. Método Folin Ciocalteu

Se preparó las soluciones estándar de ácido gálico como está descrito en el apartado 3.5.1.2, se utilizó el método de Folin Ciocalteu para evaluar las concentraciones de compuestos fenólicos de los cuales se obtuvieron las absorbancias que están mostradas en la Tabla N° 13.

En la Tabla N° 13 se presentan los valores de absorbancia de la curva de calibración de ácido gálico a 760 nm realizadas por triplicado, además de su desviación estándar y coeficiente de variación porcentual

Tabla N° 13 Calibración del método Folin Ciocalteu con estándares de ácido gálico

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Promedio	DE	CV %
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
2	0.1048	0.1046	0.1047	0.1047	0.0001	0.10
4	0.2687	0.2684	0.2686	0.2686	0.0002	0.07
6	0.4637	0.4629	0.4640	0.4635	0.0006	0.13
8	0.6833	0.6833	0.6841	0.6836	0.0005	0.07
10	0.8963	0.8975	0.8979	0.8972	0.0008	0.09

DE: Desviación estándar. CV %: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia



Fig. 15 Patrones de Ácido Gálico tratados con Folin Ciocalteu

En la Figura 15 se observa los 5 patrones que reposaron durante dos horas a oscuridad y fueron llevados al espectrofotómetro a una longitud de 760 nm dando las absorbancias de la curva de calibración de Ácido Gálico.

En la Figura 16 se observa el gráfico de calibración a partir de la concentración y la absorbancia promedio de los estándares de ácido gálico, donde se observa una linealidad y un valor de R de 0.9969 cercano a la unidad, lo que indica una proporcionalidad entre la concentración de ácido gálico y la absorbancia.

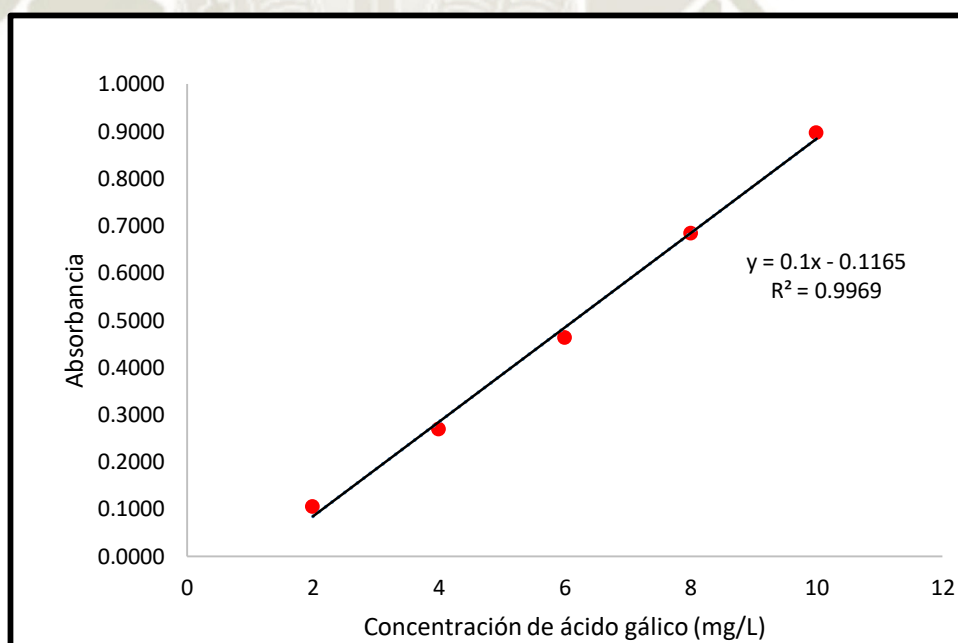


Fig. 16 Gráfico de calibración para compuestos fenólicos por el método Folin Ciocalteu.

Una vez que se obtuvo la curva de calibración que demostró la linealidad y proporcionalidad de nuestro método se procedió a tratar las muestras de los extractos de

Opuntia ficus indica “Tuna roja, naranja y verde” obtenidos mediante sonicación, como se describe en el apartado 3.3. De este modo se obtuvo lecturas de absorbancia y se interpoló a concentración de ácido gálico utilizando la ecuación de regresión lineal mostrada en la Figura 16. Los datos respectivos se presentan en la Tabla N° 14.

Tabla N° 14 Compuestos fenólicos de la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” por el método Folin Ciocalteu

Muestra	Absorbancia			Promedio	DE	CV%	Concentración mg/L
	Rep.1	Rep.2	Rep.3				
T. Roja	0.6035	0.6037	0.6063	0.6045	0.0016	0.26	7.06
T. Naranja	0.5755	0.5842	0.5873	0.5823	0.0061	1.05	6.83
T. Verde	0.4422	0.4415	0.4433	0.4423	0.0009	0.20	5.43

DE: Desviación estándar. CV %: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N° 14 se observa las absorbancias por triplicado para cada variedad de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”, hallando un promedio con el cual se logró obtener la concentración de cada variedad de tuna que se expresaron en mg/L de ácido gálico, al igual se halló la desviación estándar y coeficiente de variación porcentual.

La cantidad de compuestos fenólicos totales que contiene la muestra de tuna roja es de 7.06 mg/L, tuna naranja es de 6.83 mg/L y tuna verde es de 5.43 mg/L. Los resultados se expresaron en mg GAE /100 g de fruto liofilizado, obteniéndose 71 mg GAE /100 g de fruto liofilizado para tuna roja, 69 mg GAE /100 g de fruto liofilizado para la tuna naranja y 55 mg GAE/100 g de fruto liofilizado para la tuna verde, que se muestran en la Tabla N° 17 donde la mayor cantidad de compuestos fenólicos es de la tuna roja.

