

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL FRUTO LIOFILIZADO DE PITAHAYA AMARILLA (*Hylocereus megalanthus*) Y PITAHAYA ROJA (*Hylocereus undatus*)

Tesis presentada por las bachilleres:

Huamani Mora, Danitza Jeymy

Paucar Capia, Pamela Esmeralda

Para optar el título profesional de

Química Farmacéutica

Asesora: Mgter. Medina Pérez, Jeaneth Marisol

AREQUIPA – PERÚ

2018

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

Expediente N°. 20180000017057

N° Trámite en Fac. 1742-2018

Fecha 04-04-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

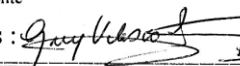
DE: HUAMANI MORA, Danitza Jeymy
PAUCAR CAPIA, Pamela Esmeralda

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"PERFIL FITOQUIMICO Y DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DEL MESOCARPIO DEL FRUTO DE *Hylocereus megalanthus* (PITAHAYA AMARILLA)"

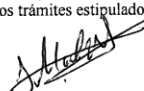
DICTAMINADORES: 1) Dra. Gaby Velasco Lozano 2) Q. F. Fernando Torres Vela

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 las recurrentes, se ha procedido a la revisión del mismo, sugiriendo se cambie el título a: "PERFIL FITOQUIMICO Y DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DEL LIOFILIZADO DEL MESOCARPIO DEL FRUTO DE *Hylocereus megalanthus* (PITAHAYA AMARILLA), *Hylocereus undatus* (PITAHAYA ROJA)", y después de realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
Firmas:  (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 10-04-18

ASESOR: Mgter. Jeaneth Medina Pérez

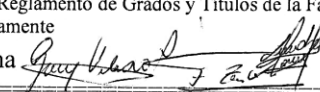
DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: "DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ACIDO ASCORBICO Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL FRUTO LIOFILIZADO DE PITAHAYA AMARILLA (*Hylocereus megalanthus*) Y PITAHAYA ROJA (*Hylocereus undatus*)" 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  Fecha 12/09/18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dra. Gaby Velasco Lozano 3) Mgter. Julitza Paredes Fuentes
2) Q. F. Fernando Torres Vela

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 las recurrentes, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

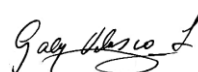
Atentamente
Firma  (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 02/10/2018

JURADOS: Presidente Dra. Gaby Velasco Lozano
Vocal Q. F. Fernando Torres Vela
Secretario Mgter. Julitza Paredes Fuentes

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 24/10/2018 Hora: 19:00 h Local: C- 402 (SUM)

DECANO



DEDICATORIA

Dedico mi trabajo y mi esfuerzo a Dios, por darme la vida, salud; por ser la luz que guía mi camino, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizaje.

A mis padres Fidel y Gloria por creer en mí, apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida; por ser el ejemplo para salir adelante y por los consejos que han sido de gran ayuda para mi vida y crecimiento.

A mi hermano Juan Carlos y Joel por su apoyo y cariño incondicional.

A mi abuelo Félix Paucar por su apoyo y cariño incondicional.

A mi abuelita Gregoria C. por su inmenso amor, cariño y comprensión, a mi abuelita Julia Rita C. por creer en mí, quien desde el cielo guía e ilumina mi camino.

Y a toda mi familia a quienes quiero y amo profundamente les dedico esta tesis.

PAMELA

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo y mi esfuerzo a Dios, por darme la vida, salud; por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizaje.

A mi abuelita Isidora por su inmenso amor, cariño, comprensión por haber estado conmigo en cada momento de mi vida.

A mi papá Jorge por su apoyo incondicional, por su inmenso amor, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida y por ser ejemplo de sacrificio y perseverancia para salir adelante.

A mi mamá Marlene por su comprensión y apoyo.

A la Lic. Tatiana y al Ing. Aldo por brindarme su apoyo, su cariño, su amor, por creer en mí, por sus sabios consejos.

A todos mis ángeles quienes desde el cielo guían e iluminan mi camino

A toda mi familia quienes quiero y amo profundamente les dedico esta tesis.

DANITZA

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento incondicional a Dios porque sin su ayuda no estaríamos en el lugar de hoy, por tenerme guardado este momento tan esperado.

A nuestros padres por habernos encaminado a luchar y conseguir mis sueños, por estar apoyándonos siempre frente a cualquier adversidad, mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

En especial al PhD. José Villanueva Salas, por incentivar nuestro espíritu investigador y brindarnos su apoyo.

A mi asesora la Mgter. Jeaneth Medina Pérez, por ser nuestro guía y apoyo en la realización de este trabajo de investigación

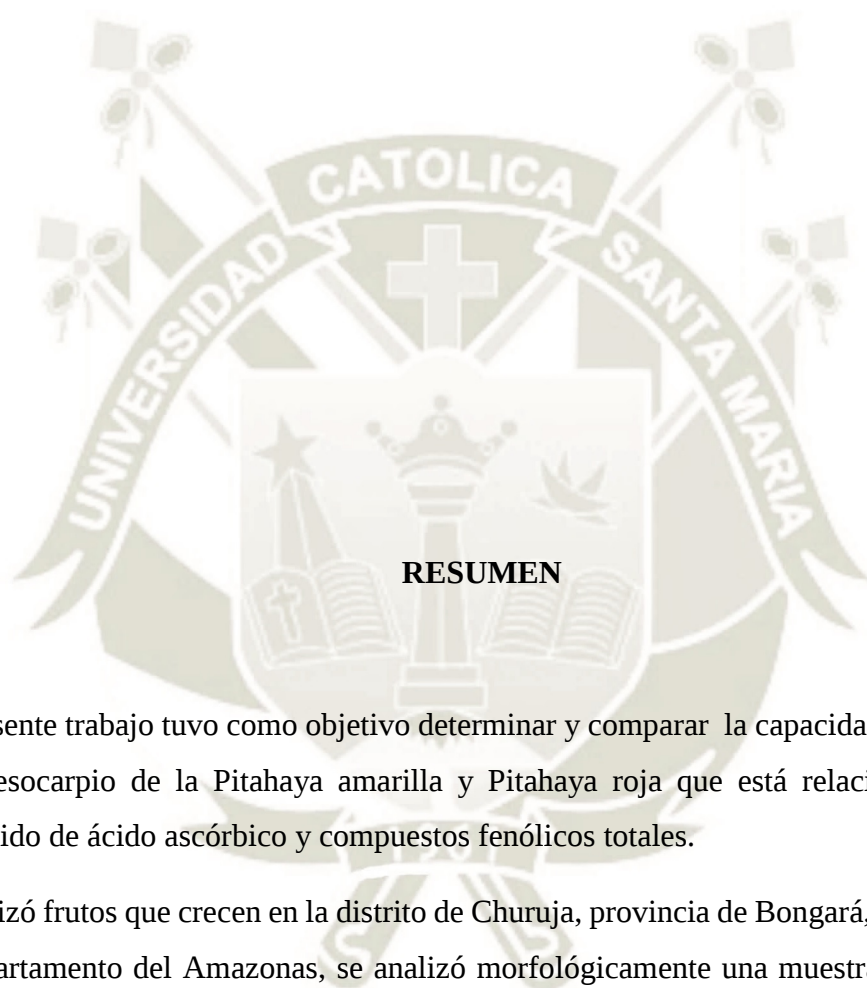
A la Dra. Gaby Velasco Lozano por ayudarnos en la revisión y redacción de este trabajo de investigación.

A la Mgter. Julitza Paredes Fuentes por ayudarnos en la revisión y redacción de este trabajo de investigación.

Al Dr. Fernando Torres Vela por ayudarnos en la revisión y redacción de este trabajo de investigación.

Y a todas aquellas personas que de una y otra forma colaboraron o participaron en la realización de esta investigación.

DANITZA Y PAMELA



RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar y comparar la capacidad antioxidante del mesocarpio de la Pitahaya amarilla y Pitahaya roja que está relacionada con el contenido de ácido ascórbico y compuestos fenólicos totales.

Se utilizó frutos que crecen en la distrito de Churuja, provincia de Bongará, perteneciente al departamento del Amazonas, se analizó morfológicamente una muestra de ellos con pedazos de tallo de los cactus en el herbario de la Universidad Nacional de San Agustín y se confirmó su pertenencia a la especie de (*Hylocereus megalanthus*) Pitahaya Amarilla e (*Hylocereus undatus*) Pitahaya roja, los cuales fueron liofilizados en el laboratorio de la Universidad Católica Santa María.

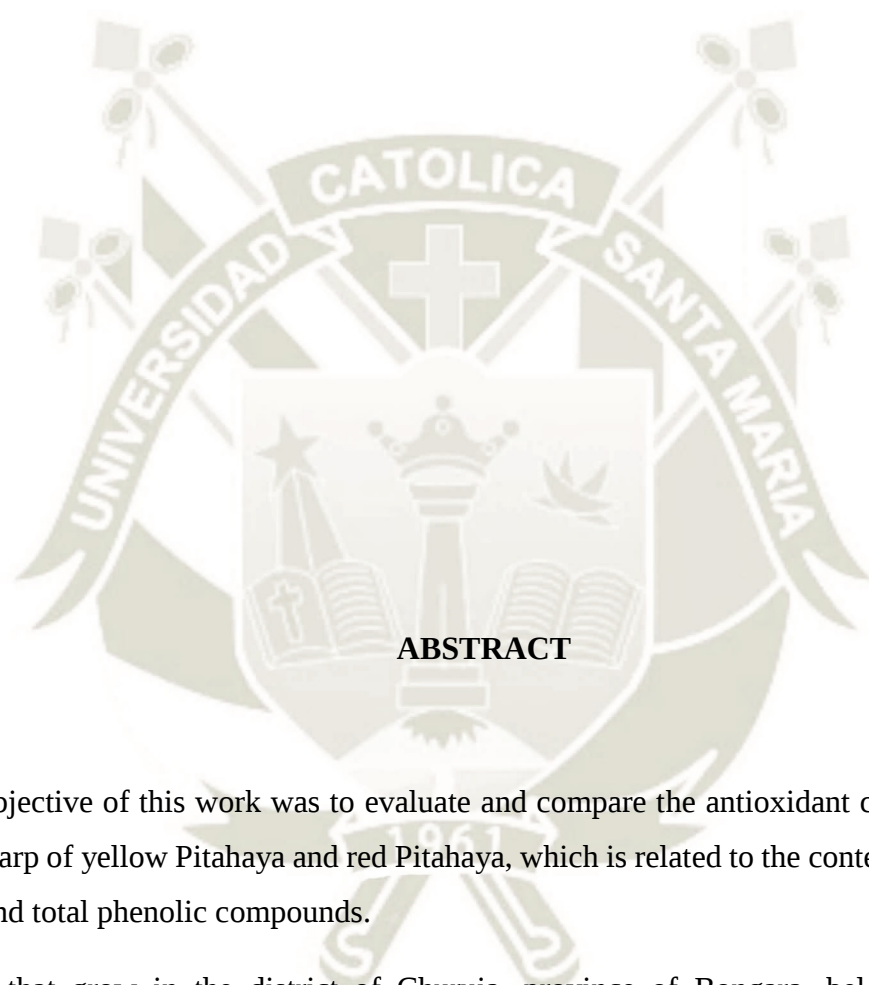
Se obtuvo un extracto del fruto liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) por sonicación, se realizó un screening fitoquímico de los extractos del fruto liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y

Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*), identificando en ambas especies taninos, lípidos, esteroides, carbohidratos y alcaloides.

Una vez culminada el screening fitoquímico, se determinó y comparó la capacidad antioxidante del extracto del fruto liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) por los métodos DPPH, CUPRAC y ABTS, obteniendo valores de 795 mg TE/100 g de fruto liofilizado y 893 mg TE/100 g de fruto liofilizado para el método de DPPH; 574 mg TE/100 g de fruto liofilizado y 1109 mg TE/100 g de fruto liofilizado para el método de ABTS; y finalmente 994 mg TE/100 g de fruto liofilizado y 1166 mg TE/100 g de fruto liofilizado para el método de CUPRAC, siendo mayor la capacidad antioxidante de la Pitahaya roja en comparación con la Pitahaya amarilla, y habiendo diferencia significativa entre los tres métodos analíticos.

Se determinó y comparó el contenido de ácido ascórbico por el método voltamperométrico obteniendo un valor de 63.82 mg AA/100 g de fruto liofilizado de Pitahaya amarilla y un valor de 159.37 mg AA/100 g de fruto liofilizado de Pitahaya roja; también se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu obteniendo un valor de 164 mg GAE/100 g de fruto liofilizado de Pitahaya amarilla y un valor de 206 mg GAE/100 g de fruto liofilizado de Pitahaya roja; podemos decir que la Pitahaya roja tiene mayor contenido de ácido ascórbico y compuestos fenólicos totales en comparación con la Pitahaya amarilla. Así mismo se concluyó que la Pitahaya roja del departamento de Amazonas, existe un mayor contenido de compuestos fenólicos totales en comparación al contenido de ácido ascórbico; por lo tanto se puede presumir que su capacidad antioxidante es atribuida en su mayoría a la existencia de compuestos fenólicos totales.

Palabras clave: *Hylocereus megalanthus*, *Hylocereus undatus*, Pitahaya, capacidad antioxidante, ácido ascórbico, polifenoles totales, ácido gálico, voltamperometría, Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS y CUPRAC.



ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate and compare the antioxidant capacity of the mesocarp of yellow Pitahaya and red Pitahaya, which is related to the content of ascorbic acid and total phenolic compounds.

Fruits that grow in the district of Churuja, province of Bongara, belonging to the department of Amazonas, were used, which were lyophilized in the laboratory of the Catholic University of Santa María, a sample of them was morphologically analyzed in the herbarium of the National University of St. Augustine and its membership in the species of (*Hylocereus megalanthus*) Pitahaya Amarilla e (*Hylocereus undatus*) Red Pitahaya was confirmed.

An extract of the freeze-dried fruit of yellow Pitahaya (*Hylocereus megalanthus*) and red Pitahaya (*Hylocereus undatus*) was obtained by sonication, a phytochemical screening of the lyophilized fruit extracts of yellow Pitahaya (*Hylocereus megalanthus*) and red

Pitahaya (*Hylocereus undatus*) was carried out, identifying tannins, lipids, steroids, carbohydrates and alkaloids in both species.

Once the phytochemical screening was completed, the antioxidant capacity of the lyophilized fruit extract of yellow Pitahaya (*Hylocereus megalanthus*) and red Pitahaya (*Hylocereus undatus*) was determined and compared by the DPPH, CUPRAC and ABTS methods, obtaining values of 795 mg TE / 100 g of lyophilized fruit and 893 mg TE / 100 g of lyophilized fruit for the DPPH method; 574 mg TE / 100 g of lyophilized fruit and 1109 mg TE / 100 g of lyophilized fruit for the ABTS method; and finally 994 mg TE / 100 g of lyophilized fruit and 1166 mg TE / 100 g of lyophilized fruit for the CUPRAC method, with an increased antioxidant capacity of the red Pitahaya compared to the yellow Pitahaya, and there being a significant difference between the three analytical methods.

The ascorbic acid content was determined and compared by the voltammetric method, obtaining a value of 63.82 mg AA / 100 g of lyophilized fruit of yellow Pitahaya and a value of 159.37 mg AA / 100 g of lyophilized fruit of red Pitahaya; the content of total phenolic compounds was also determined by the Folin Ciocalteu colorimetric method obtaining a value of 164 mg GAE / 100 g of freeze-dried fruit of Pitahaya yellow and a value of 206 mg GAE / 100 g of lyophilized fruit of red Pitahaya; We can say that the red Pitahaya has higher content of ascorbic acid and total phenolic compounds compared to the yellow Pitahaya. It was also concluded that the red Pitahaya of the department of Amazonas, there is a higher content of total phenolic compounds compared to the content of ascorbic acid; therefore it can be presumed that its antioxidant capacity is attributed mostly to the existence of total phenolic compounds.

Key words: *Hylocereus megalanthus*, *Hylocereus undatus*, Pitahaya, antioxidant capacity, ascorbic acid, total polyphenols, gallic acid, voltammetry, Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS and CUPRAC.

ÍNDICE

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xxi
ABREVIATURAS.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	xxiii
HIPÓTESIS.....	xxv
OBJETIVOS.....	xxvi
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA PITAHAYA.....	1
1.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FRUTA.....	1
1.1.2. VARIEDADES.....	2
1.1.2.1. PITAHAYA AMARILLA.....	2
1.1.2.2. PITAHAYA ROJA.....	3
1.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	4
1.1.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PITAHAYA.....	4
1.1.5. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	5
1.1.5.1. RAÍZ.....	5
1.1.5.2. TALLO.....	5
1.1.5.3. FLORES.....	6
1.1.5.4. FRUTO.....	7
1.1.5.5. SEMILLAS.....	7

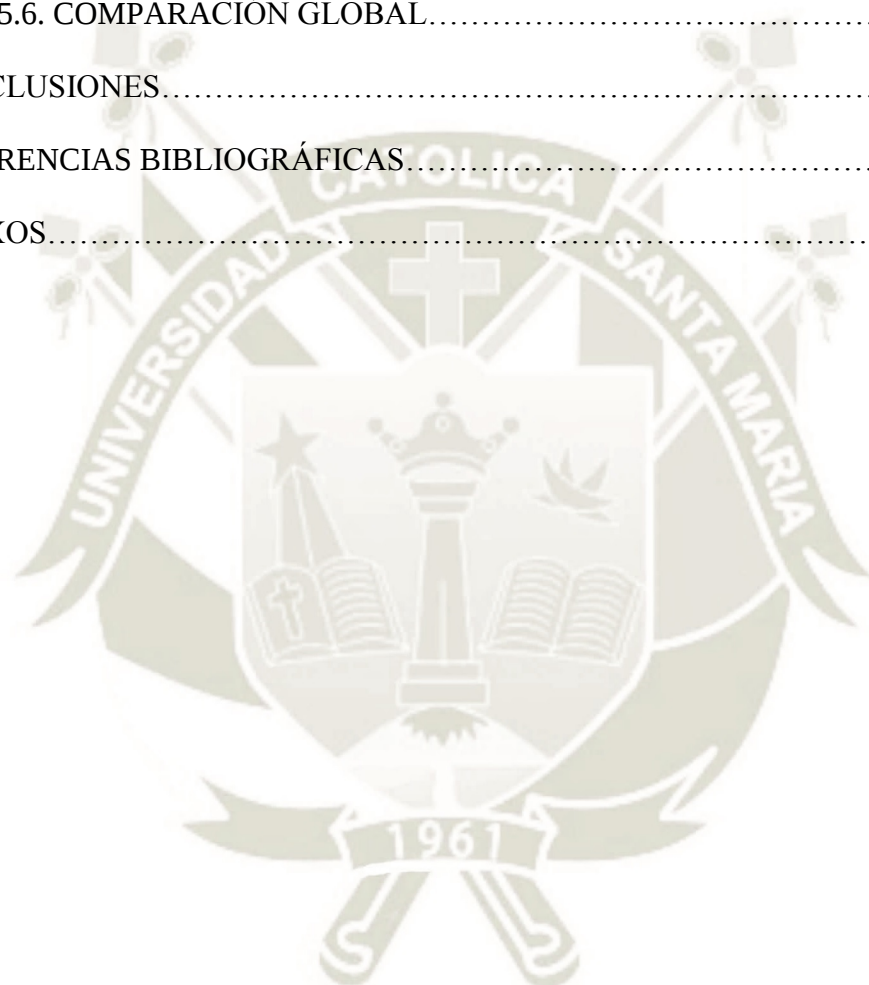
1.1.6. ORIGEN Y CONSERVACIÓN.....	7
1.1.7. CULTIVO.....	8
1.1.8. COSECHA.....	8
1.1.9. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS.....	8
1.2. ANTIOXIDANTES.....	9
1.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.....	10
1.2.2. ÁCIDO ASCÓRBICO.....	10
1.2.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO ASCÓRBICO.....	11
1.2.2.2. FUNCIONES DEL ÁCIDO ASCÓRBICO.....	13
1.2.2.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ÁCIDO ASCÓRBICO.....	13
1.2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS.....	14
1.2.3.1. CARACTERÍSTICAS.....	14
1.2.3.2. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	14
1.2.3.3. FUNCIONES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	16
1.2.3.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	16
1.2.3.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	16
1.3. RADICALES LIBRES.....	17
1.3.1. FACTORES QUE FAVORECEN LA FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES.....	17
1.4. ESTRÉS OXIDATIVO.....	17
1.5. ENVEJECIMIENTO.....	19
1.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	20
1.6.1. ENSAYOS QUE UTILIZAN EL MECANISMO DE TRANSFERENCIA	

DE UN SOLO ELECTRÓN.....	21
1.6.1.1. MÉTODO ABTS.....	21
1.6.1.2. MÉTODO DPPH.....	21
1.6.1.3. MÉTODO CUPRAC.....	21
1.6.2. ENSAYOS QUE UTILIZA EL MECANISMO DE TRANSFERENCIA DE ÁTOMOS DE HIDRÓGENO.....	21
1.6.2.1. MÉTODO TRAP.....	21
1.6.2.2. MÉTODO ORAC.....	22
1.7. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	22
1.7.1. EXTRACCIÓN POR SONICACIÓN.....	22
1.7.1.1. FUNDAMENTO.....	22
1.7.1.2. PARÁMETROS.....	23
1.8. LIOFILIZACIÓN.....	23
1.8.1. FUNDAMENTO.....	23
1.8.2. PARTES DE UN LIOFILIZADOR.....	24
1.9. VOLTAMPEROMETRÍA.....	24
1.9.1. FUNDAMENTO.....	25
1.9.2. CELDA ELECTROQUÍMICA.....	25
1.9.3. VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN CATÓDICA.....	26
1.9.4. VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA.....	26
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1. MATERIALES.....	27
2.1.1. MATERIAL VEGETAL.....	27
2.1.2. MATERIAL DE VIDRIO.....	27
2.1.3. MATERIAL DE LABORATORIO.....	28
2.1.4. EQUIPOS DE LABORATORIO.....	28

2.1.5. REACTIVOS.....	28
2.2. MÉTODOS.....	29
2.2.1. RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES.....	29
2.2.2. LIOFILIZACIÓN.....	29
2.2.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	30
2.3. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	30
2.3.1. REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN.....	32
2.3.1.1. FRACCIÓN “A”.....	32
A) FLAVONOIDES.....	32
B) TANINOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS.....	32
C) LÍPIDOS.....	32
D) HIDRATOS DE CARBONO.....	32
2.3.1.2 FRACCIÓN “B”.....	33
A) ESTEROIDES Y TRITERPENOS.....	33
B) ANTRAQUINONAS.....	33
2.3.1.3. FRACCIÓN “C”.....	33
A) ALCALOIDES.....	33
B) LEUCOANTOCIANIDINAS.....	33
C) PROTEÍNAS.....	34
2.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	34
2.4.1. MÉTODO CUPRAC.....	34
2.4.1.1 FUNDAMENTO.....	34
2.4.1.2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	35
2.4.1.3. SOLUCIÓN STOCK DE TROLOX.....	35
2.4.1.4 CURVA DE CALIBRACIÓN.....	35
2.4.2. MÉTODO DPPH.....	36

2.4.2.1 FUNDAMENTO.....	36
2.4.2.2. PREPARACIÓN DEL RADICAL DPPH.....	36
2.4.2.3. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE TROLOX.....	36
2.4.2.4 CURVA DE CALIBRACIÓN	37
2.4.3. MÉTODO ABTS.....	38
2.4.3.1 FUNDAMENTO.....	38
2.4.3.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE ABTS.....	39
2.4.3.3 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE TROLOX.....	39
2.4.3.4 CURVA DE CALIBRACIÓN	40
2.5. EVALUACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR VOLTAMPEROMETRÍA.....	41
2.5.1. PREPARACIÓN DEL BUFFER	41
2.5.2 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE ÁCIDO ASCÓRBICO.....	41
2.5.3. PARÁMETROS VOLTAMPEROMÉTRICOS.....	41
2.6. COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	42
2.6.1. FUNDAMENTO.....	42
2.6.2. SOLUCIÓN DE CARBONATO DE SODIO	42
2.6.3. SOLUCIÓN STOCK DE ÁCIDO GÁLICO.....	42
2.6.4 CURVA DE CALIBRACIÓN	43
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
3.1. RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES.....	45
3.2. LIOFILIZACIÓN.....	46
3.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	47
3.4. MARCHA FITOQUÍMICA.....	48
3.5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	50

3.5.1. MÉTODO CUPRAC.....	50
3.5.2. MÉTODO DPPH.....	52
3.5.3. MÉTODO ABTS.....	56
3.5.4. ÁCIDO ASCÓRBICO POR VOLTAMPEROMETRÍA.....	59
3.5.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	61
3.5.6. COMPARACIÓN GLOBAL.....	63
CONCLUSIONES.....	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	82



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Pitahaya amarilla de Churuja – Amazonas.....	3
Figura 1.2. Pitahaya roja de Churuja – Amazonas.....	3
Figura 1.3. Tallo de Pitahaya amarilla de Churuja – Amazonas.....	6
Figura 1.4. Tallo de Pitahaya roja de Churuja – Amazonas.....	6
Figura 1.5. Flor de Pitahaya amarilla de Churuja – Amazonas.....	6
Figura 1.6. Flor de Pitahaya roja de Churuja – Amazonas.....	6
Figura 1.7. Fruta de Pitahaya amarilla de Churuja – Amazonas.....	7
Figura 1.8. Fruta de Pitahaya roja de Churuja – Amazonas.....	7
Figura 1.9. Estructura del ácido ascórbico.....	11
Figura 1.10. Formas moleculares en equilibrio de la Vitamina C.....	13
Figura 1.11. Clasificación y biosíntesis de compuestos fenólicos.....	15
Figura 1.12. Fases de la liofilización.....	24
Figura 2.1. Marcha fitoquímica.....	31
Figura 2.2. Reacción de CUPRAC con un antioxidante.....	34
Figura 2.3. Reacción del radical DPPH con un antioxidante.....	36
Figura 2.4. Reacción de la formación del radical ABTS.....	38
Figura 2.5. Reacción del radical ABTS con un antioxidante.....	39
Figura 2.6. Reacción del reactivo Folin Ciocalteu con ácido gálico.....	42
Figura 3.1. Muestras de Pitahaya recolectadas A) Pitahaya roja B) Pitahaya amarilla..	45
Figura 3.2. Muestras de Pitahaya A) Frutos cortados. B) Frutos liofilizados.....	46
Figura 3.3 Preparación de los extractos.....	47
Figura 3.4. Pruebas de identificación de metabolitos en las muestras de Pitahaya.....	49

