

Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas**

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES
ESPECIES DE LA FAMILIA *PASSIFLORA* *IN VITRO*, MEDIANTE MÉTODO
CUPRAC Y DPPH, SEGÚN SU ESTADÍO DE MADUREZ, AREQUIPA 2017.**

Tesis presentada por los bachilleres:

Parisaca Soto, Aaron Joel

Quispe Quispe, Gina Vanessa

Para optar por el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesor:

Mg. Paredes Fuentes, Julitza

Arequipa – Perú

2019

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

Expediente N°. 20170000049470

N° Trámite en Fac. 1735-2017
Fecha 07-11-2017

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

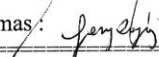
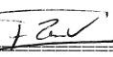
DE: **PARISACA SOTO, Aaron Joel**
QUISPE QUISPE, Gina Vanessa

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ENTRE *Passiflora ligularis* (granadilla), *Passiflora tripartita* (tumbo) Y *Passiflora edulis* (maracuyá) in vitro, MEDIANTE METODOS CUPRAC Y DPPH, SEGÚN SU ESTADIO DE MADUREZ. AREQUIPA 2017"

DICTAMINADORES: 1) **Dra. Yenny López Valencia** 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: **"ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES ESPECIES DE LA FAMILIA *Passiflora* in vitro, MEDIANTE LOS METODOS CUPRAC Y DPPH, SEGÚN SU ESTADIO DE MADUREZ. AREQUIPA 2017"**, 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 20-11-17

ASESOR: Mgter. Julitza Paredes Fuentes

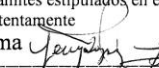
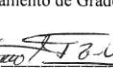
DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesora en el presente Trabajo de Investigación, cumulo con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.
Atentamente

Firma  Fecha 14/11/18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) **Dra. Yenny López Valencia** 3) **Q. F. Fernando Torres Vela**
2) **Dra. Jesús Zambrano Salas**

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 los 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 29-11-2018

JURADOS: Presidente **Dra. Yenny López Valencia**
Vocal **Dra. Jesús Zambrano Salas**
Secretario **Q. F. Fernando Torres Vela**

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 9/11/19 Hora: 19.00 Local: C- 402 (SUM)

DECANO

Dedicatoria:

A nuestras princesas, las que nos cuidan cada una desde su reino, nuestra Angel Gabrielle desde su castillo en las nubes y nuestra Pierina Emilia en su fortaleza en nuestros brazos.



Agradecimientos

Agradecemos primero a Dios por las oportunidades que nos brinda para ser cada vez mejores personas y profesionales.

Agradecemos a nuestros padres, hermanos y sobrinos, por el apoyo incondicional en el transcurso de todos estos años, en especial durante el tiempo que desarrollamos esta investigación.

Agradecemos a nuestra asesora Mgtr. Julitza Paredes Fuentes por brindarnos su apoyo, tiempo, paciencia y consejo durante la producción de este trabajo.

Agradecemos al Dr. José Villanueva Salas por su apoyo y consejo durante la realización de este proyecto.

Agradecemos a todo el personal de laboratorio que nos brindó apoyo con el material y reactivos además de consejos y apoyo moral durante el desarrollo de la investigación.

ÍNDICE

<i>Dedicatoria:</i>	ii
<i>Agradecimientos</i>	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN.....	xix
OBJETIVOS.....	xxi
OBJETIVO GENERAL	xxi
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xxi
HIPÓTESIS	xxii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 PASSIFLORACEAE.....	1
1.1.1 <i>Passiflora Ligularis</i> A. L. Juss	2
1.1.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	2
1.1.1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS.....	3
1.1.1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	4
1.1.1.4 VALOR NUTRICIONAL Y USOS	5
1.1.2 <i>Passiflora tripartita</i> (A.L Juss) Poir Var. <i>Mollissima</i> (HBK) Holm-Nielsen & <i>Jorgensen</i>	6
1.1.2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	6
1.1.2.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS.....	7
1.1.2.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	7
1.1.2.4 VALOR NUTRICIONAL Y USOS	8
1.1.3 <i>Passiflora edulis</i> Sims. <i>forma flavicarpa</i> Degener	9

1.1.3.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	9
1.1.3.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS.....	10
1.1.3.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	11
1.1.3.4 VALOR NUTRICIONAL Y USOS	12
1.2 RADICALES LIBRES, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES.....	13
1.2.1 RADICALES LIBRES.....	13
1.2.1.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO	14
1.2.1.2 ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO	15
1.2.2 ESTRÉS OXIDATIVO	16
1.2.2.1 DAÑO CAUSADO POR LOS RADICALES LIBRES.....	17
1.2.3 ANTIOXIDANTES.....	17
1.2.3.1 CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES	18
1.2.3.2 FUENTES EXÓGENAS DE ANTIOXIDANTES	19
1.3 COMPONENTES BIOACTIVOS CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL GENERO PASSIFLORA.....	20
1.3.1 VITAMINA C	20
1.3.2 VITAMINA E	21
1.3.3 FLAVONOIDES	22
1.3.4 GLICÓSIDOS	24
CAPÍTULO II.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1 LUGAR DE INVESTIGACION	26
2.2 MATERIALES.....	26
2.2.1 MATERIAL VEGETAL	26
2.2.2 REACTIVOS QUIMICOS	27
2.2.3 MATERIAL DE LABORATORIO	27
2.2.4 EQUIPOS	28

2.3 MÉTODOS.....	28
2.3.1 RECOLECCIÓN, SELECCION Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA	28
2.3.2 OBTENCIÓN DEL ZUMO.....	30
2.3.2.1 MÉTODO: EXTRACCIÓN POR EXPRESIÓN	31
2.3.2.2 FUNDAMENTO	31
2.3.2.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: PROCEDIMIENTO	31
2.3.3 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF).....	33
2.3.3.1 FUNDAMENTO	33
2.3.3.2 PROCEDIMIENTO.....	33
2.3.3.3 FACTOR DE RETENCIÓN	34
2.3.3.4 IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS	35
2.3.4 DETERMINACIÓN DE ESTADÍO DE MADUREZ	36
2.3.4.1 ÍNDICE DE SOLIDOS SOLUBLES	36
2.3.4.2 ÍNDICE DE ACIDEZ TOTAL TITULABLE.....	37
2.3.4.3 ÍNDICE DE MADUREZ.....	38
2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	38
2.3.5.1 MÉTODO CUPRAC (CAPACIDAD ANTIOXIDANTE REDUCTORA DE IONES CUPRICOS)	38
2.3.5.1.1 PROCEDIMIENTO	39
2.3.5.2 MÉTODO DPPH (ACTIVIDAD DE CAPTACION DE RADICALES LIBRES) 41	
2.3.5.2.1 PROCEDIMIENTO	42
CAPÍTULO III	44
RESULTADOS Y DISCUSION	44
3.1 RECOLECCIÓN Y OBTENCIÓN DEL ZUMO.....	44
3.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	50
3.2.1 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.....	50
3.2.2 IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS	52

3.2.3 IDENTIFICACIÓN DE FENOLES	53
3.3 DETERMINACIÓN DE ESTADÍO DE MADUREZ	55
3.3.1 ÍNDICE DE SOLIDOS SOLUBLES	55
3.3.2 ÍNDICE DE ACIDEZ TITULABLE.....	56
3.3.3 ÍNDICE DE MADUREZ	58
3.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	61
3.4.1 MÉTODO CUPRAC	61
3.4.1.1 ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	61
3.4.1.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	66
3.4.1.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL TUMBO SEGÚN CUPRAC	67
3.4.1.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA GRANADILLA SEGÚN CUPRAC ...	69
3.4.1.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL MARACUYA SEGÚN CUPRAC	72
3.4.1.6 COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ENTRE LAS TRES ESPECIES DE PASSIFLORA SEGÚN CUPRAC	75
3.4.2 MÉTODO DPPH.....	80
3.4.2.1 ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	80
3.4.2.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	84
3.4.2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL TUMBO SEGÚN DPPH.....	85
3.4.2.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA GRANADILLA SEGÚN DPPH	88
3.4.2.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL MARACUYA SEGÚN DPPH.....	90
3.4.2.6 COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ENTRE LAS TRES ESPECIES DE PASSIFLORA SEGÚN DPPH	93
CONCLUSIONES.....	99
SUGERENCIAS.....	101
Bibliografía.....	102
ANEXOS	112

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Passiflora Ligularis A. L. Juss "Granadilla"</i>	2
<i>Figura 2 Passiflora tripartita (A.L Juss) Poir Var. Mollissima (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen "Tumbo"</i>	6
<i>Figura 3 Passiflora edulis Sims. forma flavicarpa Degener "Maracuyá"</i>	10
<i>Figura 4 Estructura del ácido L-ascórbico (vitamina C) y reacción de oxidación en la que se convierte en dehidroascórbico. El conjunto ascórbico-dehidroascórbico constituye un par redox</i>	21
<i>Figura 5 Estructura química de los posibles estereoisómeros de tocoferol que componen la vitamina E natural. La presencia de los grupos -CH₃, o -H en el anillo cromano definen que estas sustancias sean α, β, γ, o δ.</i>	22
<i>Figura 6 Flavonoides. Estructura básica y tipos.</i>	23
<i>Figura 7 Estructura química de los flavonoides C-glicósidos</i>	25
<i>Figura 8 Muestras de Passiflora Ligularis A. L. Juss "granadilla"</i>	29
<i>Figura 9 Muestras de Passiflora tripartita (A.L Juss) Poir Var. Mollissima (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen "tumbo"</i>	29
<i>Figura 10 Muestras de Passiflora edulis Sims. forma flavicarpa Degener "maracuyá"</i>	30
<i>Figura 11 Extracción del zumo de cada muestra</i>	32
<i>Figura 12 Filtrado de las muestras</i>	32
<i>Figura 13 Determinación de sólidos solubles</i>	37
<i>Figura 14 reacción entre CUPRAC y el cromóforo: bis (neocuproine) Catión de quelato de cobre (I) (los protones liberados en la reacción se neutralizan por el tampón NH₄Ac ..</i>	39
<i>Figura 15 Batería de tubos de la curva de calibración para el método CUPRAC</i>	40
<i>Figura 16 Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante</i>	42
<i>Figura 17 Batería de tubos de la curva de calibración para el método DPPH</i>	43

Figura 18 Comparación de % rendimiento entre las tres especies en diferentes estadios de maduración	50
<i>Figura 19</i> Placa cromatográfica para determinación de Flavonoides.	50
<i>Figura 20</i> Placa cromatográfica para determinación de Terpenos.....	52
<i>Figura 21</i> Placa cromatográfica para identificación de Fenoles	53
<i>Figura 22</i> Determinación de índice de acidez titulable.....	58
Figura 23 Comparación de índice de maduración entre las tres especies estudiadas.....	60
<i>Figura 24</i> Curva calibración método CUPRAC	64
<i>Figura 25</i> Capacidad antioxidante de tumbo expresado en mM de ácido ascórbico	68
<i>Figura 26</i> Capacidad antioxidante de granadilla expresado en mM de ácido ascórbico	71
<i>Figura 27</i> Capacidad antioxidante de maracuyá expresado en mM de ácido ascórbico.....	73
Figura 28 Relación de capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico entre las tres especies según su estadio de madurez	79
<i>Figura 29</i> Curva de calibración método DPPH	83
Figura 30 Gráfica de %Inhibición de tumbo	86
<i>Figura 31</i> Gráfica de %Inhibición de granadilla.....	89
Figura 32 Gráfica de %Inhibición de maracuyá.....	91
Figura 33 Relación de % Inhibición equivalente a ácido ascórbico entre las tres especies según su estadio de madurez	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Passiflora ligularis</i> A. L. Juss.....	3
Tabla 2 Clasificación taxonómica <i>Passiflora tripartita</i> (A.L Juss) Poir Var. <i>Mollisima</i> (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen	6
Tabla 3 Clasificación taxonómica de <i>Passiflora edulis</i> Sims. forma <i>flavicarpa</i> Degener. ..	10
Tabla 4 Curva de calibración de método CUPRAC	40
Tabla 5 curva de calibración de método DPPH.....	43
Tabla 6 Pesos de frutos tumbo.....	45
Tabla 7 Pesos de frutos granadilla.....	46
Tabla 8 Pesos de frutos maracuyá	47
Tabla 9 Rendimiento de zumo de tumbo.....	48
Tabla 10 Rendimiento de zumo de granadilla	48
Tabla 11 Rendimiento de zumo de maracuyá	49
Tabla 12 Factores de retraso para flavonoides	52
Tabla 13 factores de retraso para terpenos	53
Tabla 14 factores de retraso para fenoles	54
Tabla 15 Intensidad de manchas cromatográficas	54
Tabla 16 Índice de sólidos solubles	56
Tabla 17 Índice de acidez titulable	57
Tabla 18 Índice de maduración	59
Tabla 19 Resultados de la Curva de Calibración, método CUPRAC.....	61
Tabla 20 Resumen del Modelo de regresión	62
Tabla 21 Resumen del ANOVA.....	62
Tabla 22 Coeficientes de Regresión	63

Tabla 23 Reactivos y sus cantidades para la evaluación antioxidante según el método CUPRAC	66
Tabla 24 Concentraciones según la ecuación de la recta.....	67
Tabla 25 Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico según el estado del tumbo	67
Tabla 26 Anova para la comparación de las Concentraciones de ácido Ascórbico	69
Tabla 27 Comparaciones específicas (Tukey) de las Concentraciones de ácido Ascórbico	69
Tabla 28 Concentraciones según la ecuación de la recta.....	70
Tabla 29 Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico según el estado de Granadilla	70
Tabla 30 Anova para la comparación de las Concentraciones de ácido Ascórbico	71
Tabla 31 Comparaciones específicas (Tukey) de las Concentraciones de ácido Ascórbico	72
Tabla 32 Concentraciones según la ecuación de la recta.....	72
Tabla 33 Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico según el estado del Maracuyá	73
Tabla 34 Anova para la comparación de las Concentraciones de ácido Ascórbico	74
Tabla 35 Comparaciones específicas (Tukey) de las Concentraciones de ácido Ascórbico	74
Tabla 36 Contrastes Multivariados.....	75
Tabla 37 Contrastes de esfericidad de Mauchly	76
Tabla 38 Efectos dentro de sujetos (o frutos para nuestro estudio).....	77
Tabla 39 ANOVA de dos factores para el método CUPRAC	78
Tabla 40 Test de Tukey de dos factores para el método CUPRAC	78
Tabla 41 Resultados de la Curva de Calibración, método DPPH	80

Tabla 42 Resumen del Modelo de regresión	81
Tabla 43 Resumen del ANOVA.....	81
Tabla 44 Coeficientes de Regresión	82
Tabla 45 Reactivos y sus cantidades para la evaluación antioxidante según el método DPPH.....	85
Tabla 46 Capacidad de captación de radicales equivalentes a ácido ascórbico según la ecuación de la recta.....	85
Tabla 47 Porcentaje de inhibición según el estadio del tumbo	86
Tabla 48 Anova para la comparación de los Porcentajes de Inhibición.....	87
Tabla 49 Comparaciones específicas (Tukey) de los Porcentajes de Inhibición.....	87
Tabla 50 Capacidad de captación de radicales equivalentes a ácido ascórbico según la ecuación de la recta.....	88
Tabla 51 Porcentajes de inhibición según la el estadio de desarrollo Granadilla.....	88
Tabla 52 Anova para la comparación de los Porcentajes de Inhibición.....	90
Tabla 53 Comparaciones específicas (Tukey) de los Porcentajes de inhibición.....	90
Tabla 54 Capacidad de captación de radicales equivalentes a ácido ascórbico según la ecuación de la recta.....	91
Tabla 55 Porcentajes de Inhibición según el estadio de desarrollo para el Maracuyá	91
Tabla 56 Anova para la comparación de los Porcentajes de inhibición	92
Tabla 57 Comparaciones específicas (Tukey) de los Porcentajes de inhibición.....	92
Tabla 58 Contrastes Multivariados.....	93
Tabla 59 Contrastes de esfericidad de Maulchy	94
Tabla 60 Efectos dentro de sujetos (o frutos para nuestro estudio).....	94
Tabla 61 ANOVA de dos factores para el método DPPH.....	96
Tabla 62 Test de Tukey de dos factores para el método dpvh	96

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la capacidad antioxidante de tres especies del género Passifloraceae procedentes de las ciudades de Madre de Dios en el caso de granadilla y maracuyá, y de Arequipa en el caso de tumbo, comercializados en el mercado mayorista “la parada” ubicada en la ciudad de Arequipa de la provincia Arequipa siendo, *Passiflora Ligularis* A. L. Juss “granadilla”, *Passiflora tripartita* (A.L Juss) Poir Var. *Mollissima* (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen “tumbo” y *Passiflora edulis* Sims. forma *flavicarpa* Degener “maracuyá”.

Se realizaron los ensayos con la finalidad de determinar primero el índice de maduración de dichas especies y se trabajó con los estadios de desarrollo, maduración y sobre maduración, para luego aplicar los respectivos ensayos con fin de determinar su capacidad antioxidante mediante los métodos CUPRAC y DPPH.

Se encontró que el índice de maduración para cada fruta concordaba con los índices descritos en las diferentes bibliografías de las normas técnicas colombianas específicas de cada fruto, los valores se encuentran representados en la tabla 9 de sólidos solubles y tabla 10 de acidez titulable con los que se determinó el cálculo para hallar el índice de maduración representados en la tabla 11 de índice de maduración donde se demuestra que los frutos se encontraban en 3 estadios de maduración distintos para cada especie, siendo estos en desarrollo, madurez y sobre madurez.