Galati et al. (2003) observaron valores de 74.6 mg de ácido gálico/100 g de jugo de tuna entera variedad siciliana. Por otro lado, Stintzing et al. (2005) obtuvieron valores de 24.2 ± 13.4 , 24.7 ± 23.1 , 33.5 ± 19.3 , 66 ± 35.8 mg ácido gálico/100 g de jugo de tuna verde, naranja, roja y morada, respectivamente⁷⁵. Al comparar las concentraciones se puede observar que la tuna roja procedente de la Joya tiene mayor cantidad de compuestos fenólicos en comparación a las variedades estudiadas por Stintzing et al. (2005).

Kuskoski y colaboradores realizaron estudios para compuestos fenólicos en pulpas de frutas del Brasil, mencionan la mora con 118 mg/100 g, uva 117 mg/100 g, guayaba 83 mg/100 g, fresa 132 mg/100 g, piña 21.7 mg/100 g, copoazu 20.5 mg/100 g, maracuyá 20 mg/100 g⁸⁰. Se puede observar que los compuestos fenólicos para las tres variedades de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” procedente de la Joya fueron mayores que la piña, copoazu y maracuyá, sin embargo fueron menores que la mora, uva, guayaba y fresa reportados por Kuskoski y colaboradores.

La universidad de Granada determinó los compuestos fenólicos para frutas tropicales no nacionales, obteniendo para la chirimoya 103.1 mg GA/g de fruta, aguacate 335.0 mg GA/g, kiwi 34.5 mg GA/g, mango 40.2 mg GA/g, papaya 24.5 mg GA/g, caqui 102.1 mg GA/g, carambola 116.9 mg GA/g⁸¹. Al comparar las concentraciones se puede observar que las tres variedades de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” son menores en compuestos fenólicos en comparación al aguacate, chirimoya, carambola y caqui teniendo valores superiores a los otros frutos.

Stintzing et al. (2005) y Carrasco y Encina (2008) concluyeron que el contenido de compuestos fenólicos está en función de la variedad de tuna y que estos son los principales responsables de la actividad antioxidante. Piga et al. (2003) informaron que el contenido de compuestos fenólicos disminuía en tuna mínimamente procesada almacenada en refrigeración y era probablemente debido a que tenía un efecto protector sobre la actividad antioxidante y el ácido ascórbico^{76, 77, 78}.

6. EVALUACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

6.1. Método Volumétrico 2.6 diclorofenolindofenol

Se preparó el estándar de ácido ascórbico como esta descrito en el apartado 3.6.3, cuya concentración y gastos se presentan en la Tabla N° 15.

Tabla N° 15 Titulación por el método 2.6 diclorofenolindofenol con estándar de ácido ascórbico.

Ácido Ascórbico 0.01%	Gasto de DCPIP 0.05%			Promedio	DE	CV%
	Rep.1	Rep.2	Rep.3			
2mL	15.8	16	16.2	16	0.2	1.25

DE: Desviación estándar. CV %: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia



Fig. 17 Titulación de ácido ascórbico con 2.6 DCPIP

En la Figura 17 se observa la titulación de ácido ascórbico con 2.6 DCPIP dando una coloración rosa débil persistente durante 5 segundos bajo agitación.

Una vez que se demostró la repetibilidad de nuestro método se procedió a tratar las muestras de los extractos de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” obtenidos por sonicación, como se describe en el apartado 2.3.3 reemplazando el etanol por solución acética metafosfórica. De este modo se obtuvo los siguientes gastos y se determinó la concentración de ácido ascórbico mostrados en la Tabla N° 16.

Ecuación 1: Cálculo para el contenido de ácido ascórbico en mg

$$X = \frac{\text{mL gastados x muestra} * 1 \text{ mg de Aa}}{\text{mL gastados x estandar}}$$

Dónde: X = Contenido de Áa (mg); Áa = Ácido ascórbico

Ecuación 2: Cálculo para el contenido de ácido ascórbico en mg/100 g

$$\text{Áa} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{X * V_a * 100}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

Dónde: V_a = volumen del aforo del extracto (mL)

Tabla N° 16 Contenido de ácido ascórbico en *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”

Muestra	Gasto de DCPIP 0.05% (mL)			Promedio	DE	CV%	Concentración mg/100 g de fruto
	Rep.1	Rep.2	Rep.3				
T. Roja	2.4	2.6	2.6	2.5	0.1155	4.62	31.25
T. Naranja	2.2	2.3	2.3	2.3	0.0577	2.51	28.75
T. Verde	1.9	1.9	2.0	1.9	0.0577	3.04	23.75

DE: Desviación estándar. CV %: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia

Los resultados para la cantidad de ácido ascórbico que contiene la muestra de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”, se expresaron en mg AAE/100 g de fruto liofilizado, obteniéndose 31.25 mg AAE /100 g de fruto liofilizado para tuna roja, 28.75 mg AAE /100 g de fruto liofilizado para la tuna naranja y 23.75 mg AAE/100g de fruto liofilizado para la tuna verde, que se muestran en la Tabla N° 17 donde la mayor cantidad de ácido ascórbico es de la tuna roja.

Carrasco y colaboradores determinaron en diferentes frutos que el mayor contenido de ácido ascórbico lo tuvo el aguaymanto (43.3 ± 0.5 mg ácido ascórbico/100 g muestra); seguido por la papaya de monte (31.41 ± 1.3 mg ácido ascórbico/100 g muestra); la tuna roja (22.75 ± 0.6 mg ácido ascórbico/100 g muestra) y finalmente el tomate de árbol

(16.09 $\pm$ 1.6 mg ácido ascórbico/100 g muestra)⁷⁶. Se puede observar que las tres variedades de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” son menores en vitamina C que el aguaymanto.

Estudios realizados en otros frutos por Kuskoski y colaboradores presentan equivalente a vitamina C (VCEAC) en mora 82.6 mg/100 g, uva 105.9 mg/100 g, guayaba 100.7 mg/100 g, fresa 132.8 mg/100 g, piña 41.1 mg/100 g, maracuyá 46.6 mg/ 100 g ⁸⁰; siendo estos frutos superiores en ácido ascórbico en comparación de los valores de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” procedentes de la Joya.