Figura 3.5. Estándares de trolox tratados por el método CUPRAC.....	51
Figura 3.6. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por el método CUPRAC.....	51
Figura 3.7. Estándares de trolox tratados por el método DPPH.....	53
Figura 3.8. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por el método DPPH...	53
Figura 3.9. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por inhibición de DPPH.....	55
Figura 3.10. Estándares de trolox tratados por el método ABTS.....	56
Figura 3.11. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por el método ABTS.....	56
Figura 3.12. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por inhibición de ABTS.....	58
Figura 3.13. Voltámetro 797 VAComputrace.....	59
Figura 3.14. Potencial pico de oxidación del estándar de ácido ascórbico.....	60
Figura 3.15. Gráfico de calibración para compuestos fenólicos por el método Folin Ciocalteu.....	62
Figura 3.16. Comparación de la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.....	64
Figura 3.17. Comparación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.....	65
Figura 3.18. Comparación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.....	65
Figura 3.19. Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Folin Ciocalteu entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.....	66
Figura 3.20. Comparación del contenido de ácido ascórbico por el método de Voltamperometría entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.....	66

Figura 3.21.Comparación de los métodos para determinar capacidad antioxidante

A) Pitahaya amarilla B) Pitahaya roja.....67

Figura 3.22. Interacción de la capacidad antioxidante por método y variedad

de Pitahaya.....70



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de la Pitahaya amarilla.....	4
Tabla 1.2. Clasificación taxonómica de la Pitahaya roja.....	4
Tabla 1.3. Composición nutricional de <i>Hylocereus megalanthus</i> e <i>Hylocereus</i> <i>Undathus</i>	5
Tabla 1.4. Contenido de ácido ascórbico y polifenoles de distintos frutos.....	12
Tabla 1.5. Fuentes comunes de radicales libres y fuentes comunes de antioxidantes....	19
Tabla 2.1 Condiciones de liofilización	30
Tabla 2.2. Preparación de la curva de calibración CUPRAC.....	35
Tabla 2.3. Preparación de estándares de trolox para el método DPPH.....	37
Tabla 2.4. Preparación de la curva de calibración DPPH.....	37
Tabla 2.5. Preparación de estándares de trolox para el método ABTS.....	40
Tabla 2.6. Preparación de la curva de calibración ABTS.....	40
Tabla 2.7. Preparación de los estándares de ácido gálico.....	43
Tabla 2.8. Preparación de la curva de calibración de Folin-Ciocalteu.....	43
Tabla 3.1. Valores considerados en la liofilización de Pitahaya.....	46
Tabla 3.2. Características organolépticas de los extractos de Pitahaya liofilizados.....	47
Tabla 3.3. Resultados de la marcha fitoquímica en muestras de Pitahaya.....	49
Tabla 3.4. Calibración del método CUPRAC con estándares de trolox.....	51
Tabla 3.5. Capacidad antioxidante de Pitahaya por el método CUPRAC.....	52
Tabla 3.6. Calibración del método DPPH con estándares de trolox.....	53
Tabla 3.7. Capacidad antioxidante de Pitahaya por el método DPPH.....	54
Tabla 3.8. Inhibición del radical DPPH.....	54
Tabla 3.9. Capacidad antioxidante de Pitahaya por el método DPPH.....	55
Tabla 3.10. Calibración del método ABTS con estándares de trolox.....	56

Tabla 3.11. Capacidad antioxidante de Pitahaya por el método ABTS.....	57
Tabla 3.12. Inhibición del radical ABTS.....	58
Tabla 3.13. Capacidad antioxidante de Pitahaya por el método ABTS.....	58
Tabla 3.14. Contenido de ácido ascórbico en Pitahayas por voltamperometría.....	60
Tabla 3.15. Calibración del método Folin Ciocalteu con estándares de ácido gálico....	61
Tabla 3.16. Compuestos fenólicos de Pitahaya por el método Folin Ciocalteu.....	62
Tabla 3.17. Resumen de resultados.....	64
Tabla 3.18. Resultados de las pruebas F para comparar varianzas entre dos grupos.....	67
Tabla 3.19. Resultados de los test t de student para comparar promedios entre dos Grupos.....	67
Tabla 3.20. ANOVA entre métodos de determinación de capacidad antioxidante para Pitahaya roja.....	68
Tabla 3.21. Test Tukey entre métodos de determinación de capacidad antioxidante para Pitahaya roja.....	69
Tabla 3.22. ANOVA entre métodos de determinación de capacidad antioxidante para Pitahaya amarilla.....	69
Tabla 3.23. Test Tukey entre métodos de determinación de capacidad antioxidante para Pitahaya amarilla.....	69

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. Muestras de Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.....	82
Anexo II. Muestras en el Liofilizador.....	83
Anexo III. Preparación del Buffer y determinación del A.A por Voltamperometría.....	84
Anexo IV. Reactivos para la Identificación de metabolitos secundarios en la P.A y P.R.....	85
Anexo V. Constancia de Identificación del espécimen vegetal “ <i>Hylocereus megalanthus</i> ”.....	86
Anexo VI. Constancia de Identificación del espécimen vegetal “ <i>Hylocereus undatus</i> ”.....	87
Anexo VII. Test F para el método CUPRAC.....	88
Anexo VIII. Test F para el método ABTS.....	88
Anexo IX. Test F para el método DPPH.....	88
Anexo X. Test F para el método de Folin Ciocalteu.....	89
Anexo XI. Test F para el método de Voltamperometría.....	89
Anexo XII. Test T para el método de Voltamperometría.....	89
Anexo XIII. Test T para el método de Folin-Ciocalteu.....	90
Anexo XIV. Resumen de resultados.....	90
Anexo XV. Análisis de varianza de Pitahaya- Capacidad antioxidante.....	91
Anexo XVI. Tabla de medias por Mínimos cuadrados para Pitahaya- Capacidad antioxidante.....	91
Anexo XVII. Preparación del buffer acetato de sodio.....	92

LISTADO DE ABREVIATURA

CUPRAC: *Capacidad de reducción antioxidante del cobre*

DPPH: *(2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)*

ABTS: *(Ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)*

CFT: Compuestos fenólicos totales

A.A: Ácido ascórbico

P.A: Pitahaya amarilla

P.R: Pitahaya roja

TROLOX: *(6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico)*

TE: Equivalente trolox

GAE: Equivalente de ácido gálico

RL: Radical libre

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

SET: Transferencia única de electrones.

HAT: Transferencia de átomos de hidrógeno.

FRAP: Poder de reducción antioxidante del hierro

DMPD: *N, N-dimetil-p-fenilendiamina*

ORAC: *Capacidad de absorción del radical oxígeno*

TRAP: *Parámetro antioxidante de captura de radicales*

HMDE: Electrodo de gota colgante de mercurio

DME: Electrodo de la gota de mercurio

SMDE: Electrodo de gota de mercurio estacionario

CSV: Voltamperometría de redisolución catódica

ASV: Voltamperometría de redisolución anódica

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al trolox

MeOH: Metanol

EtOH: Etanol

Cu⁺²: Cobre estado de oxidación II

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son moléculas capaces de proteger a nuestro organismo de los efectos causados por los radicales libres, son capaces de retardar o prevenir la oxidación de las moléculas de nuestro organismo ayudándonos a prevenir posibles enfermedades que afecten a futuro nuestra salud.

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante en la cual se pueden producir radicales libres. Los radicales libres al tener un electrón desapareado con capacidad de aparearse, buscan reaccionar con moléculas estables con el fin de alcanzar una estabilidad electroquímica conduciendo a nuestro organismo a diversas enfermedades tales como: envejecimiento precoz, problemas del sistema cardiovascular (arteriosclerosis), problemas en el sistema nervioso, daño genético (mutaciones y cánceres), entre otras. Debido a que la capacidad de nuestro organismo para contrarrestar los radicales libres es limitada, es de mucho interés el consumo de alimentos naturales que proporcionen sustancias beneficiosas a la salud.

El Perú tiene una gran diversidad de especies vegetales que han sido utilizadas desde nuestros ancestros con fines nutricionales y curativos para distintas enfermedades, las cuales pueden ser utilizadas como materia prima para la obtención y aislamiento de principios activos. Estos productos naturales en su mayoría contienen moléculas capaces de contrarrestar los agentes nocivos a los cuales nuestro cuerpo y nuestras células están expuestos día a día, las que además dañan su estructura y por ende la salud de las personas.

La “Pitahaya amarilla” *Hylocereus megalanthus* es una fruta exótica obtenida del cactus del mismo nombre perteneciente a la familia de las cactáceas, existen diversas variedades de ellas como “Pitahaya roja” *Hylocereus undatus*, las cuales podrían tener un alto contenido en vitamina C y polifenoles, llevándolos así a tener propiedades antioxidantes. Las propiedades farmacológicas que se le atribuyen son hipoglucemiantes, hipolipemiantes, laxante, tonificante de los músculos del corazón, antitumoral y capacidad antioxidante.

Los antioxidantes como compuestos fenólicos, flavonoides y vitaminas actúan sobre los radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen envejecimiento prematuro, causan daño a nivel DNA produciendo alguna mutación o desencadenando cáncer.

Los productos naturales al poseer componentes y propiedades beneficiosas para la salud de las personas, han traído consigo la atención de la industria alimentaria y farmacéutica.

Debido a la gran importancia atribuida al consumo del fruto *Hylocereus megalanthus* (Pitahaya amarilla) e *Hylocereus undatus* (Pitahaya roja) que es cultivado, en el departamento de Amazonas, es que se realizó el presente trabajo en el que se evaluó y comparó el contenido de ácido ascórbico de ambas especies por el método voltamperométrico, el contenido de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu y la actividad antioxidante por los métodos DPPH, CUPRAC y ABTS, se evaluó y comparó los resultados obtenidos con los métodos propuestos para la determinación de la actividad antioxidante de la Pitahaya. Con este estudio de ambas especies se espera conocer más acerca de estos frutos y fomentar su consumo en la ciudad de Arequipa.

Un trabajo realizado por Wee et al, en el 2011 determinaron la capacidad antioxidante del fruto y la pulpa de la familia Cactácea, género *Hylocereus*, por el método de DPPH comparando su capacidad antioxidante entre dos especies.

HIPÓTESIS.

Debido a la gran importancia de las enfermedades producidas por radicales libres y dado que se le atribuye poder antioxidante a los frutos de Pitahaya amarilla (*hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*hylocereus undatus*), es posible determinar el contenido de ácido ascórbico y compuestos fenólicos totales que están relacionados a la capacidad antioxidante y comparar si existe diferencia entre ellas.

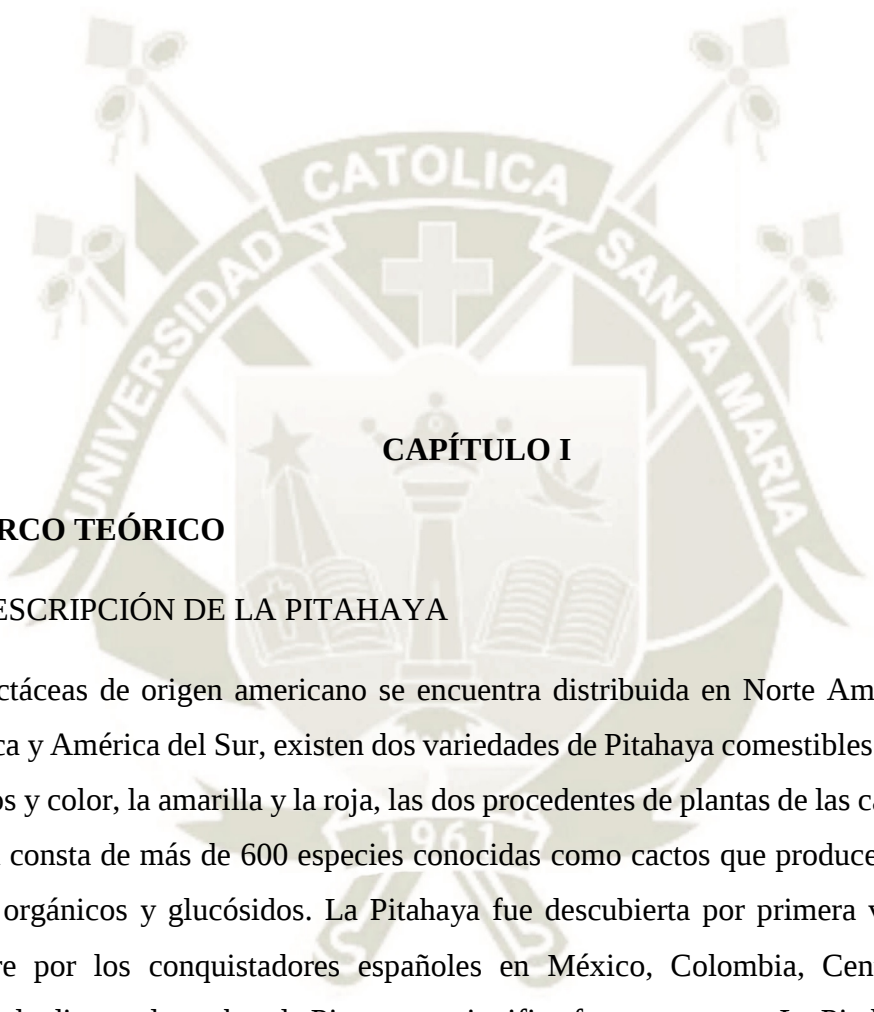
OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el contenido de ácido ascórbico y capacidad antioxidante del fruto liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*).

Objetivos específicos

- Obtener un liofilizado del fruto de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*).
- Obtener un extracto del fruto liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) por sonicación.
- Realizar un screening fitoquímico de los extractos etanólicos del fruto liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*).
- Determinar y comparar el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en los extractos de los frutos liofilizados Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) mediante el método de Folin Ciocalteu
- Determinar y comparar el contenido de ácido ascórbico de los frutos liofilizados de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) mediante el método de voltamperometría.
- Determinar y comparar la capacidad antioxidante de los extractos de los frutos liofilizados de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) por los métodos DPPH, CUPRAC y ABTS



CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA PITAHAYA

Las cactáceas de origen americano se encuentra distribuida en Norte América, Centro América y América del Sur, existen dos variedades de Pitahaya comestibles de diferentes tamaños y color, la amarilla y la roja, las dos procedentes de plantas de las cactáceas, esta familia consta de más de 600 especies conocidas como cactus que producen mucilagos, ácidos orgánicos y glucósidos. La Pitahaya fue descubierta por primera vez en forma silvestre por los conquistadores españoles en México, Colombia, Centroamérica y quienes le dieron el nombre de Pitayo que significa fruta escamosa. La Pitahaya amarilla y Pitahaya roja se cultiva de enero a marzo y desde junio hasta septiembre. ^[1]

1.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FRUTA

Es una planta cactácea perenne que crece en medios húmedos y secos sobre árboles, troncos secos, piedras y muros las cuales les sirve para apoyarse porque su arquitectura le impide sostenerse a sí misma. Esta planta produce una fruta exótica deliciosa; se denominan succulentas por denotar su riqueza en agua, tienen sabor dulce y aromático, esta fruta se conserva entre 4 y 6 ° C y alto grado de humedad alrededor de 83 % en esta

forma se puede almacenar hasta 4 semanas en óptimas condiciones, la maduración tiene lugar a una temperatura ambiente de 20 ° C. ^[1]

- a) Forma: El fruto de la Pitahaya tiene forma ovoide larga y redondeada, la amarilla se caracteriza por tener una corteza con espinas y la roja por su corteza gruesa y con brácteas; la pulpa de ambas es muy aromática y está repleta de semillas.
- b) Tamaño y peso: La Pitahaya roja es de mayor tamaño que la Pitahaya amarilla, la amarilla mide unos 90 milímetros de largo y tiene un diámetro de 65 a 70 milímetros. La roja tiene unos 12 centímetros de largo y un diámetro de 75 a 80 milímetros; el fruto de la Pitahaya roja y amarilla pesa entre 200 gramos a 1000 gramos. ^[1]
- c) Color: La variedad amarilla inicialmente es verde y amarilla en la madurez, ambas tienen la pulpa de color blanco y repleto de diminutas semillas negras; la variedad roja se caracteriza porque su cáscara es roja y gruesa y tiene brácteas verdes a diferencia de las espinas que presenta la variedad amarilla.
- d) Sabor: Su sabor es dulce y aromático es exquisito como agua azucarada. ^[1]

1.1.2. VARIEDADES

- Piel amarilla y pulpa blanca llamada *Hylocereus megalanthus*.
- Piel roja y pulpa blanca llamada *Hylocereus undatus*. ^[2]

1.1.2.1. PITAHAJA AMARILLA

Nombre científico: *Hylocereus megalanthus*, especie mayormente conocida en el territorio peruano; denominada como fruta tropical originaria del continente americano, su cáscara es blanda, su flor se caracteriza por su gran tamaño ya que alcanza 30 cm de longitud, al principio la pulpa de la fruta es de color blanco con numerosas semillas pequeñas de color marrón oscuro; la Pitahaya amarilla tiene mayor interés económico y comercial debido a su sabor y mayor resistencia al transporte y almacenamiento; se cultiva en zonas tropicales; la planta es un cactus trepador de largos tallos triangulares, la fruta es ovoide de color verde al comienzo y amarilla en la madurez, se le atribuye acción antitumoral. ^[2]



Figura 1.1. Pitahaya amarilla Churuja-Amazonas

1.1.2.2. PITAHAJA ROJA

Nombre científico: *Hylocereus undatus*, se debe evitar masticar las semillas; a menos que se la quiera utilizar como purgante energético; las Pitahayas maduras se pelan sin dificultad. Es una fruta que tiene aproximadamente 90 % de agua con un sabor dulce, tiene bajas cantidades de calorías y carbohidratos; lo cual lo convierte en un alimento muy beneficioso para la salud; gracias al aporte líquido de la fruta sirve como alimento diurético es decir evita las retenciones de líquidos, en su composición es rica en agua, vitaminas, mucílagos, fenoles; sustancias con muchos beneficios y propiedades e indispensables en la nutrición humana; también es rica en fibra la cual ayuda con el tránsito intestinal. Es recomendada para reforzar el sistema inmunológico y aumentar las defensas del cuerpo, también se dice que ayuda en la formación de tejidos, huesos, glóbulos rojos y colágeno; ayuda a que las células del organismo se mantengan en perfectas condiciones. El cultivo de este tipo de pitahaya se realiza en varios países como en España donde se le conoce como Pitahaya Canaria; también crece en países cálidos de América del Sur. ^[3]



Figura 1.2. Pitahaya roja Churuja-Amazonas

1.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica de la Pitahaya amarilla se presenta en la Tabla 1.1, y de la Pitahaya roja se presenta en la Tabla 1.2.

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de la Pitahaya amarilla

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Caryophyllidae</i>
Familia	<i>Cactaceae</i>
Género	<i>Hylocereus</i>
Especie	<i>Hylocereus megalanthus</i>

Fuente: (K.Schum.ex Vaupel) Ralf Bauer. Revista cactaceae Syt. Init 17:28,2003^[93]

Tabla 1.2. Clasificación taxonómica de la Pitahaya roja

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Caryophyllidae</i>
Familia	<i>Cactaceae</i>
Género	<i>Hylocereus</i>
Especie	<i>Hylocereus undatus</i>

Fuente: (K.Schum.ex Vaupel) Ralf Bauer. Revista cactaceae Syt. Init 17:28,2003^[93]

1.1.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PITAHAYA

El fruto de la Pitahaya tiene aproximadamente un 90 % de agua es muy refrescante e hidratante, la cantidad de azúcar que le confiere la dulzura oscila entre 10 y 19 % siendo la Pitahaya amarilla la que tiene mayor dulzura; no engorda ya que es una fruta de muy bajo valor calórico y apenas contiene carbohidratos Esta fruta es rica en fibra, calcio, fósforo, vitaminas como la B1, B2, A. En especial la variedad roja; ayuda a mejorar la digestión y problemas de estreñimiento; se aconseja en casos de anemia; es una fruta diurética y ayuda a bajar el nivel del ácido úrico.^[4] Las dos variedades de Pitahaya más conocida son la roja y amarilla ambas de gran contenido nutricional.

La composición nutricional de la *Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus* se presenta en la Tabla 1.3. ^[4]

Tabla 1.3. Composición nutricional de *Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus*

Composición Nutricional	Pitahaya Amarilla	Pitahaya Roja
Agua	85.4 g	89.4 g
Calcio	10.0 mg	6.0 mg
Calorías	50.0	36.0
Carbohidratos	13.2 g	13.2 g
Fibra	0.5 g	0.5 g
Fósforo	16.0 mg	16.0 mg
Grasa	0.1 g	0.1 g
Hierro	0.3 mg	0.4 mg

Fuente: José Apolonio Alvarado Romero (2014) ^[4]

1.1.5. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

1.1.5.1. RAÍZ

Las Pitahayas tienen dos tipos de raíces; las primarias que se encuentran en el suelo y las secundarias o adventicia que se desarrollan principalmente fuera del suelo. Las raíces primarias crecen siguiendo el nivel del suelo, profundizan de 5 a 25 cm y su área de expansión es de aproximadamente 30 cm de diámetro. Las raíces secundarias se producen después de una prolongada sequía siendo sus funciones el fijar y sostener las plantas a su tutor, absorber sustancias nutritivas y agua del ambiente. ^[5,6]

1.1.5.2. TALLO

Las plantas son perennes de carácter terrestre, con tallos triangulares verdes; las plantas son muy largas y ramificadas de 5 a 6 cm de diámetro, normalmente tiene 3 costillas anchas, los tallos son extremadamente succulentos; la epidermis es gruesa con estomas presentes o pequeños agujeros hundidos, mucilagos y otras sustancias regulan la pérdida de agua en época de sequía; en las horas más calientes las estomas se cierran y la planta pierde menos agua. ^[5,6]

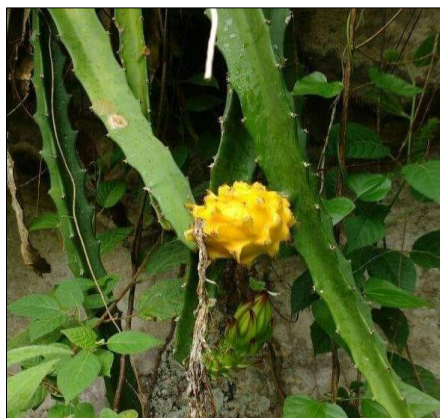


Figura 1.3. Tallo de la P.A

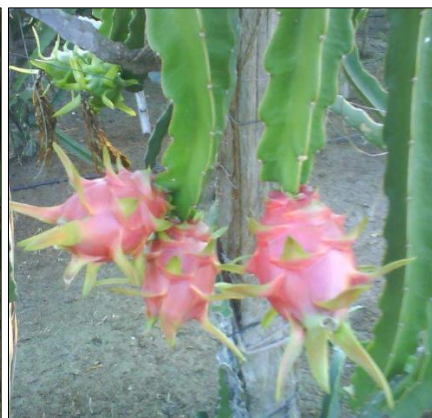


Figura 1.4. Tallo de la P.R

1.1.5.3. FLORES

Es hermafrodita, grande y mide de 15 a 30 cm de largo, son vistosas, aromáticas e individuales, de color blanco o rosado; presenta forma de tubo o trompeta, con segmentos exteriores blancos, erectos o lanceolados, anchos, enteros, apiculados, filamentos delgados color crema, ovario ínfero y unilocular, abre una sola vez en la noche, aunque han encontrado flores que abren durante la mañana y en las tardes; su aroma y miel atraen a muchos insectos; se autofecundan pero también pueden tener una fecundación cruzada; durante el día cuando las flores están cerradas se han encontrado abejas en su interior. Las flores son erectas y cuando se abren orientan buscando la luz de la luna o del sol en las primeras y las últimas horas del día. Las flores nacen en las axilas de las espinas en las partes más expuestas. La floración está en función de la humedad, luz, temperatura y la fertilización; cuando estos factores son favorables se presenta una buena floración.^[5,6] Las flores se presenta en la Figura 1.5 y 1.6



Figura 1.5. Flor de la P.A



Figura 1.6. Flor de la P.R

1.1.5.4. FRUTO

Es una baya de forma ovoide, redondeada o alargada de 10 a 12 cm de diámetro, la cáscara tiene brácteas u orejas escamosas de consistencia carnosa y cerosa; la cantidad y tamaño de las brácteas depende de la variedad; el largo del fruto fluctúa entre 8 a 12 cm y su peso es de 200 a 800 gramos; su pulpa es consistente y espumosa; el color del fruto en el Perú; la cáscara roja pulpa blanca (Pitahaya roja), cáscara amarilla pulpa blanca (Pitahaya amarilla).^[7] Como se muestra en la Figura 1.7 y 1.8



Figura 1.7. Fruto de la P.A



Figura 1.8. Fruto de la P.R

1.1.5.5. SEMILLAS

Las semillas se encuentran distribuidas en la pulpa del fruto son muy pequeños y abundantes; están cubiertas por una sustancia mucilaginosa, son muy delicadas y normalmente presentan buena germinación. En la Pitahaya roja las semillas son pequeñas en comparación con la Pitahaya amarilla son de color café oscuro en su desarrollo, cuando el fruto está completamente maduro adquieren el color negro mate lustroso; las semillas se encuentran distribuidas en toda la pulpa.

1.1.6. ORIGEN Y CONSERVACIÓN

Es originaria de América tropical, siendo México, Centro América y el Caribe los lugares que presentan el mayor número de especies; el cultivo de la Pitahaya por lo general se localiza en zonas subtropicales y amazónicas de agricultura. La maduración tiene lugar a temperatura ambiente 20 °C, se ha de conservar entre 4 a 6 °C y a un alto grado de humedad de 80 a 89 %; de esta forma se puede conservar hasta cuatro semanas en óptimas condiciones. En la Pitahaya amarilla llega a su madurez cuando el color de su piel se vuelve amarillo y en la Pitahaya roja la fruta está madura cuando

las brácteas se tornan amarillas; se debe conservar en un lugar fresco alejados de la luz del sol. ^[8]

1.1.7. CULTIVO

Se puede cultivar los dos primeros años asociado con otros cultivos tales como frijol, piña, tomate; por esta razón el cultivo de Pitahaya es una buena alternativa para los pequeños y medianos productores. En el Perú las épocas de cosecha son dos al año en los meses de febrero-marzo y de julio-agosto. Las características climáticas y edáficas para su desarrollo son a una temperatura de 18 a 25 ° C para la Pitahaya amarilla y para la Pitahaya roja es de 28 a 30 ° C. Requerimientos del suelo para su cultivo; el nitrógeno favorece el crecimiento de los tallos y aumenta el porcentaje de flores; el fósforo contribuye a la floración y la fructificación; el potasio favorece el aumento del grosor de la piel de los tallos. ^[8]

1.1.8. COSECHA

La recolección debe realizarse cuando el fruto ha alcanzado la madurez fisiológica. Manejo de pos cosecha: La limpieza de la fruta se hace con cepillos suaves para quitar las espinas, basura, residuos de flores, hormigas u otras impurezas. Se clasifica de acuerdo al tamaño y grado de madurez. La Pitahaya debe lucir fresca, tener un color intenso y brillante; la fruta debe estar libre de picaduras y golpes y no tener indicios de marchitamiento.