Así mismo, se determinó que la capacidad antioxidante mediante el método CUPRAC expresada en mM de ácido ascórbico, presentaron los valores para tumbo de 4.002 mM $\pm$ 0.016 en estadio de desarrollo, 1.29 mM $\pm$ 0.013 en estadio de madurez y 0.938 mM $\pm$ 0.021 en estadio de sobre maduración; para granadilla 0.943 mM $\pm$ 0.013 en estadio de desarrollo, 1.2 mM $\pm$ 0.013 en estadio de madurez y 1.023 mM $\pm$ 0.021 en estadio de sobre maduración; finalmente para maracuyá 1.685 mM $\pm$ 0.018 para estadio de desarrollo, 2.555 mM $\pm$ 0.018 en estadio de maduración y 2.055 mM $\pm$ 0.018 en estadio de sobre maduración, realizándose los análisis estadísticos univariados para cada estadio y un estudio de dos variables para la comparación de datos globales de las tres especies comparando sus tres estadios de maduración con la capacidad antioxidante de cada muestra, donde se observó que el tumbo en estadio de desarrollo tenía mayor capacidad antioxidante que las otras dos especies estudiadas, sin embargo, no presenta diferencia estadística con maracuyá en estadios de maduración y sobre maduración, mientras que la granadilla tiene menor capacidad antioxidante que tumbo y maracuyá además de no presentar diferencia significativa entre la capacidad antioxidante en sus tres estadios de maduración.

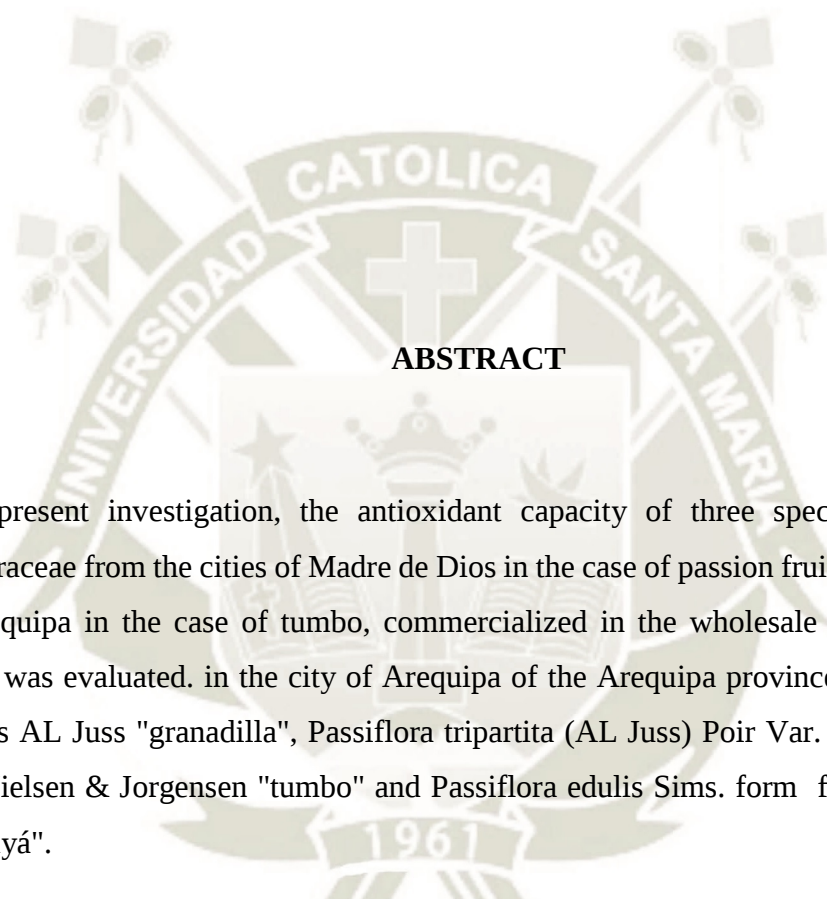
Se determinó también la capacidad de captación de radicales libres con el método DPPH expresando los resultados en % Inhibición para cada estadio de maduración, presentando resultados para tumbo de 88.52 % $\pm$ 0.776 en estadio de desarrollo, 71.02 % $\pm$ 0.779 para estadio de maduración y 72.82 % $\pm$ 0.490 para estadio de sobre maduración; para granadilla 43.86 % $\pm$ 0.822 en estadio de desarrollo, 46.61 % $\pm$ 0.245 en estadio de maduración y 44.98 % $\pm$ 0.374 para el estadio de sobre maduración; finalmente para maracuyá 52.60 % $\pm$ 0.450 para su estadio de desarrollo, 60.54 % $\pm$ 0.170 para su estadio de maduración y 46.61 % $\pm$ 0.245 para su estadio de sobre maduración, realizándose los análisis estadísticos univariados para cada estadio y un estudio de dos variables para la comparación de datos globales de las tres especies comparando sus tres estadios de maduración con la capacidad antioxidante de cada muestra, donde se observó que el tumbo en sus tres estadios de maduración presenta mayor capacidad captadora de radicales libres que los otros dos frutos estudiados, siendo el estadio de maduración en desarrollo el de mayor capacidad captadora, seguido de maracuyá como el segundo fruto con mayor capacidad captadora de radicales libres compartiendo junto con el fruto de granadilla la característica de tener mayor capacidad captadora de radicales libres en el estadio de maduración.

Todos los resultados obtenidos tanto en los análisis univariantes como en los análisis de dos variables, determinaron una diferencia significativa entre los datos de cada especie estudiada, indicando que en los análisis univariantes dependiendo de su estadio de maduración el tumbo presenta mayor capacidad antioxidante que granadilla y maracuyá, pero en el análisis de doble variable se determinó que no existe diferencia significativa entre tumbo y maracuyá comparando su capacidad antioxidante entre los tres estadios de maduración de cada especie más si existe diferencia con granadilla.

Los resultados obtenidos en relación con su capacidad captadora de radicales libres, indican que tumbo presenta una mayor capacidad captadora de radicales libres en comparación con las otras dos muestras estudiadas, tanto en los análisis univariantes como en los análisis de dos variables.

Debido a la variedad de datos obtenidos en esta investigación, se busca representar una gama de posibilidades para los diferentes usos en la industria farmacéutica, alimentaria y agroindustrial, así como develar la contribución que podría ofrecer el consumo de estos frutos en la dieta diaria.

Palabras clave: Capacidad antioxidante, capacidad captadora de radicales libres, CUPRAC, DPPH, antioxidantes, ácido ascórbico, Passiflora, estrés oxidativo.



ABSTRACT

In the present investigation, the antioxidant capacity of three species of the genus *Passifloraceae* from the cities of Madre de Dios in the case of passion fruit and passion fruit, and Arequipa in the case of tumbo, commercialized in the wholesale market "the stop" located, was evaluated. in the city of Arequipa of the Arequipa province being, *Passiflora Ligularis* AL Juss "granadilla", *Passiflora tripartita* (AL Juss) Poir Var. *Mollissima* (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen "tumbo" and *Passiflora edulis* Sims. form *flavicarpa* Degener "maracuyá".

The tests were carried out in order to determine first the maturation index of these species and worked with the stages of development, maturation and over maturation, to then apply the respective tests in order to determine their antioxidant capacity through the methods CUPRAC and DPPH.

It was found that the ripening index for each fruit was consistent with the indices described in the different bibliographies of the Colombian specific technical norms of each fruit, the values are represented in table 9 of soluble solids and table 10 of titratable acidity with which the calculation was determined to find the ripening index represented in table 11 of ripening index where it is demonstrated that the fruits were in 3 stages of maturation different for each species, being these in development, maturity and over maturity.

Likewise, it was determined that the antioxidant capacity by means of the CUPRAC method expressed in mM of ascorbic acid, presented the values for tumbo of 4.002 mM + - 0.016 in stage of development, 1.29 mM + - 0.013 in stage of maturity and 0.938 mM + - 0.021 in stage of over maturation; for granadilla 0.943 mM + - 0.013 in stage of development, 1.2 mM + - 0.013 in stage of maturity and 1.023 mM + - 0.021 in stage of over maturation; finally for passion fruit 1,685 mM + - 0.018 for stage of development, 2,555 mM + - 0.018 in stage of maturation and 2,055 mM + - 0.018 in stage of over maturation, performing the univariate statistical analyzes for each stage and a study of two variables for the Comparison of global data of the three species comparing their three stages of maturation with the antioxidant capacity of each sample, where it was observed that the tumbo in stage of development had greater antioxidant capacity than the other two species studied, however, does not present statistical difference with passion fruit in stages of maturation and over maturation, while passion fruit has less antioxidant capacity than tumbo and passion fruit, in addition to not presenting significant difference between the antioxidant capacity in its three stages of maturation.

The free radical uptake capacity was also determined with the DPPH method, expressing the results in% Inhibition for each stage of maturation, presenting results for 88.52% + - 0.776 tumbo in development stage, 71.02% + - 0.779 for maturation stage and 72.82% + - 0.490 for over maturity stage; for granadilla 43.86% + - 0.822 in stage of development, 46.61% + - 0.245 in stage of maturation and 44.98% + - 0.374 for the stage of over maturation; finally for passion fruit 52.60% + - 0.450 for its stage of development, 60.54% + - 0.170 for its stage of maturity and 46.61% + - 0.245 for its stage of over maturation, performing the univariate statistical analyzes for each stage and a study of two variables for the comparison of global data of the three species comparing their three stages of maturation with the antioxidant capacity of each sample, where it was observed that the tumbo in its three stages of maturation has higher capacity to capture free radicals than the other two fruits studied , being the stage of maturation in development the one of greater capacity capturing, followed of maracuyá like the second fruit with greater capacity capturing of free radicals sharing together with the fruit of granadilla the characteristic of having greater capacity capturing of free radicals in the stage of maturation.

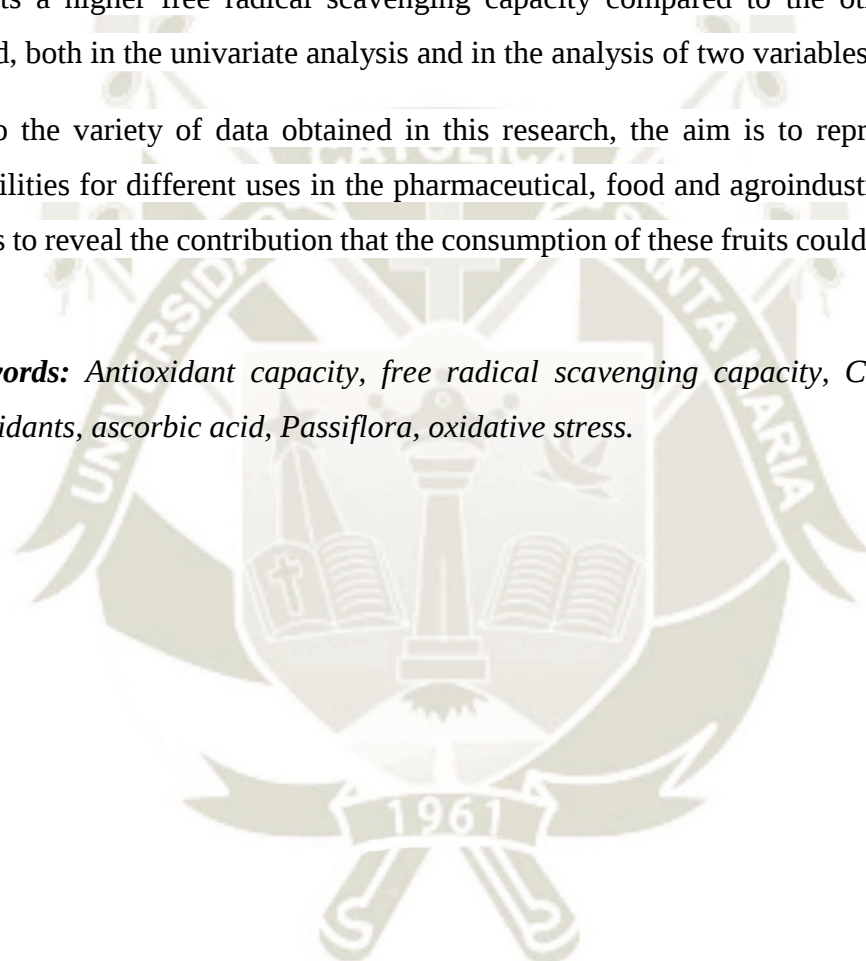
All the results obtained both in the univariate analysis and in the analysis of two variables, determined a significant difference between the data of each species studied, indicating that

in the univariable analyzes, depending on their maturity stage, the tumbo presents greater antioxidant capacity than granadilla and passion fruit, but in the double variable analysis it was determined that there is no significant difference between tumbo and passion fruit comparing its antioxidant capacity between the three stages of maturation of each species more if there is a difference with passion fruit.

The results obtained in relation to its free radical scavenging capacity indicate that tumbo presents a higher free radical scavenging capacity compared to the other two samples studied, both in the univariate analysis and in the analysis of two variables.

Due to the variety of data obtained in this research, the aim is to represent a range of possibilities for different uses in the pharmaceutical, food and agroindustrial industries, as well as to reveal the contribution that the consumption of these fruits could offer in the daily diet.

Key words: *Antioxidant capacity, free radical scavenging capacity, CUPRAC, DPPH, antioxidants, ascorbic acid, Passiflora, oxidative stress.*



INTRODUCCIÓN

La fitoterapia y la fitofarmacología están tomando con el paso de los años cada vez más importancia, previniendo el avance de condiciones adversas en el organismo y mejorando la calidad de vida de los consumidores (Acero de mesa, Linares Pinel, & Muñoz-Mingarro Martinez, 2007).

Esta investigación tiene como objetivo ampliar el conocimiento sobre las propiedades de las especies del género *Passiflora* de esta región, con la finalidad de contribuir a la proliferación de investigaciones de este tipo con repercusión en sus funciones medicinales, cosméticas e industriales.

Desde inicios de siglo, nunca antes hubo una generación con tal fenómeno de riesgo al estrés oxidativo como en la actualidad, debido en su mayoría al cambio radical del estilo de vida (Ramos, Batista, Gomez, & Zamora, 2006) estando expuestos a factores ambientales nocivos, el contacto a toxinas, sobre medicación farmacológica y el cambio en los hábitos alimenticios que cada vez va deteriorando la calidad de los productos y por tanto la salud de la población (Landete, 2013).

Debido a esto, una caterva de estudios epidemiológicos han establecido una correlación inversa entre la ingesta de frutas y verduras y la mortalidad (Rojano, Zapata, & Cortes, 2012) exponiendo la falta de componentes bioactivos que combatan el aumento de radicales libres en nuestro organismo las que provocan varias enfermedades, por lo que los estudios de capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* han tomado mayor relevancia a lo largo del siglo desarrollando cada vez más técnicas que ayuden incrementando información sobre los productos naturales que cada año varían en su composición biológica adaptándose a las nuevas condiciones climáticas (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Las especies del género *Passiflora* han sido ampliamente estudiadas en todo el mundo, debido a que son plantas endémicas pueden crecer en todo tipo de suelo encontrándoseles en todo el mundo por este motivo (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010) teniendo varias investigaciones respecto a su capacidad antioxidante mediante varios métodos, teniendo una variedad entre datos en relación con los lugares donde fueron estudiadas, aquí en Perú se conocen al menos 91 especies de este género y más de 31 taxones endémicos, que representan una variedad de componentes activos distintos entre sí (Esquerre, Rojas, Llatas,

& Delgado, 2014), por ello nació la idea de comparar la capacidad antioxidante de tres de las especies más comercializadas en la ciudad de Arequipa.



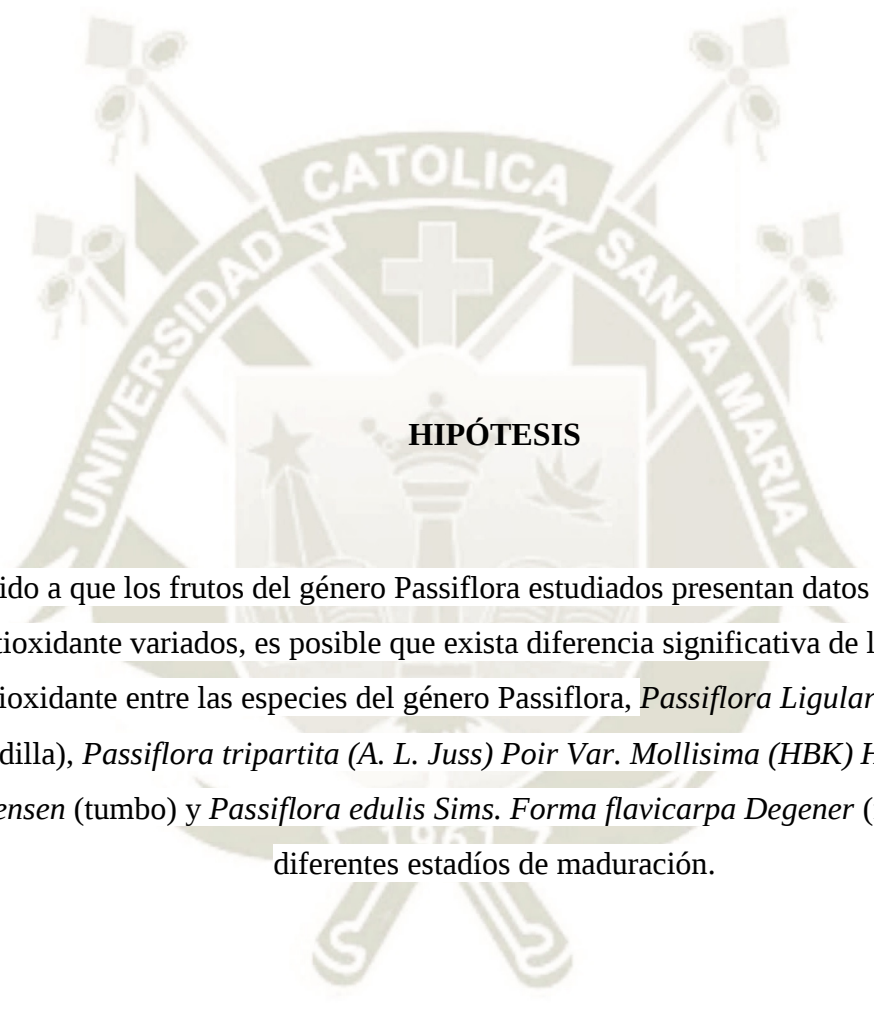
OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Comparar la capacidad antioxidante *in vitro* entre tres frutos de la familia *Passifloraceae* en diferentes estadios de madurez mediante los métodos CUPRAC y DPPH.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar valores de índice de maduración de los tres frutos estudiados de la familia *Passifloraceae*.
- Definir los principales grupos de metabolitos secundarios de forma cualitativa mediante cromatografía en capa fina de tres frutos de la familia *Passifloraceae*.
- Evaluar y comparar la capacidad antioxidante *in vitro* entre tres frutos de la familia *Passifloraceae* en diferentes estadios de maduración mediante el método CUPRAC.
- Evaluar y comparar la capacidad antioxidante *in vitro* entre tres frutos de la familia *Passifloraceae* en diferentes estadios de maduración mediante el método DPPH.