7. COMPARACIÓN GLOBAL

Tabla N° 17 Resumen de resultados

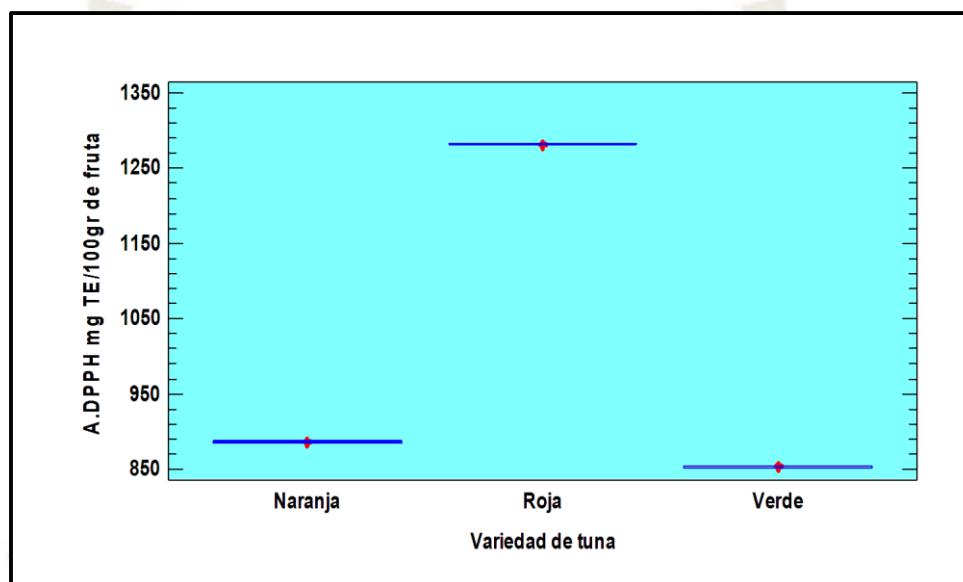
Variedad	Capacidad Antioxidante	Compuestos Fenólicos	Ácido Ascórbico
Muestras	DPPH (mg trolox /100 g)	Folin Ciocalteu (mg ácido gálico /100 g)	2.6 diclorofenolindofenol (mg ácido ascórbico /100 g)
T. Roja	1281.5	71	31.25
T. Naranja	886.3	69	28.75
T. Verde	853.7	55	23.75

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N° 17 se expresó los resultados de los análisis realizados en unidades de mg/100g de fruto liofilizado de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde”. Tales valores, contienen de modo resumido los resultados de los métodos para la determinación de la capacidad antioxidante DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) que fueron expresados en mg de trolox/100 g de fruto liofilizado, también la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin Ciocalteu, que se expresó en mg de ácido gálico/100 g de fruto liofilizado y finalmente la determinación del contenido de ácido ascórbico por el método volumétrico 2.6 diclorofenolindofenol, que se expresó en mg de ácido ascórbico /100 g de fruto liofilizado.

En la Figura 18 a través de un gráfico de Caja y Bigotes, se observa que la tuna roja tiene mayor capacidad antioxidante a comparación de la tuna naranja y verde con el método de DPPH, obteniendo en la tuna roja 1281.5 mg TE/ 100 g de fruto liofilizado, tuna naranja 886.3 mg TE/100 g de fruto liofilizado y tuna verde 853.7 mg TE/100 g de fruto que se muestran en la Tabla N° 17.

Fig. 18 Comparación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH entre Tuna roja, naranja y verde.



Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N° 18 los resultados de la capacidad antioxidante por el método DPPH en las tres variedades de tuna indican a través del ANOVA que las diferencias son altamente significativas ($p < 0.01$).

Tabla N° 18 ANOVA Capacidad Antioxidante por el método DPPH en las tres variedades de tuna.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	539.372	2	269.686	135.23	0
Intra grupos	11.9654	6	1.99423		
Total (Corr.)	551.337	8			

Fuente: Elaboración propia

Dado que en el test de ANOVA se encontró que había diferencia significativa entre los grupos se procedió a realizar el test de Tukey para demostrar cuál de los grupos son iguales o no iguales.

En la Tabla N° 19 el test de Tukey muestra que la tuna roja es la que presenta el mayor contenido de compuesto fenólicos alcanzando un promedio de 1281.5 mg TE/100 gr fruto liofilizado, la misma que difiere de la capacidad antioxidante alcanzada por las variedad naranja y verde que alcanzaron promedios de 853.7 y 886.3 mg TE/100 gr fruto liofilizado respectivamente.

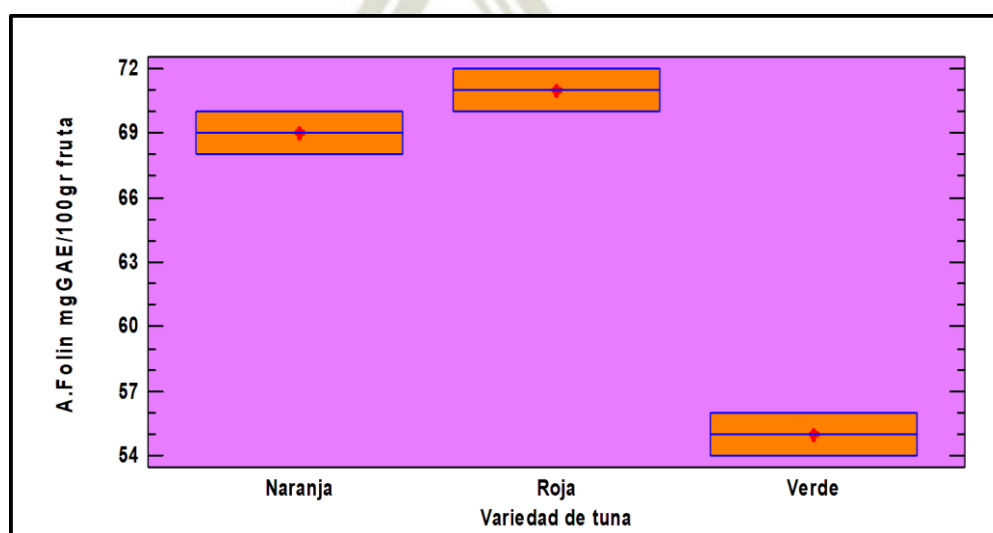
Tabla N° 19 Test Tukey para Capacidad Antioxidante en tres variedades de tuna

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Tuna roja	3	1281.5	B
Tuna naranja	3	886.3	A
Tuna verde	3	853.7	A

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 19 a través de un gráfico de Caja y Bigotes, se observa que la tuna roja tiene mayor contenido de compuestos fenólicos totales que la tuna naranja y verde con el método de Folin Ciocalteu, obteniendo en la tuna roja 71 mg GAE / 100 g, en la tuna naranja 69 mg GAE / 100 g y en la tuna verde 55 mg GAE / 100 g de fruta liofilizada que se muestran en la Tabla N° 17.