1.1.9. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

La Pitahaya contiene, mucilagos y fenoles; también contiene vitaminas del grupo B (como la B1 o tiamina; B3 o niacina y la B2 o rivotravina); tiene minerales como calcio, fósforo, hierro y tiene alto contenido en agua y posee proteína vegetal y fibra soluble; sus semillas son comestibles que contienen ácidos grasos beneficiosos. ^[9]

Al fruto de la Pitahaya se le atribuye acción antitumoral, antiinflamatorio y antioxidante; beneficios y usos medicinales: ^[9]

- Retrasa el envejecimiento celular
- Refuerza el sistema inmunológico
- Estimula la producción de glóbulos blancos, rojos y plaquetas
- Puede prevenir la arterioesclerosis

- Nos ayuda a regular el tránsito intestinal
- Reduce el riesgo de padecer infarto cerebral y cardiaco
- Las semillas tienen efecto laxante
- Nos ayuda a prevenir los cálculos renales
- Inhibe el crecimiento de células tumorales
- Regula el nivel de azúcar en sangre (glucemia)
- Estimula la producción de colágeno
- Mejora la absorción del hierro (combate la anemia ferropénica)
- Excelente para la formación de huesos y dientes
- Reduce los niveles de ácido úrico o gota

Se trata de una fruta muy especial en cuanto a cualidades medicinales con un amplio espectro de aplicaciones; desde el alivio de problemas estomacales comunes tales como gastritis, recomendada para personas con diabetes y problemas endocrinos; uno de los beneficios de la Pitahaya es su contenido de aceites naturales en la semilla que mejora el funcionamiento del tracto digestivo; tiene efecto laxante. ^[9]

En México, además de los frutos; los tallos de la Pitahaya se utilizan como verdura y medicina; se menciona que fracciones licuadas de tallos son utilizadas para el tratamiento de afecciones de los riñones; para el tratar el dolor de cabeza y para eliminar la caspa. Los tallos son más nutritivos que la zanahoria y la lechuga; y en algunos sitios los utilizan como forraje para dárselo al ganado; con las flores se preparan diferentes infusiones para aliviar enfermedades del corazón. ^[9]

1.2. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son captadores de radicales libres; es una molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de un sustrato oxidable, actuando como donador de electrones (agente reductor); la oxidación de tales sustratos podrá ser iniciada por dos tipos de especies reactivas: los radicales libres y aquellas especies que sin ser radicales libres; son suficientemente reactivas para inducir la oxidación de sustratos. Los antioxidantes son un conjunto de compuestos químicos o productores biológicos que contrarrestan de un manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales libres u oxidante, tales como la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El antioxidante al reaccionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un

radical libre débil con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos, como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Los antioxidantes pueden producirse en las células (antioxidantes endógenos) y también puede ser suministrados externamente a través de los alimentos o suplementos (antioxidantes exógenos).^[10-12]

1.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

Respecto a los antioxidantes pueden ser de dos tipos:^[13]

- Antioxidantes endógenos son las enzimas (proteínas) con capacidad antioxidante que no se consumen al reaccionar con los radicales libres y son dependientes de sus cofactores tales como el cobre, hierro, zinc, magnesio y selenio.
- Antioxidantes exógenos son las moléculas que provienen de la dieta y se consumen al reaccionar con los radicales libres, por lo que deben ser reemplazados regularmente.

Según su naturaleza, se clasifica en dos grupos:^[14]

- a) Antioxidantes enzimáticos: Superóxido dismutasa con cofactores Mn, Cu-Zn, Glutathione, peroxidasa y Catalasa. (Endógenos).
Incluyen enzimas capaces de eliminar o neutralizar especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno o sus intermediarios.
- b) Antioxidantes no enzimáticos: Vitamina E, vitamina C, ácido lipoico, ubiquinonas, carotenoides y flavonoides. (Exógenos).
Permite la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, la inhibición de la unión de iones metálicos necesarios para la formación de ERO.

Además de las vitaminas, los oligoelementos como el cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio son necesarios incorporarlos al organismo a través de la dieta, porque conforman la parte activa del núcleo de las enzimas antioxidantes.^[14]

1.2.2. ÁCIDO ASCÓRBICO

La vitamina C o ácido ascórbico es un importante antioxidante hidrosoluble sensible al calor, por su gran capacidad para donar electrones. Su deficiencia se conoce como escorbuto y se asocia a una mayor susceptibilidad a infecciones, debilidad muscular y fatiga; en niños puede causar anomalías y hemorragias óseas. La vitamina C tiene

efecto protector en la oxidación celular y es capaz de reducir el número de radicales libres producidos durante procesos metabólicos. El poder antioxidante se debe principalmente a la alta capacidad de donar electrón y poder regresar en su forma reducida la cual es su forma más activa. Es un nutriente esencial requerido para un cierto número de reacciones metabólicas en todos los animales y plantas y que es sintetizada internamente por algunos organismos, a excepción de los humanos, primates, peces, aves e insectos. Algunos animales la sintetizan a partir de la glucosa mediante la vía del ácido glucorónico; los que no la pueden sintetizar es porque carecen de la enzima que cataliza la etapa final de oxidación, lo que estos deben ingerirla a través de la alimentación. Es termolábil y se oxida en el aire con facilidad, además que actúa como cofactor en numerosas enzimas implicadas en la biosíntesis de colágeno, carnitina y en algunos neurotransmisores, atrapando una gran variedad de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en medios acuosos. La vitamina C se encuentra biodisponible en frutas, hortalizas, zumos y alimentos fortificados. ^[15-17]

Contiene varios elementos estructurales que contribuyen a su comportamiento químico: la estructura de la lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, así como un grupo alcohol primario y secundario. La estructura química del ácido ascórbico se presenta en la Figura 1.9.

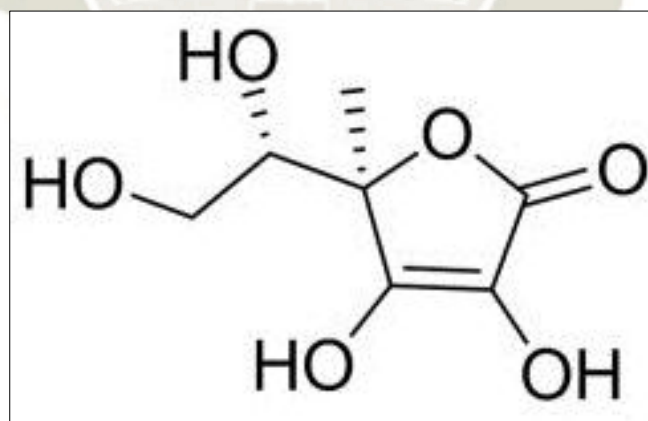


Figura 1.9. Estructura del ácido ascórbico ^[71]

Fuente: Alanoca Soany. (2014) “Evaluación del contenido de ácido ascórbico y polifenoles totales del sancayo (*corryocactus brevistylus*) y determinación de su actividad antioxidante y genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica.”[Tesis para optar por el título profesional de Ingeniera Biotecnologa]. Universidad Católica de Santa Maria Arequipa .Peru.

1.2.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

Es soluble en agua, por lo que suele eliminarse en el agua de cocción, se oxida con facilidad en solución, en especial cuando se expone al calor; la oxidación puede acelerarse por la presencia de hierro, cobre o pH alcalino. El ácido ascórbico puede ser sintetizado a partir de glucosa y galactosa por las plantas y muchos mamíferos, pero no por el hombre, se absorbe en el intestino en un 90 %; las dietas ricas en zinc o pectina puede disminuir la absorción, en tanto que esta puede aumentar por sustancias en extracto cítrico natural; las cantidades ingeridas mayores del nivel de saturación de los tejidos se eliminan por orina. ^[16]

El contenido de vitamina C y polifenoles en diversos frutos se muestra en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Contenido de ácido ascórbico y polifenoles de distintos frutos.

Fruto (pulpa)	Ácido ascórbico (mg de ácido ascórbico/ 100g)	Polifenoles (mg de ácido gálico/ 100g)	Autor
Albaricoque fresco	7	45,7	<i>Tosun I., et al. 2003</i>
Cereza fresca	10	70,7-241,4	<i>Melicháčová S., et al. 2010</i>
Ciruela fresca	6	376,5	<i>Zapata S., et al. 2014</i>
Fresa fresca	60	1638,4	<i>Zapata S., et al. 2014</i>
Limón fresco	50	30-35	<i>Zapata P., et al. 2006</i>
Limón	45	60-70	<i>Zapata P., et al. 2006</i>
Mandarina fresca	31	242,6	<i>Zapata S., et al. 2014</i>
Manzana fresca	5	426,7	<i>Zapata S., et al. 2014</i>
Melocotón fresco	7	15-25	<i>Zapata P., et al. 2006</i>
Melón fresco	33	20-30	<i>Zapata P., et al. 2006</i>
Sandia	7	10-20	<i>Zapata P., et al. 2006</i>
Naranja	50	40-50	<i>Zapata P., et al. 2006</i>
Pera fresca	4	124,7	<i>Zapata S., et al. 2014</i>
Camu-camu (liofilizado)	1445	1385,549- 1188,573	<i>Salgado N., et al. 2012</i>

Fuente: Geidy D. "Tablas Científicas". Ed Sadag color. 7 Ed. Barcelona 1975. ^[79]

1.2.2.2. FUNCIONES Y BENEFICIOS DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

Tiene una potente acción antioxidante, tiene múltiples funciones como coenzima o cofactor, protege el organismo de los radicales libres y es estimulante de la absorción del hierro. Participa en la hidroxilación de la prolina para formar hidroxiprolina en la síntesis de colágeno, sustancia de la cual depende la integridad de la estructura celular en todos los tejidos fibrosos (tejido conjuntivo, cartílago, matriz ósea, dentina, piel y tendones). Participa en la cicatrización de heridas, fracturas y hemorragias, también reduce el riesgo de infecciones. Es esencial para la oxidación de ciertos aminoácidos fenilalanina y tirosina; en el metabolito del triptófano y en la síntesis de noradrenalina. Una alimentación rica en vitamina C ofrece una protección añadida contra todo tipo de cánceres, es regenerador de la vitamina E. ^[15]

1.2.2.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

El ácido ascórbico es un donante de electrones, convirtiéndolo en un potente antioxidante soluble en agua. Su actividad antioxidante deriva del desplazamiento de ácido L- ascórbico a su forma oxidada L-dehidroascórbico eso también habilita a la molécula para combatir radicales oxidativos y radicales acuosos como el oxígeno singlete. ^[18] Tal como se muestra en la Figura 1.10.

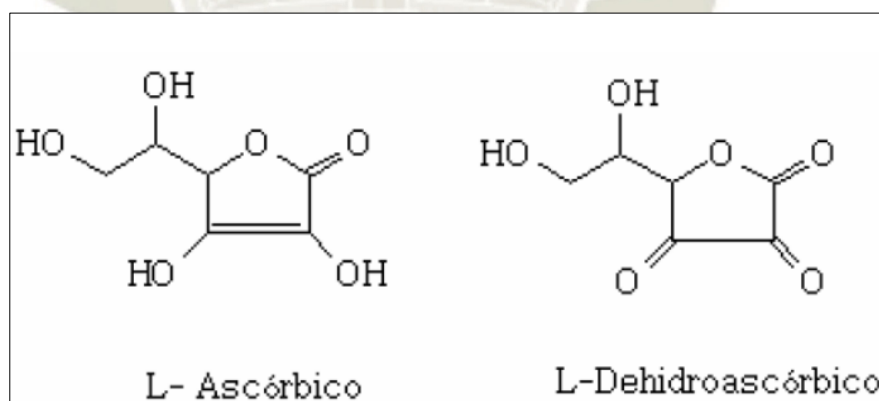


Figura 1.10. Formas moleculares en equilibrio del ácido ascórbico ^[71]

Fuente: Alanoca Soany. (2014) “Evaluación del contenido de ácido ascórbico y polifenoles totales del sancayo (*corryocactus brevistylus*) y determinación de su actividad antioxidante y genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica.”[Tesis para optar por el título profesional de Ingeniera Biotecnologa]. Universidad Católica de Santa Maria Arequipa .Peru.

El ácido ascórbico es el antioxidante más eficaz para evitar la peroxidación lipídica en cualquier tipo de membrana celular, pero este es muy sensible a la presencia de

hierro disuelto el cual puede degradarlo. El proceso de oxidación de ácido ascórbico depende de la presencia de metales como el cobre o el hierro que lo conducen a su degradación. Entre otros factores fisicoquímicos se incluye la temperatura, la concentración de sales y los azúcares. El pH es muy importante en este caso, además de la presencia de oxígeno, enzimas, catalizadores metálicos, aminoácidos, oxidantes y reductores inorgánicos que influyen en su degradación. ^[19]

1.2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS

Son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal, se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia, sabor y aroma de los vegetales. Se encuentran en las verduras y frutas. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres. ^[20]

Los fenoles son un grupo de compuestos orgánicos que presentan en su estructura un grupo funcional hidroxilo unido a un radical arilo. Por lo tanto, la fórmula general para un fenol se escribe como Ar-OH. Los fenoles se nombran, generalmente, como derivados del miembro más sencillo de la familia que es el fenol o hidroxibenceno. ^[20]

1.2.3.1 CARACTERÍSTICAS ^[20]

- Contienen un anillo aromático con un grupo -OH (fenol).
- Suelen ser ácidos, solubles en agua, y pueden formar puentes de hidrógeno.
- Pueden establecer interacciones con un grupo peptídico (taninos).
- Los fenoles con grupo catecol pueden formar quelatos con metales.
- Son muy susceptibles a oxidación (antioxidantes).
- La mayoría son derivados fenilpropanoides.
- Un grupo numeroso e importante entre ellos son los flavonoides.
- Sus estructuras pueden ser monoméricas, diméricas (lignanós) y poliméricas (lignina y taninos).

1.2.3.2. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos comprenden una amplia variedad de moléculas que tienen una estructura polifenol (es decir, varios grupos hidroxilo en el anillo aromático), también moléculas con fenol en el anillo tales como ácidos fenólicos. ^[21]

Según su estructura química tenemos 2 grandes grupos: ^[21]

a) No Flavonoides

Entre ellos hay dos subgrupos:

- Fenoles no carboxílicos: C₆, C₆-C₁, C₆-C₃.
- Ácidos fenólicos: derivados del ácido benzoico C₆-C₁ y derivados del ácido cinámico C₆-C₃.

b) Flavonoides

Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado, existen tres Subgrupos: ^[21]

- Antocianos.
- Flavonas, flavononas y flavanoles
- Taninos condensados y lignanos.

Clasificación y biosíntesis de los compuestos fenólicos por la ruta del ácido shikímico se muestra en la Figura 1.11.

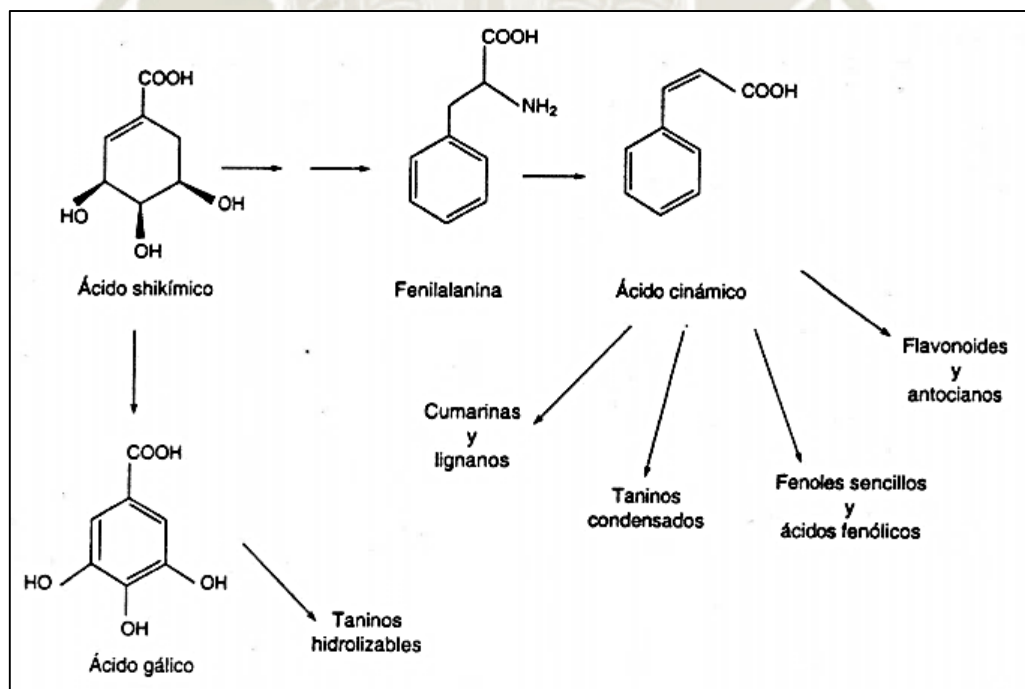


Figura 1.11. Clasificación y biosíntesis de compuestos fenólicos ^[42]

. Claudia Kuklinski. "Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural". (2003)

1.2.3.3. FUNCIONES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Desde el punto de vista de su actividad biológica muchos polifenoles tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que se le confiere actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. Los flavonoides, uno de los grupos pertenecientes a los compuestos fenólicos, además de poseer una gran actividad antioxidante, presentan otras propiedades a nivel celular que incluyen: la estimulación de la comunicación intercelular a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de destoxificación. ^[22,23]

Existen también sustancias con actividad estrogénica (fitoestrógenos), como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol, mientras que otros, como los taninos, son capaces de fijar metales y proteínas, lo que afecta a la disponibilidad de éstos y puede estar en el origen de algunos efectos inespecíficos (por ejemplo, antimicrobianos), o prevención de enfermedades neurodegenerativas. Compuestos fenólicos como las antocianinas que son responsables del color rojo, azul y violáceo característicos de muchas frutas como fresas, uvas, ciruelas, etc. ^[24,25]

1.2.3.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son considerados como potentes antioxidantes en los sistemas biológicos in vitro. La actividad antioxidante de los flavonoides es mucho más fuertes que la de las vitaminas C y E. Los efectos protectores se han atribuido a su capacidad de transferir electrones a los radicales libres, la quelación de catalizadores metálicos, activar enzimas antioxidantes, inhibir oxidasas, reducir los radicales de la alfa-tocoferol, mitigar el estrés oxidativo causado por el óxido nítrico y aumentar los niveles de ácido úrico. ^[25]

1.2.3.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los polifenoles tienen la característica de ser fuertes antioxidantes por mecanismo de captación de radicales libres, que puede neutralizar los radicales libres donando átomos de hidrógeno y formando productos más estables y también a través de la quelación de metales de transición, reduciendo o inhibiendo la formación de radicales libres. ^[25]

1.3. RADICALES LIBRES

Los RL son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos y tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar de alcanzar su estabilidad electroquímica. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media. Desde el punto de vista molecular, actúan como potentes agentes oxidantes y son causa de envejecimiento al combinarse con moléculas esenciales, como el ADN y proteínas, a las cuales desactivan. La función que desarrollan los RL presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos. En los seres vivos se genera muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término “especies reactivas de oxígeno (ROS)” como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y/o fácilmente convertibles en radicales. De forma análoga existen especies reactivas del nitrógeno (RNS), del cloro (RClS) y del bromo (RBrS).^[26-28]

Los RL recorren nuestro organismo intentando robar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido robar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que puede destruir nuestras células. Los RL pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario, o de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV.^[29]

Los daños que los RL pueden ocasionar en las células son: destrucción de las proteínas de la membrana ocasionando la pérdida de la identidad de la célula, fusión de los lípidos (grasas) y las proteínas de la membrana, endureciéndola, haciéndola más frágil y quebradiza, punción de la membrana celular permitiendo que las bacterias y virus puedan penetrar fácilmente, ruptura de la membrana nuclear abriendo el núcleo y dejándolo expuesto al material genético, mutación y destrucción del material genético, reimprimiendo y destruyendo la anterior información genética, y amenaza al sistema inmunológico mediante la debilitación de las células inmunes debido a tales daños. Como resultado, el daño de los RL se ha relacionado con diferentes procesos patológicos como la aterosclerosis, cáncer, catarata senil, insuficiencia renal aguda y crónica, diabetes

mellitus, hipertensión arterial, cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica distrofia muscular, artritis e inflamación, enfisema pulmonar e incluso el mismo proceso de envejecimiento. Los RL no son completamente dañinos, ya que nuestro propio organismo los fabrica en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus, el incremento de los RL por encima de la cantidad de sustancias antioxidantes, conduce al estrés oxidativo, lo que produce daño celular. [30,31]

1.3.1. FACTORES QUE FAVORECEN LA FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES

[29]

- Radiación ionizante (ultravioleta, térmica)
- Excesiva disponibilidad de metales de transición
- Efectos adversos de compuestos químicos tóxicos
- Contaminación ambiental
- Exceso de ejercicio
- Humo de cigarrillo
- Interrupción de la cadena mitocondrial de electrones
- Disminución de la capacidad antioxidante enzimática
- Exceso de oxígeno o aumento de su concentración

1.4. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio en nuestras células debido a un aumento en los radicales libres, especies reactivas de oxígeno y una disminución en los antioxidantes. Con el tiempo, este desajuste en el equilibrio entre los RL y los antioxidantes puede dañar nuestros tejidos. El estrés oxidativo en condiciones severas puede causar la muerte celular, en condiciones moderadas desencadenar la apoptosis y en condiciones intensa puede provocar la necrosis. [32,33]

El estrés oxidativo puede generarse por 2 motivos: [28]

- a) La disminución de antioxidantes que puede ser ocasionada por la malnutrición (ingesta dietética insuficiente de alfa-tocoferol, ácido ascórbico o aminoácidos azufrados necesarios para la generación de glutatión).
- b) La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno causadas por radiación, exposición a altas concentraciones de oxígeno, elevada concentración de

contaminantes o una excesiva activación de los sistemas naturales productores de radicales (enfermedades crónicas inflamatorias como artritis reumatoide o situaciones agudas en las que se desencadena una respuesta inflamatoria sistémica como es la enfermedad grave)

El daño que produce el estrés oxidativo habitualmente se relaciona con el proceso de envejecimiento (asociado a la acumulación de componentes celulares oxidados como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos). ^[34] La Tabla 1.5 presenta fuentes comunes de radicales libres y antioxidantes.

Tabla 1.5. Fuentes comunes de radicales libres y fuentes comunes de antioxidantes

Fuentes comunes de radicales libres	Fuentes comunes de antioxidants
-Humo del cigarrillo	-Frutas y verduras
-Contaminación ambiental	-Té y café
-Radiación	-Frijoles
-Luz ultravioleta	-Nueces
-Alcohol/Drogas	-Chocolate oscuro

Fuente: Montero Revisión Anual de la Facultad de Medicina (1996) ^[34]

1.5. ENVEJECIMIENTO

En la vida de los organismos aerobios, es decir, aquellos que usan el oxígeno como medio para conseguir energía, existe el peligro de que la presencia de radicales libres supere las defensas antioxidantes, esta situación se denomina estrés oxidativo y se relaciona con diferentes enfermedades, así como con el envejecimiento, esta situación puede deberse a un aporte insuficiente en la dieta de antioxidantes, a una producción excesiva de radicales libres durante el metabolismo de fármacos, o por una activación excesiva del sistema celular, los RL pueden encontrarse en el interior o en el exterior de las células o incluso diseminados por todo el organismo, manteniendo actividad biológica al oxidarse, dañando principalmente el tejido conjuntivo, proteínas, enzimas, lípidos, membranas celulares, fibras de colágeno, ADN y ARN, entre otros, y su acción también la pueden ejercer sobre los leucocitos favoreciendo su activación anómala, por lo cual están implicados en la producción de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. ^[35,36]

1.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los métodos para la determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inducido o reducido en presencia de un antioxidante, la inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra, sin embargo, hay otros ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Además de los antioxidantes dietéticos comunes (vitaminas C y E), los compuestos fenólicos son considerados como potentes antioxidantes en los sistemas biológicos *in vitro*, la actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. En la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar al antioxidante. [25,37]

Clasificación de los modelos de ensayo *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante según su modo de reacción SET o HAT. Los ensayos basados en HAT y SET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra. [38]

a) Ensayos basados en la transferencia de un solo electrón (SET): Ensayos basados en la reacción por transferencia de un solo electrón; se basan en la medida de la capacidad de un compuesto en reducir un oxidante, que cambia de color cuando se reduce. [38]

- ABTS (*Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico*)
- DPPH (*2,2-difenil-1-picril-hidrazilo*)
- CUPRAC (*Capacidad de reducción antioxidante del cobre*)
- FRAP (*Poder de reducción antioxidante del hierro*)
- DMPD (*N,N-dimetil-p-fenilendiamina*)

b) Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT): Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrogeno; aplican un esquema de reacción competitiva en la cual el antioxidante y el sustrato compiten por un radical peroxilo. [38]

- ORAC (*Capacidad de absorción del radical oxígeno*)
- TRAP (*Parámetro antioxidante de captura de radicales*)
- LDL (*Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad*)
- *Inhibición de la oxidación del ácido linoleico*

1.6.1. ENSAYOS QUE UTILIZAN EL MECANISMO TRANSFERENCIA DE UN SOLO ELECTRÓN (SET)

En general estos métodos utilizan radicales libres estables por lo que no es necesario generarlos en el medio:

1.6.1.1. MÉTODO ABTS

Mide la capacidad de un compuesto de reducir el radical catiónico ABTS⁺ evaluando la disminución en la absorbancia a 734 nm. El ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica. Es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. ^[39]

1.6.1.2. MÉTODO DPPH

Se basa en la reacción del radical reducido (DPPH*) con un donador de hidrógenos y la generación de su forma reducida (DPPH). Se cuantifica midiendo la disminución de absorbancia a 515 nm. Se emplea sobre todo para determinar la eficacia antiradicalaria de compuestos fenólicos. Es soluble solamente en medio orgánico. ^[39]

1.6.1.3. MÉTODO CUPRAC

Se basa en la absorbancia medida del quelato Cu(I)-neocuproína (Nc) [Cu(Nc)²⁺] formando como resultado de la reacción redox de los antioxidantes rompe-cadenas con el agente CUPRAC, Cu(II)-Nc, donde la absorbancia es medida a una longitud de onda de 450 nm. ^[41]

1.6.2. ENSAYOS QUE UTILIZA EL MECANISMO DE TRANSFERENCIA DE ÁTOMOS DE HIDRÓGENO

1.6.2.1. MÉTODO TRAP

Se desarrolla para medir el estado antioxidante del plasma humano. Los radicales peroxilo oxidan antioxidantes del plasma y la oxidación y su inhibición se miden por absorción de oxígeno. Como antioxidante de referencia se usa el Trolox (derivado sintético de la vitamina E). ^[39]

1.6.2.2. MÉTODO ORAC

Mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente, como la fluoresceína, sometida a un flujo constante de radicales peroxilo generados por el AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro). La protección ejercida por los antioxidantes se cuantifica a través de la fluorescencia. [39]

1.7. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN [42]

Existen varias formas de conseguir los principios activos a partir de material vegetal, dentro de ellos están: [42]

- a) Extracción mecánica: Expresión, calor, incisiones.
- b) Destilación: Basada en la diferente volatilidad de los componentes del material vegetal.
- c) Extracción con gases supercríticos: Utiliza gases como dióxido de carbono o butano a temperatura y presión crítica.
- d) Extracción con disolventes: Depende de las características de la droga y la naturaleza del solvente, temperatura, tiempo de contacto, existen dos tipos:
 - d.1) Extracción discontinua: maceración, digestión, infusión, decocción.
 - d.2) Extracción continua: percolación y soxhlet. [42]

1.7.1. EXTRACCIÓN POR SONICACIÓN

En los últimos años ha cobrado gran importancia la extracción con tecnología que asegura una elevada pureza y buen rendimiento. [43,44]

La extracción por sonicación es más apropiada cuando la materia vegetal se ve afectada con las elevadas temperaturas de los métodos de extracción convencionales. [43,44]

1.7.1.1. FUNDAMENTO

Se basa en la aplicación de ondas sonoras de presión con frecuencias superiores 20 kHz para la formación, crecimiento y colapso de burbujas en un medio líquido produciendo la destrucción de la pared celular e incrementando el área

de contacto con el disolvente y facilitando la liberación de los principios activos por ósmosis o difusión. ^[43-45]

1.7.1.2. PARÁMETROS

Disolvente: Las ondas sonoras se ven afectadas por la viscosidad y tensión superficial

Temperatura: Se usan temperaturas menores a las de los métodos extractivos.