HIPÓTESIS

Debido a que los frutos del género *Passiflora* estudiados presentan datos de capacidad antioxidante variados, es posible que exista diferencia significativa de la capacidad antioxidante entre las especies del género *Passiflora*, *Passiflora Ligularis* A. L. Juss (granadilla), *Passiflora tripartita* (A. L. Juss) Poir Var. *Mollissima* (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen (tumbo) y *Passiflora edulis* Sims. *Forma flavicarpa* Degener (maracuyá), en diferentes estadios de maduración.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 PASSIFLORACEAE

La familia *Passifloraceae*, comprende más de 600 especies correspondientes a 18 géneros, dentro de la cual se encuentra el género *Passiflora* que se subdivide en 22 subgéneros, contando con 400 especies, de las cuales 360 son nativas de América y 40 de África, el género *Passiflora* se considera endémico en el nuevo mundo (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010), encontrándose distribuida en zonas pan tropicales, con unas pocas especies en el sur de China y Nueva Zelanda (Feuillet & MacDougal, 2007).

En el Perú, se puede encontrar al menos 91 especies y 1 híbrido natural, además de 31 taxones endémicos (Esquerre, Rojas, Llatas, & Delgado, 2014), la familia está dividida en dos tribus, las Paropsieae principalmente africanas y arborescentes y las *Passifloraceae* principalmente americanas (Alvarado, 2007), el género *Passiflora*, distribuido en regiones tropicales y subtropicales, puede encontrarse en regiones moderadamente cálidas y templadas entre 400 y 2000 m.s.n.m como también en altitudes de 3000 m.s.n.m. (Carvajal, y otros, 2011). Los frutos de la familia *Passifloraceae* han sido estudiados frecuentemente por su capacidad antioxidante, donde se observó una mayor actividad frente a frutos de otras familias (Marroquín, Cruz, & Cáceres, 2012). Muchas de las especies de este género, son utilizados en la medicina popular tradicional de muchos países en diversos tratamientos

fitoterapéuticos, como en la ansiedad, insomnio, histeria, epilepsia, espasmos y dolor. (Carvajal, y otros, 2011).

Cuando los conquistadores llegaron a América, denominaron a las flores de este género “la flor de la pasión” ya que su estructura floral es curiosa, la corona policromada filamentosa simboliza la corona de espinas y las cinco llagas de cristo, mientras que los tres estilos semejan clavos y los estambres parecen los martillos que hundieron dichos clavos (Raisman & Gonzalez, 2013).

1.1.1 *Passiflora Ligularis* A. L. Juss

1.1.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica de *Passiflora Ligularis* A. L. Juss, según el director del Herbarium Arequipense (HUSA) se encuentra representada en la tabla 1 y se puede observar una muestra gráfica del espécimen en la figura 1.



Figura 1 *Passiflora Ligularis* A. L. Juss "Granadilla"

Fuente: (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010). *Passifloraceae* passifloras Maracuyá, Granadilla, Curuba, Gulupa

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Passiflora ligularis* A. L. Juss.

DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Rosidae
ORDEN	Malpighiales
FAMILIA	<i>Passifloraceae</i>
GENERO	<i>Passiflora</i>
ESPECIE	<i>Passiflora ligularis</i> A. L. Juss

FUENTE: Elaboración propia

1.1.1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS

Passiflora ligularis Juss, conocida como “granadilla”, originaria de América tropical (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010), puede ser cultivada en altitudes desde 1700 m.s.n.m y 2600 m.s.n.m, entre las temperaturas de 15 a 18 °C, con precipitaciones anuales entre 2000 y 2500 mm, en suelos sueltos, aireados y ricos en materia orgánica con un pH entre 5,5 y 6,5 y humedad relativa entre 60 y 80%, pueden ser cultivadas durante todo el año (Carvajal, y otros, 2014) desde el norte de Argentina hasta México (Santos, Varon, & Salamanca, 2009) y cultivada principalmente para el consumo de su fruto (Santos, Varon, & Salamanca, 2009).

En el Perú ha sido reportada en los departamentos de Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Huánuco, Junín, Lambayeque, La Libertad, Madre de Dios, Loreto y Pasco (Esquerre, Rojas, Llatas, & Delgado, 2014) y es frecuentemente cultivada en los Andes por lo que en nuestro país así como en todos los países por donde cruza la cordillera de los Andes se encuentra en buen estado de conservación, sin riesgo de amenaza (Esquerre, Rojas, Llatas, & Delgado, 2014).

1.1.1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Raíz.- Raíces de consistencia fibrosa, fasciculadas, pivotantes y de escaso crecimiento, de la que derivan varias raíces secundarias y terciarias, se desarrolla entre 30 y 50 cm de profundidad (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Tallo.- Herbáceo y de consistencia leñosa, cilíndrica y variable, cumple la función de brindar soporte y almacenar agua, el tallo y las ramas presentan nudos cada 12 o 15 cm. Se encuentran 7 estructuras en el tallo: una hoja, dos brácteas, dos yemas florales al interior de las brácteas, una yema vegetativa y un zarcillo (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Hojas.- De color verde intenso, acorazonadas de borde liso, enteras, alternas, de color verde por el haz y un tono grisáceo con reflejos morados por el envés. Se insertan al tallo mediante el peciolo y hacen unión con las lígulas (Alvarado, 2007).

Flores.- Conocidas como “flor de la pasión”, exótica y atractiva de agradable aroma. Sépalos de color blanco en el haz y verdes con márgenes blancas por el envés, de forma lanceolada, con pétalos tubulares con franjas de color azul, púrpura y blanco, formando una corola en dos series de 43 pétalos en el interior y el exterior simulando una corona (Alvarado, 2007). Consta de 5 estambres unidos por la base, las antenas son planas, extensas y se unen hacia la mitad del filamento con dehiscencia longitudinal; los pistilos son de tres carpelos abiertos, unidos en un ovario unilocular, ovoide con numerosos óvulos, los estilos son aplanados y están divididos en tres ramas cada una con estigmas capitados que se alinean horizontalmente (Alvarado, 2007) (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Fruta.- Compuesta por el exocarpio (corteza dura), mesocarpio (corteza blanca y esponjosa), endocarpio (pulpa comestible), las semillas y el epicarpio que es una cubierta natural delgada de consistencia cerosa que protege la fruta de los cambios bruscos de temperatura. El exocarpio conformado por varias capas de células cortas y pared gruesa, le

da solidez y favorece el transporte de la fruta, el mesocarpio es blanco, esponjoso y seco, lo cual favorece el almacenamiento, el endocarpio, conformado por una fina membrana blanca, alberga un promedio de 200 a 250 semillas envueltas por un anillo grisáceo translucido (Alvarado, 2007), es mucilaginoso y acidulado (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010), las semillas son de color negro, planas, presentan pequeñas cavidades y testa de consistencia pétrea. (Alvarado, 2007) (Chaparro, Maldonado, Franco, & Urango, 2015)

1.1.1.4 VALOR NUTRICIONAL Y USOS

En general la planta de *Passiflora ligularis* puede utilizarse por sus diferentes efectos como analgésicos y sedantes, sin embargo nos centraremos en los usos de los frutos, sujetos de investigación en esta tesis, las que mayormente se usa contra afecciones gastrointestinales (Esquerre, Rojas, Llatas, & Delgado, 2014), pese a que el contenido fitoquímico de la fruta varía según su índice de madurez (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

La “granadilla”, gracias al sabor dulce y aroma agradable, se utilizan para diversos preparados de consumo como jugos, mermeladas, néctares, jarabes, jaleas, cocteles, helados entre otros (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010), además de utilizarse también por sus diferentes efectos farmacológicos al ser consumidos como tratamiento de la tos en neonatos, crecimiento de niños (como frotación en las articulaciones), antidiarreico en neonatos, regula la presión sanguínea, propiedades digestivas y diuréticas por lo que es recomendado para pacientes con cuadros de gastritis, úlceras gástricas y hernia distal, así como para niños y ancianos por su fácil digestión, contiene sustancias cicatrizantes, por ser rica en ácido ascórbico, ayuda a fortalecer el sistema inmunológico además de ser un activador del timo, por lo que se usa como tratamiento de la gripe y controla los síntomas de la resaca por ingesta de alcohol. (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010) (Carvajal, y otros, 2014).

1.1.2 *Passiflora tripartita* (A.L Juss) Poir Var. *Mollisima* (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen

1.1.2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica de *Passiflora tripartita* (A.L Juss) Poir Var. *Mollisima* (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen, según el director del Herbarium Arequipense se encuentra representada en la tabla 2 y se puede observar una muestra gráfica del espécimen en la figura 2.



Figura 2 *Passiflora tripartita* (A.L Juss) Poir Var. *Mollisima* (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen "Tumbo"

Fuente: (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010). *Passifloraceae* passifloras Maracuyá, Granadilla, Curuba, Gulupa

Tabla 2 Clasificación taxonómica *Passiflora tripartita* (A.L Juss) Poir Var. *Mollisima* (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen

DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Rosidae
ORDEN	Malpighiales
FAMILIA	<i>Passifloraceae</i>
GENERO	<i>Passiflora</i>
ESPECIE	<i>Passiflora tripartita</i> (A.L Juss) Poir Var. <i>Mollisima</i> (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen

FUENTE: Elaboración propia

1.1.2.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS

Passiflora tripartita (A.L. Juss) Poir Var. *Mollissima* (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen, especie originaria de la zona andina suramericana (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010), se halla presente a lo largo de la cordillera de los Andes desde Venezuela hasta Bolivia (Esquerre, Rojas, Llatas, & Delgado, 2014), a alturas entre 1800 y 3600 m.s.n.m en bosques tropicales altos, habiéndose naturalizado en Chile, México, Nueva Zelanda, Australia y los Estados Unidos de América (Simirgiotis, Schmeda, Bórquez, & Kennelly, 2013).

Crece a una altura de 6 metros, encontrándose en la orilla de los bosques y matorrales en lugares húmedos (Naturales, 2017) con temperaturas de 8 a 16 °C (Rojano, Zapata, & Cortes, 2012) y con una humedad relativa entre 70 y 75% (Chaparro, Maldonado, Franco, & Urango, 2015).

En el Perú se encuentra en los departamentos de Amazonas, Ancash, Apurímac, Cajamarca, Cusco, Junín, Huánuco, La Libertad, Lambayeque, Lima, Pasco, Piura, Puno y Tacna, siendo muy cultivada en los Andes, por lo que su población están en buen estado y no hay riesgo de amenaza (Esquerre, Rojas, Llatas, & Delgado, 2014).

1.1.2.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Raíz.- Fibrosa y ramificada con anclaje, con raíces primarias de escaso crecimiento, de las que emergen varias raíces secundarias (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Tallo.- Cilíndrico y de color verde, de joven presenta tricomas y a medida que se lignifica va tomando color marrón oscuro llegando hasta purpura. De consistencia leñosa o semileñosa, trepadora y con tendencia a ramificarse desde sus primeras etapas de crecimiento (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Hojas.- Trilobulada, tetra lobulada o penta lobulada, es decir, son polimórficas. Contienen tricomas en el haz y envés, son alternas, ovaladas u oblongas de textura membranosa a

coriácea y bordes ondulados, con estípulas reniformes, glandulado-aserradas. Los peciolos pueden ser largos o cortos; con 6-14 glándulas subsésiles o elongadas, frecuentemente muy pequeñas. El tamaño de las hojas oscila entre 7 y 10 cm de longitud y 3 a 6 cm de ancho (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Los zarcillos son hojas modificadas, en forma de espiral, que emergen de las axilas de las hojas y son fundamentales para que la planta pueda adherirse a elementos que encuentra a su alrededor (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010) (Alvarado, 2007).

Flores.- Son de color rosado a rosado intenso, oblongos, carinados rematando en una arista apical, son hermafroditas péndulas o erectas. La flor del tumbo está conformada por brácteas ovadas a lanceoladas, opérculo, hipantio conspicuo, de color verde a púrpura en el ápice y corola, la cual tiene una o dos hileras frecuentemente ligadas al margen del cáliz que presenta cinco sépalos de color rosado-magenta a purpúreos, de consistencia más gruesa hacia el centro y delgada a los lados, cinco pétalos reducidos a tubérculos de colores muy vistosos y llamativos parecidas a los sépalos para los polinizadores, y cinco estambres (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010) (Chaparro, Maldonado, Franco, & Urango, 2015).

Las anteras son grandes y dorsifijas oblongas de color amarillo por el abundante polen; los estigmas son de color rojizo en la base; el ovario es súpero (Alvarado, 2007).

Fruto.- Baya de forma oblongo-ovado a elipsoidal de color amarillo-naranja, al madurar expele aroma muy agradable. Presenta cáscara medianamente gruesa, el epicarpio es criáceo, el mesocarpo de color blanco y esponjoso, el arilo es transparente de color naranja, amarillo pálido o grisáceo que está sostenido por el funículo, posee abundantes semillas y sabor ácido. (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010) (Alvarado, 2007) (Chaparro, Maldonado, Franco, & Urango, 2015)

1.1.2.4 VALOR NUTRICIONAL Y USOS

Passiflora tripartita (A.L Juss) Poir Var. *Mollissima* (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen, conocida vulgarmente como “tumbo” en Perú, en Latinoamérica su cultivo comercial inició en los años 50 en el altiplano, donde sus características organolépticas la posicionan como

una de las mejores passifloras para el consumo (Primot, Coppens, Rioux, Ocampo, & Garcin, 2005).

América del Sur tiene una gran cantidad de frutas nativas y exóticas sub explotadas de gran interés para la tecnología de los alimentos, la ciencia y las aplicaciones industriales, con muchas propiedades nutricionales y funcionales que aún no se han descubierto (Garcia, y otros, 2017), siendo el “tumbo” una especie exótica muy apetecida por su exquisito sabor, aroma y excelente contenido vitamínico. (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010)

Este fruto contiene compuestos polifenólicos con alta capacidad reductora, con escaso conocimiento sobre sus beneficios para prevenir el cáncer color rectal (Chaparro, Maldonado, Urango, & Rojano, 2015), además representan una fuente vegetal con activos potenciales para ser usados como coadyuvante de los foto protectores solares (Inocente, Tomas, Huamán, Palomino, & Bonilla, 2014), atribuyéndosele la actividad biológica en una parte a su contenido de flavonoides C-glicosilados (Simirgiotis, Schmeda, Bórquez, & Kennelly, 2013).

Dentro de sus usos medicinales tenemos que se usa como tranquilizante, antiespasmódico, hipotensor y diurético, además de usarse como coadyuvante en el tratamiento de afecciones del hígado y riñones (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Se usa principalmente como producto comestible en diferentes formas, en refrescos, jugos, néctares, concentrados, licores, helados, productos de pastelería y confitería (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010), y ornamentalmente como cerco vivo (Esquerre, Rojas, Llatas, & Delgado, 2014).

Este fruto también se destaca una alta cantidad de humedad, moderadas calorías y carbohidratos, lo que la hace una fruta apta para personas que desean reducir de peso (Chaparro, Maldonado, Franco, & Urango, 2015).

1.1.3 *Passiflora edulis Sims. forma flavicarpa Degener*

1.1.3.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica de *Passiflora edulis* Sims. forma *flavicarpa* Degener, según el director del *Herbarium* Arequipense (HUSA) se encuentra representada en la tabla 3 y se puede observar una muestra gráfica del espécimen en la figura 3.



Figura 3 *Passiflora edulis* Sims. forma *flavicarpa* Degener "Maracuyá"

Fuente: (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010) *Passifloraceae* passifloras Maracuyá, Granadilla, Curuba, Gulupa.

Tabla 3 Clasificación taxonómica de *Passiflora edulis* Sims. forma *flavicarpa* Degener.

DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Rosidae
ORDEN	Malpighiales
FAMILIA	<i>Passifloraceae</i>
GENERO	<i>Passiflora</i>
ESPECIE	<i>Passiflora edulis</i> Sims. forma <i>flavicarpa</i> Degener

FUENTE: Elaboración propia

1.1.3.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS

Passiflora edulis Sims. forma *flavicarpa* Degener es una especie cultivada ampliamente en países tropicales y subtropicales (Rojas & Tomás, 2010), actualmente es cultivada para

comercio en Kenia, Sud África, Australia, Colombia, Venezuela, Estados Unidos, Japón y Brasil (Ganaderia, 2017) siendo este más raro en Asia, Australia y África Tropical (Kanu, Okorie, Uche, & Awa, 2017). Fue en Brasil donde se domesticó, cultivo e industrializo (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010), siendo introducida a otros países durante el siglo XIX (Piura, Maradiaga, Palacios, Ponce, & Medina, 2014).

En el Perú se le puede encontrar en los departamentos de Amazonas, Cajamarca, Cusco, Junín, La Libertad, Lambayeque, Loreto, Madre de Dios, Pasco y San Martín (Esquerre, Rojas, Llatas, & Delgado, 2014).

Existen dos variedades: *Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*, cuyos frutos son amarillos y crece desde el nivel del mar hasta los 1 000 m.s.n.m; y la *Passiflora edulis* Sims var. *Purpurea*, con frutos color púrpura y que se adapta a zonas altas por encima de 1 200 m.s.n.m (Rojas, y otros, 2012)

Se cultiva hasta un nivel de 1300 m.s.n.m, dando mayor rendimiento entre los 400 y 800 m.s.n.m (Ganaderia, 2017), desarrollándose en zonas de clima cálido entre temperaturas de 20 a 30 °C, con una precipitación anual de 1500 mm, en suelos sueltos y bien drenados de al menos un metro de profundidad (Prácticas, 2009) , con alto contenido de materia orgánica y pH entre 5,5 y 6,8 (Ganaderia, 2017).