Fig. 19 Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Folin Ciocalteu entre Tuna roja, naranja y verde.



Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N° 20 con respecto a la evaluación de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu se encontró mediante el ANOVA que las diferencias entre las variedades de tuna para polifenoles son altamente significativas ($p < 0.01$).

Tabla N° 20 ANOVA Polifenoles Totales por el método de Folin Ciocalteu en las tres variedades de tuna.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.68934	2	2.34467	1710.24	0
Intra grupos	0.00822576	6	0.00137096		
Total (Corr.)	4.69757	8			

Fuente: Elaboración propia

Dado que en el test de ANOVA se encontró que había diferencia significativa entre los grupos se procedió a realizar el test de Tukey para demostrar cuál de los grupos son iguales o no iguales.

En la Tabla N° 21 mediante el Test de Tukey se encontró que la tuna variedad roja es la que presenta el mayor promedio en polifenoles con un valor de 71 mg GAE / 100 g de fruta liofilizada, en segundo lugar, se encontró a la variedad de tuna naranja con un promedio de 69 mg GAE / 100 g de fruta liofilizada y en tercer lugar se tiene a la tuna variedad verde cuyo promedio de polifenoles es de 55 mg GAE / 100 g de fruta liofilizada. Las diferencias en los polifenoles entre todas las variedades de tuna estudiadas son altamente significativas.

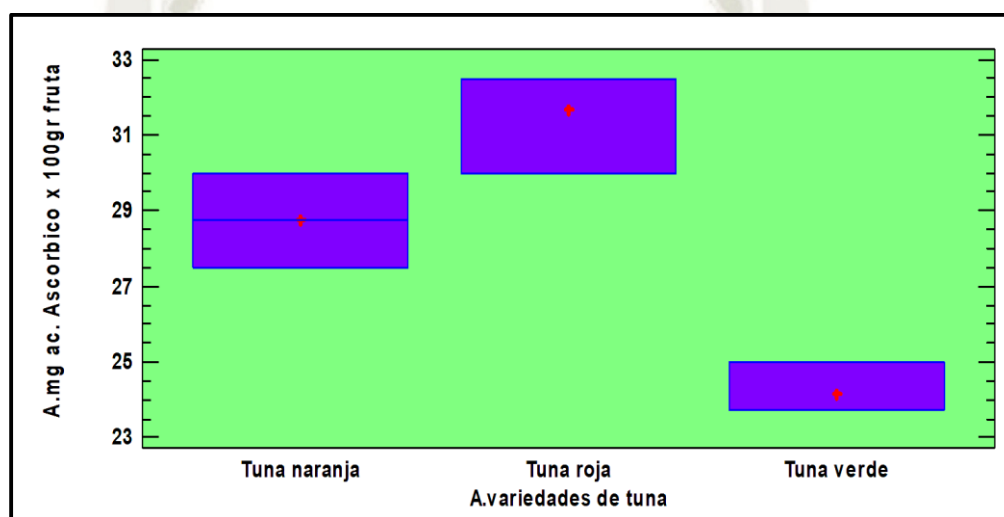
Tabla N° 21 Test Tukey para Polifenoles Totales en tres variedades de tuna

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T. roja	3	71	C
T. naranja	3	69	B
T. verde	3	55	A

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 20 a través de un gráfico de Caja y Bigotes, se observa que la tuna roja tiene mayor contenido de ácido ascórbico que la tuna naranja y verde con el método Volumétrico 2.6 DCPIP obteniendo en la tuna roja 31.25 mg A.A/ 100 g de fruto liofilizado, en la tuna naranja 28.75 mg A.A/ 100 g de fruto liofilizado y en la tuna verde 23.75 mg A.A/ 100 g de fruto liofilizado que se muestran en la Tabla N° 17.

Fig. 20 Comparación del contenido de ácido ascórbico por el método Volumétrico 2.6 DCPIP entre la Tuna roja, naranja y verde.



Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N° 22 los resultados de la evaluación de ácido ascórbico por el método 2.6 DCPIP en las tres variedades de tuna indican a través del ANOVA que las diferencias son altamente significativas ($p < 0.01$).

Tabla N° 22 ANOVA Ácido Ascórbico por el método 2.6 DCPIP en las tres variedades de tuna.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	85.7639	2	42.8819	30.88	0.0007
Intra grupos	8.33333	6	1.38889		
Total (Corr.)	94.0972	8			

Fuente: Elaboración propia

Dado que en el test de ANOVA se encontró que había diferencia significativa entre los grupos se procedió a realizar el test de Tukey para demostrar cuál de los grupos son iguales o no iguales.

En la Tabla N° 23 con la aplicación del Test de Tukey se puede revelar que en las variedades de tuna roja y naranja se encuentra los promedios más altos de ácido ascórbico con valores de 31.25 mg A.A/ 100 g y 28.75 mg A.A/ 100 g respectivamente, difiriendo con el promedio alcanzado en la variedad de tuna verde, la cual alcanzo un promedio de 23.75 mg A.A/ 100 g.