Tiempo de sonicación: Depende de la interacción entre disolvente y pared celular. ^[43-45]

1.8. LIOFILIZACIÓN

El frío se utiliza desde tiempos inmemorables empezando por los incas y vikingos con la finalidad de obtener alimentos hipercalóricos, liviana y que no se malogre rápidamente para sus tropas. ^[47]

1.8.1. FUNDAMENTO

Es un proceso de deshidratación mediante la sublimación del hielo que se produce por la presión de vapor y temperatura se encuentran por debajo del punto triple de agua de esta manera se garantiza en los alimentos en su composición y estabilidad no se vean modificadas. ^[46-47]

La liofilización comprende 3 fases:

- a) Congelación: Es la principal etapa de la liofilización que depende de la cantidad y naturaleza, la velocidad de congelación es la que define el número de cristales que se formaran y la porosidad del alimento. ^[48,49]
- b) Sublimación: El agua congelable de producto se elimina bajo la administración de presión al vacío a una velocidad de sublimación que es resultado de la diferencia de la presión de vapor de agua en la interfase de hielo, presión parcial de agua en interfase de hielo y la presión parcial de agua en la cámara de secado: De esta manera el hielo se sublima dando un alimento con el 5 % de humedad. ^[48,50]
- c) Desorción: Se produce cuando se ha eliminado el hielo totalmente y existen porciones de agua no congelable ligadas al alimento para lo cual se eleva la temperatura y de esta

manera que se puedan eliminar dando como resultados el 2 % de humedad del alimento. ^[50]

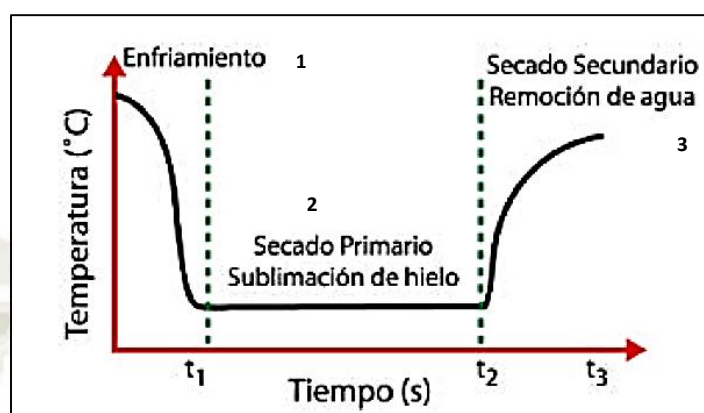


Figura 1.12: Fases de la liofilización ^[92]

Fuente: Juan Ramírez (2006) "Liofilización de alimentos ReCiTeIA 6 (2) 1-39

En la Figura 1.12 se muestra las fases la liofilización la donde, la fase 1 es la congelación donde toda el agua del alimento se congela, la fase 2 sublimación el agua congelable es eliminada y la fase 3 desorción donde el agua no congelable del alimento es eliminada por un aumento de temperatura.

1.8.2. PARTES DE UN LIOFILIZADOR

- Sistema de congelación: permite la congelación mediante inmersión de fluidos fríos en los estantes que contienen el material a liofilizar.
- Sistema de vacío: bomba de vacío que impide que el alimento se descongele.
- Sistema de condensación: evita que el vapor de agua regrese a la muestra.
- Sistema de calefacción: administra el calor de sublimación.
- Sistema de medición y control: controlan la temperatura en las placas, producto, condensador, muestra y presión cámara de secado. ^[48,50]

1.9. VOLTAMPEROMETRÍA

La voltamperometría se desarrolló a partir de la polarografía descubierta en 1920 por Jaroslav Heyroosky es un método electro analítico de alta sensibilidad y gran variedad de aplicaciones para distintos analitos. ^[53-56]

1.9.1 FUNDAMENTO

Método electro analítico que mide la intensidad de corriente frente al potencial aplicado sobre el analito para que ocurra una reacción redox la cual produce un flujo de corriente eléctrica.^[57-59]

Tiene dos etapas

- Pre concentración donde el analito en la solución se encuentra en su estado de oxidación cero y su máxima concentración esta sobre la superficie del electrodo de trabajo.^[60]
- Redisolución electroquímica donde se aplica un barrido de potencial en sentido contrario al inicial sobre el electrodo de trabajo produciendo una reacción de óxido reducción que produce un pico de corriente eléctrica versus el potencial aplicado y la altura de cada pico es directamente proporcional a la concentración del analito.^[60]

1.9.2. CELDA ELECTROQUÍMICA

Celdas electroquímicas de tres electrodos: es el más usado compuesto por electrodo de trabajo, referencia, electrodo auxiliar, un sistema de agitación y otro de burbujeo de gas nitrógeno.^[51-56]

Electrodo de referencia tiene un potencial constante, por tanto el potencial de corriente aplicado sobre el electrodo de trabajo debe ser diferente al de referencia, siendo el más usado el electrodo de Ag/AgCl.^[51-56]

Electrodo auxiliar por el cual fluye la intensidad de corriente que produce la reacción redox, los cuales pueden ser de carbón o platino.

El electrodo de trabajo es un micro electrodo de algunos micrómetros cuadrados y puede ser de mercurio el cual puede ser multimodo, oro, plata, platino o carbón^[54-56]

Los modos del electrodo de trabajo de mercurio pueden ser:

- a) Electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE)^[56]

Utiliza una gota de mercurio para todas las mediciones, tiene un tubo capilar donde la gota de mercurio es forzada a salir y de esta manera su superficie sea reproducible y renovable.

b) Electrodo de la goteo de mercurio (DME)^[56]

Fue el primero en descubrirse y genera una nueva gota de mercurio para cada medición, tiene un tubo capilar fino por el cual la gota de mercurio cae por gravedad, el intervalo de tiempo en que cae una y otra gota son constantes.

c) Electrodo de gota de mercurio estacionario (SMDE) ^[61]

La formación de la gota de mercurio es muy rápida y el tiempo en que la gota está colgada en el capilar en su máximo volumen es mayor, la intensidad de corriente pasa por un área constante de la gota y se genera una nueva gota en cada medición

1.9.3. VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN CATÓDICA (CSV)

Donde el electrodo de trabajo tiene un potencial cargado positivamente en comparación con el analito, donde el electrodo de trabajo de mercurio se oxida para formar una sal insoluble con el analito para luego aplicar un barrido de potencial negativo de esta forma se redisuelve la sal insoluble por reducción del mercurio, generándose una intensidad de corriente catódica. ^[61]

1.9.4. VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA (ASV)

Donde el analito es concentrado sobre el electrodo para aplicar un potencial más negativo en comparación a la del analito quedando como resultado esta reducida y acumulada para luego aplicar un potencial positivo se obtiene la redisolución por oxidación del mercurio, generándose una intensidad de corriente anódica. ^[61]



CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. MATERIAL VEGETAL

- *Hylocereus undatus* “Pitahaya roja”
- *Hylocereus megalanthus* “Pitahaya amarilla”

2.1.2. MATERIAL DE VIDRIO

- Fiolas 2,5,10,25,100 mL
- Pipetas graduadas de 1,2,5 y 10 mL
- Pipetas volumétricas de 1,2,5 y 10 mL
- Frascos ámbar
- Beakers de 50,100 y 1000 mL
- Embudos pesa muestra
- Baguetas
- Tubos de ensayo
- Peras de decantación
- Embudos

2.1.3. MATERIAL DE LABORATORIO

- Micropipetas 20 -200 μL
- Micropipetas 100-1000 μL
- Micropipetas 25-250 μL
- Propipetas
- Filtros anotop 0.45 μm
- Tubos Falcon
- Gradilla para tubos de ensayo
- Tips para micropipetas
- Papel de Filtro
- Papel Aluminio

2.1.4. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Liofilizador modelo Triad “LABCONCO”
- Bomba de vacío rotatoria “VACUUBRAND”
- Voltámetro 797 VA computrace “Metrohm”
- Balanza analítica Sartorius
- Sonicador (Branson 2510 – E)
- Espectrofotómetro (CARY60 UV – VIS, Agilent Technologies)
- Centrífuga (Hettich zentrifugen EBA20)
- Agitador Vortex (Analog mixer)
- Potenciómetro (Metrohn 825pHlab)
- Agitador Magnético
- Microcelda de cuarzo (90 μL)

2.1.5. REACTIVOS

- Cloruro de cobre II dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck)
- Etanol 96 % ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$) (DIPROQUIM)
- Metanol (CH_3OH) (Merck)
- Ácido sulfúrico 97 % (H_2SO_4)
- Ácido clorhídrico 36 % (HCl)
- Ácido nítrico 63 % (HNO_3)
- Ácido acético glacial 100 % ($\text{CH}_3\text{-COOH}$) (Merck)

- Cloroformo (CHCl_3) (Merck)
- Cloruro férrico (FeCl_3)
- Cristales de yodo (I_2)
- Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$)
- Hidróxido de sodio perlas P.A. (NaOH) (Merck)
- Reactivo de Dragendorff
- Granallas de zinc (Zn)
- Reactivo Trolox P.A. (Calbiochem)
- Reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) P.A. (Calbiochem)
- Reactivo de Folin Ciocalteu P.A. (Merck)
- Ácido gálico P.A. ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$)
- Carbonato de sodio P.A. (Na_2CO_3)
- Reactivo ABTS P.A. (ácido 2'2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]) (Sigma)
- Persulfato de potasio P.A. ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Merck)
- Neocuproina P.A. (Merck)
- Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Sigma)
- Sulfato de sodio Q.P (Na_2SO_4) (Merck)
- Hidróxido de amonio 25 % (NH_4OH)

2.2. MÉTODOS

2.2.1. RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES

Se realizó en el mes de abril del 2018 en el distrito de Churuja la provincia de Bongará, departamento de Amazonas. Los criterios de inclusión para su selección fueron: consistencia firme, color, peso aproximado de 250 g. Adquiriéndose 1 Kg de cada uno Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) que fueron almacenados a una temperatura de 4 ° C hasta antes de que fueran liofilizados.

2.2.2. LIOFILIZACIÓN

Los frutos se lavaron, pelaron y el mesocarpio fue cortado en rodajas delgadas para luego ser colocadas en la bandeja del liofilizador modelo Triad “LABCONCO” en el laboratorio H -203 de la UCSM.

Los frutos liofilizados fueron colocados en bolsas de papel kraft y propileno con cierre hermético que fueron almacenados a una temperatura de 4° C hasta su uso.

Las condiciones experimentales de liofilización se presentan en la Tabla 2.1

Tabla 2.1 Condiciones de liofilización de las muestras

Proceso	Rampa	Temperatura	Tiempo
Pre freeze	-	-	6 horas
Seg. 1	0.25 °C / min	-50 °C	10 horas
Seg. 2	0.25 °C / min	10 °C	16 horas
Seg. 3	0.1 °C / min	15 °C	1 hora

Fuente: Elaboración propia

2.2.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se pesó 1g de muestra liofilizada de cada una de las especies vegetales, se colocó en un tubo Falcon, se agregó 3 mL metanol o etanol 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 para recolectar los 3 sobrenadantes y enrasar a 10 mL con metanol o etanol 96 % para luego poder realizar los análisis de ácido ascórbico, compuestos fenólicos totales, CUPRAC, DPPH y ABTS

2.3. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

La identificación de metabolitos secundarios de ambas especies vegetales se realizó a partir de los extractos etanólicos de cada especie mediante el protocolo de marcha fitoquímica modificada de la Universidad Nacional San Juan Bosco, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Farmacia, Argentina, como se muestra en la Figura 2.1. [62-65]

En la Figura 2.1 los extractos etanólicos obtenidos de ambas especies se separan en tres fracciones denominadas “A”, “B” y “C”.

En la fracción “A” se realizó la identificación de los metabolitos secundarios: flavonoides, taninos y compuestos fenólicos, hidratos de carbono y lípidos.

En la fracción “B” se realizó la identificación de metabolitos secundarios: esteroides, triterpenos y antraquinonas

En la fracción “C” se realizó la identificación de metabolitos secundarios: alcaloides, leucoantocianidinas y proteínas.

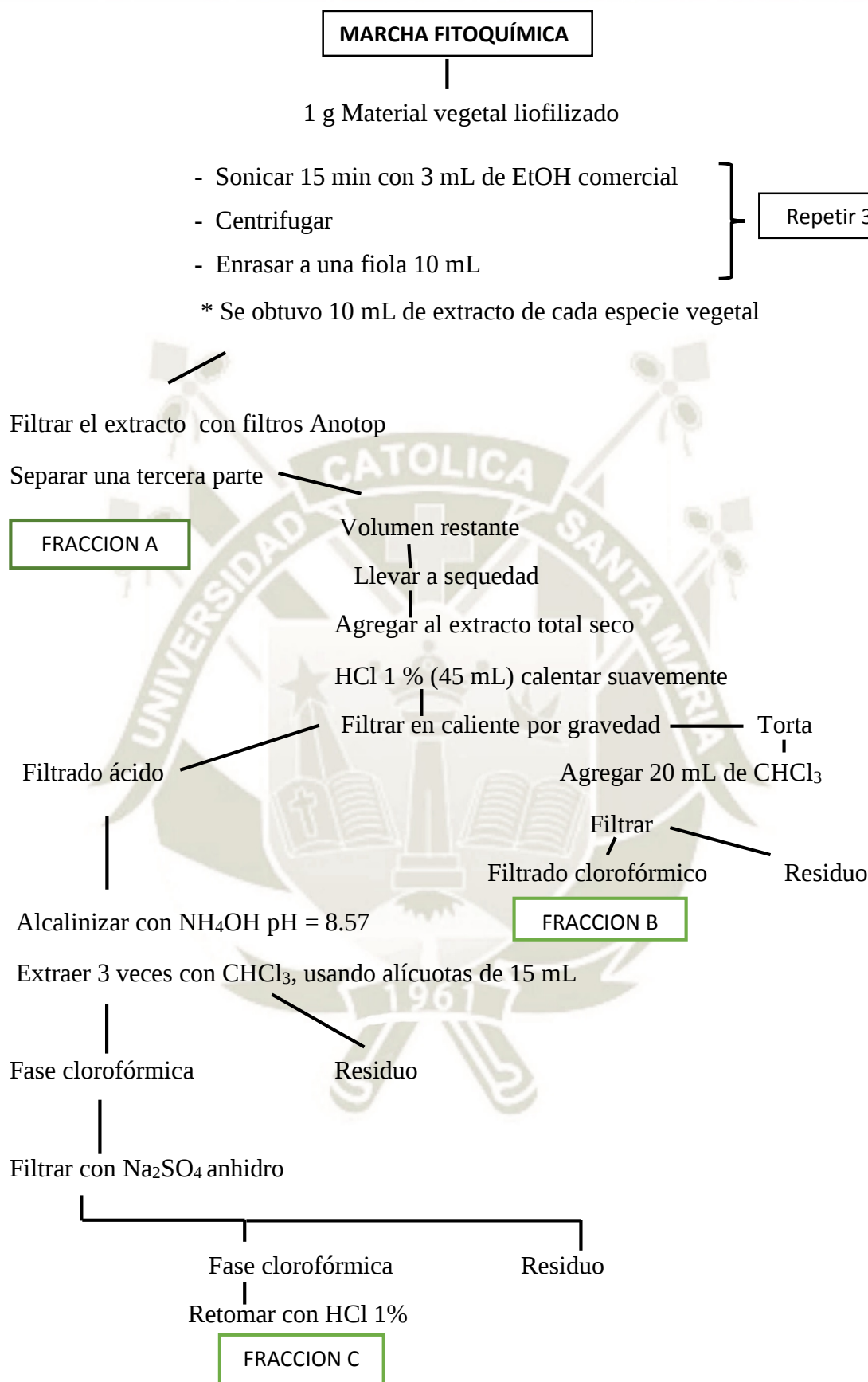


Figura 2.1. Marcha fitoquímica en el cual se separan los extractos obtenidos en cuatro fracciones para la identificación de los metabolitos secundarios.

2.3.1. REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN

2.3.1.1 FRACCIÓN “A”

A) FLAVONOIDES

Reacción de Shinoda: Se llevó a sequedad una alícuota de 0.5 mL de la fracción “A” en un tubo de ensayo y se reconstituyó con igual volumen de agua destilada, posteriormente se agregó granallas de Mg y 0.2 mL HCl cc. Luego se observó la coloración en los tubos de ensayo después de la reacción.

La coloración amarilla demuestra la presencia de flavonoides

B) TANINOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS

Se llevó a sequedad una alícuota de 3 mL de fracción “A” a baño de agua en un tubo de ensayo, el residuo seco se disolvió en 1 mL de agua destilada y se le agregó 3 gotas de FeCl_3 al 1 %. Luego se observó la coloración en los tubos de ensayo después de la reacción.

La coloración amarillo verdoso demuestra la presencia de taninos gálicos

C) LÍPIDOS

Unas gotas de fracción “A” se depositaron en papel filtro, se dejó secar y luego se expuso a vapores de I_2 por 2 min. Luego se observó las manchas del papel filtro.

Las Manchas de color marrón-naranja demuestran presencia de lípidos

D) HIDRATOS DE CARBONO

Se llevó a sequedad una alícuota de 2 mL de fracción “A” y se reconstituyó con agua destilada, posteriormente se adicionaron 0.5 mL de solución acuosa de fenol al 5 % y luego se agregó sobre la superficie 2.5 mL de H_2SO_4 cc. Luego se observó la coloración en los tubos de ensayo después de la reacción.

La coloración naranja pardo demuestra la presencia de hidratos de carbono.

2.3.1.2 FRACCIÓN “B”

A) ESTEROIDES Y TRITERPENOS

Reacción de Lieberman-Bouchard: Se mezclaron 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se enfrió a baño de hielo, luego una alícuota de 2 mL de fracción “B” se pusieron en contacto con la mezcla de reactivos anteriores, luego el tubo se colocó en baño de hielo y se agregó gotas de H_2SO_4 por las paredes. Luego se observó la coloración en los tubos de ensayo después de la reacción

La coloración verde azulada demuestra la presencia de esteroides y la coloración rojo-naranja presencia de Triterpenos.

B) ANTRAQUINONAS

Reacción de Borntranger: Se tomó una alícuota de 3 mL de fracción “B” con 5 mL de NaOH al 5 % los cuales fueron agitados. Luego se observó la coloración en los tubos de ensayo después de la reacción.

La coloración roja demuestra la presencia de naftoquinonas.

2.3.1.3. FRACCIÓN “C”

A) ALCALOIDES

Se tomó una alícuota de 0.2 mL de fracción “C”, se llevó a sequedad y se reconstituyó con 2 mL de HCl 1 % y luego se agregó 2 gotas de reactivo de Dragendorf. Luego se observó la formación de un precipitado en los tubos de ensayo después de la reacción.

La formación de un precipitado naranja-pardo demuestra la presencia de alcaloides.

B) LEUCOANTOCIANIDINAS

Reacción Roseheim: Se llevaron a sequedad una alícuota de 2 mL de la fracción “C” y se reconstituyó con ese mismo volumen de HCl 1 % se adicionó 1 mL de HCl cc se mezcló y se calentó a baño de agua por 10 min. Luego se observó la coloración en los tubos de ensayo después de la reacción.

La coloración carmesí a rosa pálido demuestra la presencia de leucoantocianidinas.

C) PROTEÍNAS

Se tomó una alícuota de 2 mL de fracción “C” y se adicionó 1 gota HNO_3 cc, luego se observó la coloración en los tubos de ensayo después de la reacción.

La coloración amarillenta demuestra la presencia de proteínas.

2.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Para la determinación de la capacidad antioxidante del fruto de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*), se utilizaron tres métodos colorimétricos: CUPRAC, DPPH y ABTS.

2.4.1. MÉTODO CUPRAC

2.4.1.1 FUNDAMENTO

Se basa en la formación de compuesto cromógeno de Cu (II) con neocuproína a un pH 7 dado por el buffer acetato de amonio que, al ponerse en contacto con antioxidante, este compuesto cromógeno se reduce a Cu (I) con neocuproína, como se muestra en la Figura 2.2. La absorbancia del cromógeno Cu (I) se mide a 450 nm. [66, 67]

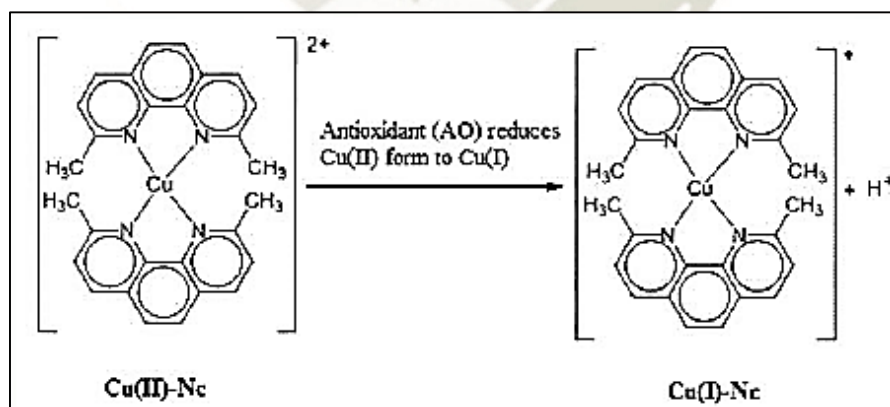


Figura 2.2. Reacción de CUPRAC con un antioxidante. [41]

Fuente: Mustafa Ozyurek, a et al “A comprehensive review of CUPRAC methodology” Analytical Methods. 3(11):2439-2453.

2.4.1.2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Se preparó una solución etanólica de CuCl_2 0.01 M, pesando 0.017 g del reactivo y enrasando a una fiola de 10 mL, también se preparó una solución etanólica de neocuproína 0,0075 M, pesando 0.0156 g del reactivo y enrasando a una fiola de 10 mL. Además, se preparó una solución buffer de acetato de amonio 1 M a pH 7.

2.4.1.3. SOLUCIÓN STOCK DE TROLOX

Se preparó una solución stock de trolox 2×10^{-4} M, pesando 0.0025 g de reactivo y enrasando a una fiola de 50 mL con etanol 96 %

2.4.1.4 CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva de calibración se preparó con 5 estándares de diferentes concentraciones de trolox en un rango de 0.008 – 0.040 mM en fiolas de 5 mL a las cuales se agregó cada reactivo preparado como se muestra en la Tabla 2.2, se enrasó con etanol 96 %, se homogenizó y se dejó reaccionar 30 minutos a oscuridad, para luego leer su absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en el espectrofotómetro (CARY60 UV – VIS, Agilent Technologies)

Tabla 2.2 Preparación de la curva de calibración CUPRAC

Patrones	Concentración (mM)	Trolox (μL)	CuCl_2 (mL)	Buffer (mL)	Neocuproína (mL)
1	0.008	100	1	1	1
2	0.016	200	1	1	1
3	0.024	300	1	1	1
4	0.032	400	1	1	1
5	0.040	500	1	1	1
Blanco	0	0	1	1	1

Fuente: Elaboración propia

Preparación de las muestras, se pesó 1g de muestra liofilizada de cada una de las especies vegetales, se colocó en un tubo Falcon, se agregó 3 mL etanol 96 % se procedió a sonicar por 15 min .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 para recolectar los 3 sobrenadantes y enrasar a 10 mL con etanol para luego poder realizar el análisis por el método CUPRAC.

Se preparó las muestras por triplicado para cada especie vegetal agregando 1 mL de CuCl_2 , 1 mL de buffer, 1 mL de neocuproina, 400 μL de extracto de las especies vegetales.