1.1.3.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Passiflora edulis Sims. forma *flavicarpa* Degener es una planta trepadora, vigorosa, leñosa, perenne y con ramas que alcanzan los 20 metros de largo (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Tallo.- De color verde, acanalado en la parte superior, glabro y marrón al final del proceso de lignificación, con zarcillos axilares de mayor tamaño que las hojas enrolladas en forma espiral (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Hojas.- De color verde lustroso con peciolos glabros acanalados, con dos nectarios redondos en la base del foliolo. La lamina foliar es palmeada, con tres lóbulos sin divisiones en las áreas jóvenes. Presentan estipulas lineares subuladas y enteras, con brácteas de ovadas a oblongo-ovadas, aserradas y libres (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Flores.- Solitarias y axilares, erectas, hermafroditas, fragantes y vistosas. Poseen sépalos verdes en su parte abaxial, blancos en su parte adaxial, oblongos, con una quilla en la cara abaxial la misma que remata en una arista, glandulíferos y una corona de filamentos radiantes de color púrpura en la base y blanco en el ápice. Poseen cinco estambres y tres estigmas, además de pétalos blancos y oblongos y un hipanto inconspicuo (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Fruto.- Es una baya globosa u ovoide de color amarillo en estadio maduro, la pulpa es gelatinosa y contiene pequeñas semillas con arilo succulento, emana un aroma muy agradable y poseen un alto contenido de aceite de alto valor nutricional y fácil digestión. (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010) (Esquerre, Rojas, Llatas, & Delgado, 2014).

1.1.3.4 VALOR NUTRICIONAL Y USOS

Passiflora edulis Sims. forma flavicarpa Degener se usa de forma tradicional alrededor del mundo, considerando al fruto como un estimulante digestivo y utilizado también en el tratamiento de carcinoma gástrico, tumores intestinales, disentería e hipertensión, así mismo en el tratamiento del alivio de la constipación, relajante muscular, dolores estomacales, se usa para bajar la fiebre, como diurético (Villena, Arroyo, Cisneros, Espinoza, Varas, & Fernandez, 2013) , en ataques nerviosos (Rojas, y otros, 2012) y anticonvulsivo (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

Se consume como fruta fresca o en jugos; se utiliza para preparar néctares, yogurt, mermeladas, licores, helados, postres, salsas, así como en pastelería y confitería. El aceite de las semillas refinado también es utilizado en la alimentación humana, donde se compara

con el aceite del algodón en cuanto al valor nutritivo y fácil digestión. (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

En el ámbito industrial el aceite que se extrae de la semilla puede utilizarse para la fabricación de jabones, tintas, barnices, esencias y perfumes. (Perea Dallos, Fischer, & Miranda, 2010).

El fruto *Passiflora edulis* Sims. forma flavicarpa Degener es fuente de glicósidos, fenoles, carotenoides, L-ácido ascórbico, antocianinas, lactonas, aceites esenciales, aminoácidos, carbohidratos, minerales, enzimas y triterpenos. (Franco, Cartagena, Correa, Rojano, & Piedrahita, 2014).

1.2 RADICALES LIBRES, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

1.2.1 RADICALES LIBRES

Se definen como moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares, siendo los radicales que derivan del oxígeno las más representativas de las especies reactivas generadas en el organismo (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007), en toxicología se refieren a estos como radicales capaces de interactuar con componentes de tejidos (Kehrer & Klotz, 2015).

En 1954 se establece que las propiedades tóxicas del oxígeno se debe a las especies reactivas de oxígeno, poco tiempo después en 1956, se propuso que los radicales libres juegan un papel en el proceso de envejecimiento, desarrollándose una extensa investigación de los radicales libres en sistemas biológicos. En 1969 se descubre la enzima superóxido dismutasa (SOD), develando al fin evidencia consistente sobre la importancia del estudio de los radicales libres (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007).

Los radicales libres producidos controladamente por el organismo, permite la realización de algunos procesos fisiológicos como la fertilización del ovulo, la activación de genes y enzimas, la síntesis del colágeno, prostaglandinas y hormonas, además de la fagocitosis y lisis de membranas bacterianas. (Hernández, Licea, Hernández, Marcel, & Yanes, 2011).

Entre sus beneficios más importantes se encuentran la generación de ATP a partir de ADP en la mitocondria, la desintoxicación de xenobióticos, apoptosis de células dañadas o defectuosas, depuración de microorganismos y forman parte en la generación de prostaglandinas y leucotrienos (Mohammed, Mohammed, Mohammed, & Isam, 2015).

Muchos de los radicales libres pueden explicar la patología de algunos estados de toxicidad y enfermedades, sin embargo, es difícil de determinar su acción en trastornos específicos ya que pueden surgir después de eventos que causen lesiones, pudiendo no tener efecto, mejorar o agravar el daño final (Kehrer & Klotz, 2015).

El daño que causan los radicales libres ocurren en las proteínas, fosfolípidos poliinsaturados de la membrana celular, carbohidratos y ácidos nucleicos, provocando así varios cambios bioquímicos y fisiológicos al interior de la célula activando una reacción en cadena (Ramos, Batista, Gomez, & Zamora, 2006).

Los radicales libre forman especies reactivas, las cuales son las de oxígeno (ROS), hierro (RIS), cobre (RCS) y nitrógeno (RNS) (Ramos, Batista, Gomez, & Zamora, 2006), estas especies se producen de manera normal en el organismo debido a las reacciones de óxido-reducción (Hernández, Licea, Hernández, Marcel, & Yanes, 2011), como también por reacciones por procesos ligados a patologías y xenobióticos (Kehrer & Klotz, 2015).

1.2.1.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Son productos del proceso metabólico normal del organismo (Rojano, Zapata, & Cortes, 2012), por lo que no podemos referirnos a estas especies solo como agentes oxidantes (Kehrer & Klotz, 2015), ya que representan un papel importante en varios procesos de regulación y señalización intracelular como segundos mensajeros (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007), producidos además por la explosión oxidativa de los fagocitos o por el metabolismo de xenobióticos (Mohammed, Mohammed, Mohammed, & Isam, 2015), dentro de las especies reactivas de oxígeno más importantes tenemos:

- **Anión superóxido (O_2^-)**

Radical con una configuración di-radical con dos electrones desapareados, con una semivida relativamente larga (Gutowski & Kowalczyk, 2013) y liberada por procesos metabólicos o después de irradiación física (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007), se le considera una especie reactiva de oxígeno primaria, interactuando con otras moléculas para formar especies secundarias, siendo esta acción su efecto más tóxico (Gutowski & Kowalczyk, 2013).

- **Radical hidroxilo ($\cdot OH$)**

Formado a partir del radical superóxido en presencia de hierro, tiene una alta reactividad y una vida media muy corta (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007), reaccionando rápidamente con diferentes moléculas dentro de la célula como azúcares, aminoácidos, fosfolípidos y ácidos orgánicos (Gutowski & Kowalczyk, 2013).

- **Radicales peróxido ($RO_2\cdot$) y alcóxido ($RO\cdot$)**

Son la forma protonada de radical superóxido, tienen la tendencia a aceptar electrones y por lo tanto se reducen ellos mismos, deslocalizando su anillo de benceno, inician la peroxidación de ácidos grasos (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007).

- **Peroxido de hidrógeno (H_2O_2)**

Se forman a partir de dos radicales hidroxilos, es un agente oxidante y reductor débil, poco reactivo fisiológicamente pero capaz de inactivar varias enzimas, capaz de oxidar cetoácidos y de penetrar membranas. (Kehrer & Klotz, 2015).

1.2.1.2 ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO

Las especies reactivas de nitrógeno producidas en cantidades anormales, pueden producir estrés nitrosativo, estado en el que puede conducir a reacciones de nitrosilación que pueden

alterar estructuras de proteínas, inhibiendo su función normal (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007).

- **Óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)**

Es una molécula generada por óxido nítrico sintasas específicas, producto de la metabolización de arginina en citrulina, actúa como segundo mensajero en varios procesos fisiológicos y su toxicidad está relacionada con su capacidad de combinarse con aniones superóxido (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007).

- **Anión peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$)**

Producida por la unión de óxido nítrico y anión superóxido, es una molécula mucho más oxidativamente activa, actuando como un potente agente oxidante causando fragmentación del ADN y oxidación de lípidos (Gutowski & Kowalczyk, 2013).

1.2.2 ESTRÉS OXIDATIVO

Se define como el desequilibrio bioquímico provocado por la sobre producción de radicales libres y especies reactivas (Fina, 2010) o una alteración en el equilibrio pro oxidante-antioxidante a favor de pro oxidantes (Kehrer & Klotz, 2015).

En condiciones fisiológicas normales, el equilibrio dentro de la célula es controlado por los antioxidantes (Rojano, Zapata, & Cortes, 2012), sin embargo al desencadenarse el estrés oxidativo, provoca diversas afecciones patológicas crónicas como enfermedades cardiovasculares (Kehrer & Klotz, 2015), diabetes (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010), cáncer (oxidación de ácidos nucleicos) (San miguel & Martin gil, 2009), parkinson (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007), alzheimer (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007), entre otras.

1.2.2.1 DAÑO CAUSADO POR LOS RADICALES LIBRES

Estas afecciones se deben al hecho de que los radicales libres pueden causar daño reversible o irreversible a todo tipo de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc. (San miguel & Martin gil, 2009), lo cual se realiza mediante 4 mecanismos:

- a) **Oxidación proteica.**- Consiste en oxidar los grupos sulfhidrilo, metionina y cisteína, así anulan su actividad en el organismo (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007).
- b) **Oxidación de ácidos nucleicos.**- Alterando la secuencia de azúcares-fosfatos o las bases puricas o pirimidínicas desestabilizando la estructura (San miguel & Martin gil, 2009).
- c) **Peroxidación lipídica.**- Destruyendo la porción hidrofóbica de la membrana de los ácidos grasos poliinsaturados, afectando las funciones celulares a nivel de la membrana (Kehrer & Klotz, 2015).
- d) **A nivel de la matriz celular.**- Provocando la fragmentación de los polipeptidos proteoglicanos e impidiendo la formación de hélices de colágeno (San miguel & Martin gil, 2009).

1.2.3 ANTIOXIDANTES

Son moléculas estables con capacidad de donar electrones a radicales libres y neutralizarlos (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010) por lo que son capaces de disminuir o evitar el estrés oxidativo en las células, eliminando los intermediarios de radicales libres y otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos (Landete, 2013).

1.2.3.1 CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes se clasifican en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, los cuales forman parte de las tres líneas de defensa que el organismo tiene para proteger las células del estrés oxidativo (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007).

Enzimáticos.- Comprenden la primera línea de defensa, llamados también antioxidantes preventivos por evitar la formación de especies reactivas (Hernández, Licea, Hernández, Marcel, & Yanes, 2011), dentro de estas tenemos:

- a) **Súper oxido dismutasa.-** enzima que interactúa con Cu, Zn, Fe y Mn, para formar compuestos que catalizan especies reactivas dentro y fuera de las células (Ramos, Batista, Gomez, & Zamora, 2006).
- b) **Catalasa.-** Enzima que cataliza peróxido de hidrogeno convirtiéndolas en agua y oxígeno (Hernández, Licea, Hernández, Marcel, & Yanes, 2011).
- c) **Sistema glutatión.-** El sistema incluye, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y glutatión S.transferasa, sistema presente en animales, plantas y microorganismos y encargados de evitar el avance del estrés oxidativo (Hernández, Licea, Hernández, Marcel, & Yanes, 2011).

No enzimáticos.- Comprenden la segunda línea de defensa, eliminando las especies reactivas, suprimiendo el inicio de la cadena de reacciones de propagación de estrés oxidativo (Hernández, Licea, Hernández, Marcel, & Yanes, 2011), dentro de esta tenemos:

- a) **Ácido ascórbico.-** Antioxidante monosacárido imposible de sintetizar en humanos, por lo que debe ser obtenida mediante la dieta (Coronado, Vega, Gutierrez, Vazquez, & Radilla, 2015).
- b) **Glutati6n.-** No es necesaria en la alimentaci6n diaria, ya que es sintetizada por el organismo, es un péptido que contiene cisteína con un grupo tiol capaz de reducir especies reactivas (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010).
- c) **Melatonina.-** Es una hormona natural que puede atravesar la membrana celular y la barrera hematoencefalica, lo que la convierte en un potente antioxidante. (Hernández, Licea, Hernández, Marcel, & Yanes, 2011).
- d) **Tocoferoles y tocotrienoles.-** Son vitaminas liposolubles con propiedades antioxidantes, siendo el alfa tocoferol el más estudiado por su amplia biodisponibilidad (Hernández, Licea, Hernández, Marcel, & Yanes, 2011).
- e) **Ácido úrico.-** Representa la mitad de la capacidad antioxidante del plasma, otorgando propiedades antioxidantes similares a la vitamina C (Hernández, Licea, Hernández, Marcel, & Yanes, 2011).

La tercera línea de defensa son las enzimas proteolíticas, proteinasas, proteasas y peptidasas, que degradan y eliminan las proteínas modificadas oxidativamente y evitan la acumulaci6n de proteínas oxidadas (Hernández, Licea, Hernández, Marcel, & Yanes, 2011).

1.2.3.2 FUENTES EXÓGENAS DE ANTIOXIDANTES

Conocidos como antioxidantes dietéticos son de consumo cotidiano que pueden prevenir los efectos adversos de las especies reactivas (Coronado, Vega, Gutierrez, Vazquez, & Radilla,

2015), teniendo dentro de estas la vitamina C, la vitamina E, la vitamina A, fito estrógenos, polifenoles como los flavonoides, taninos, terpenos, quinonas entre otras (San miguel & Martin gil, 2009). La principal fuente de polifenoles son las frutas y vegetales, donde los polifenoles se presentan de forma conjugada con azúcares o ácidos grasos (Landete, 2013).

Los flavonoides son el grupo más ampliamente distribuido dentro de los polifenoles, debido a su estructura ideal donde han demostrado ser más efectivos como antioxidantes que la vitamina E y C *in vitro* sobre bases molares (Urquiaga & Leighton, 2000).

Algunas fuentes importantes de estos compuestos son las bayas, frutos secos, frutos cítricos, vinos y bebidas como té y mates (Landete, 2013), sin embargo, es importante la consulta médica y la correcta prescripción de una dieta balanceada ya que en dosis altas estos antioxidantes podrían actuar como pro oxidantes (Ramos, Batista, Gomez, & Zamora, 2006).

1.3 COMPONENTES BIOACTIVOS CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL GENERO PASSIFLORA

La capacidad antioxidante de los alimentos está determinado por la mezcla de diferentes compuestos activos con actividad antioxidante, con diferentes mecanismos de acción y actividad sinérgica, que en su mayoría son compuestos fenólicos con más de 8000 compuestos identificados y agrupados de acuerdo a su estructura química como ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas, ligninas y flavonoides, además de otros compuestos como vitaminas y minerales (Beserra Almeida, y otros, 2011).

1.3.1 VITAMINA C

La vitamina C o ácido ascórbico es considerada uno de los nutrientes naturales más importantes y además uno de los antioxidantes más potentes en nuestra dieta diaria (Beserra Almeida, y otros, 2011), sintetizada a partir de glucosa en todas las plantas (Acero de mesa, Linares Pinel, & Muñoz-Mingarro Martinez, 2007) es un antioxidante hidrófilo que puede existir en tres estados redox: Ascorbato, radical semidehidroascorbato y dehidroascorbato

(San miguel & Martin gil, 2009). En la figura 4 podemos observar la formación de ácido dehidroascórbico la cual es una reacción reversible (Acero de mesa, Linares Pinel, & Muñoz-Mingarro Martinez, 2007).

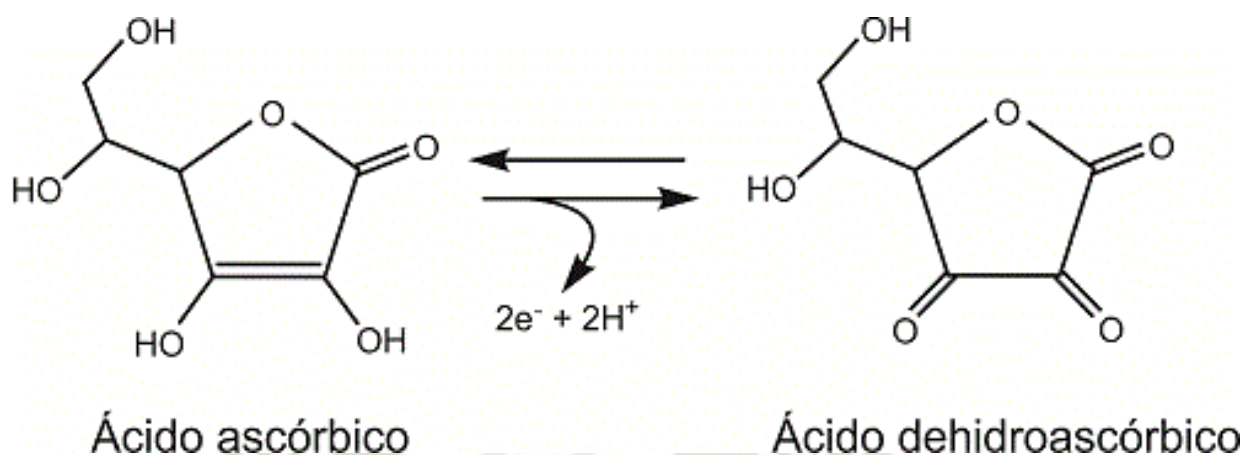


Figura 4 Estructura del ácido L-ascórbico (vitamina C) y reacción de oxidación en la que se convierte en dehidroascórbico. El conjunto ascórbico-dehidroascórbico constituye un par redox

Fuente: (Hevia, 2011). Vitamina C recuperado de <http://www.metabolismo.biz/web/vitamina-c/>

Es una vitamina monosacárido que se encuentra en una concentración muy elevada en muchos tejidos y plasma a pesar de no ser sintetizada por los humanos (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010). Reacciona con diferentes especies oxigenadas como el O_2^- , OH , H_2O_2 y ROO , actuando sinérgicamente con la vitamina E o el urato para regenerarse y volviendo a su estado activo (San miguel & Martin gil, 2009).