Tabla N° 23 Test Tukey para Ácido Ascórbico en tres variedades de tuna

Variedades de tuna	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Tuna Roja	3	31.25	B
Tuna Naranja	3	28.75	B
Tuna Verde	3	23.75	A

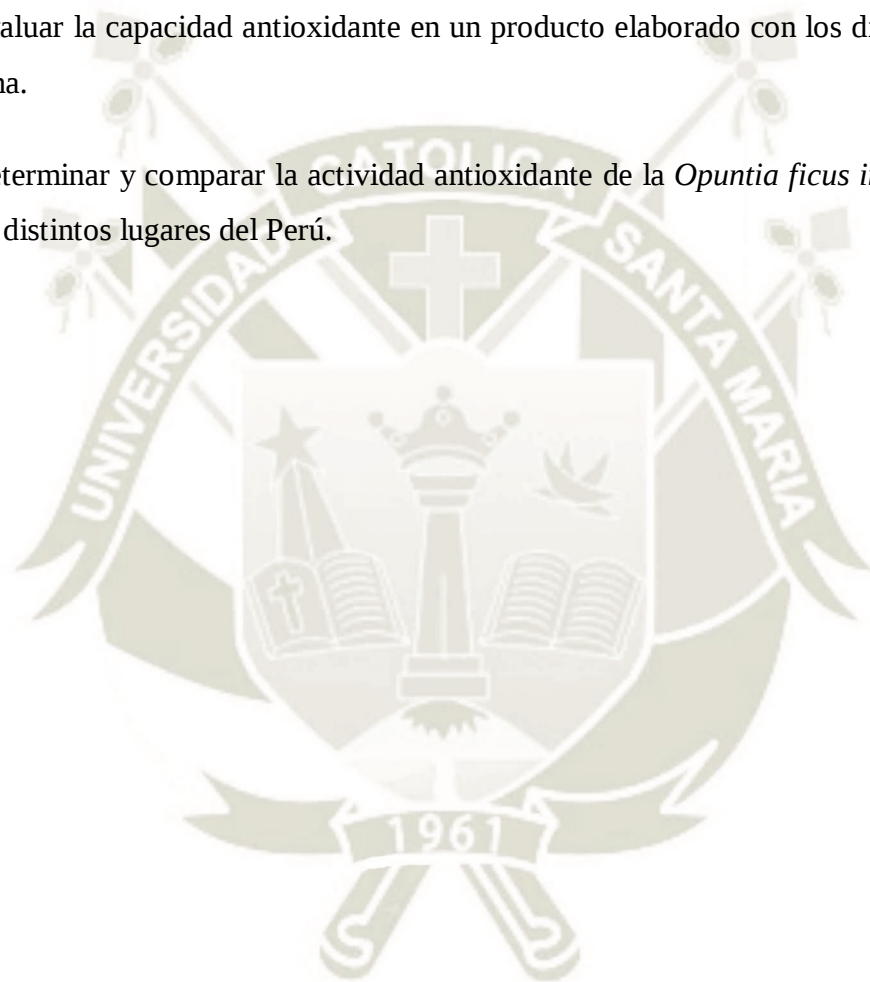
Fuente: Elaboración propia

CONCLUSIONES

1. Se determinó y comparó la capacidad antioxidante del extracto del fruto liofilizado de la *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” mediante el método DPPH. Obteniéndose la mayor capacidad antioxidante para la tuna roja con 1281.5 mg TE/100 g de fruto liofilizado a diferencia de la tuna naranja con 886.3 mg TE/100 g de fruto liofilizado y tuna verde con 853.7 mg TE/100 g de fruto liofilizado.
2. Se liofilizó el mesocarpio del fruto de *Opuntia ficus indica* “Tuna roja, naranja y verde” obteniendo un porcentaje de rendimiento de 13.8129 +/- 0.98 % para la tuna roja, 13.9629 +/- 1.03 % para la tuna naranja y 14.1699 +/- 0.74 % para la tuna verde. A partir de esta se logró obtener el extracto por sonicación utilizando etanol como solución extractora para los métodos DPPH y Folin Ciocalteu y solución acética metafosfórica para la determinación de ácido ascórbico.
3. Se determinó y comparó el contenido de compuestos fenólicos totales mediante el método Folin Ciocalteu y ácido ascórbico por el método volumétrico 2.6 DCPIP, obteniendo que la tuna roja tiene mayor contenido de compuestos fenolicos totales con 71 mg GAE /100 g de fruto liofilizado y un valor de 31.25 mg A.A/100 g de fruto liofilizado ácido ascórbico, concluyendo que la tuna roja tiene mayor contenido de compuestos fenólicos totales y ácido ascórbico en comparación con la tuna naranja y verde.

SUGERENCIAS

1. Comparar la actividad antioxidante, los compuestos fenólicos totales y el contenido de ácido ascórbico en distintos tiempos de cosecha de la *Opuntia ficus indica*.
2. Analizar la capacidad antioxidante en diferentes tiempos de almacenamiento.
3. Evaluar la capacidad antioxidante en un producto elaborado con los diferentes tipos de tuna.
4. Determinar y comparar la actividad antioxidante de la *Opuntia ficus indica* procedente de distintos lugares del Perú.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jiang Q. Free Radical Biology and Medicine Natural forms of vitamin E: metabolism , antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic Biol Med*. 2014;72:76–90.
2. Lee S, Ju E, Kim J. Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root. *Exp Mol Med*. 2001;33(4):263–8.
3. Mohammad S, Hashemi B, Brewer MS, Safari J, Nowroozi M. International Journal of Food Properties Antioxidant activity, reaction mechanisms and kinetics of *Matricaria recutita* extract in commercial blended oil oxidation. *Int J Food Prop*. 2015;19(2):37–41.
4. Aragona M, Lauriano ER, Pergolizzi S, Faggio C. *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as a source of bioactivity compounds for health and nutrition. *Nat Prod Res*. 2018;6419:1–13.
5. ITIS. *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller [Internet]. Integrated Taxonomic Information System. 2019. Available from: www.itis.gov
6. Lim T. *Opuntia ficus-indica*. In: *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Springer; 2012. p. 660–82.
7. Griffith M. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *Am J Bot*. 2004;91(11):1915–21.
8. Lee Y, Pyo Y, Ahn C, Kim S. Food functionality of *Opuntia ficus-indica* var. cultivated in Jeju Island. *Prev Nutr Food Sci*. 2005;10(1):103–10.
9. Novoa S. Sobre el Origen de la Tuna en el Perú, algunos alcances. *Zo Arid*. 2006;10:174–81.
10. Domínguez-López A. Revisión: Empleo de los frutos y de los cladodios de la chumbera (*Opuntia* spp.) en la alimentación humana. *Food Sci Technol Int*. 1995;1(2):65–74.
11. Russell CE, Felker P. The Prickly-pears (*Opuntia* spp., Cactaceae): A Source of Human and Animal Food in Semiarid Regions. *Econ Bot*. 1987;41(3):433–45.
12. Feugang J, Konarski P, Zou D, Stintzing F, Zou C. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci*. 2006;11(1):2574–89.
13. Cota-sánchez J. Nutritional Composition of the Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) Fruit. In: *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. Elsevier; 2016. p. 691–712.
14. Shedbalkar U, Adki V, Jadhav J, Bapat V. *Opuntia* and Other Cacti: Applications and