2.4.2. MÉTODO DPPH

2.4.2.1 FUNDAMENTO

Se basa en la reducción del radical de nitrógeno estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil), que al donar un protón de hidrógeno el antioxidante al radical este pierde su color violeta a un amarillo tenue. La reacción química se muestra en la Figura 2.3. [66-68]

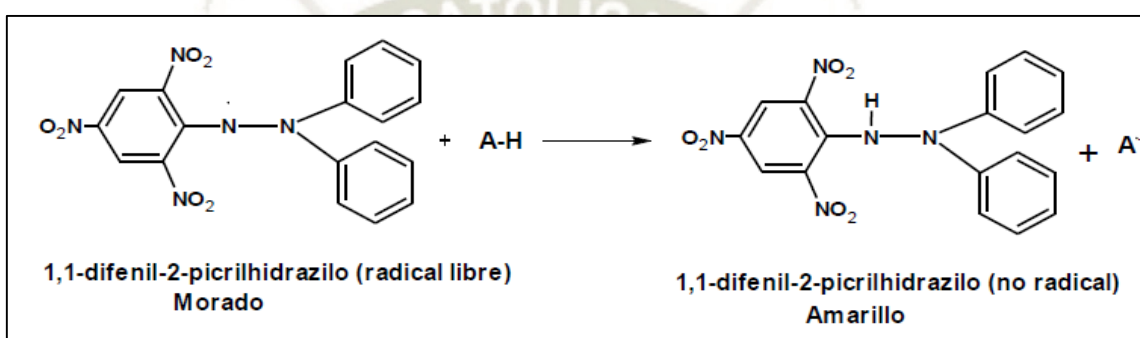


Figura 2.3. Reacción del radical DPPH con un antioxidante. [66]

Fuente: Romero Maria.(2017) “Desarrollo de electrodos modificados con polímeros conductores y nanopartículas para la determinación de actividad antioxidante. Aplicación en Agroalimentación” [Tesis Doctoral] Universidad de Córdoba. Argentina.

El tiempo estimado para que se dé la reacción es de 30 minutos a oscuridad, posteriormente se lee su absorbancia a 515 nm.

2.4.2.2. PREPARACIÓN DEL RADICAL DPPH

Se preparó una solución madre de DPPH a una concentración 300 μM en etanol comercial para lo cual se pesó 3 mg del reactivo y se enrasó en una fiola de 25 mL, protegiéndose de la luz.

2.4.2.3. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE TROLOX

Se preparó una solución stock de trolox a 1598 μM con etanol 96 %, para lo cual 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 muestra en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Preparación de estándares de trolox para el método DPPH

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

Fuente: Elaboración propia

2.4.2.4 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 muestra en la Tabla 2.4, 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 2.4. Preparación de 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	-	-	-	5
Blanco	-	-	2.5	2.5

Fuente: Elaboración propia

Preparación de las muestras, se pesó 1g de muestra liofilizada de cada una de las especies vegetales, se colocó en un tubo Falcon, se agregó 3 mL etanol 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 para recolectar los 3 sobrenadantes y enrasar a 10 mL con etanol 96 % para luego poder realizar el análisis por el método DPPH. Se preparó las muestras por triplicado para cada especie

vegetal agregando 1.5 mL de extracto, 1.5 mL DPPH y se enrasó a 5 mL con etanol 96 %.

2.4.3 METODO ABTS

2.4.3.1 FUNDAMENTO

Se basa en la formación y reducción del radical $ABTS^+$ (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzo tiazolin -6-sulfónico). La formación del radical $ABTS^+$ es por la reacción de oxidación de la sal ABTS con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) como se muestra en la Figura 2.4, dando un color verde azulado que absorbe luz a 734 nm tras 18 horas de reacción. [70-72]

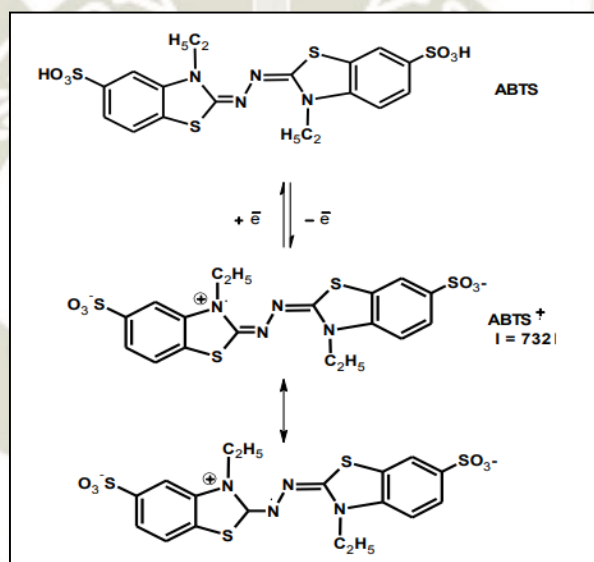


Figura 2.4. Reacción de la formación del radical ABTS [73]

Fuente: Tovar Jennifer. (2013). “Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la eco región cafetera”. [Trabajo de grado para optar al título de químico industrial]. Universidad Tecnológica De Pereira. Colombia.

La reducción del $ABTS^+$ se produce tras la reacción con antioxidantes donde el radical va perdiendo su color dependiendo de la cantidad de antioxidante presente, esperándose 7 minutos para que se produzca la reacción en oscuridad. Tal reacción se muestra en la Figura 2.5. [73-74]

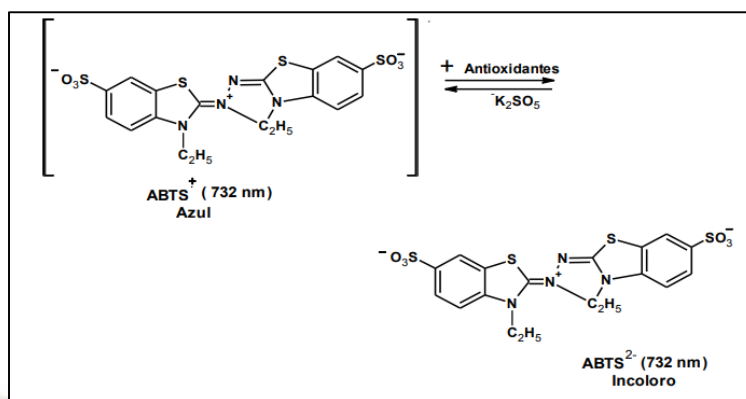


Figura 2.5. Reacción del radical ABTS con un antioxidante. [73]

Fuente: Tovar Jennifer. (2013). “Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la eco región cafetera”. [Trabajo de grado para optar al título de químico industrial]. Universidad Tecnológica De Pereira. Colombia.

2.4.3.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE ABTS

Se preparó una solución de ABTS, pesando 39.2 mg del reactivo y enrasando en una fiola de 5 mL con H₂O destilada (solución A). Posteriormente se preparó una solución de persulfato de potasio pesando 6.6 mg del reactivo, enrasando a una fiola de 5 mL con H₂O destilada (solución B). Ambas soluciones fueron cubiertas de la luz.

La solución madre de ABTS se preparó mezclando volúmenes iguales de las soluciones A y B (relación 1:1) mezcla que se dejó a temperatura ambiente y en oscuridad por 18 horas antes de ser usada. A partir de la solución madre se preparó una solución diluida de ABTS en un frasco ámbar agregado 1 mL de solución madre con 60 mL de etanol 96 % se leyó en el espectrofotómetro a 734 nm hasta obtener una absorbancia que este dentro de 1.08-1.12 corrigiendo con la adición de etanol 96 % o solución madre de ABTS.

2.4.3.3 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE TROLOX

Se preparó una solución stock de trolox 1 mM, se pesó 2.5 mg de Trolox y se enrasó a una fiola 10 mL con etanol 96 %, a partir de solución stock se preparó estándares de trolox de 0.05- 0.5 mM en fiolas de 2 mL, como se muestra en la Tabla 2.5.

En la Tabla 2.5 se encuentran las concentraciones de los estándares de trolox así como el volumen utilizado a partir de la solución stock de trolox para la luego de ello se pueda preparar la curva de calibración.

Tabla 2.5. Preparación de estándares de trolox para el método ABTS

Estándar	Vol. solución stock de trolox	Concentración
	(μL)	(mM)
1	40	0.050
2	100	0.125
3	200	0.250
4	300	0.375
5	400	0.500

Fuente: Elaboración propia

2.4.3.4 CURVA DE CALIBRACIÓN

Se preparó 5 patrones en fiolas de 2 mL agregando 100 μL de los estándares de trolox con 1900 μL de solución diluida de ABTS como se muestra en la Tabla 2.6. Se dejó reposar 7 min en oscuridad, luego se procedió a leer a una longitud de onda de 734 nm en el espectrofotómetro (CARY60 UV – VIS, Agilent Technologies).

Tabla 2.6. Preparación de la curva de calibración ABTS

Patrones	Estándares	ABTS sol diluida	Concentración
	(μL)	(μL)	(mM)
1	100	1900	0.050
2	100	1900	0.125
3	100	1900	0.250
4	100	1900	0.375
5	100	1900	0.500
Blanco	-	2000	-

Fuente: Elaboración propia

Preparación de las muestras, se pesó 1g de muestra liofilizada de cada una de las especies vegetales, se colocó en un tubo Falcon, se agregó 3 mL de etanol 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 para recolectar los 3 sobrenadantes y enrasar a 10 mL con etanol 96 % para luego poder realizar el análisis por el método ABTS. Se preparó las muestras por triplicado para cada especie vegetal agregando 50 μL de extracto más 1950 μL de solución diluida de ABTS.

2.5. EVALUACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR VOLTAMPEROMETRÍA

Se evaluó el contenido de ácido ascórbico de las especies vegetales por voltamperometría por el método estandarizado que usa como electrodo de trabajo al electrodo de mercurio multimodo (DME), electrodo auxiliar de platino y electrodo de referencia Ag/AgCl con solución interna de KCl 3 M por adición de estándar.

2.5.1. PREPARACIÓN DEL BUFFER

Se preparó buffer de acetato de sodio 0.1 M para 1 L a un pH de 4.64 a partir de ácido acético glacial, perlas de hidróxido de sodio y se enrasó con H₂O ultrapura, se determinó el pH con el potenciómetro (Metrohn 825pHlab).

2.5.2. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Se pesó 0.01 g de ácido ascórbico el cual se enrasó a una fiola de 100 mL con H₂O ultrapura, para la medición del estándar en la celda se colocaron 10 mL de buffer acetato de sodio y 100 µL de estándar, se dejó purgar con gas inerte nitrógeno y se localizó el potencial pico de oxidación, posteriormente se realizaron 2 adiciones más de 100 µL cada una de estándar a la celda.

Preparación de las muestras, se pesó 1g de muestra liofilizada de cada una de las especies vegetales, se colocó en un tubo Falcon, se agregó 3 mL metanol, 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 para recolectar los 3 sobrenadantes y enrasar a 10 mL con metanol para luego poder realizar el análisis por el método voltamperométrico para ambas especies vegetales por triplicado, se procedió a medir en el voltámetro Metrohn 797 VA Computrace colocándose en la celda con 10 mL de buffer acetato de sodio pH 4.6 con 1 mL de muestra y luego se realizó las 2 adiciones de estándar de 100 µL cada una. Los electrodos utilizados fueron electrodo de trabajo de mercurio (DME), electrodo auxiliar de platino y electrodo de referencia Ag/AgCl con solución interna de KCl 3 M. ya antes mencionados.

2.5.3. PARÁMETROS VOLTAMPEROMÉTRICOS

- Tiempo de purga: 300 seg
- Potencial de deposición: 0.55 V

- Tiempo de deposición: 15 seg
- Velocidad de barrido: 0.0099 V/seg

El contenido de ácido ascórbico obtenido por el voltamperometro fue de mg de ácido ascórbico/ L de muestra y se convirtió a mg de ácido ascórbico/ 100 g de fruta liofilizado de cada especie vegetal.

2.6. COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

2.6.1. FUNDAMENTO

Se basa en la reducción del reactivo de Folin Ciocalteu compuesto por la mezcla ácido fosfotungstico y fosfomolibdico de color amarillo que al reaccionar con compuestos fenólicos en medio básico dado por el carbonato de sodio se reducen formando óxidos de molibdeno y tungsteno que son de color azul que se leen a una longitud de onda de 760 nm. La reacción química entre el reactivo Folin Ciocalteu con el ácido gálico, un compuesto fenólico de referencia, se presenta en la Figura 2.6. [3,74-76]

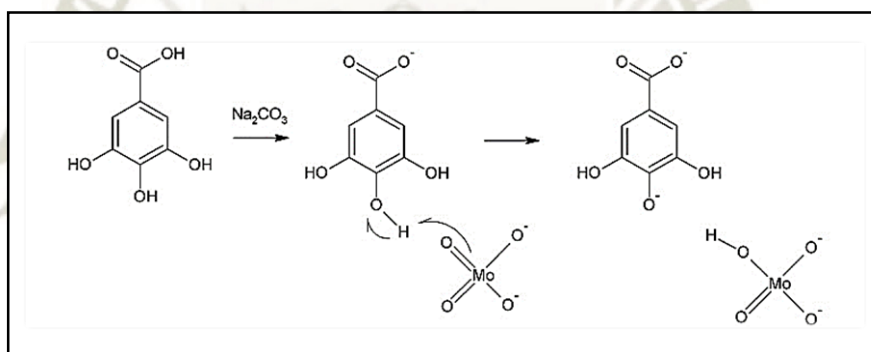


Figura 2.6. Reacción del reactivo Folin Ciocalteu con ácido gálico. [76]

Fuente: Muñoz B, Gaspar T et al (2017) “Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales” Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 20(2): 23-28

2.6.2. SOLUCIÓN DE CARBONATO DE SODIO

El carbonato de sodio previo a la preparación de la solución se llevó a desecar a la mufla 24 h a una temperatura 70 °C luego se preparó una solución al 20 % de carbonato de sodio anhidro, para ello se pesó 2 g de reactivo en una fiola 10 mL y se enrasó con H₂O destilada.

2.6.3. SOLUCIÓN STOCK DE ÁCIDO GÁLICO

Se preparó una solución de 100 ppm, para ello se pesó 10 mg de ácido gálico, disolviéndose en 1 mL de etanol.96 % Se enrasó con H₂O destilada a 100 mL. A

partir de la solución madre se preparó 5 estándares a diferentes concentraciones entre 2-10 ppm y se enrasó a fioles de 2 mL con H₂O destilada, como se muestra en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7. Preparación de los estándares de ácido gálico

Concentración (ppm)	Volumen de sol madre (μL)	Volumen final (mL)
2	10	2
4	20	2
6	30	2
8	40	2
10	50	2

Fuente: Elaboración propia

2.6.4 CURVA DE CALIBRACIÓN

Se preparó 5 patrones en fioles de 2 mL, agregándose estándares de ácido gálico preparados a partir de la solución madre de ácido gálico, H₂O, reactivo Folin Ciocalteu, se dejó reposar 5 min en oscuridad, luego se agregó carbonato de sodio al 20 % y se enrasó a 2 mL con H₂O destilada, como se muestra en la Tabla 2.8. Se dejó reposar por 2 h a oscuridad.

Tabla 2.8. Preparación de la curva de calibración de Folin Ciocalteu

Patrones	Concentración (ppm)	Vol. de estándares (μL)	H ₂ O (μL)	Rx Folin Ciocalteu (μL)	Carbonato de sodio 20 % (μL)
1	2	40	460	200	800
2	4	80	420	200	800
3	6	120	380	200	800
4	8	160	340	200	800
5	10	200	300	200	800
Blanco	0	0	1000	200	800

Fuente: Elaboración propia

Se centrifugó a 60 revoluciones por minuto durante 15 minutos y se procedió a leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

Las muestras se extrajeron según el ítem 2.2.3 cambiando de solvente, etanol 96 % en lugar de metanol. Se preparó las muestras por triplicado para cada especie vegetal agregando 460 μ L de H₂O, 200 μ L de reactivo Folin Ciocalteu, carbonato de sodio 800 μ L y el extracto 200 μ L enrasando a fiolas de 2 mL.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comparar los análisis realizados CUPRAC, DPPH, ABTS, Voltamperometría y Folin Ciocalteu entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja se realizó pruebas de T de student, requiriendo primero la determinación del estadístico F para comparar las varianzas iguales y diferentes entre ambas variedades de Pitahaya ($p < 0.01$).

Para correlacionar los tres métodos de determinación de la capacidad antioxidante se comparó las medias de cada grupo de estudio utilizando un análisis de varianza de una vía ANOVA, y la correlación múltiple fue realizada mediante el test de Tukey.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES

Se recolectó frutos de Pitahaya amarilla y roja (mostrados en la Figura 3.1) en el mes de abril del 2018 en el distrito de Churuja, provincia de Bongará, departamento de Amazonas. Las frutas recolectadas tenían consistencia firme, color amarillo/rojo, peso de 250 g, se adquirió 1 kg de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) que fueron almacenados a una temperatura de 4 °C hasta antes de su liofilización.

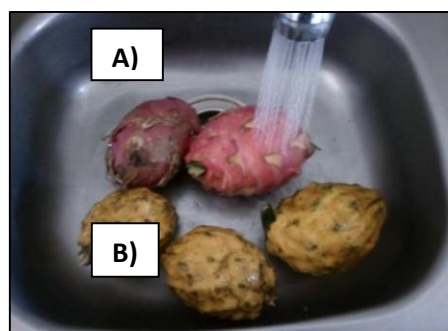


Figura 3.1. Muestras de Pitahaya recolectadas las cuales fueron lavadas para ser almacenadas **A)** Pitahaya roja **B)** Pitahaya amarilla

3.2. LIOFILIZACIÓN

Se cortó el mesocarpio de los frutos en delgadas rodajas para luego ser colocadas en la bandeja del liofilizador Triad “LABCONCO”. Las rodajas de los frutos liofilizados tenían las siguientes características compactas y de sabor dulce.

Para el cálculo del porcentaje de rendimiento de liofilización, definido por la ecuación 3.1, se consideraron los valores de peso de muestra fresca y muestra seca, presentados en la Tabla 3.1.

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

Ecuación 3.1. Cálculo del rendimiento de liofilización

Tabla 3.1. Valores considerados en la liofilización de Pitahaya.

Muestra	Peso de muestra fresca	Peso de muestra seca	Rendimiento de liofilización
Pitahaya Amarilla	162.90 g	28.60 g	17.28 ± 0.80 %
	159.40 g	26.10 g	
	168.70 g	30.20 g	
Pitahaya Roja	248.30 g	33.95 g	13.75 ± 0.37 %
	262.30 g	37.10 g	
	244.40 g	32.80 g	

Fuente: Elaboración propia

Posterior a la liofilización, las muestras fueron conservadas en papel kraft y bolsas de propileno con cierre hermético a una temperatura de 4 ° C, hasta su posterior uso. Una muestra de los frutos de Pitahaya antes y después de liofilizarse se presenta en la Figura 3.2

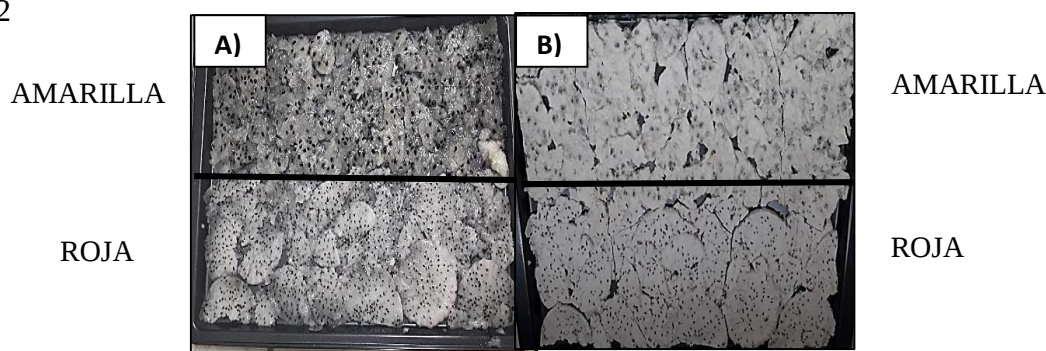


Figura 3.2. Muestras de Pitahaya. **A)** Frutos cortados. **B)** Frutos liofilizados

Las características organolépticas de los frutos de Pitahaya antes de ser liofilizados se describen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Características organolépticas del mesocarpio de los frutos de Pitahaya.

Muestra	Color	Olor	Aspecto	Sabor
Pitahaya amarilla	Blanco	<i>Sui generis</i>	Compacto	Dulce
Pitahaya roja	Blanco	<i>Sui generis</i>	Compacto	Dulce

Fuente: Elaboración propia

3.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS



Figura 3.3: Preparación de los extractos

En la figura 3.3 se muestra la preparación de los extractos de las especies vegetales Pitahaya amarilla y Pitahaya roja luego de ser liofilizados para proceder a los distintos análisis: determinación de ácido ascórbico para lo cual el solvente usado fue metanol.

En el caso de Folin Ciocalteu, CUPRAC, DPPH y ABTS la preparación de los extractos se realizó con etanol 96 %

3.4. MARCHA FITOQUÍMICA

Se separó cada extracto de Pitahaya obtenido mediante sonicación en cuatro fracciones como se describe a continuación:

Se conservó 10 mL de cada extracto de Pitahaya en tubos de ensayo, denominándolo “Fracción A”.

Se transfirió 20 mL de cada extracto de Pitahaya a beakers de vidrio y se llevó a sequedad a baño de agua por 30 minutos. Se dejó los beakers a temperatura ambiente por 10 minutos, luego se agregó a cada una 45 mL de HCl 1 % calentando suavemente hasta su evaporación, se reconstituyó el residuo con 5 mL adicionales de HCl 1 % se filtró el contenido hacia un matraz. Al residuo que permaneció en el papel filtro se le agregó 20 mL de cloroformo y se filtró en beakers, el filtrado clorofórmico denominándolo “Fracción B”.

El filtrado ácido que contiene el matraz se alcalinizó con gotas de NH_4OH 25 %, verificando por potenciometría el viraje de pH de 0.57 a 8.57. Se transfirió la solución a una pera de decantación y se extrajo 3 veces con cloroformo, usando alícuotas de 15 mL cada una. Se conservó la fase acuosa en tubos de ensayo, denominándolos “Fracción D”. Se filtró la fase clorofórmica a través de un papel filtro impregnado con Na_2SO_4 anhidro hacia un beaker. Se sometió a calor en una hornilla eléctrica hasta evaporar el cloroformo, y se reconstituyó el residuo con 20 mL de HCl 1 %, conservándose en tubos de ensayo denominados “Fracción C”.

La fracción A se utilizó para identificar flavonoides, taninos, lípidos y carbohidratos. Por su parte, la fracción B se usó para determinar esteroides y antraquinonas. Finalmente, la fracción C fue utilizada para identificar alcaloides, antocianinas y proteínas. Las pruebas de identificación para tales metabolitos vegetales se presentan en la Figura 3.4 y los resultados se muestran en la Tabla 3.3.

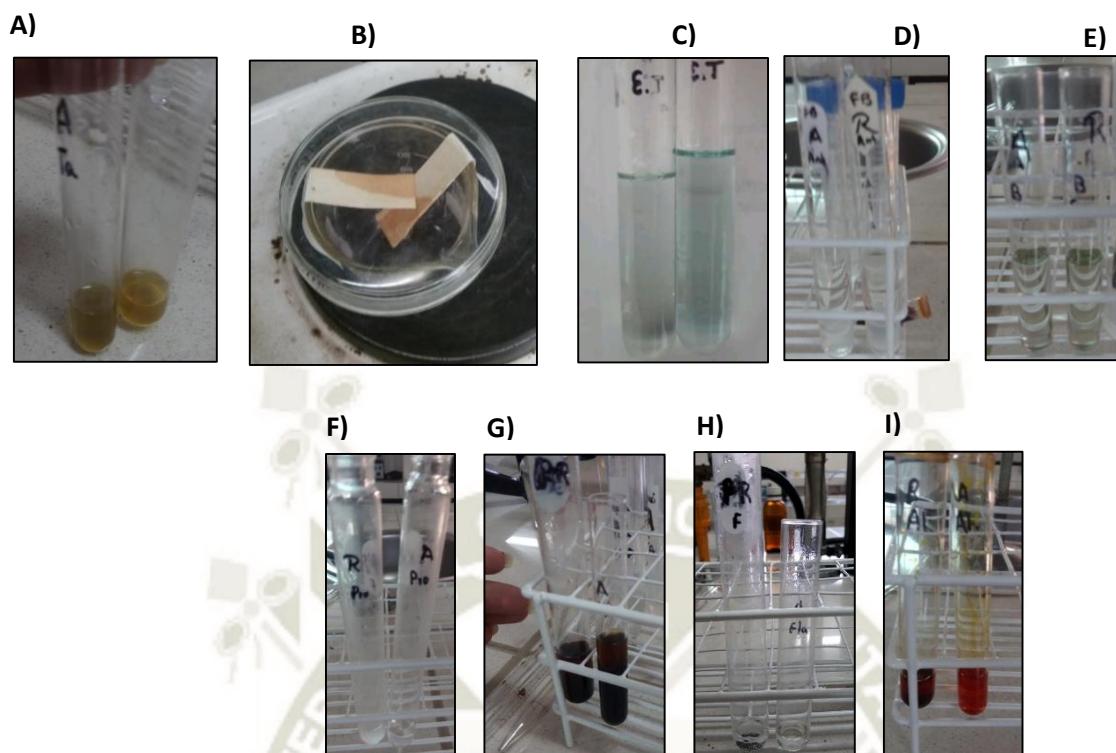


Figura 3.4. Pruebas de identificación de metabolitos en las muestras de Pitahaya.

A) Taninos. **B)** Lípidos. **C)** Esteroides. **D)** Antraquinonas. **E)** Antocianinas
F) Proteínas. **G)** Carbohidratos. **H)** Flavonoides. **I)** Alcaloides

Tabla 3.3. Resultados de la marcha fitoquímica en muestras de Pitahaya.

Prueba / Muestra	Pitahaya amarilla	Pitahaya Roja
Taninos	Positivo	Positivo
Lípidos	Positivo	Positivo
Esteroides	Positivo	Positivo
Antraquinonas	Negativo	Negativo
Antocianinas	Negativo	Negativo
Proteínas	Negativo	Negativo
Carbohidratos	Positivo	Positivo
Flavonoides	Negativo	Negativo
Alcaloides	Positivo	Positivo

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 3.3 se muestra el screening fitoquímico de los extractos etanólicos de los frutos liofilizados de Pitahaya amarilla y Pitahaya roja donde se confirma la presencia de taninos, lípidos, carbohidratos, esteroides y alcaloides

Figuroa y colaboradores realizaron un screening fitoquímico de la Pitahaya roja procedente de Huaral y realizaron una extracción por maceración utilizando como solvente etanol 70 % y encontraron la presencia de carbohidratos, azúcares reductores, flavonoides, esteroides, taninos y alcaloides en comparación con nuestros resultados obtenidos se encontró la presencia de los mismos metabolitos primarios y secundarios excepto la presencia de flavonoides. ^[71]

Comparando los resultados descritos de la Pitahaya roja procedente de Huaral con la Pitahaya roja procedente de Amazonas en la cual no se encontró la presencia de flavonoides lo cual se puede deber a diversos factores.