1.3.2 VITAMINA E

La vitamina E o alfa-tocoferol, biosintetizado en la vía del ácido siquimico (anillo aromático) y de la vía del metileritritol 4-fosfato (cola hidrofóbica) (Acero de mesa, Linares Pinel, & Muñoz-Mingarro Martinez, 2007), es considerado el principal antioxidante secuestrador de radicales lipofílicos in vivo (Landete, 2013), con 8 homólogos conocidos como se puede observar en la figura 5, d-alfa, d-beta, d-gamma y d-delta tocoferol y los correspondientes tocotrienoles (San miguel & Martin gil, 2009), siendo el d-alfa tocoferol

el de mayor actividad biológica con actividad antioxidante debido a su carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol, previniendo así el daño oxidativo a las membranas e impidiendo las reacciones de propagación (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010), además amortigua los efectos peroxidantes del ion superoxido, modula la cascada metabólica del ácido araquidónico y controla la fluidez de la membrana celular ordenando su estructura (San miguel & Martin gil, 2009).

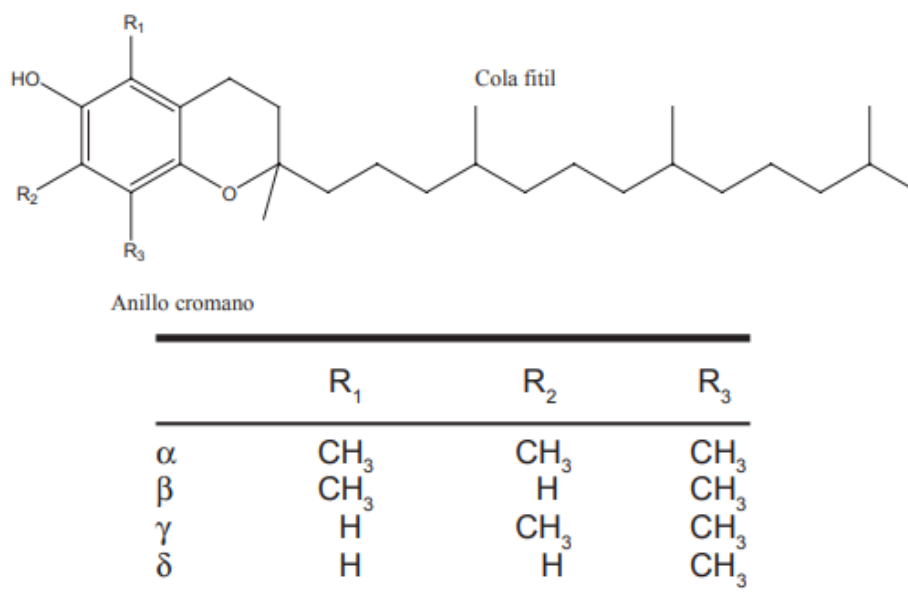


Figura 5 Estructura química de los posibles estereoisómeros de tocoferol que componen la vitamina E natural. La presencia de los grupos -CH₃, o -H en el anillo cromano definen que estas sustancias sean α, β, γ, o δ.

FUENTE: (Blé-Castillo, Díaz-Zagoyab, & Méndezc, 2008) Suplementación con vitamina E, ¿benéfica o dañina?

1.3.3 FLAVONOIDES

Los flavonoides son una de las clases más grandes de los compuestos fenólicos vegetales, biosintetizados a través de las vías del ácido siquímico y ácido malónico (Acero de mesa, Linares Pinel, & Muñoz-Mingarro Martinez, 2007) con una estructura básica que contiene 15 carbonos como se puede observar en la figura 6, dispuestos en dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos (Taiz, Zeiger, M. Møller, & Murphy, 2014). La

mayoría de los flavonoides se presentan en forma de glucósidos y se hallan presentes en todas partes de las plantas, siendo las flavonas las más ampliamente distribuidas y las isoflavonas más restringidas (Lock de Ugaz, 2001).

Su estructura es ideal para la eliminación de radicales libres y han demostrado ser más efectivos como antioxidantes que la vitamina C y vitamina E *in vitro* sobre bases molares (Urquiaga & Leighton, 2000).

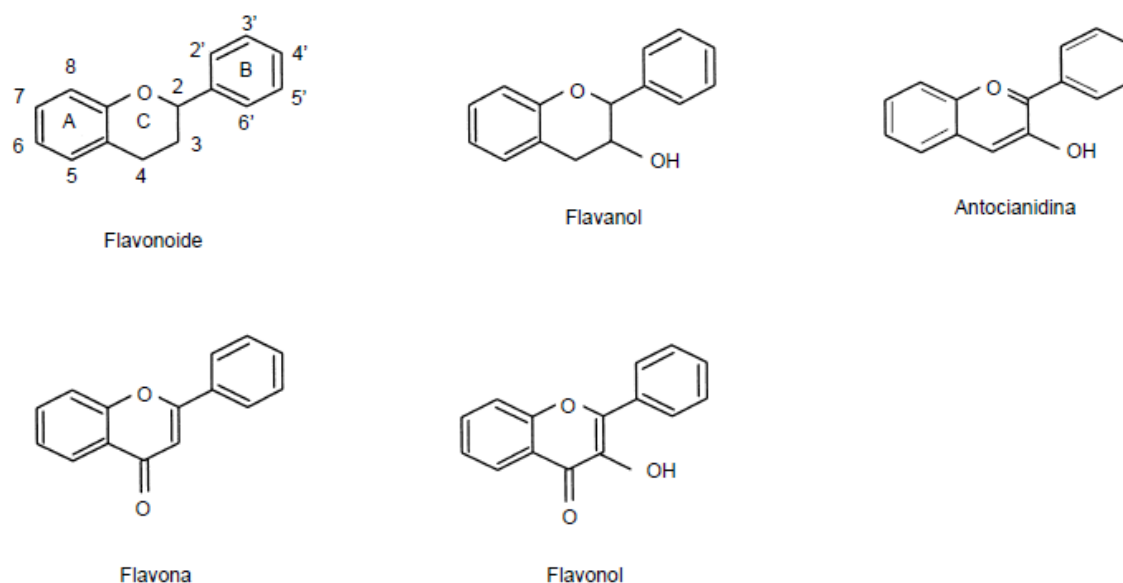


Figura 6 Flavonoides. Estructura básica y tipos.

Fuente: (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes

Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen principalmente a los radicales hidroxilo y superóxido, evitando así la peroxidación lipídica, también se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides evitando los procesos inflamatorios y la agregación plaquetaria (Xiao, Capanoglu, Jassbi, & Miron, 2016).

En las frutas frescas y jugos obtenidos por expresión o procesos industriales contienen mayormente flavononas y flavonas, teniendo un limitado número de representantes identificados y muchos más derivados aún sin identificar, debido a la variable concentración de estas especies no identificadas (Gattuso, Barreca, Gargiulli, Leuzzi, & Caristi, 2007). Los flavonoides se clasifican en 4 grandes grupos (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002):

- **Antocianinas**

Son flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y frutos (García & Pérez-Urria Carril, 2009), presentan una amplia gama de colores que comprenden rojos, rosados, morados y azules (Urquiaga & Leighton, 2000), estos colores dependen del número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B y del pH de las vacuolas en las que se almacenan (García & Pérez-Urria Carril, 2009).

- **Flavonas y Flavonoles**

Protegen del daño causado por la luz ultravioleta absorbiéndola, los flavonoles en las flores forma patrones simétricos de líneas, puntos o círculos concéntricos. Las flavonas y flavonoles no se restringen solo a las flores, encontrándose estos compuestos en todas las partes verdes de la planta protegiendo las células de la luz UV-B la cual incrementa la producción de estos compuestos (Urquiaga & Leighton, 2000).

- **Isoflavonoides**

Presentan una amplia actividad farmacológica no solo en el ser humano sino también en la planta como insecticida o piscicida, encontrados mayormente en legumbres, presentan una estructura similar a los esteroides permitiendo a estos compuestos adherirse a los receptores de estrógeno (Urquiaga & Leighton, 2000).

1.3.4 GLICÓSIDOS

Los glicósidos son compuestos de azúcares y agliconas que producen uno o más azúcares por hidrólisis, el aglicon puede ser terpeno, flavonoide, cumarina o cualquier otro compuesto natural, uniéndose entre ellas mediante átomos de oxígeno (O – glicósidos), carbono (C – glicósidos), nitrógeno (N – glicósidos) y azufre (S – glicósidos) siendo los glicósidos unidos por oxígeno los más estudiados y los glicósidos unidos por carbono los más estables (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002).

• FLAVONOIDES C-GLICÓSIDOS

Los flavonoides C-glicósidos como los que se observan en la figura 7, reciben mucha menos atención que los flavonoides O-glicósidos, sin embargo, este tipo de glicosido presentan muchos beneficios para la salud humana, además de ser más estables en comparación con O-glicósidos en medios hidrolíticos, por esto se ha reportado que en el futuro será de interés aplicar el conocimiento de la C-glucosilación de flavonas en experimentos de ingeniería metabólica para generar glucósidos de flavona en plantas recombinantes y microbios con el fin de controlar el metabolismo de flavonoides y para la generación de medicamentos fitocéticos glucosilados útiles (Xiao, Capanoglu, Jassbi, & Miron, 2016).

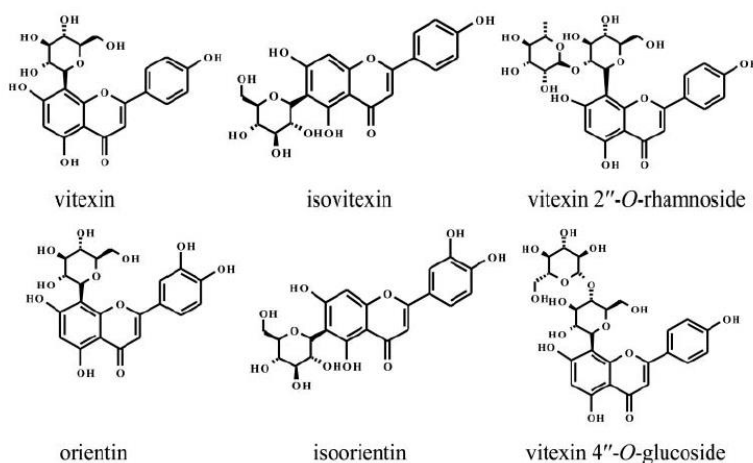


Figura 7 Estructura química de los flavonoides C-glicósidos

FUENTE: (Xiao, Capanoglu, Jassbi, & Miron, 2016). Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health Benefits

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE INVESTIGACION

El presente trabajo de investigación se realizó durante los meses de diciembre 2017 a marzo 2018, en los laboratorios (laboratorio H -103 y H-104) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María.

2.2 MATERIALES

2.2.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal investigado corresponde a frutos de las especies:

- *Passiflora Ligularis* A. L. Juss “granadilla”
- *Passiflora tripartita* (A.L Juss) Poir Var. *Mollisima* (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen “tumbo”
- *Passiflora edulis* Sims. forma *flavicarpa* Degener “maracuyá”

2.2.2 REACTIVOS QUIMICOS

- Estándar de ácido ascórbico (Merck)
- Alcohol etílico
- Reactivo DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- Acetato de etilo
- Cloruro de cobre (II)
- Neocuproína 98%
- Agua destilada
- Vainillina
- Ácido sulfúrico
- Hidróxido de sodio
- Fenolftaleína
- Metanol
- Cloruro férrico
- Ácido fórmico
- Ácido acético
- Tolueno
- Anhídrido acético

2.2.3 MATERIAL DE LABORATORIO

- Fiolas (5, 10, 25, 50 100 y 250 ml)
- Micropipetas de 0-100 μ L y 100-1000 μ L
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Pipetas de 0.5, 1, 2, 5 y 10 ml
- Probetas de 10 y 100 ml
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitado de 10, 50, 100, 250 y 500 ml

- Pizetas
- Cubetas de cuarzo 1cm
- Cubeta cromatográfica
- Baguetas
- Pipetas 1, 2, 5 y 10 ml
- Placa silica Gel
- Capilares de vidrio
- Erlenmeyer 100 ml
- Bureta 25 ml

2.2.4 EQUIPOS

- Balanza analítica
- Lámpara de luz UV
- Campana
- Espectrofotometro UV
- Refrigerador

2.3 MÉTODOS

2.3.1 RECOLECCIÓN, SELECCION Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA

La recolección de los frutos de las 3 especies se realizó el 13 de noviembre del 2017 en horas de la mañana en el mercado mayorista de “La Parada”, ubicado en el departamento de Arequipa, provincia de Arequipa.

La selección de los frutos acordes con la necesidad de nuestra investigación, se realizó clasificándolos según su color, haciendo uso de las cartas de colores y especificaciones organolépticas establecidas en sus respectivas normas técnicas:

- *Passiflora Ligularis* A. L. Juss “granadilla”.- Fruto en forma de baya, esférica y de cáscara dura, de color verde a amarillo, con sabor dulce y aromático característico y de tamaño entre 6 y 8 cm de diámetro, con peso de 70 a 140 g (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 4101, 1997), se observa los frutos recolectados en la figura 8.



Figura 8 Muestras de *Passiflora Ligularis* A. L. Juss “granadilla”

Fuente: Elaboración propia.

- *Passiflora tripartita* (A.L Juss) Poir Var. Mollissima (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen “tumbo”.- Fruto de piel delgada pero consistente, de coloración amarilla a anaranjado ligero, de tamaño aproximado de 8 cm y peso entre 40 a 70 g, con pulpa anaranjada de textura gelatinosa de sabor suave y agradable, perfumado y ligeramente ácido (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 1262, 1979), se observa los frutos recolectados en la figura 9.



Figura 9 Muestras de *Passiflora tripartita* (A.L Juss) Poir Var. Mollissima (HBK) Holm-Nielsen & Jorgensen “tumbo”

Fuente: Elaboración propia

- *Passiflora edulis* Sims. forma flavicarpa Degener “maracuyá”.- Frutos ovalados, de cáscara amarillo firme, el peso del fruto debe exceder los 130g, con pulpa de tonalidad amarilla intensa de alta acidez (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 1267, 1979), se observa los frutos recolectados en la figura 10.



Figura 10 Muestras de *Passiflora edulis* Sims. forma flavicarpa Degener “maracuyá”

Fuente: Elaboración propia

Después de la selección se lavaron los frutos con agua potable y fueron secadas con tela de algodón, consiguientemente se mantuvieron en refrigeración a 4°C, para luego ser transportadas a los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María para la respectiva investigación.

2.3.2 OBTENCIÓN DEL ZUMO

Según la NTC 5468 un zumo es un líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 5468, 2012).

La obtención de este zumo fue realizado mediante extracción mecánica por expresión, para trabajar con el zumo recién exprimido el cual mantiene las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de las frutas (Pássaro Carvalho & Londoño-Londoño, 2012).

2.3.2.1 MÉTODO: EXTRACCIÓN POR EXPRESIÓN

Este tipo de extracción se utiliza desde tiempo ancestrales e industrialmente empezó a desarrollarse en los años 40, incorporando muchos avances tecnológicos que han permitido aumentar el rendimiento y calidad del zumo obtenido (Pássaro Carvalho & Londoño-Londoño, 2012).

2.3.2.2 FUNDAMENTO

El principio del funcionamiento se basa en separar los elementos del fruto que de permanecer demasiado tiempo en contacto con el zumo, podrían tener influencia adversa para la calidad del extracto, evitando el paso de sustancias procedentes de las semillas, membranas y cortezas (Pássaro Carvalho & Londoño-Londoño, 2012).

2.3.2.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: PROCEDIMIENTO

Para la experimentación con los zumos de las diferentes especies en diferentes estadios de maduración, se realizó la extracción mecánica de cada fruto colocando la pulpa de un fruto en un paño de lino, para luego ser envuelta y presionada hasta completa extracción del zumo en vasos de precipitado, en la figura 11 se observa los zumos extraídos de las diferentes frutas y los restos de pulpa en los paños de lino, luego para el análisis de sólidos solubles se utilizó la muestra extraída sin diluir, mientras que para el análisis de acidez total titulable se disolvió 10 ml de los zumos obtenidos en 100 ml de agua y para los análisis de capacidad antioxidante se tomó una alícuota de 1 ml de cada zumo y se disolvió en 50 ml de etanol para luego ser filtrados con papel filtro de paso rápido como se puede observar en la figura 12, estos procedimientos se realizaron para cada fruto en sus diferentes estadios de maduración y por triplicado, trabajándose inmediatamente después de la extracción de los zumos.