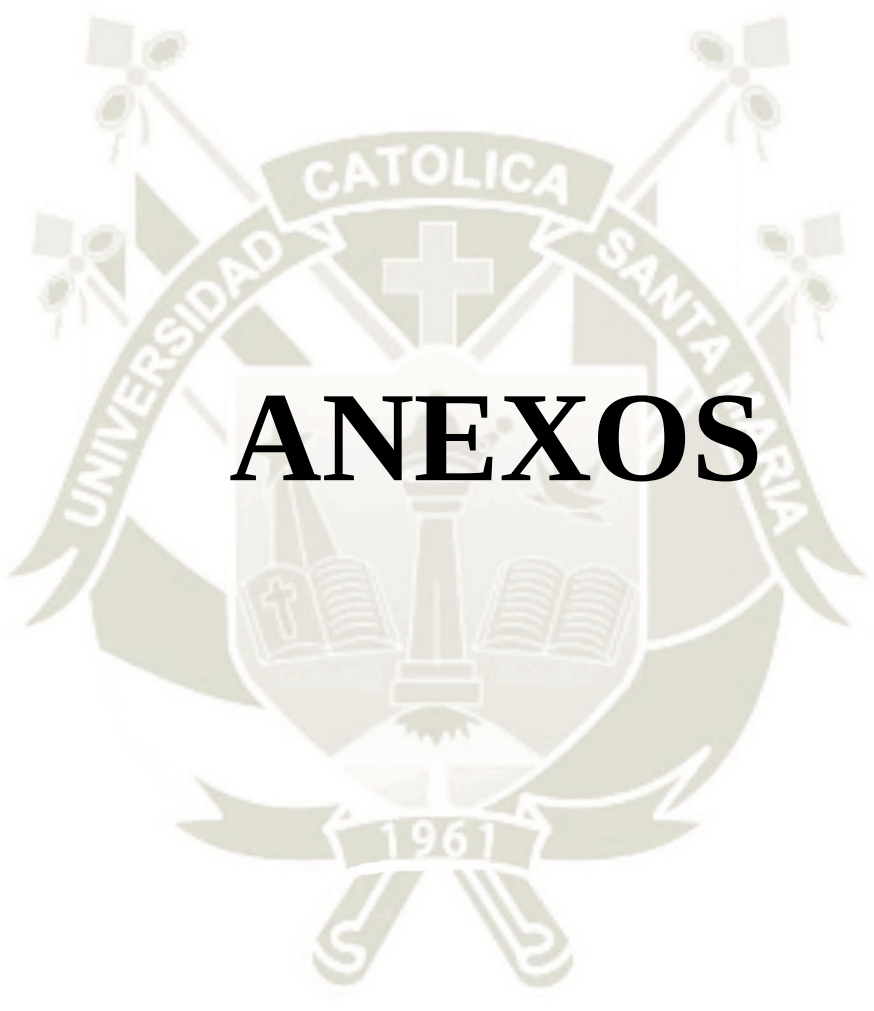
- Biotechnological Insights. Trop Plant Biol. 2010;3:136–50.
15. Butera D, Tesoriere L, Di Gaudio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi A, et al. Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. J Agric Food Chem. 2002;50(23):6895–901.
 16. Guzmán Loayza D, Chávez J. Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. Rev la Soc Química del Perú. 2007;73(1):41–5.
 17. Sáenz C, Sepúlveda E. Cactus-Pear Juices. J Prof Assoc Cactus Dev. 2001;1:3–10.
 18. Gutteridge JMC, Halliwell B. Biochemical and Biophysical Research Communications Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? Biochem Biophys Res Commun. 2018;502(2):183–6.
 19. Jones D, Sies H. The Redox Code. Antioxid Redox Signal. 2015;23(9):734–6.
 20. Samet JM, Wages PA. Oxidative Stress from Environmental Exposures. Curr Opin Toxicol. 2018;7:60–6.
 21. Schröder P, Krutmann J. Environmental Oxidative Stress - Environmental Sources of ROS. Handb Environ Chem. 2005;2:19–31.
 22. Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiol Rev. 2002;82:47–95.
 23. Burton GJ, Jauniaux E, Medicine F. Oxidative stress. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2011;25(3):287–99.
 24. Martínez G. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. Rev Cuba Farm. 2005;39(3):1–11.
 25. Buffenstein R, Edrey YH, Yang T, Mele J. The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. Age (Omaha). 2008;30:99–109.
 26. Birben E, Sahiner U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. WAO J. 2012;1:9–19.
 27. Church DF, Pryor WA. Free-Radical Chemistry of Cigarette Smoke and Its Toxicological Implications. Environ Health Perspect. 1985;64:111–26.
 28. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. Thorax. 1999;54:1061–9.
 29. Azzam E, Jay-gerin J, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress

- and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* 2012;327(2):48–60.
30. Flora S, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res.* 2008;501–23.
31. Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst).* 2004;3:1109–15.
32. Kujoth G, Hiona A, Pugh T, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, et al. Mitochondrial DNA Mutations , Oxidative Stress , and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science (80-).* 2005;309:481–5.
33. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 2004;43:200–27.
34. Sohal R. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(1):37–44.
35. Menzel DB. The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress. *Toxicol Lett.* 1994;72:269–77.
36. Sies H. Redox Biology Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180–3.
37. George S, Hamblin M, Abrahamse H. Effect of red light and near infrared laser on the generation of reactive oxygen species in primary dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2018;188:60–8.
38. Azzam E, Jay-Gerin J, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* 2012;327:48–60.
39. Vetrani C, Costabile G, Marino L Di, Rivellese AA, Costabile G, Marino L Di, et al. Nutrition and oxidative stress: a systematic review of human studies. *Int J Food Sci Nutr ISSN.* 2013;64(3):312–26.
40. Rao A V, Balachandran B. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Diseases. *Nutr Neurosci.* 2002;5(5):291–309.
41. Bonomini F, Rodella L, Rezzani R. Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. *Aging Dis.* 2015;6(2):109–20.
42. Salvayre R, Salvayre N, Camare C. Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie.* 2016;125:281–96.
43. Akaike T, Maeda H. Nitric oxide and virus infection. *Immunology.* 2000;101:300–8.
44. Klaunig JE, Wang Z. Oxidative stress in carcinogenesis. *Curr Opin Toxicol.* 2018;7:116–21.
45. Lugin J, Rosenblatt N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during

- inflammatory processes. *Biol Chem*. 2014;395(2):203–30.
46. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;292:18–36.
 47. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. Potential applications of antioxidants - A review. *J Pharm Res*. 2013;7(9):828–35.
 48. Araújo R, Martins D, Borba M. Oxidative stress and disease. In: *A Master Regulator of Oxidative Stress*. IntechOpen; 2016. p. 185–99.
 49. Carochio M, Ferreira I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 2013;51:15–25.
 50. Palace V, Khaper N, Qin Q, Singal P. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(5):746–61.
 51. Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(1):74–9.
 52. Kand'ár R, Žáková P, Mužáková V. Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clin Chim Acta*. 2006;365(2):249–56.
 53. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009;30(2):1–12.
 54. Sies H, Stahl W, Sundquist A. Antioxidant Functions of Vitamins. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;669(1):7–20.
 55. Vervoort L, Ronden J, Thijssen H. The Potent Antioxidant Activity of the Vitamin K Cycle in Microsomal Lipid Peroxidation. *Biochem Pharmacol*. 1997;54:871–6.
 56. Procházková D, Bou I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011;82:513–23.
 57. Šegatin N, Hanzlowsky A, Ulrih NP, Abramovic H, Terpin P. Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chem*. 2011;128:62–9.
 58. Young A, Lowe G. Carotenoids - Antioxidant Properties. *Antioxidants*. 2018;7(28):10–3.
 59. Powell SR. Zinc and Health: Current Status and Future Directions. *Am Soc Nutr Sci*. 2000;1:1447–54.
 60. Xu D, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural Antioxidants in Foods

- and Medicinal Plants: Extraction , Assessment and Resources. *Int J Mol Sci.* 2017;18(96):20–31.
61. Huang D, Ou B, Prior R. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem.* 2005;53(6):1841–56.
62. Blois M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;181:1199–200.
63. Teixeira J, Gaspar A, Garrido E, Garrido J, Borges F. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *Biomed Res Int.* 2013;1:1–12.
64. Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventós R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: *Methods in enzymology.* Academic Press; 1999. p. 152–78.
65. Khorassani S, Ebrahimi A, Maghsoodlou M, Shahraki M, Price D, Paknahad A. A novel high performance stopped-flow apparatus equipped with a special constructed mixing chamber containing a plunger under inert condition with a very short dead-time to investigate very rapid reactions. *Arab J Chem.* 2015;8(6):873–84.
66. Russell CE, Felker P. The Prickly-pears (*Opuntia* spp., Cactaceae): A Source of Human and Animal Food in Semiarid Regions. *Econ Bot.* 1987;41(3):433–45.
67. Feugang J, Konarski P, Zou D, Stintzing F, Zou C. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci.* 2006;11(1):2574–89.
68. Cota-sánchez J. Nutritional Composition of the Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) Fruit. In: *Nutritional Composition of Fruit Cultivars.* Elsevier; 2016. p. 691–712.
69. Shedbalkar U, Adki V, Jadhav J, Bapat V. *Opuntia* and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. *Trop Plant Biol.* 2010;3:136–50.
70. Butera D, Tesoriere L, Di Gaudio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi A, et al. Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *J Agric Food Chem.* 2002;50(23):6895–901.
71. Guzmán Loayza D, Chávez J. Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Rev la Soc Química del Perú.* 2007;73(1):41–5.
72. Sáenz C, Sepúlveda E. Cactus-Pear Juices. *J Prof Assoc Cactus Dev.* 2001;1:3–10.
73. Galati EM, Mondello MR, Giuffrida D, Dugo G, Miceli N, Pergolizzi S, Taviano MF. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus-indica* (L.) mill. Fruit juice: Antioxidant and antiulcerogenic activity. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry. 2003;51, 4903-4908
74. Carrasco, Ritva, Encina Z, Christian R. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú. 2008. 74(2), 108-124
 75. Piga A, Del Caro A, Pinna I, Agabbio M. Changes in ascorbic acid, polyphenol content and antioxidant activity in minimally processed cactus pear fruits. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 2003. 36, 257-262.
 76. Stintzing FC, Herbach KM, Mosshammer MR, Carle R, Yi W, Sellappan S, Akoh CC, Bunch R, Felker P. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. 53, 442-451
 77. Muñoz J, Ramos E, Ortiz U, Castañeda. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Rev Soc Quím Perú. 2007. 73 (3) : 142-149
 78. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM., Mancini F, Roseane F. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Food Science and Technology. Campinas. 2007. 25 (4), 726-732.
 79. Barea Á. Caracterización, capacidad antioxidante y perfil fenólico de frutas subtropicales producidas y comercializadas en la costa de Granada. [Tesis Doctoral]. Universidad de Granada de España; 2015.