Flores y colaboradores realizaron tres extractos de la Pitahaya roja procedente de México con diferentes solventes agua, etanol y acetona y diferentes métodos de extracción respectivamente decocción, maceración, licuado obteniendo los siguientes resultados para el extracto acuoso se encontró la presencia de saponinas, flavonoides, quinonas, glucósidos cardiotónicos, terpenos, cumarinas, taninos excepto alcaloides ^[91]

En el caso del extracto acetónico se encontró la presencia de saponinas, flavonoides, glucósidos cardiotónicos, terpenos, cumarinas taninos y alcaloides. En el extracto etanólico se encontró la presencia de flavonoides, glucósidos cardíacos, terpenos, cumarinas, taninos y alcaloides. ^[91]

3.5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

3.5.1. MÉTODO CUPRAC

Se preparó las soluciones de cloruro de cobre, buffer y neocuproina descritos en los apartados 2.4.1.2 y 2.4.1.3. Asimismo, se preparó las soluciones estándar de trolox cuyas concentraciones y absorbancias se presentan en la Tabla 3.4.

Los estándares de trolox tratados por el método CUPRAC antes de ser leídos en el espectrofotómetro (CARY60 UV – VIS, Agilent Technologies) se muestran en la Figura 3.5.

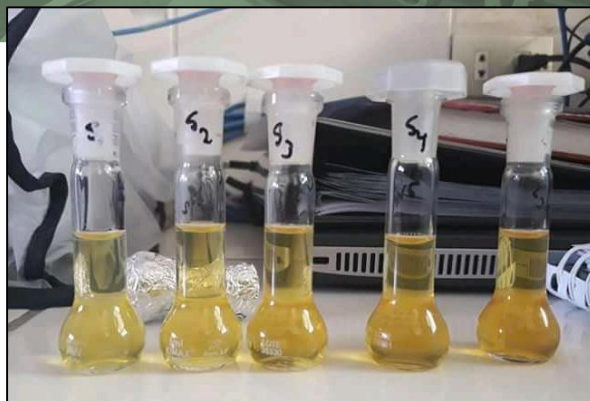


Figura 3.5. Estándares de trolox tratados por el método CUPRAC

Tabla 3.4. Calibración del método CUPRAC con estándares de trolox

Concentración (mM)	Absorbancia			Promedio	St. Dev.	C.V. %
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
0.008	0.3272	0.3407	0.3428	0.3369	0.0080	2.51
0.016	0.4301	0.4463	0.4444	0.4403	0.0090	2.01
0.024	0.5517	0.5704	0.5652	0.5624	0.0100	1.72
0.032	0.6800	0.6518	0.6518	0.6625	0.0200	2.31
0.040	0.7609	0.7599	0.7599	0.7626	0.0040	0.51

St. Dev: Desviación estándar. C.V. %: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia

A partir de la concentración y la absorbancia promedio de los estándares de trolox, se realizó el gráfico de calibración presentado en la Figura 3.6.

Linealidad: Capacidad del método para establecer si existe una relación directamente proporcional entre las absorbancias y la concentración de los estándares donde R^2 tiene que ser cercano a la unidad

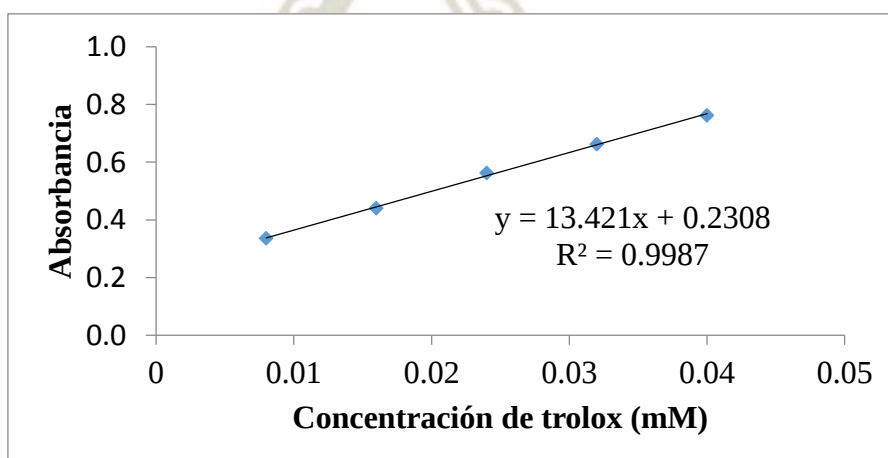


Figura 3.6. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por el método CUPRAC

Se trató a las muestras de extractos de Pitahaya roja y Pitahaya amarilla obtenidos mediante sonicación, como se describe en el apartado 2.2.3. De este modo se obtuvo lecturas de absorbancia y se interpoló a concentración de trolox utilizando la ecuación de regresión lineal mostrada en la Figura 3.6. Los datos respectivos se presentan en la Tabla 3.5

Tabla 3.5. Capacidad antioxidante de Pitahaya por el método CUPRAC

Muestra	Absorbancia			Promedio	St. Dev.	C.V. %	Concentración * F.D.
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3				
Pitahaya amarilla	0.6577	0.6579	0.6565	0.6574	0.0008	0.06	3.97 mM trolox
Pitahaya Roja	0.7319	0.7312	0.7304	0.7312	0.0008	0.05	4.66 mM trolox

St. Dev: Desviación estándar. C.V. %: Coeficiente de variación porcentual. F.D: Factor de dilución (125)

Fuente: Elaboración propia

La capacidad antioxidante de los frutos de Pitahaya roja y Pitahaya amarilla se obtuvieron mM de trolox para Pitahaya amarilla 3.97 mM y Pitahaya roja 4.66 mM para luego ser expresados en mg de trolox /100 g de fruto liofilizado obteniéndose los siguientes resultados para Pitahaya amarilla 994 mg TE/100 g y Pitahaya roja 1166 mg TE /100 g que se muestran en la Tabla 3.17, obteniéndose mayor capacidad antioxidante por el método de CUPRAC para la Pitahaya roja.

Nisa y colaboradores determinaron la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC para *Hylocereus polyrhizus* con un extracto obtenido por maceración con etanol 70 % el cual fue evaporado hasta obtener un extracto viscoso y tuvo como resultado una capacidad antioxidante de 79 mg de TE / 100 g de fruto, en comparación con la capacidad antioxidante obtenida de *Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus* respectivamente 994 mg TE /100 g de fruto liofilizado y 1166 mg TE /100 g de fruto liofilizado donde ambas variedades obtuvieron una capacidad antioxidante mucho mayor que la de *Hylocereus polyrhizus*.^[77]

3.5.2. MÉTODO DPPH

Se preparó las soluciones de reactivos y los estándares de calibración como está descrito en el apartado 2.4.2.2, cuyas concentraciones y absorbancias se presentan en la Tabla 3.6.

Los estándares de trolox tratados por el método DPPH se muestran en la Figura 3.7



Figura 3.7 Estándares de trolox tratados por el método DPPH

Tabla 3.6. Calibración del método DPPH con estándares de trolox

Concentración (μM)	Absorbancia			Promedio	St. Dev.	C.V. %
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
20	0.9625	0.9572	0.9202	0.9466	0.0200	2.43
40	0.8421	0.821	0.8787	0.8473	0.0300	3.44
60	0.7233	0.7197	0.7967	0.7466	0.0400	5.82
80	0.6175	0.6117	0.6350	0.6214	0.0100	1.95
100	0.4801	0.5238	0.5394	0.5144	0.0300	5.98

St. Dev: Desviación estándar. C.V. %: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia

A partir de la concentración y la absorbancia promedio de los estándares de trolox, se realizó el gráfico de calibración presentado en la Figura 3.8.

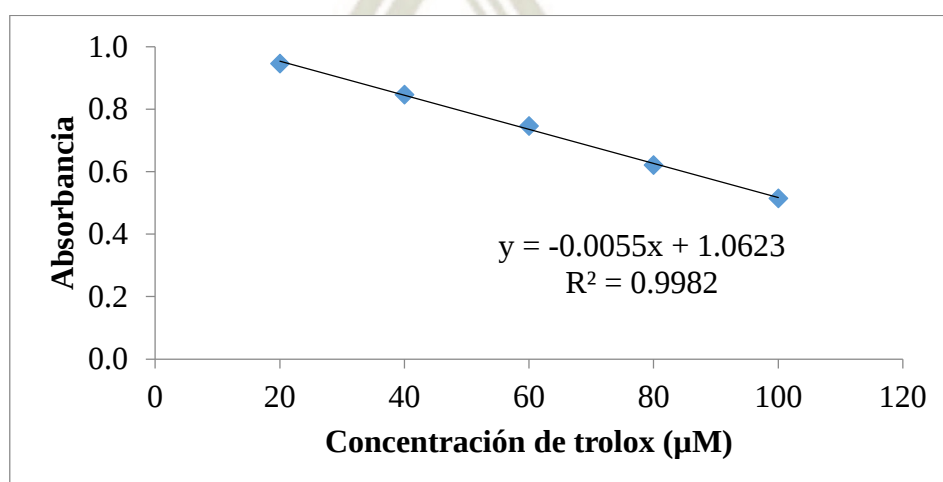


Figura 3.8. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por el método DPPH

Se trató a las muestras de extractos de Pitahaya obtenidos mediante sonicación, como se describe en el apartado 2.2.3 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 3.8. Los datos respectivos se presentan en la Tabla 3.7

Tabla 3.7. Capacidad antioxidante de Pitahaya por el método DPPH

Muestra	Absorbancia			Promedio	St. Dev.	C.V. %	Concentración * F.D.
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3				
Pitahaya amarilla	0.5304	0.5428	0.5556	0.5429	0.0100	2.32	3.18 mM trolox
Pitahaya Roja	0.4852	0.4852	0.4659	0.4788	0.0100	2.33	3.57 mM trolox

St. Dev: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual. F.D: Factor de dilución(33.33)

Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, se realizó 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 1.6346.

Tales resultados se muestran en la Tabla 3.8

Tabla 3.8. Inhibición del radical DPPH

Concentración	% Inhibición
µM	DPPH
20	42.09
40	48.17
60	54.33
80	61.98
100	68.53

Fuente: Elaboración propia

A partir de la concentración y el porcentaje de inhibición del radical DPPH de los estándares de trolox calculados, se realizó el gráfico de calibración presentado en la Figura 3.9.

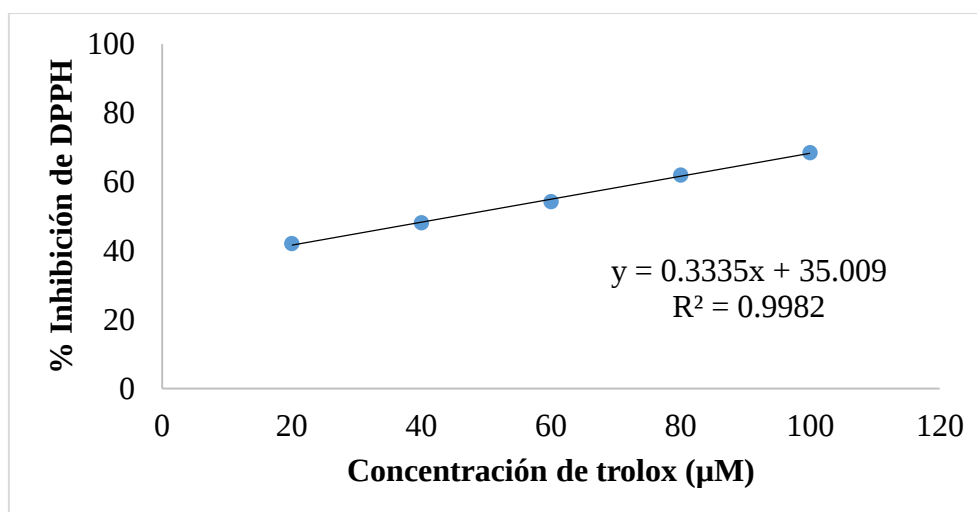


Figura 3.9. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por inhibición de DPPH

Utilizando la ecuación de regresión lineal presentada en la Figura 3.9 se interpoló la concentración de trolox de las muestras de Pitahaya a porcentaje de inhibición del radical DPPH. Tales resultados se presentan en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9 Capacidad antioxidante de Pitahaya por el método DPPH

Muestra	% Inhibición DPPH			Promedio	St. Dev.	C.V.%	St. Dev:
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3				
Pitahaya amarilla	67.55	66.79	66.01	66.78	0.8	1.15	
Pitahaya roja	70.32	70.32	71.50	70.71	0.7	0.96	

Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual

Fuente: Elaboración propia

La capacidad antioxidante y porcentaje de inhibición del radical DPPH para la Pitahaya amarilla y Pitahaya roja que se obtuvo fue de 3.18 mM trolox (66.78 %) y 3.57 mM trolox (70.71 %) respectivamente los cuales fueron expresados en mg TE/100 g de fruto liofilizado obteniéndose 795 mg TE /100 g de fruto liofilizado para Pitahaya amarilla y 893 mg TE/100 g de fruto liofilizado para Pitahaya roja que se muestran en la Tabla 3.17, donde la Pitahaya roja tuvo mayor capacidad antioxidante que la Pitahaya amarilla por el método de DPPH.

Figuerola y colaboradores determinaron la capacidad antioxidante por el método de DPPH de la Pitahaya roja procedente de Huaral donde el extracto fue obtenido por maceración con etanol de 70 % obteniendo como resultado 8.87 mg TE/100 g de fruto quedando

demostrado que la capacidad antioxidante de Pitahaya roja recolectada de Amazonas la cual utilizo otro método de extracción fue mayor. ^[69]

3.5.3. MÉTODO ABTS

Se preparó las soluciones, reactivos y los estándares de calibración como está descrito en el apartado 2.4.3.2, cuyas concentraciones y absorbancias se presentan en la Tabla 3.10.

Los estándares de trolox tratados por el método ABTS se muestran en la Figura 3.10.



Figura 3.10. Estándares de trolox tratados por el método ABTS

Tabla 3.10. Calibración del método ABTS con estándares de trolox

Concentración	Absorbancia			Promedio	St. Dev.	C.V. %
mM	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
0.050	0.8714	0.8740	0.8731	0.8728	0.0010	0.15
0.125	0.7917	0.7969	0.8055	0.7980	0.0070	0.87
0.250	0.7084	0.7116	0.7132	0.7111	0.0020	0.34
0.375	0.6309	0.6312	0.6318	0.6313	0.0005	0.07
0.500	0.5178	0.5186	0.5224	0.5196	0.0020	0.47

St. Dev: Desviación estándar. C.V. %: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente. Elaboración propia

A partir de la concentración y la absorbancia promedio de los estándares de trolox, se realizó el gráfico de calibración presentado en la Figura 3.11.

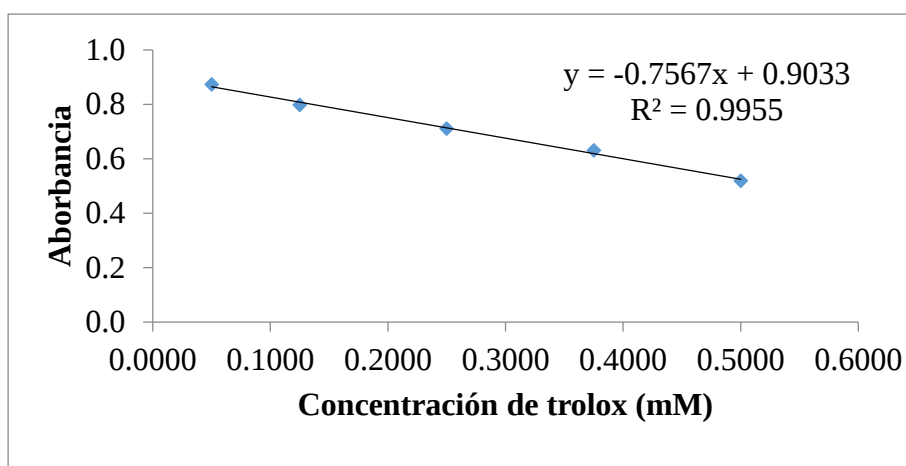


Figura 3.11. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por el método ABTS

Se trató a las muestras de extractos de Pitahaya amarilla y Pitahaya roja obtenidos mediante sonicación, como se describe en el apartado 2.2.3. De este modo se obtuvo lecturas de absorbancia y se interpoló a concentración de trolox utilizando la ecuación de regresión lineal mostrada en la Figura 3.11. Los datos respectivos se presentan en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Capacidad antioxidante de Pitahaya por el método ABTS

Muestra	Absorbancia			Promedio	St. Dev.	C.V. %	Concentración * F.D.
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3				
Pitahaya amarilla	0.5687	0.5678	0.5676	0.5680	0.0006	0.10	2.29 mM Trolox
Pitahaya roja	0.7297	0.7301	0.7298	0.7299	0.0002	0.03	4.43 mM Trolox

St. Dev: Desviación estándar. C.V. %: Coeficiente de variación porcentual. F.D: Factor de dilución (10)

Fuente: Elaboración propia

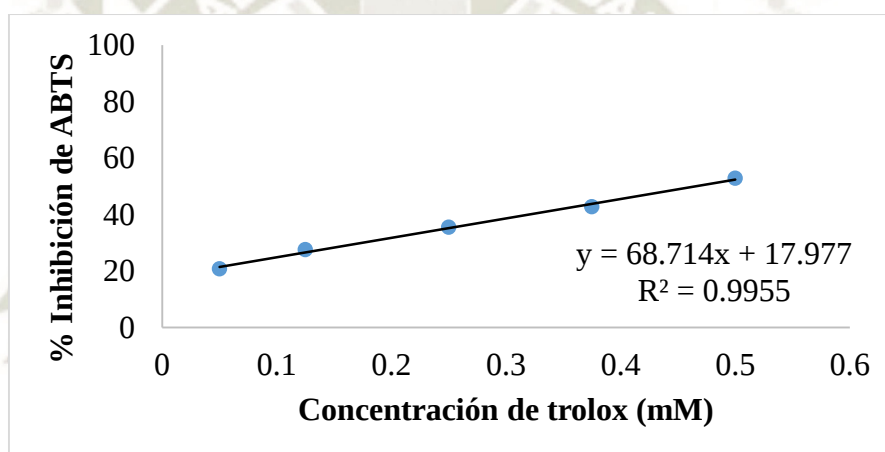
Por otro lado, se realizó un análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de ABTS (radical ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) de los estándares respecto a la concentración de los mismos, considerando como 100 % al blanco de absorbancia que fue solución diluida del reactivo ABTS con etanol 96 % dando como absorbancia 1.1013. Tales resultados se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Inhibición del radical ABTS

Concentración mM	% Inhibición ABTS
0.050	20.75
0.125	27.54
0.250	35.43
0.375	42.68
0.500	52.82

Fuente: Elaboración propia

A partir de la concentración y el porcentaje de inhibición del radical ABTS de los estándares de trolox, se realizó el gráfico de calibración presentado en la Figura 3.12.


Figura 3.12. Gráfico de calibración para capacidad antioxidante por inhibición de ABTS

Utilizando la ecuación de regresión lineal presentada en la Figura 3.12 se interpoló la concentración de trolox de las muestras de Pitahaya a porcentaje de inhibición del radical ABTS. Tales resultados se presentan en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13. Capacidad antioxidante de Pitahaya por el método ABTS

Muestra	% Inhibición ABTS			Promedio	St. Dev.	C.V. %
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
Pitahaya amarilla	33.74	33.71	33.73	33.73	0.02	0.06
Pitahaya roja	48.36	48.44	48.46	48.42	0.05	0.11

St. Dev: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual

Fuente: Elaboración propia

La capacidad antioxidante y porcentaje de inhibición de ABTS de Pitahaya amarilla y Pitahaya roja que se obtuvo fue de 2.29 mM trolox (33.73 %) y 4.43 mM (48.42 %) respectivamente los que fueron expresados en mg de TE /100 g de fruto liofilizado, obteniéndose 574 mg TE /100 g de fruto liofilizado para Pitahaya amarilla y 1109 mg TE /100 g de fruto liofilizado para Pitahaya roja que se muestran en la Tabla 3.17.

Ochoa y colaboradores determinaron la capacidad antioxidante del jugo de la pulpa fermentado de *Hylocereus undatus* de la ciudad de Puebla-México por el método de ABTS obteniendo 24.12 mg TE/100 g de fruto en comparación con la de procedencia de Amazonas es quien tiene mayor capacidad antioxidante con 1109 mg TE/100 g de fruto liofilizado. [78]

3.5.4 ÁCIDO ASCÓRBICO POR VOLTAMPEROMETRÍA

En la Figura 3.13, contiene la celda electroquímica con 10 mL de buffer y 1 mL de muestra o estándar, según sea el caso, adicionándose dos veces 100 μ L de estándar de ácido ascórbico (método de adición de estándar).

Adición de estándar: Es la adición de alícuotas de la matriz a soluciones estándares los cuales están diluidos a volúmenes constantes luego se procede a determinar la señal de los estándares así como el de la muestra preparada de la misma forma, en ausencia de estándar añadido.



Figura 3.13. Voltámetro 797 VA Computrace

Se preparó la solución estándar de ácido ascórbico como está descrito en el apartado 2.5.2 y se determinó su potencial pico de oxidación, obteniéndose el siguiente gráfico que se muestra en la Figura 3.14 .

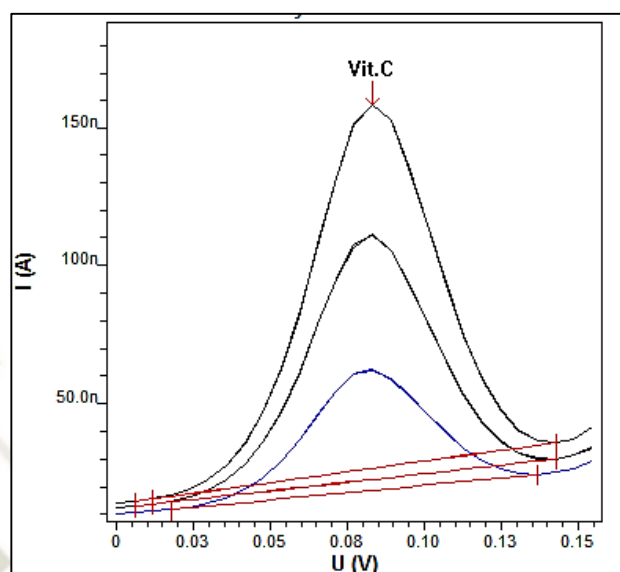


Figura 3.14. Potencial pico de oxidación del estándar de ácido ascórbico

Asimismo, se determinó el contenido de ácido ascórbico de las muestras de Pitahaya por el método de adición de estándar, considerando un total de 6 repeticiones como se muestra en Tabla 3.14.

Tabla 3.14. Contenido de ácido ascórbico en las Pitahayas por voltamperometría

Muestras	Concentración A.A en mg / L			Promedio	St. Dev.	C.V. %
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
Pitahaya Roja	194.23	195.96	177.06	189.08	10.44	5.52
Pitahaya amarilla	71.95	78.07	77.17	75.73	3.30	4.36

St. Dev: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual

Fuente: Elaboración propia

La cantidad de ácido ascórbico que contiene la muestra de Pitahaya roja es de 189.08 mg A.A /L, mientras que la muestra de Pitahaya amarilla contiene 75.73 mg A.A /L. Se expresó el resultado en función al peso de fruto liofilizado, obteniéndose 159.37 mg A.A /100 g de fruto liofilizado en Pitahaya roja y 63.83 mg A.A /100 g de fruto liofilizado en Pitahaya amarilla. Los cuales se muestran en la Tabla 3.17, obteniéndose como resultado que la Pitahaya roja tiene mayor contenido de ácido ascórbico.

Torres y colaboradores determinaron que la cantidad de ácido ascórbico que contiene la Pitahaya amarilla procedente del valle de Cauca, Colombia donde el extracto se preparó por agitación con etanol al 80 % y fue determinada por el método colorimétrico de la 2-nitroanilina fue de 2209 mg A.A /100 g de semillas y 800 mg A.A /100 g de pulpa de la fruta. En comparación con la Pitahaya amarilla procedente de Churuja - Amazonas fue de 63.83 mg A.A /100 g de fruto liofilizado mostrando un menor contenido de ácido ascórbico.^[70]

Comparando el contenido de ácido ascórbico obtenido de Pitahaya amarilla que fue de 63.83 ± 2.78 mg A.A/100 g y Pitahaya roja que fue de 159.37 ± 8.80 mg A.A/100 g de fruto liofilizado comparando con otros frutos, como la naranja (50 mg/100 g ácido ascórbico), limón (45 - 50 mg / 100 g de ácido ascórbico), la manzana (5 mg / 100 g ácido ascórbico) y la cereza (10 mg /100 g ácido ascórbico) se puede apreciar que la Pitahaya amarilla como la Pitahaya roja tiene mayor contenido de ácido ascórbico.^[79,80]

3.5.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Se preparó las soluciones estándar de ácido gálico como está descrito en el apartado 2.6.3, cuyas concentraciones y absorbancias fueron correlacionadas por el método Folin Ciocalteu. Estos valores se presentan en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15. Calibración del método Folin Ciocalteu con estándares de ácido gálico

Concentración (ppm)	Absorbancia			Promedio	St. Dev.	C.V.%
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
2	0.0132	0.0133	0.0135	0.0133	0.0002	1.15
4	0.0339	0.0337	0.0337	0.0338	0.0001	0.34
6	0.0564	0.0527	0.0554	0.0548	0.0020	3.49
8	0.0749	0.0794	0.0759	0.0767	0.0020	3.08
10	0.1045	0.1053	0.1048	0.1049	0.0004	0.39

St. Dev: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia

A partir de la concentración y la absorbancia promedio de los estándares de ácido gálico, se realizó el gráfico de calibración presentado en la Figura 3.15.