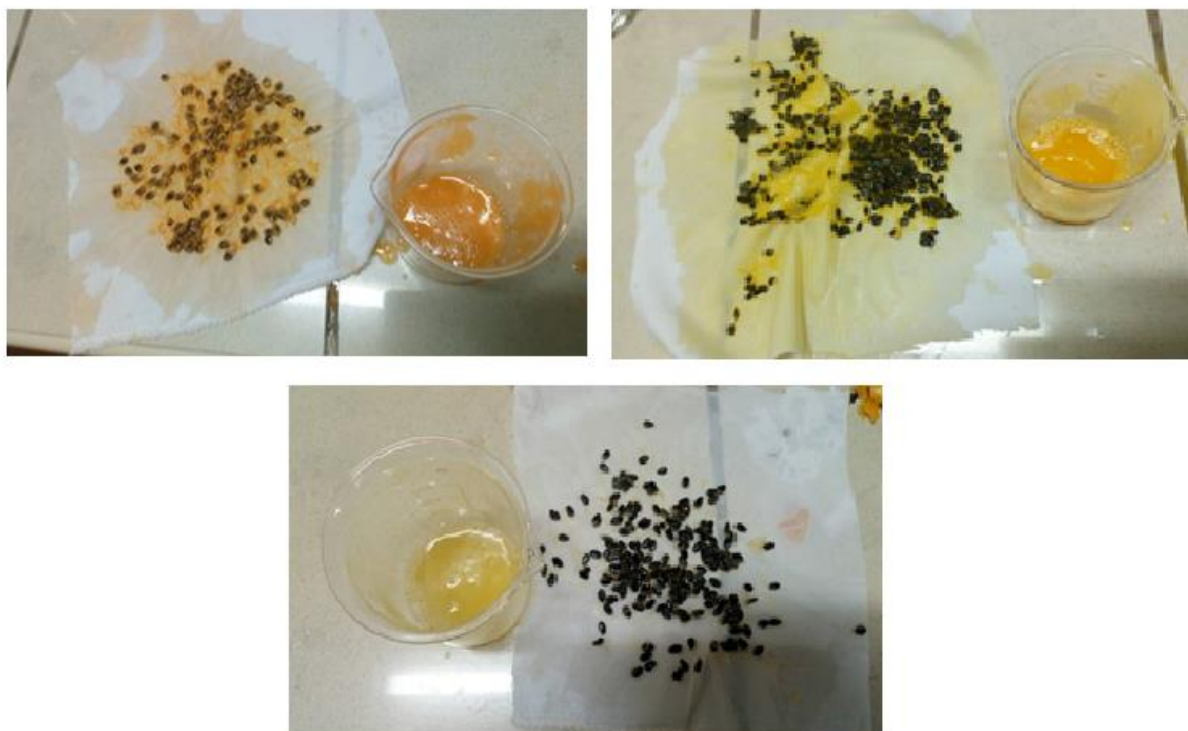


Figura 11 Extracción del zumo de cada muestra

Fuente: Elaboración propia.



Figura 12 Filtrado de las muestras

Fuente: Elaboración propia.

2.3.3 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de componentes por distribución entre dos fases inmiscibles (la fase móvil y fase estacionaria) (Preethi, Harita, & Rajesh, 2017), teniendo varios tipos de métodos cromatográficos, dependiendo de la naturaleza de las fases sean sólido – líquido, líquido – líquido o gases – líquido (Sherma & Fried, 2005).

2.3.3.1 FUNDAMENTO

La cromatografía en capa fina se fundamenta en la afinidad de los compuestos con respecto a la fase estacionaria y la fase móvil (Preethi, Harita, & Rajesh, 2017), impulsados por la acción capilar se distribuyen sobre la superficie de la fase estacionaria (Carvajal Rojas, Hata Uribe, Sierra Martinez, & Rueda Niño, 2009).

Los compuestos con mayor afinidad a la fase estacionaria se distribuyen lentamente mientras que los otros componentes se distribuyen más rápidamente, una vez producida la separación se puede visualizar los componentes individuales (Sherma & Fried, 2005).

2.3.3.2 PROCEDIMIENTO

Se utilizó placas de silica gel, las cuales fueron divididas en trozos de 10 cm de largo y 3 cm de ancho, se marcó con un lápiz dos líneas una en la parte inferior a 1 cm de la base y el otro a 1 cm del borde superior, marcas que sirvieron como referencia para el inicio y fin de la corrida cromatográfica, posteriormente se sembraron las diferentes muestras diluidas (1:1 en etanol) en las diferentes placas, sembrándolas en forma de banda y repasando 3 veces cada muestra, luego las placas se dejaron secar a temperatura ambiente antes de ser colocadas en sus respectivas fases móviles.

Las fases móviles fueron preparadas en cubas cromatográficas media hora antes de la experimentación y se dejaron selladas con la fase móvil para saturar el medio, una vez secas las placas se colocaron en sus fases móviles, evitando el contacto de las fases móviles con el punto de siembra de las muestras, evitando así errores en las corridas cromatográficas, posteriormente se dejó arrastrar la muestra junto a la fase móvil hasta la segunda marca de la placa de silica gel, indicando así el final de la corrida cromatográfica.

Al finalizar la corrida cromatográfica, se dejó secar las placas a temperatura ambiente, donde después pasado un tiempo se pudo observar la separación de los componentes reflejados como puntos coloreados en las placas con diferentes diámetros y distancias recorridas, posteriormente se trataron las placas con sustancias reveladoras específicas para cada ensayo de separación cromatográfica, dependiendo del tipo de componentes que se busca separar, identificar y visualizar, después de tratar con reveladores las placas, se dejó secar a 100 °C por un máximo 10 minutos en una estufa precalentada y finalmente se visualizó cada placa con ayuda de luz UV/V a 254 nm y 366 nm.

2.3.3.3 FACTOR DE RETENCIÓN

La relación entre las distancias recorridas por la muestra y la fase móvil desde el origen de la placa se conoce como factor de retención (R_f) (Preethi, Harita, & Rajesh, 2017). La retención y la selectividad en la separación dependen de la polaridad del compuesto (Acero de mesa, Linares Pinel, & Muñoz-Mingarro Martinez, 2007), determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes y la naturaleza del disolvente, donde los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares serán arrastrados con mayor facilidad (Sherma & Fried, 2005). Para calcular el R_f se aplica la siguiente formula:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil (Y)}}$$

2.3.3.4 IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS

La identificación de los posibles metabolitos secundarios con acción antioxidante en las tres especies, se llevó a cabo por cromatografía de capa fina con las siguientes fases móviles siguiendo la metodología antes descrita:

- **Flavonoides.-** Para este grupo de metabolitos secundarios, se realizaron distintas pruebas con varias fases móviles siendo la mezcla azeotrópica Acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:27) la que mejor separó los componentes bioactivos correspondientes a este grupo y se reveló con reactivo de cloruro de aluminio 1% en etanol esparciendo este reactivo por la placa cromatográfica, dejándola secar a temperatura ambiente y posteriormente se colocó en una estufa a 100 °C por 10 minutos para luego ser observadas con ayuda de luz ultravioleta a 254 nm y 366 nm.
- **Terpenos.-** Para este grupo de metabolitos secundarios, se realizaron distintas pruebas con varias fases móviles siendo la mezcla tolueno: acetato de etilo (9:1) la que mejor separó los componentes bioactivos correspondientes a este grupo y se reveló con reactivo de Liebermann burchard esparciendo este reactivo por la placa cromatográfica, dejándola secar a temperatura ambiente y posteriormente se colocó en una estufa a 100 °C por 10 minutos para luego ser observadas con ayuda de luz ultravioleta a 254 nm y 366 nm.
- **Fenoles.-** Para este grupo de metabolitos secundarios, se realizaron distintas pruebas con varias fases móviles siendo la mezcla acetato de etilo: etanol: agua (10:2:1) la que mejor separó los componentes bioactivos correspondientes a este grupo y se reveló con reactivo cloruro férrico 2% esparciendo este reactivo por la placa cromatográfica, dejándola secar a temperatura ambiente, luego de unos minutos se observó la placa con luz natural.

2.3.4 DETERMINACIÓN DE ESTADÍO DE MADUREZ

Existen diferentes conceptos de madurez las cuales son “madurez de cosecha”, “madurez de consumo” y “madurez fisiológica”. Esta última es aquel momento del desarrollo donde el fruto alcanza todas las características sensoriales propias de la especie, como el sabor, color, aroma y textura. La madurez fisiológica se define cuando la fruta se encuentra fisiológicamente en su máximo estado de crecimiento y desarrollo, y todas sus partes, especialmente la semilla, están formadas, maduras y aptas para su reproducción (del Pilar Pinzón, Fischer, & Corredor, 2007), posteriormente siguen los estadios de “madurez comercial” y “madurez organoléptica” o de “consumo” y con el tiempo al estado de “sobre madurez” (Grozeff, 2016).

La maduración es un proceso irreversible y coordinado que se produce en la fase final del desarrollo de los frutos y de los vegetales que conduce a cambios fisiológicos, bioquímicos y sensoriales entre los que se encuentran la biosíntesis de pigmentos, la síntesis de compuestos volátiles de aroma y sabor, el cambio en el metabolismo de los azúcares, las modificaciones en la estructura de la pared celular que afectan la textura (Melgarejo, y otros, 2015).

2.3.4.1 ÍNDICE DE SÓLIDOS SOLUBLES

Los azúcares constituyen la mayor parte de los sólidos solubles presentes en el jugo de las frutas, los ácidos orgánicos, aminoácidos, componentes fenólicos y pectinas solubles contribuyen al contenido de sólidos solubles, aunque se encuentran en proporciones inferiores al de los azúcares (Grozeff, 2016). El contenido de sólidos solubles se determinó con un refractómetro digital o analógico colocando una gota de la muestra en el aparato el cual representa el valor de sólidos solubles en una escala de grados Brix (1 ° Brix equivale a 1 gramo de sólido soluble para cada 100 gramos de solución) (Grozeff, 2016).



Figura 13 Determinación de sólidos solubles

FUENTE: ELABORACIÓN propia

2.3.4.2 ÍNDICE DE ACIDEZ TOTAL TITULABLE

Este valor incluye todas las sustancias de naturaleza ácida en el zumo que reaccionan con NaOH, siendo la mayoría de sustancias los ácidos orgánicos. La acidez total titulable se determina normalmente titulando un volumen conocido de zumo con una solución estándar de NaOH, con fenolftaleína como indicador, el resultado obtenido se expresa como gramos de ácido cítrico (Sinclair, Bartholomew, & Raamsey, 1945).

Para la determinación de acidez titulable, con una pipeta se extrajo 10 ml. del zumo puro de cada fruto y se hizo una dilución de 1: 10 con agua destilada. Se trasvasó a un erlenmeyer, se agregaron unas gotas de fenolftaleína y se tituló con Na(OH) 0,1 N hasta tonalidad rosada persistente (Grozeff, 2016). La acidez titulable se calculó con la siguiente formula:

$$\text{Acidez titulable} = \frac{\text{ml Na(OH)} \times \text{Normalidad} \times \text{factor del ácido en meq.}}{\text{ml. de Zumo}} \times 100$$

*factor de ácido cítrico = 0.064 meq.

2.3.4.3 ÍNDICE DE MADUREZ

Se realiza para asegurar una calidad mínima aceptable para el consumidor y una larga vida de almacenamiento, es el cociente entre el % de sólidos solubles (expresado como ° Brix) y la acidez total titulable también en % (expresada en gramos de ácido cada 100 ml. de jugo) (Grozeff, 2016). Por lo tanto con los datos obtenidos en los ensayos anteriores (sólidos solubles y acidez titulable) se calcula el índice de maduración con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de maduración} = \frac{\% \text{ sólidos solubles (° Brix)}}{\% \text{ acidez titulable (g de ácido cítrico/100 ml)}}$$

2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

2.3.5.1 MÉTODO CUPRAC (CAPACIDAD ANTIOXIDANTE REDUCTORA DE IONES CUPRICOS)

El método CUPRAC es un ensayo de capacidad antioxidante simple y útil para una amplia variedad de compuesto polifenólicos, tanto lipofílicos como hidrofílicos (Apak R. , y otros, 2007) tales como ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, carotenoides, antocianinas, así como para tioles, antioxidantes sintéticos, vitaminas C y E (Özyürek, y otros, 2011). El reactivo oxidante cromogénico utilizado para el ensayo CUPRAC es el catión bis (neocuproine) cobre (II) (Cu (II) -Nc) actúa como un agente de transferencia eléctrica de la esfera externa, y el cromóforo CUPRAC formado por la reducción de este reactivo con antioxidantes, es el catión bis (neocuproína) cobre (I) (Cu (I) -Nc). La absorbancia del quelato de Cu (I) formado como resultado de la reacción redox con polifenoles reductores, vitaminas C y E se mide a 450 nm. El color amarillo anaranjado se debe al quelato de Cu (I) -Nc formado. Las reacciones de CUPRAC son esencialmente completadas dentro de 30 min (Özyürek, y otros, 2011). EL reactivo CUPRAC, bis

(neocuproína) cobre (II) cloruro (Cu(II)-Nc), reacciona con antioxidantes reductores de n-electrones (AO) de la siguiente manera:

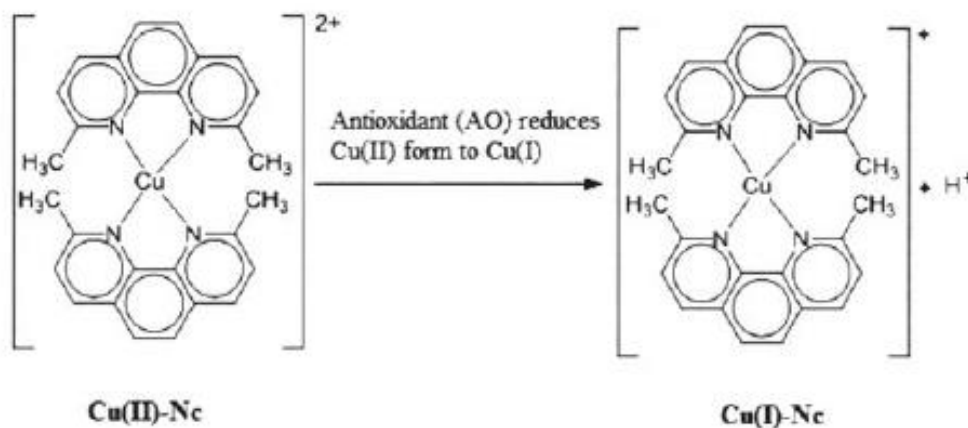


Figura 14 reacción entre CUPRAC y el cromóforo: bis (neocuproína) Catión de quelato de cobre (I) (los protones liberados en la reacción se neutralizan por el tampón NH₄Ac

Fuente: (Özyürek, y otros, 2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology

2.3.5.1.1 PROCEDIMIENTO

Para este ensayo se prepararon los reactivos de acetato de amonio solución Buffer 1M a pH7 (19,2706 g en 250 ml), neocuproína solución 7.5×10^{-3} M en etanol (39.04 mg en 25 ml), cloruro de cobre di hidratado solución 1.2×10^{-2} M en Agua (403,35 mg en 250 ml) y ácido Ascórbico: Stock 2.0×10^{-4} M en Etanol (8.8 mg en 250 ml). Posteriormente se preparó una curva de calibración, utilizando como antioxidante ácido ascórbico en 6 tubos de ensayo donde 1 tubo contuvo el blanco de la curva y los otros 5 las diferentes concentraciones de ácido ascórbico.

El procedimiento como se resume en la tabla 4 se efectuó agregando 1 ml de Buffer acetato de amonio, 1 ml de neocuproína, 1 ml de Cloruro de Cobre y ácido ascórbico en las siguientes cantidades: 0.25 ml, 0.5 ml, 1 ml, 1.5 ml y 2 ml, para los tubos de la curva exceptuando al blanco, finalmente se agregó etanol en las siguientes cantidades: 2 ml, 1.75 ml, 1.5ml, 1 ml y 0.5 ml, exceptuando el tubo número 5 de la curva, todo esto para obtener las concentraciones finales de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 mM de ácido ascórbico,

finalmente los tubos se agitaron cuidadosamente y se dejaron en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, pasado este tiempo se procedió a la lectura por espectrofotometría a 450 nm, el resultado de la batería de tubos preparada se puede observar en la figura 15.

Tabla 4 Curva de calibración de método CUPRAC

	blanco	Est 1	Est 2	Est 3	Est 4	Est 5
Buffer acetato	1	1	1	1	1	1
Neocuproína	1	1	1	1	1	1
CuCl₂	1	1	1	1	1	1
Ácido ascórbico	-	0.25	0.5	1	1.5	2
etanol	2	1.75	1.5	1	0.5	-
Concentración	mM	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08

Fuente: Registro de Datos propios

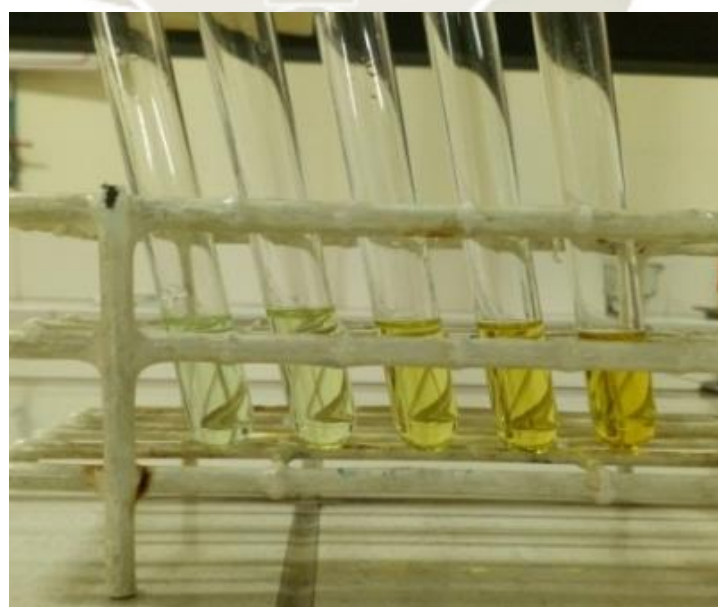


Figura 15 Batería de tubos de la curva de calibración para el método CUPRAC

Fuente: Elaboración propia.

2.3.5.2 MÉTODO DPPH (ACTIVIDAD DE CAPTACION DE RADICALES LIBRES)

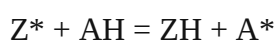
DPPH o 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo, es uno de los pocos radicales nitrogenados orgánicos estables de larga vida útil, altamente reactiva y disponible comercialmente (Huang, Ou, & Prior, 2005).

Es un método rápido, simple, económico y ampliamente utilizado para medir la capacidad de los compuestos para actuar como eliminadores de radicales libres o donantes de hidrógeno, y para evaluar la actividad antioxidante de los alimentos. Este método es fácil y se aplica para medir la capacidad antioxidante general y la actividad de eliminación de radicales libres de los jugos de frutas y vegetales en varios sistemas de solventes diferentes, incluidos el etanol, la acetona acuosa, el metanol, el alcohol acuoso y benceno (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

Es un método conveniente para el ensayo antioxidante de cisteína, glutatión, ácido ascórbico, tocoferol y compuestos aromáticos polihidroxilo en el aceite de oliva, frutas, jugos y vinos (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

El ensayo se basa en la medición de la capacidad de eliminación de radicales libres de los antioxidantes, el electrón extraño del átomo de nitrógeno en el DPPH se reduce al recibir un átomo de hidrógeno de los antioxidantes a la hidracina correspondiente (Sagar, Kedare, & Singh, 2011).