ANEXOS

ANEXO I

MUESTRAS DE TUNA ROJA, NARANJA Y VERDE



ANEXO II

MUESTRAS EN EL LIOFILIZADOR



ANEXO III

EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA



Peso de tuna liofilizada



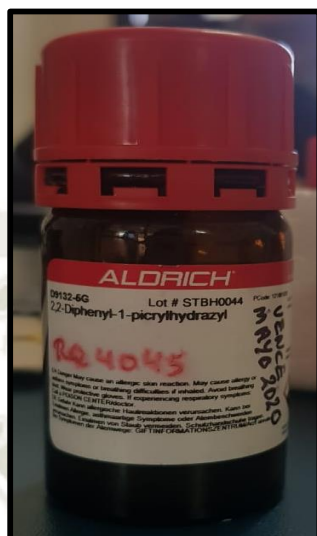
Sonicación de las muestras en tubos falcón



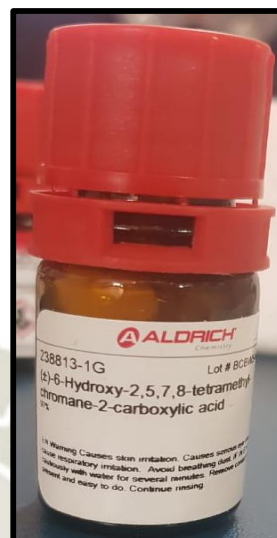
Extracto de las muestras por triplicado en fiolas de 10 ml

ANEXO IV

REACTIVOS Y PREPARACIÓN PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE



Reactivo DPPH



Reactivo Trolox



Peso del reactivo DPPH de 3 mg



Peso del reactivo trolox de 4 mg



Solución stock de trolox y solución madre de DPPH con una concentración de 1598 μM en etanol al 96% y 304 μM en etanol al 96% respectivamente.



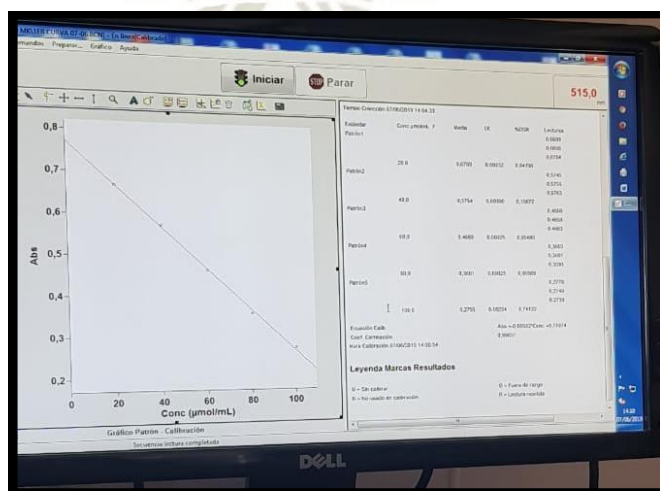
Estándares de trolox para el método DPPH



Patrones para la curva de calibración



Reposo a oscuridad de patrones



Curva de calibración leída a 515 nm en el espectrofotómetro

ANEXO V

CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN DEL ESPÉCIMEN VEGETAL *OPUNTIA FICUS INDICA* VARIEDAD ROJA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N° 049-2019-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que los frutos de la muestra fresca del espécimen presentada por **Maria Karina, Tunqui Garcia y Carla Alejandra, Bernal Velarde** egresada de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmaceuticas, Bioquimicas y Biotecnologicas de la Universidad Católica de Santa María, para la ejecución de su Tesis “**Capacidad antioxidante del extracto alcohólico de los frutos de *Opuntia ficus indica* (tuna roja, blanca y amarilla) Arequipa 2019**”. La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

Reino	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Opuntioideae
Genero	<i>Opuntia</i>
Especie	<i>opuntia ficus-indica</i> (L) Mill Var. Roja

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 03 de junio del 2019.


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)
Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercano
Teléfono: (054) 237755 / 993659045
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ



ANEXO VI

CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN DEL ESPÉCIMEN VEGETAL *OPUNTIA
FICUS INDICA* VARIEDAD NARANJA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N° 051-2019-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que los frutos de la muestra fresca del espécimen presentada por **Maria Karina, Tunqui Garcia y Carla Alejandra, Bernal Velarde** egresada de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmaceuticas, Bioquimicas y Biotecnologicas de la Universidad Católica de Santa María, para la ejecución de su Tesis “**Capacidad antioxidante del extracto alcohólico de los frutos de *Opuntia ficus indica* (tuna roja, blanca y amarilla) Arequipa 2019**”. La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

Reino	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Opuntioideae
Genero	<i>Opuntia</i>
Especie	<i>opuntia ficus-indica</i> (L) Mill Var. Naranja

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 03 de junio del 2019.




Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)
Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercano
Teléfono: (054) 237755 / 993659045
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

ANEXO VII

CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN DEL ESPÉCIMEN VEGETAL *OPUNTIA FICUS INDICA* VARIEDAD VERDE



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N° 050-2019-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que los frutos de la muestra fresca del espécimen presentada por **Maria Karina, Tunqui García y Carla Alejandra, Bernal Velarde** egresada de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmaceuticas, Bioquimicas y Biotecnologicas de la Universidad Católica de Santa María, para la ejecución de su Tesis "**Capacidad antioxidante del extracto alcohólico de los frutos de *Opuntia ficus indica* (tuna roja, blanca y amarilla) Arequipa 2019**". La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

Reino	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Opuntioideae
Genero	<i>Opuntia</i>
Especie	<i>opuntia ficus-indica</i> (L) Mill Var. Verde

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 03 de junio del 2019.

Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR

Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 993659045
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