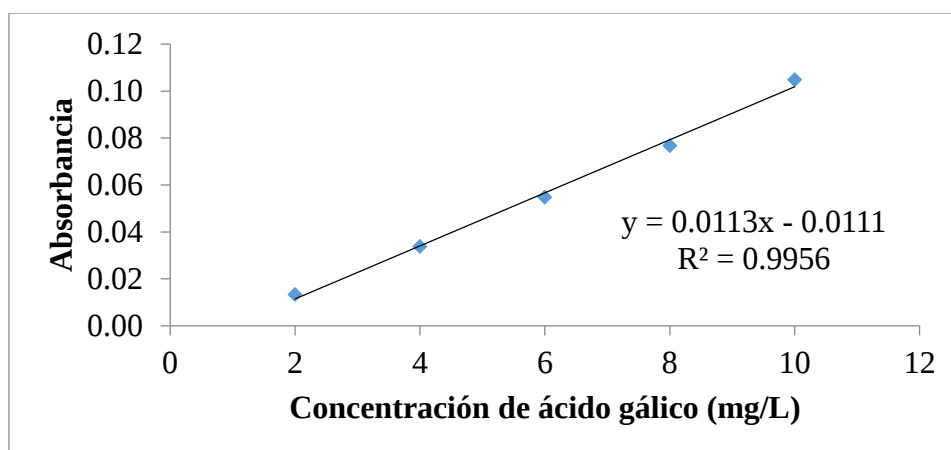


Figura 3.15. Gráfico de calibración para compuestos fenólicos por el método Folin Ciocalteu

Se trató a las muestras de extractos de Pitahaya obtenidos mediante sonicación, como se describe en el apartado 2.2.3. 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 3.15. Los datos respectivos se presentan en la Tabla 3.16.

Tabla 3.16. Compuestos fenólicos de Pitahaya por el método Folin Ciocalteu

Muestra	Absorbancia			Promedio	St. Dev.	C.V. %	Concentración * F.D.
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3				
Pitahaya amarilla	0.0794	0.0766	0.0787	0.0782	0.0010	1.86	148.09 mg/L
Pitahaya roja	0.0818	0.0830	0.0825	0.0824	0.0006	0.73	185.25 mg/L

St. Dev: Desviación estándar. C.V. %: Coeficiente de variación porcentual. F.D: Factor de dilución (111)

Fuente: Elaboración propia

La cantidad de compuestos fenólicos totales que contiene la muestra de Pitahaya roja es de 185.25 mg/L y Pitahaya amarilla 148.09 mg/L. Los resultados se expresaron en mg GAE /100 g obteniéndose 164 mg GAE /100 g de fruto liofilizado para Pitahaya amarilla y 206 mg GAE /100 g de fruto liofilizado para Pitahaya roja, que se muestran en la Tabla 3.17 donde la mayor cantidad de compuestos fenólicos es de la Pitahaya roja

Wee y colaboradores determinaron el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de Pitahaya roja de Malasia por el método Folin Ciocalteu, obteniendo 28.65 mg GAE

/100 g de ácido gálico en pulpa, utilizando como solvente etanol para obtener un jugo donde la cantidad de compuestos fenólicos es menor en comparación con la de procedencia de Churuja-Amazonas. ^[81]

En comparación con Elfi y colaboradores que cuantificaron los (CFT) de Pitahaya amarilla proveniente de Indonesia de la cual se preparó un extracto por maceración con etanol, por el método Folin Ciocalteu, obteniendo 24.6 mg GAE /100 en fruta. Donde la cantidad de compuestos fenólicos totales de la procedencia de Churuja - Amazonas fue mayor. ^[82]

Según Flores y colaboradores obtuvieron (CFT) por el método de Folin Ciocalteu para Pitahaya roja procedente de Michoacan - México fue de: 92.64 mg GAE/100 g de fruta extraída con agua mediante decocción, 145.67 mg GAE /100 g de fruta extraída con acetona preparando un jugo y 109.86 mg GAE /100 g de fruta extraída con etanol por maceración en comparación con la Pitahaya roja procedente de Churuja - Amazonas posee una mayor cantidad de (CFT), lo cual se podría deber a diversos factores. ^[91]

Chemah y colaboradores analizaron pitahayas procedentes de Malasia y encontraron 38.0 mg GAE/100 g de semillas de Pitahaya roja y 40.6 mg GAE/100 g de semillas de Pitahaya amarilla extraídas con etanol utilizando un dispersor, 33.0 mg GAE/100 g de semillas de Pitahaya roja y 31.5 mg GAE /100 g de semillas de Pitahaya amarilla extraída con agua utilizando un dispersor Comparando con los extractos del fruto con semillas y pulpa el contenido de (CFT) es mayor lo cual se debería a la separación de la pulpa y semillas. ^[83]

3.5.6. COMPARACIÓN GLOBAL

Se expresó los resultados de los análisis realizados en unidades de mg/100 g respecto al fruto liofilizado de Pitahaya amarilla "*Hylocereus megalanthus*" y Pitahaya roja "*Hylocereus undatus*". Tales valores, conteniendo de modo resumido los resultados de los métodos para determinación de capacidad antioxidante CUPRAC (*Capacidad de reducción antioxidante del cobre*), DPPH (*2,2-difenil-1-picril-hidrazilo*), ABTS (*ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico*) 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 de voltamperometría, que se expresó en mg de ácido ascórbico /100 g de fruto liofilizado que se presentan en la Tabla 3.17

Tabla 3.17. Resumen de resultados

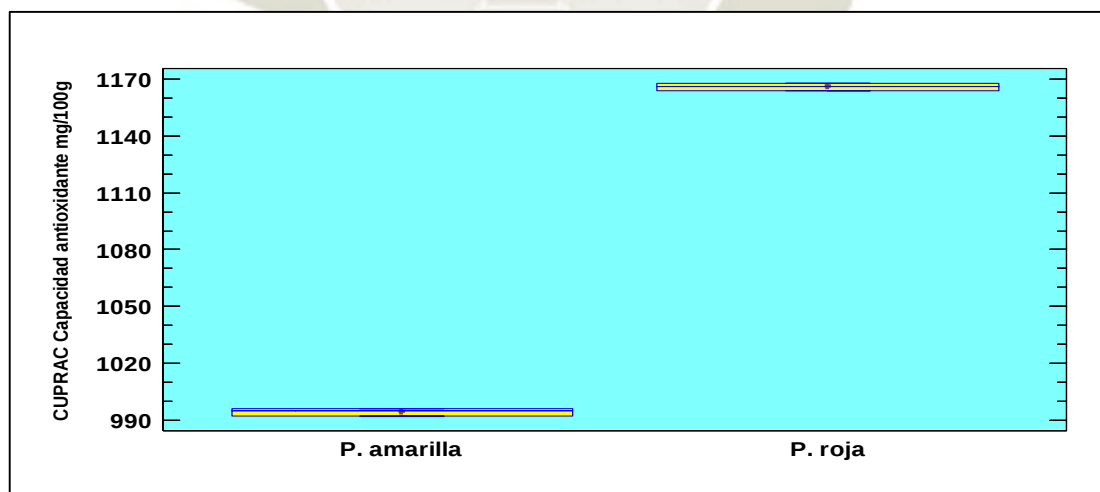
Variedad	Estadístico	Capacidad antioxidante			Compuestos Fenólicos Folin Ciocalteu (mg /100 g Acido gálico)	Ácido ascórbico Voltamperometría (mg /100 g de acido ascórbico)
		CUPRAC	DPPH	ABTS		
Unidades		(mg/100 g trolox)	(mg/100 g trolox)	(mg/100 g trolox)		
Pitahaya amarilla	Promedio	994	795	574	164	63.82
	St.Dev	2.08	19.5	0.58	14.57	2.78
	C.V %	0.21	2.45	0.10	8.87	4.36
Pitahaya roja	Promedio	1166	893	1109	206	159.37
	St.Dev	2.0	17.32	1.73	5.51	8.80
	C.V %	0.17	1.94	0.16	2.68	5.52

St. Dev: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia

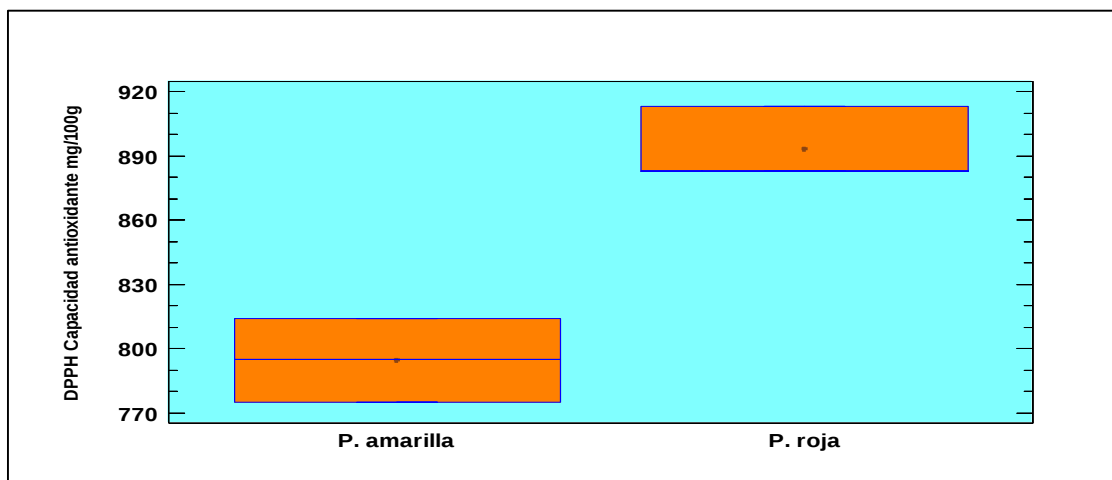
En la Figura 3.16. A través de un grafico de Caja y Bigotes, se observa que la Pitahaya roja tiene mayor capacidad antioxidante que la Pitahaya amarilla con el método de CUPRAC, obteniendo en la Pitahaya roja 1166 mg TE/ 100 g y en la Pitahaya amarilla 994 mg TE/ 100 g de fruta liofilizada que se muestran en la Tabla 3.17.

Figura 3.16. Comparacion de la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.



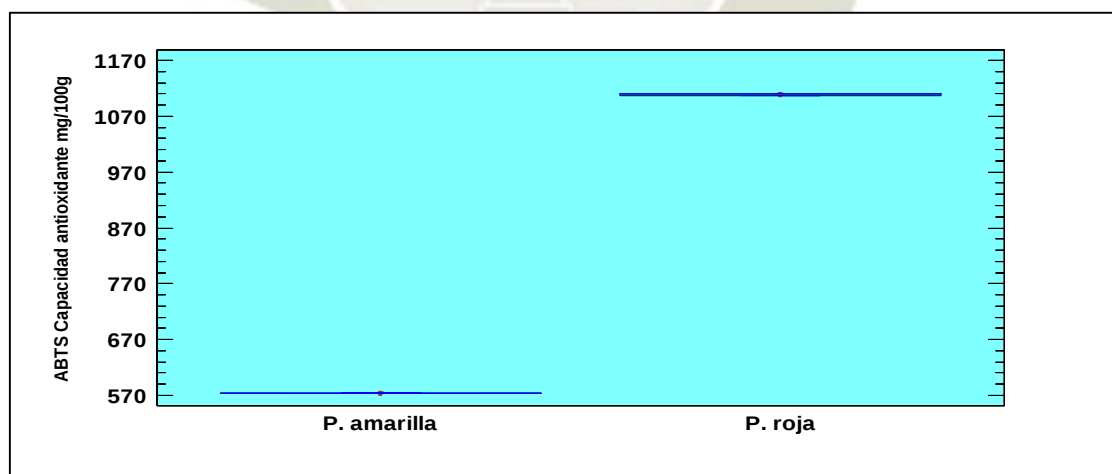
En la Figura 3.17. A través de un grafico de Caja y Bigotes, se observa que la Pitahaya roja tiene mayor capacidad antioxidante que la Pitahaya amarilla con el método de DPPH, obteniendo en la Pitahaya roja 893 mg TE/ 100 g y en la Pitahaya amarilla 795mg TE/ 100 g de fruta liofilizada que se muestran en la Tabla 3.17.

Figura 3.17. Comparación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.



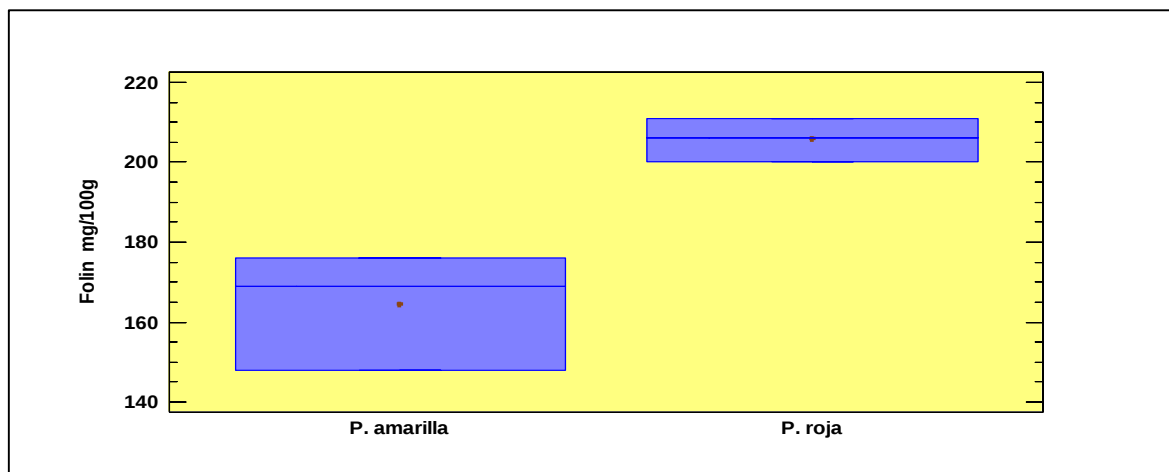
En la Figura 3.18. A través de un gráfico de Caja y Bigotes, se observa que la Pitahaya roja tiene mayor capacidad antioxidante que la Pitahaya amarilla con el método de ABTS, obteniendo en la Pitahaya roja 1109 mg TE/ 100 g y en la Pitahaya amarilla 574 mg TE/ 100 g de fruta liofilizada que se muestran en la Tabla 3.17.

Figura 3.18. Comparación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.



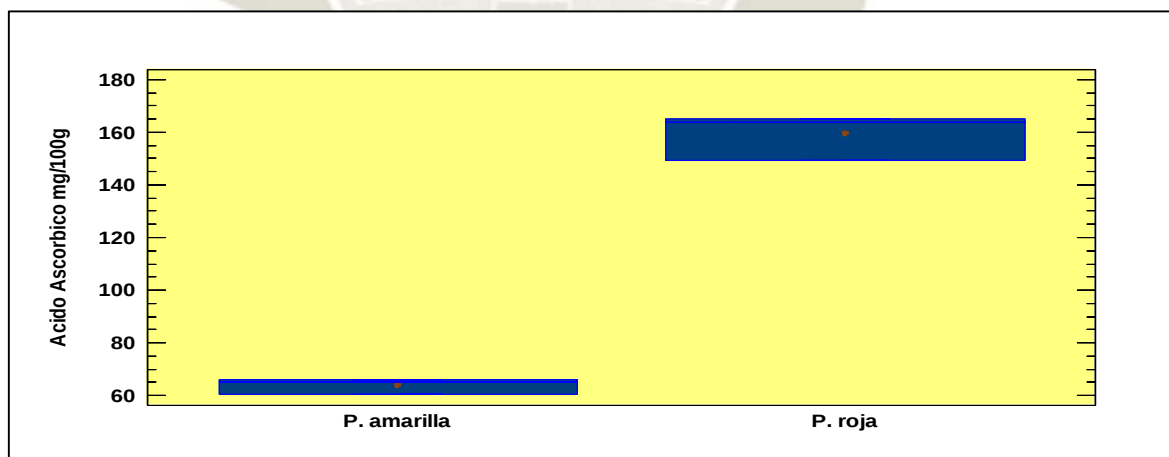
En la Figura 3.19. A través de un gráfico de Caja y Bigotes, se observa que la Pitahaya roja tiene mayor capacidad antioxidante que la Pitahaya amarilla con el método de Folin ciocalteu, obteniendo en la Pitahaya roja 206 mg GAE / 100 g y en la Pitahaya amarilla 164 mg GAE / 100 g de fruta liofilizada que se muestran en la Tabla 3.17.

Figura 3.19. Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Folin Ciocalteu entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.



En la Figura 3.20. A través de un grafico de Caja y Bigotes, se observa que la Pitahaya roja tiene mayor capacidad antioxidante que la Pitahaya amarilla con el método de Voltamperométrico, obteniendo en la Pitahaya roja 159.37 mg A.A/ 100 g y en la Pitahaya amarilla 63.82 mg A.A/ 100 g de fruta liofilizada que se muestran en la Tabla 3.17.

Figura 3.20. Comparación del contenido de ácido ascórbico por el método de Voltamperometría entre Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.



Para comparar los análisis realizados CUPRAC, DPPH, ABTS, voltamperometría y Folin Ciocalteu para la Pitahaya amarilla y Pitahaya roja, se realizó pruebas de T de student, requiriendo primero la determinación del estadístico F para comparar la varianzas iguales o diferentes entre ambas variedades de pitahaya ($p < 0.01$). Los resultados de tal proceso se presentan en la Tabla 3.18.

Tabla 3.18. Resultados de las pruebas F para comparar varianzas entre dos grupos

Prueba	F teórico	F experimental	Varianza
CUPRAC	19	1.08	Iguales
DPPH	19	1.27	Iguales
ABTS	0.05	0.11	Diferentes
Folin Ciocalteu	19	7	Iguales
Voltamperometría	0.05	0.1	Diferentes

Fuente: Elaboración propia

Como se muestra en la Tabla 3.18, las varianzas son iguales entre las dos variedades de pitahaya para cada uno de los experimentos realizados, con excepción del método ABTS y Voltamperometría. De este modo se realizó test T de student para muestras con varianzas iguales ($p < 0.01$) al evaluar los métodos CUPRAC, DPPH y Folin Ciocalteu, mientras que se realizó el test T de student para muestras con varianzas diferentes ($p < 0.01$) al evaluar el método ABTS y voltamperometría .

Tabla 3.19 Resultados de los test T de student para comparar promedios entre dos grupos

Prueba	T teórico	T experimental	Probabilidad	Significancia
CUPRAC	4.6	-103	0.0000	AS
DPPH	4.6	-6.53	0.0028	AS
ABTS	4.6	-507.86	0.0000	AS
Folin-Ciocalteu	4.6	-4.60	0.0100	AS
Voltamperometría	4.6	-17.91	0.0000	AS

AS: altamente significativa

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 3.19 se muestra los resultados del test t de student en todos los análisis realizados existe diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre los resultados obtenidos para la Pitahaya roja y amarilla. Por lo tanto, se concluyó que la Pitahaya roja posee una mayor capacidad antioxidante cuyo promedio global es 1056 mg TE/100 g de fruto liofilizado en comparación con la Pitahaya amarilla cuyo promedio global es de 788 mg TE /100 g de fruto liofilizado y la concentración de compuestos fenólicos, ácido ascórbico es mayor respecto a la Pitahaya amarilla. Se comparó los 3 métodos para determinar la capacidad antioxidante: CUPRAC, DPPH y ABTS; mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), respecto a cada muestra de Pitahaya.

En la Figura 3.21. En la gráfica de barras podemos observar que el método más adecuado para determinar capacidad antioxidante es CUPRAC ya que tiene mayor promedio en

ambas especies (A=1166 mg TE/ 100 g y B= 994 mg TE/100 g) en comparación con DPPH y ABTS.

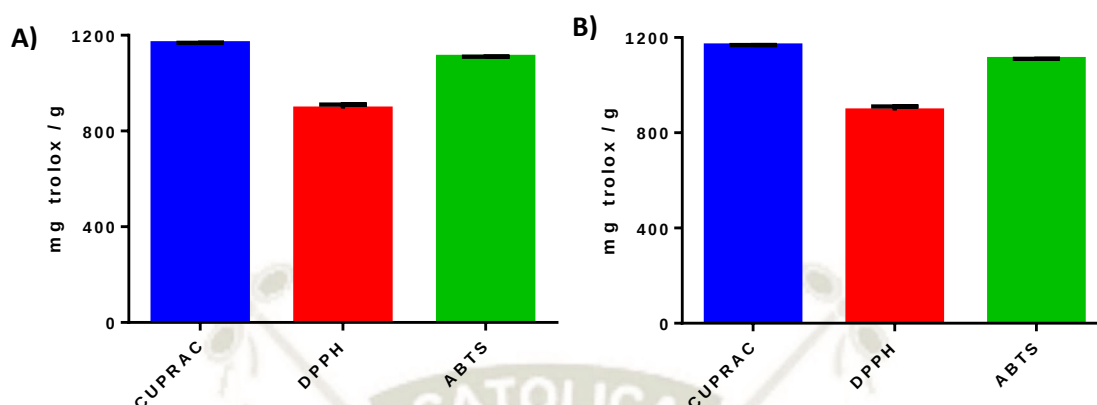


Figura 3.21. Comparación entre los métodos para determinar capacidad antioxidante.

A) Pitahaya roja B) Pitahaya amarilla

En la Tabla 3.20. ANOVA se muestra que los tres métodos tienen diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) entre los valores de capacidad antioxidante para Pitahaya roja.

Tabla 3.20. ANOVA entre métodos de determinación de capacidad antioxidante para Pitahaya roja

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	124434	2	62217	607.98	0
Intra Grupos	614	6	102.333		
Total (Corr.)	125048	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 3.21 se muestra el test Tukey para Pitahaya roja, donde los tres métodos para determinar capacidad antioxidante difieren entre ellos, el método CUPRAC es el que obtuvo los valores más elevados con un valor promedio de 1166 mg TE/100 g de fruto liofilizado de Pitahaya roja en comparación con el DPPH y ABTS que también difieren entre ellos.

Tabla 3.21. Test Tukey entre métodos de determinación de capacidad antioxidante para Pitahaya roja

Métodos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
DPPH	3	893	A
ABTS	3	1109	B
CUPRAC	3	1166	C

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 3.22. ANOVA se muestra que los tres métodos tienen diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) entre los valores de capacidad antioxidante para Pitahaya amarilla.

Tabla 3.22. ANOVA entre métodos de determinación de capacidad antioxidante para Pitahaya amarilla

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	265668	2	132834	1035.07	0
Intra grupos	770	6	128.333		
Total (Corr.)	266438	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 3.23 se muestra el test Tukey para Pitahaya amarilla donde los tres métodos para determinar capacidad antioxidante difieren entre ellos, el método CUPRAC es el que obtuvo los valores más elevados con un valor promedio de 994 mg TE/100 g de fruto liofilizado de Pitahaya amarilla en comparación con el DPPH y ABTS que también difieren entre ellos.

Tabla 3.23. Test Tukey entre métodos de determinación de capacidad antioxidante para Pitahaya amarilla

Métodos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ABTS	3	573.667	A
DPPH	3	794.667	B
CUPRAC	3	994.333	C

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 3.22 se muestra la interacción entre el método y la variedad de Pitahaya sobre la capacidad antioxidante. Una vez más se reafirma las versiones dadas anteriormente, es decir el método CUPRAC y la Pitahaya roja tienen mayor capacidad antioxidante.

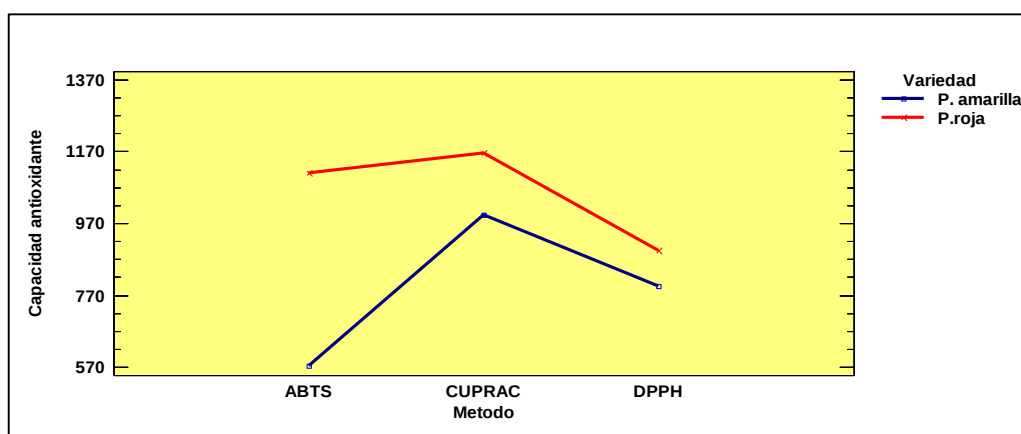


Figura 3.22. Interacción de la capacidad antioxidante por método y variedad de Pitahaya.