El DPPH se caracteriza por ser un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón de reserva sobre la molécula en su totalidad, de modo que las moléculas no se dimerizan, como la mayoría de los otros radicales libres. La deslocalización también da lugar al color violeta profundo, con una absorción en solución de etanol a aproximadamente 520 nm (Sagar, Kedare, & Singh, 2011). Al mezclar la solución de DPPH con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno como se puede observar en la figura 16, da lugar a la forma reducida con la pérdida del color violeta. Representando el radical DPPH por $Z^{\bullet}$ y la molécula donante por AH, la reacción primaria es:



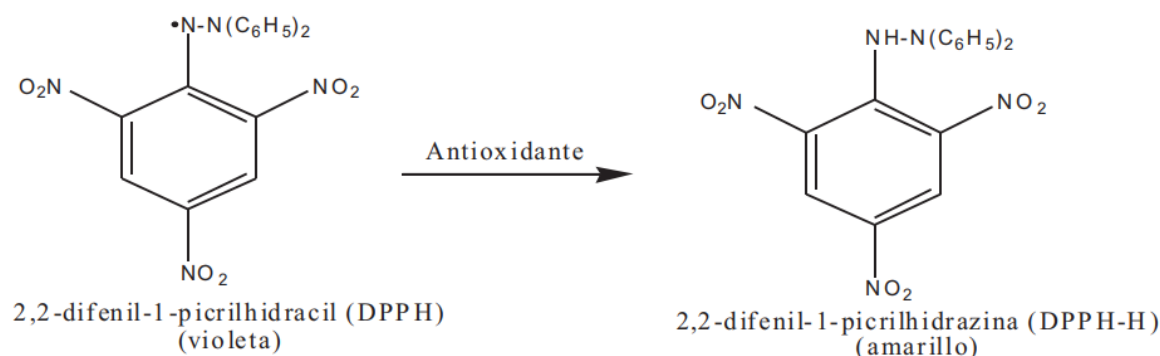


Figura 16 Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante

Fuente: (La Rosa Toro, Vigo López, & Muedas Taipe, 2011). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PISCO PERUANO MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Donde ZH es la forma reducida y A • es un radical libre producido en el primer paso. Este último radical sufrirá más reacciones que controlan la estequiometría general, por lo que la molécula de DPPH Z • pretende representar los radicales libres formados en el sistema cuya actividad debe ser suprimida por la sustancia AH (Sagar, Kedare, & Singh, 2011).

2.3.5.2.1 PROCEDIMIENTO

Se preparó una solución de DPPH a una concentración de 100 mM (1.9716 mg en 50 ml) protegiendo el preparado de la luz en una fiola cubierta con papel aluminio, luego se realizó un barrido espectrofotométrico calibrando la solución a una absorbancia de 0.800 $\pm$ 0.02 a una longitud de onda de 520 nm, luego se realizó la preparación de la curva de calibración iniciando con la preparación de un stock de ácido ascórbico a una concentración de 1 mg/ml que de igual forma se protegió de la luz del mismo modo que la solución de DPPH y se realizó 5 diluciones a partir de este stock: 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 y 1.5 ml respectivamente disueltas en 10 ml de etanol para obtener las concentraciones de 0.03 mg/ml, 0.06 mg/ml, 0.09 mg/ml, 0.12 mg/ml y 0.15 mg/ml. Para la preparación de la curva se agregó 2.9 ml de solución DPPH 100 mM y 0.1 ml de las soluciones de ácido ascórbico previamente preparadas como se encuentra resumido en la tabla 5, adicionalmente se preparó un blanco que contenía 2.9 ml de DPPH 100 mM y 0.1 ml de etanol, luego se agitaron cuidadosamente y se dejaron reposar en oscuridad por 30 minutos para finalmente ser leídas en el espectrofotómetro a

520 nm, este ensayo se realizó por triplicado, el resultado de la batería de tubos preparada se puede observar en la figura 17.

Tabla 5 curva de calibración de método DPPH

Cc Estándares de ácido ascórbico	Alícuotas de Estándares	Volumen de Dpph 100 mM	Cc final de ácido ascórbico
0.03 mg/ml	0.1 ml	2.9 ml	0.1mg/100 ml
0.06 mg/ml	0.1 ml	2.9 ml	0.2mg/100 ml
0.09 mg/ml	0.1 ml	2.9 ml	0.3mg/100 ml
0.12 mg/ml	0.1 ml	2.9 ml	0.4mg/100 ml
0.15 mg/ml	0.1 ml	2.9 ml	0.5mg/100 ml

Fuente: Registro de Datos propios



Figura 17 Batería de tubos de la curva de calibración para el método DPPH

Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 RECOLECCIÓN Y OBTENCIÓN DEL ZUMO

La recolección como fue descrita en el segundo capítulo, se realizó siguiendo los lineamientos de las normas técnicas colombianas correspondientes a cada fruto, realizando el pesaje de cada fruto se obtuvieron las medidas representadas en las tablas 6, 7 y 8.

Como podemos observar en la tabla 6, se pesaron 10 frutos de tumbo en diferentes estadios de maduración, las medidas de peso obtenidas para el fruto tumbo en sus diferentes estadios de maduración en esta investigación concuerdan con lo estipulado en la norma técnica Colombiana 1262 donde se indica que el peso del fruto debe estar entre 40 y 70 g (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 1262, 1979) siendo el peso promedio de 70.693 g para el estadio de desarrollo, 70.609 g para el estadio de madurez y 70.355 g para el estadio de sobre madurez, pesos que se encuentran en el margen superior de pesos especificados en la norma técnica colombiana.

Tabla 6 Pesos de frutos tumbo

Pesos de frutos de tumbo en gramos (g)			
Muestras	Desarrollo	Madurez	Sobre madurez
1	70.66	71.83	70.27
2	71.15	70.28	70.15
3	70.83	71.28	71.03
4	70.43	69.98	70.78
5	70.59	70.01	69.99
6	70.89	70.14	70.13
7	69.94	71.12	70.48
8	71.24	70.46	70.3
9	70.68	70.39	70.25
10	70.52	70.6	70.17
Promedio	70.693	70.609	70.355
Desviación estándar	0.3717	0.6105	0.3222

FUENTE: Elaboración propia.

Como podemos observar en la tabla 7, se pesaron 10 frutos de granadilla en diferentes estadios de maduración, las medidas de peso obtenidas para el fruto granadilla en sus diferentes estadios de maduración en esta investigación concuerdan con lo estipulado en la norma técnica Colombiana 4101 donde se indica que el peso del fruto debe estar entre 70 y 140 g (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 4101, 1997) siendo el peso promedio de 100.434 g para el estadio de desarrollo, 100.754 g para el estadio de madurez y 100.03 g para el estadio de sobre madurez, pesos que se encuentran dentro del rango de pesos especificados en la norma técnica colombiana.

Tabla 7 Pesos de frutos granadilla

Pesos de frutos de granadilla en gramos (g)			
Muestras	Desarrollo	Madurez	Sobre madurez
1	99.11	101.56	101.1
2	100.33	100.58	100.45
3	101.15	101.23	100.25
4	99.45	100.67	100.36
5	100.23	100.35	100.67
6	101	100.94	101.25
7	100.67	100.25	99.23
8	100.28	100.62	99.57
9	100.56	100.85	100.25
10	101.56	100.49	100.78
Promedio	100.434	100.754	100.03
Desviación estándar	0.7431	0.4030	0.6267

FUENTE: Elaboración propia.

Como podemos observar en la tabla 8, se pesaron 10 frutos de maracuyá en diferentes estadios de maduración, las medidas de peso obtenidas para el fruto maracuyá en sus diferentes estadios de maduración en esta investigación concuerdan con lo estipulado en la norma técnica Colombiana 1267 donde se indica que el peso del fruto debe exceder los 130 g (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 1267, 1979) siendo el peso promedio de 152.56 g para el estadio de desarrollo, 150.25 g para el estadio de madurez y 150.38 g para el estadio de sobre madurez, pesos que se adecuan al peso especificado en la norma técnica colombiana.

Tabla 8 Pesos de frutos maracuyá

Pesos de frutos de maracuyá en gramos (g)			
Muestras	Desarrollo	Madurez	Sobre madurez
1	153.14	152.55	149.25
2	150.45	153.3	150.9
3	150.45	150.39	154.32
4	152.93	150.92	152.12
5	151.56	152.35	150.39
6	151.39	152.89	150.92
7	152.56	151.25	150.25
8	150.25	151.69	152.45
9	151.59	152.1	151.22
10	150.35	150.39	150.12
Promedio	152.56	150.25	150.38
Desviación estándar	1.1035	1.0249	1.4468

FUENTE: Elaboración propia.

Con el fin de determinar la cantidad de zumo que puede obtenerse de los frutos se realizó la extracción de zumo de cada fruto de una muestra aproximada de 10 g de pulpa en sus diferentes estadios de maduración, extrayendo el zumo de forma mecánica (método de extracción por expresión) como fue descrito en el capítulo anterior, el zumo extraído fue luego pesado obteniéndose los datos expresados en las tablas 9, 10 y 11 de rendimiento de zumo.

El cálculo de rendimiento se realizó con la siguiente formula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Zumo obtenido (g)}}{\text{Peso de muestra (g)}} \times 100$$

Tabla 9 Rendimiento de zumo de tumbo

Zumo de tumbo									
	Desarrollo			Madurez			Sobre madurez		
muestras	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Peso de muestra (g)	10.05	10.08	9.99	10.07	10.16	10.10	10.18	10.01	10.02
Zumo obtenido (g)	4.26	4.19	3.85	4.15	4.29	4.05	3.98	4.07	4.10
% Rendimiento	42.39	41.57	38.54	41.21	42.22	40.1	39.1	40.66	40.92
Promedio (%)		40.83			41.18			40.23	

FUENTE: Elaboración propia.

En la tabla 9 observamos los volúmenes de zumo obtenido a partir de aproximadamente 10 g de tumbo podemos observar que se obtienen aproximadamente 4 g de zumo en los tres estadios de maduración, teniendo como rendimiento de extracción 40.83 % en el caso del fruto en estadio de desarrollo, 41.18 % en el caso del fruto en estadio de madurez y 40.22 % en el caso del fruto en estadio de sobre madurez.

Tabla 10 Rendimiento de zumo de granadilla

Zumo de granadilla									
	Desarrollo			Madurez			Sobre madurez		
muestras	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Peso de muestra (g)	10.03	10.09	10.22	10.15	10.08	10.23	10.08	10.12	10.04
Zumo obtenido (g)	4.24	4.11	4.27	4.12	4.02	4.33	4.06	4.13	4.11
% Rendimiento	42.27	40.73	41.78	40.59	39.88	42.33	40.28	40.81	40.94
Promedio (%)		41.60			40.93			40.67	

FUENTE: Elaboración propia

En la tabla 10 observamos los volúmenes de zumo obtenido a partir de aproximadamente 10 g de granadilla podemos observar que se obtienen aproximadamente 4 g de zumo en los tres estadios de maduración, teniendo como rendimiento de extracción 41.60 % en el caso del fruto en estadio de desarrollo, 40.93 % en el caso del fruto en estadio de madurez y 40.67 % en el caso del fruto en estadio de sobre madurez.

Tabla 11 Rendimiento de zumo de maracuyá

Zumo de maracuyá									
muestras	Desarrollo			Madurez			Sobre madurez		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Peso de muestra (g)	10.04	10.17	10.02	10.15	10.16	10.15	10.11	10.01	10.02
Zumo obtenido (g)	5.24	4.59	4.97	4.59	5.17	5.12	4.91	5.07	4.75
% Rendimiento	52.19	45.60	49.60	45.22	50.89	50.44	48.57	50.65	47.41
Promedio (%)		48.97			48.85			48.87	

FUENTE: Elaboración propia.

En la tabla 11 observamos los volúmenes de zumo obtenido a partir de aproximadamente 10 g de maracuyá podemos observar que se obtienen aproximadamente 5 g de zumo en los tres estadios de maduración, teniendo como rendimiento de extracción 48.97 % en el caso del fruto en estadio de desarrollo, 48.85 % en el caso del fruto en estadio de madurez y 48.87 % en el caso del fruto en estadio de sobre madurez.

Los datos obtenidos muestran que el fruto con mayor rendimiento de extracción mediante método de expresión es el zumo de maracuyá en todos los estadios de maduración, con valores de 48.97 % para su estadio en desarrollo, 48.85 % para su estadio de madurez y 48.87 % para su estadio de sobre madurez, mientras que el rendimiento de granadilla y tumbo son similares en todos los estadios de maduración con valores aproximados al 40 % en ambos frutos, como se puede observar en la figura 18, donde se muestra claramente que entre los estadios de maduración de cada fruto no existe diferencia significativa referente a su rendimiento de extracción.

Comparación de % rendimiento entre las tres especies en diferentes estadios de maduración

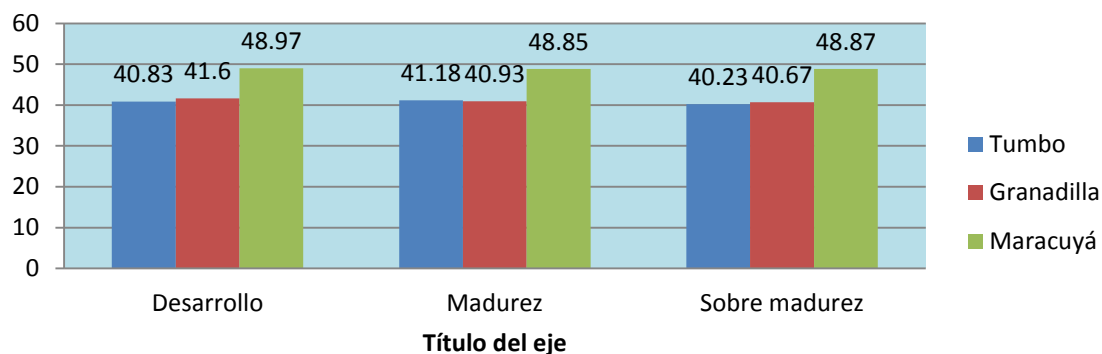


Figura 18 Comparación de % rendimiento entre las tres especies en diferentes estadios de maduración

FUENTE: Elaboración propia.

3.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

3.2.1 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

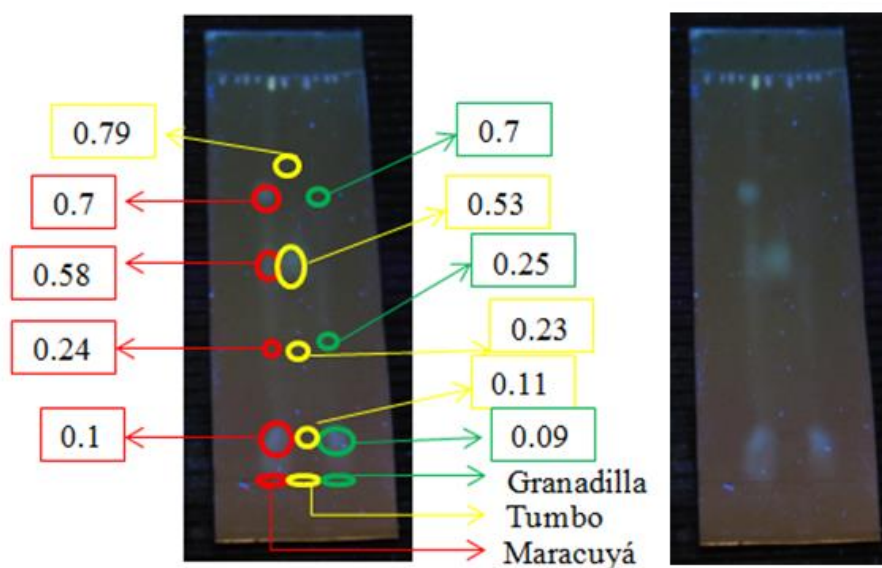


Figura 19 Placa cromatográfica para determinación de Flavonoides.

FUENTE: Elaboración propia.

El ensayo de cromatografía en capa fina con el fin de determinar compuestos pertenecientes al grupo de flavonoides, se realizó como fue descrito en el capítulo anterior diluyendo la muestra en etanol (1:1) y se sembró en la placa 3 veces en el siguiente orden: maracuyá, tumbo y granadilla utilizando como fase móvil una mezcla de Acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100.11.11.27) y se reveló con reactivo de cloruro de aluminio 1% en etanol en contraste de luz UV a 366 nm, la cual evidencia bandas coloreadas que podrían corresponder a metabolitos del grupo de flavonoides.

Se puede observar manchas azules turquesas como se observa en la figura 19, en diferentes posiciones como se ve descrito en la tabla 12, indicativo de existencia de varios compuestos pertenecientes al grupo de metabolitos de flavonoides, sin embargo la diferencia de distancias recorridas y el diámetro de las mismas, puede ser indicativo de existir diferencias entre los componentes bioactivos de las tres especies, lo cual concuerda con las diferencias que se ven descritas en varias investigaciones alrededor del mundo, donde se estudian y comparan diferentes especies del género *Passiflora*, tomando como ejemplo el compendio de investigaciones revisado por el equipo de Dhawan, Dhawan y Sharma en su publicación de revisión del género *Passiflora* donde detallan algunos de los componentes bioactivos de 48 especies de *Passiflora* (Dhawan, Dhawan, & Sharma, 2004), otra de las diferencias entre las tres especies estudiadas es que las muestras de tumbo y maracuyá presentan 4 marcas separadas y la granadilla solo 3.

Teóricamente se sabe de la existencia de flavononas, flavonas y flavonoles, presentes en la composición fitoquímica de estas especies, siendo los compuestos de flavonoides c-GLICÓSIDOS el grupo más estable y amplio en estas especies (Zucolotto, y otros, 2011) componentes como Orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin (Xiao, Capanoglu, Jassbi, & Miron, 2016) GLICÓSIDOS de rutina, quercetina, kaempferol, luteolina (Garcia, y otros, 2017), apigenina, miricetina, (Simirgiotis, Schmeda, Bórquez, & Kennelly, 2013), algunas propias de la especie como passiflorina, passicapsina, passibiflorina, passicoriacina (Dhawan, Dhawan, & Sharma, 2004) y muchos otros compuestos que aún no se han identificado (Garcia, y otros, 2017).