Apak y colaboradores reportaron que el método CUPRAC es capaz de determinar la capacidad antioxidante de polifenoles naturales y sintéticos, vitamina C y E, compuestos hidrofílicos y lipofílicos simultáneamente, lo cual representa una ventaja por sobre otros métodos para determinar capacidad antioxidante por transferencia de electrones como el método DPPH. Por lo cual CUPRAC obtiene mayor cantidad de capacidad antioxidante en comparación con DPPH y ABTS con los extractos de Pitahaya amarilla y Pitahaya roja.^[84-88]

Li y colaboradores compararon los métodos CUPRAC y ABTS al determinar la capacidad antioxidante de diversos extractos vegetales de *Vitis vinifera*, concluyendo que el método CUPRAC genera resultados mayores que con ABTS, en toda variante considerada. En comparación con los resultados obtenidos con los extractos de Pitahaya roja y Pitahaya amarilla CUPRAC tiene resultados mayores que DPPH y ABTS.^[89]

Wootton y colaboradores correlacionaron varios métodos para determinar la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales de 23 jugos vegetales mediante análisis de regresión lineal, tomando en cuenta el coeficiente de determinación R^2 , siendo un valor cercano a 1 un indicador de alta correlación entre dos grupos de resultados.^[90]

Tal procedimiento no se realizó en la presente investigación pues se requeriría al menos de tres muestras diferentes para realizar un análisis de regresión lineal, teniéndose únicamente dos variedades de Pitahaya. De este modo se optó por realizar ANOVA para investigar la similitud o diferencia entre los métodos CUPRAC, DPPH y ABTS

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el liofilizado del mesocarpio del fruto de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*); obteniendo un rendimiento de liofilización de 17.28 ± 0.80 % en la Pitahaya amarilla y un valor de 13.75 ± 0.37 % en la Pitahaya roja.
2. Se obtuvo el extracto del mesocarpio liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) por sonicación.
3. Se realizó un screening fitoquímico de los extractos del mesocarpio liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*), identificando en ambas especies taninos, lípidos, esteroides, carbohidratos y alcaloides.
4. Se determinó y comparo el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en el extracto del mesocarpio liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) obteniéndose un valor de 164 mg GAE/100 g de fruta liofilizada y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) con un valor de 206 mg GAE/100 g de fruta liofilizada por el método de Folin Ciocalteu, concluyendo que la Pitahaya roja tiene mayor contenido de CFT en comparación con la Pitahaya amarilla. La influencia a la actividad antioxidante de la Pitahaya se le atribuye en su mayoría al contenido de compuestos fenólicos totales presentes en la muestra por la influencia del mismo como antioxidante y por su cantidad encontrada en el fruto.
5. Se determinó y comparo el contenido de ácido ascórbico en el extracto del mesocarpio liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) obteniéndose un valor de 63.82 mg A.A/100 g de fruta liofilizada y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) con un valor de 159.37 mg A.A/100 g de fruta liofilizada mediante voltamperometría, concluyendo que la Pitahaya roja tiene mayor contenido de ácido ascórbico en comparación con la Pitahaya amarilla.
6. Se determinó y comparó la capacidad antioxidante del extracto del fruto liofilizado de Pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y Pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) por los métodos DPPH, CUPRAC y ABTS. Al comparar la capacidad antioxidante entre métodos para la Pitahaya amarilla y Pitahaya roja, se concluye que el método más adecuado es CUPRAC en ambas especies de Pitahaya en comparación con DPPH y ABTS, habiendo diferencia altamente significativa entre los 3 métodos analíticos. Siendo mayor la capacidad antioxidante para Pitahaya roja por el método

de CUPRAC 1166 mg TE /100 g de fruto liofilizado en comparación con la Pitahaya amarilla por el método de CUPRAC 994 mg TE /100 g de fruto liofilizado.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Medina Pablo, Mendoza Freddy (2011) “Evaluación de mermelada y néctar a partir de la pulpa de Pitahaya y determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) Tesis de grado para optar el título de Ingeniero Químico. Universidad de Guayaquil- Ecuador.
- [2]. Pushpakumara, D.K. y Kariyawasam, Gunasena, H.P., M. Dragon fruit *Hylocereus undatus* (Haw) Britton and Rose. In: Underutilized fruit trees in Sri Lanka. World Agroforestry Centre South Asia Office, New Delhi, India. (2007).
- [3]. Kuskoski, et al. (2005) “Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos”. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas.; 25(4):7266732.
- [4]. Alvarado Romero, José Apolonio (2014) “Caracterización pos cosecha de la calidad del fruto de Pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) y roja (*Hylocereus undatus*)” Tesis a la obtención del Título de Ingeniero agrónomo. Universidad de Guayaquil.
- [5]. Imbert, et al.(2006) Pitahaya (*Hylocereus spp*): a new fruit crop, a market with a future. Fruits. 61(4): 237-250.
- [6]. OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). Nicaragua. (2001). [acceso abril 16, 2018]. Disponible en: [http:// www.oirsa.org](http://www.oirsa.org).
- [7]. Gunasena, et al. Dragon fruit *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose. In: Underutilized fruit trees in Sri Lanka. World Agroforestry Centre South Asia Office, New Delhi, India. (2007).
- [8]. Parra. M., Tamizaje fotoquímico y determinación de la actividad laxante de tallos y semillas de Pitahaya., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba Ecuador., Tesis 2010., P.p 65-66.
- [9]. Difilo Angelo Ivan (2017) “Fortalecimiento asociativo de los actores de la economía popular y solidaria para el aprovechamiento de oportunidades de negocios en mercados internacionales. Caso: Asociación de productores y comercializadores de Pitahaya y otros productos palora, provincia de Morona Santiago- Ecuador, 2015-2016” Tesis previa a la obtención del título de Magister en gestión del desarrollo local comunitario. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

- [10]. Dabrowska Criado C., Moya Mir M. “Vitaminas y antioxidante”. Saned y ediciones S.L, 2009.
- [11]. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. “The definition and measurement of antioxidants in biological systems.” *Free Radic Biol Med* 18(1), 125-126.1995.
- [12]. Zamora J.D. “Antioxidants: micronutrients fighting for health.” *Rev Chil Nutr* 2007; 34:1-11.2007.
- [13]. Balsano et al (2009) “Antioxidant effects of natural bioactive compounds.” *Curr. Pharm Des.*; 15(26):3063-73.
- [14]. Mruk et al.(2002) “Antioxidant superoxide dismutase a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility.” *Contraception* 65(4): 5-11.
- [15]. Ramírez Tortosa M.C., Quiles Morales J.L. “Tratado de nutrición. Tomo 1: Vitamina C, Vitamina E y otros antioxidantes de origen alimentario”. Editorial Acción Médica. Junio 2005.
- [16]. Chebrolu et al. (2012) “An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. *LWT*”- *Food Science and Technology*, 47(2), 443-449 pp.
- [17]. Gonzales C. Caracterización físico químico del fruto de garmbullo (*Myrtillocactus geometrizans*) [Tesis de Maestría]. Santiago de Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales; (2010).
- [18]. Wayner et al. (1986) “The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration dependent”. *Biochim. Biophys. Acta* 884, 119-123.
- [19]. Lopes et al. (2013) “Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L.”. *Molecules*, 18, 6852-6865.
- [20]. Ashwell M. “Conceptos sobre alimentos funcionales”. ILSI press Europe. International Life Sciences Institute 2002.
- [21]. Robards et al. (1999) “Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits” *Food Chem* 66:36-40.1999.

- [22]. Tomas et al. (2000) “Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing.” En: Atta-ur. Rahman ed. Studies in Natural products Chemistry. Amsterdam: Elsevier 23:39-95
- [23]. Martínez et al. (2002) “Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes”. Nutr. Hosp. XVII (6) 271-278.
- [24]. Tomas et al. (2001) “Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables.” J Sci Food Agric 81:53-76
- [25]. Escamilla et al. (2009) “Flavonoides y sus acciones antioxidantes”. Vol.22 N° 2, México, Marzo-Abril, pag.73-75
- [26]. Maldonado et al. “Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Rev Med UV 2010. Disponible en: http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf. (Consultado en septiembre de 2018).
- [27]. Ugartondo Vanessa (2009) “Caracterización de derivados poli fenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares.” Universidad de Barcelona, España
- [28]. Halliwell et al. “Oxidative stress and neurodegeneration; where are we now” Journal of Neurochem 97, 1634-1658..
- [29]. Guija et al.(2000) “Radicales libres y envejecimiento.” Bol Soc Quim Perú. 46:33-55.
- [30]. Melissa Block. Antioxidantes naturales: Como reducir el riesgo de cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares. 1era ed. Madrid: Ediciones Nowtilus S.L. (2010).
- [31]. Pereira et al. (2012) “Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family”. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 3061-3067.
- [32]. Myra M. Tetteh, MPP Ciencias de la salud y estrés oxidativo. Centro de Excelencia en Ciencias de Salud Ambiental de la Universidad de Michigan Environmental Health Fact Sheet, (2012).
- [33]. Lee et al. (2004) “Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals.” Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 3: 21-33.

- [34]. Montero E. (1996) “Los radicales libres y las defensas antioxidante.” An FacMed Perú 57(4):78-81.
- [35]. Marwah et al. (2007) “Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman”. Food Chemistry. 101(2): 465-470.
- [36]. Zamora, D (2007). “Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud”. Revista chilena de Nutrición, 34(1): 17-26.
- [37]. Antolovich et al. (2002) “Methods for testing antioxidant activity.” Analyst 127(1):183-198.
- [38]. Gómez et al.(2006) “Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41(4):1220-1234.
- [39]. Magalhaes et al. (2008) “Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties.” Anal Chim Acta 613(1): 1-19.
- [41]. Mustafa et al. (2011) “A comprehensive review of CUPRAC methodology” Analytical Methods. 3(11):2439-2453.
- [42]. Claudia Kuklinski. “Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural”. (2003).
- [43]. Barrera Fernanda. (2015) “Métodos alternativos para la extracción y purificación de productos naturales de interés para la industria farmacéutica” [tesis para optar el título de doctora] Universidad nacional de Córdoba, Argentina
- [44]. Rodríguez et al. (2014) “Use of ultrasound radiation for extraction of bioactive compounds from natural sources Current events and perspectives”. Revista CENIC Ciencias Quimicas, 45(1): 139-147.
- [45]. Xia et al. (2006) “Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusión”. Journal of Food Engineering 74 (4): 557–560.
- [46]. Ayala et al. (2010) “Liofilización de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*)”. Revista de la facultad de química farmacéutica 17(2):121-127

- [47]. Huayama et al. (2013) “Efecto del tiempo de congelación en la capacidad de rehidratación de la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) liofilizada” revista de universidad nacional de Trujillo agroindustrial science 3(1): 27-33.
- [48] Colchado (2015) “Efecto del método de liofilización, densidad de carga y temperatura de placa en la de -fresa (*fragaria vesca* l.) Deshidratada” [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero agroindustrial] Universidad nacional de santa Chimbote. Perú.
- [49]. Grajales et al. (2005) “Liofilización de carambola (*Averrhoa carambola* L.) osmodeshidratada” Ingeniería y Competitividad 7(1):19-26.
- [50]. Santarrosa Verónica (2013) “Evaluación nutricional comparativa de pitahaya (*Hylocereus triangularis*) deshidratada en deshidratador de bandejas con la liofilizada” [Tesis de grado previa la obtención del título de Bioquímico farmacéutico] Escuela superior politécnica de Chimborazo. Ecuador
- [51]. Abad Fernando (2016) “Determinación de vitamina c en brocoli (*brassica Oleracea italica*) mediante la técnica de Voltamperometría cíclica” [Proyecto de Investigación para optar por el título profesional de Químico] Universidad central del Ecuador, Quito.
- [52]. Pacheco et al. (2013) “Voltametrías: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos” Revista virtual de Química 5(4):516-537.
- [53]. Mauricio Wilches Zuñiga ,Luis Fernando Ruiz Monsalve ,Mauricio Hernandez Valdivieso “Bioingeniería VI Fundamentos para la instrumentación para clínica y radiaciones ionizantes, Editorial Universidad de Antioquia, Ciencia y Tecnología (2007).
- [54]. Wang J , “Analytical Electrochemistry” Second Edition; WILEY-VCH New York (2000)
- [55]. Allen B, “Electrochemical methods fundamentals and applications”, 1ª edic. John Wiley & sons. New York (1980)
- [56]. D.A. Skoog, F. J. Holler, T.A. Nieman, Principios de análisis instrumental, 5ta Ed., Editorial Mc Graw-Hill España (2001)
- [57]. Achterberg et al. (1999) “Stripping voltammetry for the determination of trace metalspeciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters.” Analytica Chimica Acta 400, 381-397.

- [58]. Arancibia et al. (2007) “Determination of aluminium in water samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry in the presence of pyrogallol red and a quaternary ammonium salt.” *Talanta* 73(3):546-552.
- [59]. Fogg, A (1994). “Adsorptive stripping voltammetry or Cathodic Stripping Voltammetry Methods of accumulation and determination in stripping voltammetry” *Analytical Proceedings including Analytical Communications* 31, 313-317.
- [60]. Jorge Luis Tafur Salazar (2016) “Determinacion de metales pesados cd,ii,pb(ii)y hg (ii) mediante voltamperometria de redisolucion anodica en gaus residuales mineras distrito minero portovelo –zaruma” [Tesis para obtener el grado de magister en Ambiental],Escuela Politecnica Nacional
- [61]. Carracedo Pinal Ambel. (1999) “Desarrollo de técnicas electroanalíticas aplicables a metales en fluidos biológicos de interés biosanitario. Determinación de cu en lcr. (líquido cefalorraquídeo)”[tesis doctoral], Universidad de Extremadura..
- [62]. Rondina et al. (1989) “Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas. (1989). *Revista de investigaciones agropecuarias.INTA.serie 2,Biología y Produccion Vegetal*, VI,Nº22.Buenos Aires
- [63]. *Phytochemical Methods*”.Harbone .J.B.2º Ed.Editorial Chapman and Hall (1984).
- [64]. *Farmacopea Nacional Argentina VI Ed* (1978) “.
- [65]. *Farmacopea Argentina VII Ed.*(2003)
- [66]. Romero Maria.(2017) “Desarrollo de electrodos modificados con polímeros conductores y nanopartículas para la determinación de actividad antioxidante. Aplicación en Agroalimentación” [Tesis Doctoral] Universidad de Córdoba. Argentina.
- [67]. Karasakal Ayca. (2015) “Evaluation of antixoidant activities of brassica napus’s seeds by CUPRAC, ABTS/persulfate and DMPD method”.*Journal Marmara Pharmaceutical*. 2(19):153-158.
- [68]. Londoño Julian. “Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En Luis Fernando Garcés Giraldo/Giraldo et al. *Desarrollo y transversalidad serie lasallista investigación y ciencia*. Itagüí, Colombia.: Editorial Artes y Letras S.A.S (2011). 129-162.

[69] Figueroa D, Mollinedo M.(2017) “Actividad antioxidante del extracto etanólico del mesocarpio del fruto de *Hylocereus undatus* “pitahaya” e identificación de los fitoconstituyentes” [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Universidad Wiener Lima. Perú.

[70] Torres et al. (2017) “Evaluation of bioactive compounds with functional interest from yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus* Haw)”. Revista.Facultad .Nacional.Agronomia. 70(3): 8311-8318..

[71]. Alanoca Soany. (2014) “Evaluación del contenido de ácido ascórbico y polifenoles totales del sancayo (*corryocactus brevistylus*) y determinación de su actividad antioxidante y genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica.”[Tesis para optar por el título profesional de Ingeniera Biotecnologa]. Universidad Católica de Santa Maria Arequipa .Peru.

[72]. Saucedo Juan. (2015). “Obtención de antioxidantes en polvo a partir de *Ipomea batata* camote morado “. [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Químico], Universidad nacional de Trujillo. Perú.

[73]. Tovar Jennifer. (2013). “Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la eco región cafetera”. [Trabajo de grado para optar al título de químico industrial]. Universidad Tecnológica De Pereira. Colombia.

[74]. Escudero Luisa.(2017) “Determinación de la capacidad antioxidante de vinos tintos. Efecto de la maceración con subproductos de la industria enológica”. [Trabajo Fin de Grado Farmacia]. Universidad de Sevilla.España.

[75]. Arroyo (2016) “Determinación de compuestos polifenólicos y evaluación del efecto antioxidante del fruto de *Physalis peruviana* “aguaymanto” comparado con su producto liofilizado” [Tesis para optar el Título Profesional de: Químico farmacéutico] Universidad Católica de Santa Maria Arequipa. Peru.

[76]. Muñoz et al. (2017) “Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales” Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 20(2): 23-28.

- [77] Nisa Isneni (2015) “Efectos cytoprotective y antioxidante de extractos de fruta etanolica del dragón rojo (*Hylocereus polyrhizus*) y zanahoria(*Daucus Carota* L.)” [Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias].Universidad Gadjah Mada. Indonesia
- [78]. Ochoa et al (2012) “Características antioxidantes, fisicoquímicas y microbiológicas de jugo fermentado y sin fermentar de tres variedades de pitahaya (*Hylocereus* spp)”. Scientia Agropecuaria, ISSN-e 2077-9917, Vol. 3, N°. 4, 2012, págs. 279-289.
- [79]. GEIGY D. “Tablas Científicas.” Ed. Sadagcolor. 7 Ed. Barcelona 1975
- [80]. Muñoz et al. (2007) “Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios” Revista de sociedad química del Perú 73(3):142-149.
- [81] Wee et al. (2011) “Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits” Pelagia Research Library 2(3): 418-425..
- [82]. Elfi et al .(2012) “Phytochemical screening and analysis polyphenolic antioxidant activity of methanolic extract of white dragon fruit (*Hylocereus undatus*)” Indonesian J. Pharm. 23(1): 60-64.
- [83] Chemah et al (2010) “Determination of pitaya seedes as a natural antioxidant and source of essential fatty acids” International Food Research Journal 17: 1003-1010..
- [84]. Apak et al. (2007) “Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay” Molecules 12(7): 1496-1547
- [85]. Niki et al. (2000) “Evaluation of Antioxidant Capacity. What Capacity is Being Measured by Which Method ” IUBMB Life 50: 323–329.
- [86]. Apak et al. (2004) “A Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols, Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method” J. Agric. Food Chem. 52: 7970–7981
- [87]. Apak et al. (2005) “Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper(II)-Neocuproine as Chromogenic Oxidant: The CUPRAC Method” Free Radic. Res. 39: 949–961

[88]. Jimenez et al (2008) “High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts in vitro” Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(10): 3470–3477

[89]. Li et al. (2008) “Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods” Journal of Food and Drug Analysis 16(6):98-104.

[90]. Wootton et al (2011) “Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods” Food Research International 44: 217-224.

[91]. Flores et al. (2016) “Perfil fitoquímico y actividad antioxidante de extractos de pitahaya *Hylocereus undatus*.” Verano de la investigación científica. 2(1):29-33

[92]. Juan Ramírez (2006) “Liofilización de alimentos revista ReCiTeIA 6 (2) 1-39

[93]. Revista cactaceae Syt. Init 17:28,2003

ANEXO I

Muestras de Pitahaya amarilla y Pitahaya roja



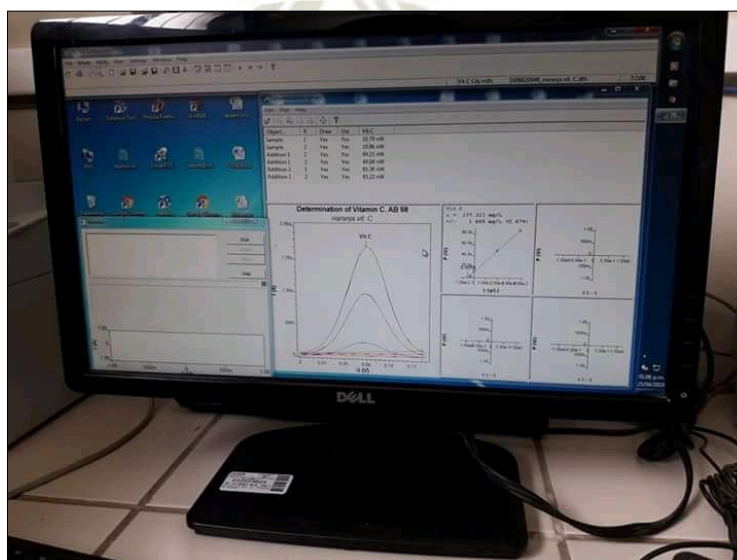
ANEXO II

Muestras en el Liofilizador



ANEXO III

Preparación del Buffer y determinación del Ácido Ascórbico por Voltamperometría



ANEXO IV

Reactivos para la Identificación de metabolitos secundarios en la P.A y P.R



ANEXO V

Constancia de identificación del espécimen vegetal “*Hylocereus megalanthus*”



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



CONSTANCIA 07- 2018-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas de frutos y tallos de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Hylocereus megalanthus* de la familia Cactaceae de nombre común “pitahaya amarilla”. Dichas muestras fueron obtenidas de zonas de cultivo del distrito de Churuja, provincia de Bongara, departamento de Amazonas por DANITZA HUAMANI MORA Y PAMELA PAUCAR CAPIA para la ejecución de la Tesis: PERFIL FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DEL MESOCARPIO DE *Hylocereus megalanthus* (PITAHAYA AMARILLA) AREQUIPA-2018. de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la universidad católica Santa María.

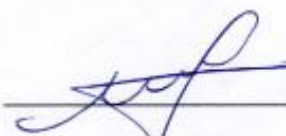
Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
 CLASE: MAGNOLIOPSIDA
 SUBCLASE: CARYOPHYLLIDAE
 ORDEN: CARYOPHYLLALES
 FAMILIA: Cactaceae
 GENERO: Hylocereus
 ESPECIE: *Hylocereus megalanthus* (K.Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime por conveniente.

Arequipa 2 de Abril del 2018




 Blgo. Leoncio Mariño Herrera
 DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

ANEXO VI

Constancia de identificación del espécimen vegetal “*Hylocereus undatus*”



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



CONSTANCIA 09- 2018-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas de frutos y tallos de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Hylocereus undatus* de la familia Cactaceae de nombre común “pitahaya roja”. Dichas muestras fueron obtenidas de zonas de cultivo del distrito de Churuja, provincia de Bongara, departamento de Amazonas por DANITZA HUAMANI MORA Y PAMELA PAUCAR CAPIA para la ejecución de la Tesis: PERFIL FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIÓXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DEL MESOCARPIO DE *Hylocereus megalanthus* (PITAHAYA AMARILLA) e *Hylocereus undatus* (PITAHAYA ROJA) AREQUIPA-2018, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María.

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
 CLASE: MAGNOLIOPSIDA
 SUBCLASE: CARYOPHYLLIDAE
 ORDEN: CARYOPHYLLALES
 FAMILIA: Cactaceae
 GENERO: Hylocereus
 ESPECIE: *Hylocereus undatus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime por conveniente.

Arequipa 8 de Abril del 2018


 Bigo. Leoncio Mariño Herrera
 DIRECTOR
 Herbarium Arequipense (HUSA)

ANEXO VII

Test F para el método CUPRAC

	PA	PR
Media	994.3330	1166
Varianza	4.333	4
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	1.083	
P ($F \leq f$) una cola	0.48	
Valor crítico para F (una cola)	19	

ANEXO VIII

Test F para el método ABTS

	PA	PR
Media	573.6660	1109
Varianza	0.333	3
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	0.111	
P ($F \leq f$) una cola	0.1	
Valor crítico para F (una cola)	0.052	

ANEXO IX

Test F para el método DPPH

	PA	PR
Media	794.6660	893
Varianza	380.3330	300
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	1.2677	
P ($F \leq f$) una cola	0.440	
Valor crítico para F (una cola)	19	

ANEXO X

Test F para el método FOLIN CIOCALTEAU

	PA	PR
Media	164.3330	205.6660
Varianza	212.3330	30.3330
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	7	
P (F<=f) una cola	0.125	
Valor crítico para F (una cola)	19	

ANEXO XI

Test F para el método de VOLTAMPEROMETRÍA

	PA	PR
Media	63.8266	159.3733
Varianza	7.7605	77.5462
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	0.1000	
P(F<=f) una cola	0.0909	
Valor crítico para F (una cola)	0.0526	

ANEXO XII

Test T para el método de VOLTAMPEROMETRÍA

	PR	PA
Media	159.3733	63.8266
Varianza	77.5462	7.7605
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-17.9177	
P(T<=t) una cola	0.0015	
Valor crítico de t (una cola)	4.6000	
P(T<=t) dos colas	0.0031	
Valor crítico de t (dos colas)	4.3026	

ANEXO XIII

Test T de FOLIN CIOCALTEU

	<i>PA</i>	<i>PR</i>
Media	164.3333	205.6666
Varianza	212.3333	30.3333
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-4.5957	
P(T<=t) una cola	0.0096	
Valor crítico de t (una cola)	4.6000	
P(T<=t) dos colas	0.0193	
Valor crítico de t (dos colas)	3.1824	

ANEXO XIV

Resumen de resultados

Determinación		Capacidad antioxidante			Compuestos fenólicos	Ácido ascórbico
Método		CUPRAC	DPPH	ABTS	Folin Ciocalteu	Voltamperometría
Unidades		mg/100g trolox	mg/100g trolox	mg/100g trolox	mg/100g ácido gálico	mg/100g
Pitahaya amarilla	Rep. 1	995	814	574	176	60.64
	Rep. 2	996	795	573	148	65.80
	Rep. 3	992	775	574	169	65.04
	x	994	795	574	164	63.82
	St.Dev.	2.08	19.50	0.58	14.57	2.78
	C.V.%	0.21	2.45	0.10	8.87	4.36
Pitahaya roja	Rep. 1	1168	883	1107	200	163.71
	Rep. 2	1166	883	1110	211	165.17
	Rep. 3	1164	913	1110	206	149.24
	x	1166	893	1109	206	159.37
	St.Dev.	2.00	17.32	1.73	5.51	8.80
	C.V.%	0.17	1.94	0.16	2.68	5.52

x: Promedio. St.Dev: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual

ANEXO XV

Análisis de Varianza de Pitahaya- Capacidad antioxidante

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Pitahaya método	225802	2	112901	978.91	0
B: Pitahaya variedad	324281	1	324281	2811.68	0
INTERACCIONES					
AB	164300	2	82150.1	712.28	0
RESIDUOS	1384	12	115.333		
TOTAL	715767	17			

ANEXO XVI

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Pitahaya – Capacidad antioxidante

			Error	Límite	Límite
Nivel	Casos	Media	Est.	Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	18	921.778			
Pitahaya-método					
ABTS	6	841.333	4.3843	831.781	850.886
CUPRAC	6	1080.17	4.3843	1070.61	1089.72
DPPH	6	843.833	4.3843	834.281	853.386
Pitahaya-variedad					
P. amarilla	9	787.556	3.5797	779.756	795.355
P. roja	9	1056	3.5797	1048.2	1063.8
Método-Variedad					
ABTS - P.A	3	573.667	6.2003	560.157	587.176
ABTS - P.R	3	1109	6.2003	1095.49	1122.51
CUPRAC - P.A	3	994.333	6.2003	980.824	1007.84
CUPRAC - P.R	3	1166	6.2003	1152.49	1179.51
DPPH - P.A	3	794.667	6.2003	781.157	808.176
DPPH - P.R	3	893	6.2003	879.491	906.509

ANEXO XVII

Preparación de buffer acetato de sodio

Se preparó 1 L de buffer acetato de sodio 0.1M a pH 4.64 mediante los cálculos descritos a continuación:

$$pH = pka + \log \left(\frac{S}{A} \right)$$

$$4.64 = 4.7 + \log \left(\frac{S}{A} \right)$$

$$\left(\frac{S}{A} \right) = 0.79$$

$$0.79 X + 1 X = 0.1 M$$

$$X = 0.0559 M$$

$$\left(\frac{S}{A} \right) = \frac{0.79(0.0559)}{1(0.0559)} = \frac{0.0442 M}{0.0559 M} \quad CH_3-COONa / CH_3-COOH$$

Acetato de sodio

$$0.0442 \text{ mol} * 82.05 \frac{g}{mol} * 1 L = 3.6266 g \quad CH_3-COONa$$

Hidróxido de sodio

$$82.05 \frac{g}{mol} CH_3-COONa \longrightarrow 40 \frac{g}{mol} NaOH$$

$$3.6266 g \quad CH_3-COONa \longrightarrow X$$

$$X = 1.7680 g NaOH$$

Ácido acético

$$82.05 \frac{g}{mol} CH_3-COONa \longrightarrow 60.05 \frac{g}{mol} CH_3-COOH$$

$$3.6266 g \quad CH_3-COONa \longrightarrow X,$$

$$X = 2.6542 g \text{ de } CH_3-COOH$$

$$2.6542 g \text{ de } CH_3-COOH * 1.05 \frac{g}{mL} = 2.5278 mL$$

Ácido acético

$$0.0559 \text{ mol} * 60.05 \frac{g}{mol} * 1 L = 3.3568 g \text{ de } CH_3-COOH$$

$$3.3568 g \text{ de } CH_3-COOH * 1.05 \frac{g}{mL} = 3.1968 mL \text{ de } CH_3-COOH$$