Tabla 12 Factores de retraso para flavonoides

Factor de retraso (Rf)			
Manchas	Maracuyá	tumbo	Granadilla
1	0.1	0.11	0.09
2	0.24	0.23	0.25
3	0.58	0.53	-
4	0.7	0.79	0.7

FUENTE: Elaboración propia.

3.2.2 IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS

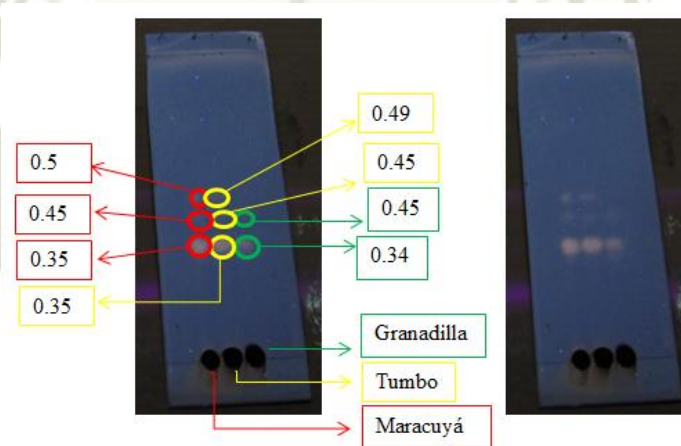


Figura 20 Placa cromatográfica para determinación de Terpenos

FUENTE: Elaboración propia.

El ensayo de cromatografía en capa fina con el fin de determinar compuestos pertenecientes al grupo de terpenos, se realizó como fue descrito en el capítulo anterior diluyendo la muestra en etanol (1:1) y se sembró en la placa 3 veces en el siguiente orden: maracuyá, tumbo y granadilla utilizando como fase móvil una mezcla de tolueno: acetato de etilo (9:1) y se reveló con reactivo de Liebermann burchard en contraste con luz UV a 366 nm, la cual evidencia bandas coloreadas como se ve en la figura 20 que podrían corresponder a metabolitos del grupo de terpenos o triterpenos. Se puede observar manchas rojizas, azules

y verdosas en diferentes posiciones para cada muestra como se ve descrito en la tabla 13, indicativo de existencia de varios compuestos pertenecientes al grupo de metabolitos de terpenos, con la característica distintiva de que en las muestras de maracuyá y tumbo existen tres marcas a distancias similares y en la granadilla solo dos, lo que indica que podría haber diferencia entre componentes bioactivos de estas tres especies. Teóricamente se sabe de la existencia de compuestos isoprenoides en el género *Passiflora* como carotenoides (García, y otros, 2017), ciclopasiflosidos (Simirgiotis, Schmeda, Bórquez, & Kennelly, 2013), limonenos, linalool, geraniol entre otros (Dhawan, Dhawan, & Sharma, 2004), presentes en la composición fitoquímica de estas especies.

Tabla 13 factores de retraso para terpenos

Factor de retraso (Rf)			
Manchas	Maracuyá	tumbo	Granadilla
1	0.35	0.35	0.34
2	0.45	0.45	0.45
3	0.5	0.49	-

FUENTE: Elaboración propia.

3.2.3 IDENTIFICACIÓN DE FENOLES

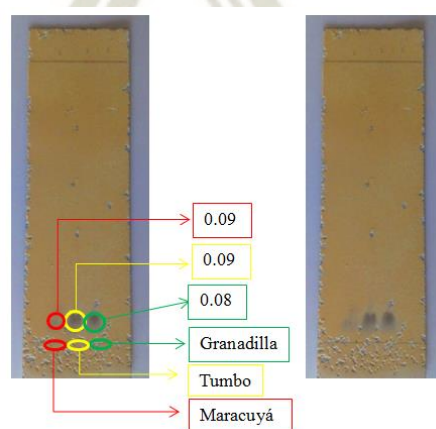


Figura 21 Placa cromatográfica para identificación de Fenoles

Fuente: Elaboración Propia.

El ensayo de cromatografía en capa fina con el fin de determinar compuestos pertenecientes al grupo de fenoles, se realizó como fue descrito en el capítulo anterior diluyendo la muestra en etanol (1:1) y se sembró en la placa 3 veces en el siguiente orden: maracuyá, tumbo y granadilla utilizando como fase móvil una mezcla de Acetato de etilo: etanol: agua (10:2:1) y se reveló con reactivo de cloruro férrico 2%, la cual evidencia manchas coloreadas que podrían corresponder a metabolitos fenólicos como se puede observar en la figura 21, se puede observar manchas purpuras en diferentes dimensiones para cada muestra como se ve descrito en la tabla 14, donde las tres marcas se encuentran a casi la misma altura, lo que podría significar la existencia de compuestos fenólicos similares entre las tres especies, con la única diferencia de la intensidad de cada mancha. Teóricamente se sabe de la existencia de fenoles tipo catecol presentes en la composición fitoquímica de estas especies, como ácido cafeico, ácido elágico, ácido galico (Saravanan & Parimelazhagan, 2014), furaneol, derivados de maltol y derivados de ionol (Dhawan, Dhawan, & Sharma, 2004). Finalmente en la tabla 15 representamos la intensidad de las manchas cromatográficas evidenciando la diferencias descritas en las respectivas marchas cromatográficas.

Tabla 14 factores de retraso para fenoles

Factor de retraso (Rf)			
Manchas	Maracuyá	tumbo	Granadilla
1	0.09	0.09	0.08

FUENTE: Elaboración propia.

Tabla 15 Intensidad de manchas cromatográficas

Intensidad manchas cromatográficas	Maracuyá	Tumbo	Granadilla
Flavonoides	++	+++	+
Terpenos	+++	+++	++
Fenoles	+	++	++

FUENTE: Elaboración propia

3.3 DETERMINACIÓN DE ESTADÍO DE MADUREZ

3.3.1 ÍNDICE DE SÓLIDOS SOLUBLES

Como se describió en el capítulo anterior, se determinó el índice de sólidos solubles colocando dos o tres gotas del zumo de cada fruto a analizar en el prisma principal frente al aparato, luego se bajó la placa de luz diurna y se observó por el lente enfocable graduando la escala hasta un punto visible, los resultados obtenidos están descritos en la tabla 16.

Los resultados obtenidos para cada muestra de zumo de cada especie en diferentes estadios de maduración, concuerdan con la bibliografía en la cual se indica que los sólidos solubles conforme va pasando el tiempo aumentan en relación con la madurez del fruto (del Pilar Pinzón, Fischer, & Corredor, 2007), además los datos también concuerdan con los valores ofrecidos por las normas técnicas colombianas, donde el fruto en estadio de madurez comercial debe presentar valores de sólidos solubles mínimos de 10.7 ° Brix en el caso de tumbo (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 1262, 1979), 10.3 ° Brix en el caso de granadilla (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 4101, 1997) y 12.0 ° Brix en el caso de maracuyá (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 1267, 1979), valores que aseguran que la cantidad de sólidos solubles en el fruto son los adecuados para el estadio de maduración “maduro”, además en relación con otros trabajos de investigación como el trabajo de Ligia Rodríguez, Leslie Lopez y Maribel Garcia donde se determinó el índice de sólidos solubles para el fruto de maracuyá obteniendo resultados de 11.5, 14.1 y 16.3 ° Brix (Rodríguez, Lopez, & Garcia, 2010) para muestras en distintos estadios de maduración que de la misma forma que en este trabajo van en orden ascendente demostrando relación con los datos obtenidos en esta investigación, así también se demuestra en manuales de cosecha y poscosecha de los frutos como en el caso de la granadilla donde Luz Melgarejo junto a su equipo de investigadores determinaron que el índice de sólidos solubles de granadilla aumentaba rápidamente hasta alcanzar la madurez comercial donde se mantuvieron en valores constantes por varios días, obteniendo como lecturas iniciales valores de 10.5 ° Brix en estadio de desarrollo y 13.3 ° Brix en estadio de maduración, valores que se mantuvieron por varios días de almacenamiento (Melgarejo, y

otros, 2015), lo cual nuevamente concuerda con los datos obtenidos en esta investigación, en el que se hallaron aumento de sólidos solubles expresados en grados Brix.

Tabla 16 Índice de sólidos solubles

Muestra	Estadío de madurez (Organoléptico)	Promedio Grados °BRIX	Desviación estándar
“Tumbo”	Desarrollo	10.1	0.1
	Madurez	12.4	0.1
	Sobre madurez	14.9	0.0578
“Granadilla”	Desarrollo	10.2	0.2
	Madurez	13.4	0.1528
	Sobre madurez	13.6	0.2646
“Maracuyá”	Desarrollo	7	0.2517
	Madurez	12.1	0.1732
	Sobre madurez	13	0.2309

FUENTE: Elaboración propia.

3.3.2 ÍNDICE DE ACIDEZ TITULABLE

Como se describió en el capítulo anterior, se realizó una disolución de zumo de cada fruto en agua, colocando 10 ml de zumo puro de cada especie en 100 ml de agua, depositados en frascos Erlenmeyer, luego se añadió 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N como se observa en la figura 22. Los gastos de solución de hidróxido de sodio y valores de índice de acidez titulable, son descritos en la tabla 17 de índice de acidez titulable según la fórmula de % acidez titulable expresado en gramos de ácido cítrico por 100 ml de muestra.

Los resultados obtenidos concuerdan con la bibliografía en la cual se indica que la acidez titulable conforme va pasando el tiempo disminuye en relación con la madurez del fruto (del Pilar Pinzón, Fischer, & Corredor, 2007), además los datos también concuerdan con los valores ofrecidos por las normas técnicas colombianas, donde los valores mínimos de acidez titulable para cada especie son 1.0 % para el caso de tumbo (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 1262, 1979), 0.4 % para el caso de Granadilla (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 4101, 1997) y 3.5 % para el caso de maracuyá (ICONTEC, NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 1267, 1979), además en relación con otros trabajos de investigación como Julio Aguilar quien reporto valores de % acidez titulable de 0.224 para sus muestras de granadilla, valor muy inferior al del obtenido en esta investigación (Aguilar, Espinoza, Cabanillas, Gómez, Valverde, & Benavides, 2014), cuyo valor mínimo de acidez titulable fue de 0.448, valor que si se encuentran relacionados con los hallados por Luz Melgarjo y su equipo, quienes reportaron valores entre 0.47 y 0.66 (Melgarejo, y otros, 2015), valores que se encuentran muy próximos a los reportados en esta investigación.

Tabla 17 Índice de acidez titulable

Muestras según su estadio de madurez organoléptico		Gasto NaOH 0.1 N	Promedio % Acidez titulable g de ácido cítrico / 100 ml	Desviación estándar
“Tumbo”	Desarrollo	3.7	2.36	0.0272
	Madurez	3.3	2.11	0.0225
	Sobre Madurez	2.6	1.66	0.0295
“Granadilla”	Desarrollo	1	0.64	0.0469
	Madurez	0.8	0.51	0.0165
	Sobre Madurez	0.7	0.45	0.0106
“Maracuyá”	Desarrollo	7.2	4.6	0.0816
	Madurez	6.8	4.35	0.2175
	Sobre Madurez	5.4	3.46	0.1093

FUENTE: Elaboración Propia

- **Formula de acidez titulable:**

$$\text{Acidez titulable} = \frac{\text{ml Na(OH)} \times \text{Normalidad} \times \text{factor del ácido en meq.}}{\text{ml. de Zumos}} \times 100$$

*factor de ácido cítrico = 0.064 meq.



Figura 22 Determinación de índice de acidez titulable

FUENTE: Elaboración propia

3.3.3 ÍNDICE DE MADUREZ

Este ensayo es utilizado en frutos con características organolépticas y fisicoquímicas en estadio de maduración comercial, con el fin de dilucidar que los frutos se encuentran en óptimas condiciones de consumo y venta al público general (Pássaro Carvalho & Londoño-Londoño, 2012), en esta investigación se utilizó este índice de maduración con el fin de determinar que los frutos analizados en la investigación se encontraban en distintos estados de maduración, encontrándose que la relación entre índice de sólidos solubles e índice de acidez titulable, arrojaron resultados de índice de maduración óptimos para la diferenciación de los estadios de maduración a estudiar siendo estos estadios: desarrollo, madurez y sobre madurez, los resultados luego de utilizar la fórmula de índice de maduración, son expresado en la tabla 18.

- **Formula de índice de maduración**

$$\text{Índice de maduración} = \frac{\% \text{ sólidos solubles (° Brix)}}{\% \text{ acidez titulable (g de ácido cítrico/100 ml)}}$$

Tabla 18 Índice de maduración

Muestra	Índice de maduración óptimo de consumo	Estadío de madurez (Organoléptico)	Promedio índice de maduración	Desviación estándar
“Tumbo”	6.1	Desarrollo	4.28	0.0153
		Madurez	5.87	0.2022
		Sobre madurez	8.95	0.0200
“Granadilla”	25	Desarrollo	15.93	0.0551
		Madurez	26.27	0.5813
		Sobre madurez	30.35	0.4258
“Maracuyá”	2.6	Desarrollo	1.52	0.0072
		Madurez	2.78	0.1137
		Sobre madurez	3.76	0.1419

FUENTE: Elaboración propia

Los datos obtenidos de sólidos solubles y acidez titulable correspondientes al estadío de maduración “madurez” obtenidos en esta investigación se encontraban dentro de los lineamientos de las normas técnicas colombianas por lo que el valor de índice de maduración es el adecuado para el estadío de maduración comercial, es decir, que las muestras de las tres especies se encuentran en el estadío adecuado de consumo por lo que valores inferiores a estos y por consecuencia mayores a estos se consideraran en diferentes estadío de maduración correspondiente a estadío de maduración en desarrollo y sobre maduración

correspondientemente, los datos fueron comparados entre especies como se puede observar en la figura 23.

En contraste con nuestra investigación vemos que los datos obtenidos concuerdan con los datos reportados por otros investigadores como Luz Melgarejo y su equipo de investigadores que reportaron datos de seis frutos de granadilla en diferentes estadios de maduración con el fin de determinar los cambios fisicoquímicos que sufren con el paso del tiempo siendo el índice inferior de 7.6 (fruto verde) y el mayor índice de 20 (fruto amarillo), con lo que indicaban que organolépticamente el fruto se encontraba en calidad de madurez comercial (Melgarejo, y otros, 2015), otra investigación llevada a cabo por Ingrid del Pilar, Fischer y Corredor, quienes estudiaron el efecto del tiempo sobre la maduración de maracuyá reportaron índices de maduración de 2.08 para el fruto en estadio de maduración en desarrollo y 4.34 en estadio de sobre maduración (del Pilar Pinzón, Fischer, & Corredor, 2007), datos que se asemejan a los obtenidos en esta investigación, con respecto al fruto tumbo comparamos nuestros datos con investigaciones como la llevada a cabo por Carlos Emilio Reina donde investigo el comportamiento del fruto después de la cosecha del mismo y durante el almacenaje encontrando que el valor de índice de maduración en varios frutos estadio de madurez comercial variaba entre 6.8 y 7.9, los cuales aumentaron con el paso del tiempo alcanzando valores de 8,5 en estadio de sobre maduración (Reina, 1995), datos que se asemejan a los obtenidos en nuestra investigación.

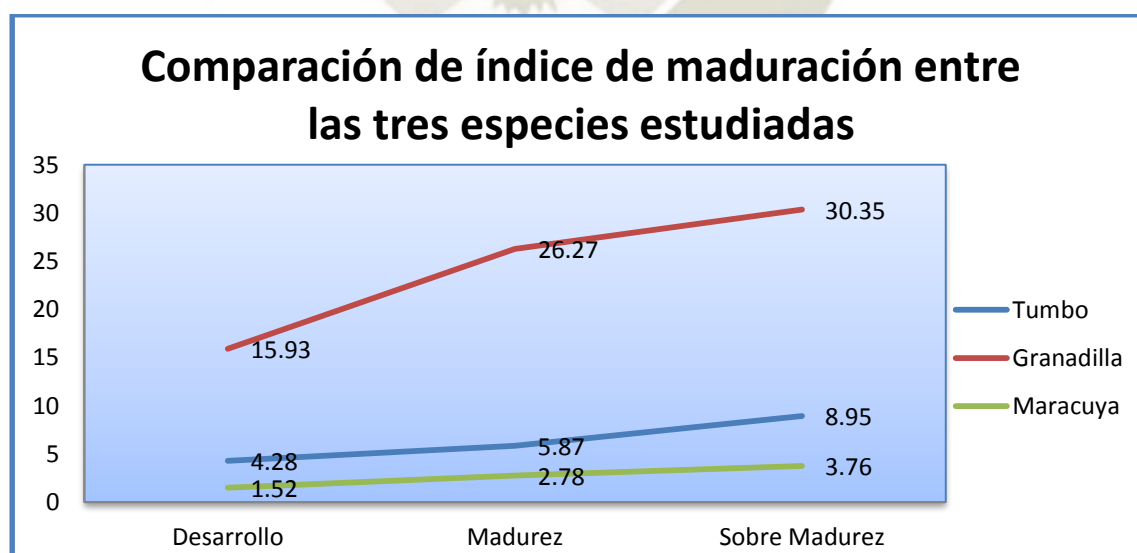


Figura 23 Comparación de índice de maduración entre las tres especies estudiadas

FUENTE: Elaboración propia.

3.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

3.4.1 MÉTODO CUPRAC

3.4.1.1 ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

En la elaboración de la curva de calibración se utilizó como reactivo antioxidante estándar ácido ascórbico, este estándar fue preparado a cinco concentraciones crecientes, de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 mM, estas concentraciones finales resultan de la adición de los reactivos que precisa el método, y cuyas concentraciones de dichos reactivos se señalaron en el capítulo II de la presente investigación, la tabla de concentraciones de estas diluciones – incluyendo el blanco se desarrolló también en ese apartado. Todas las soluciones fueron mezcladas y sometidas a agitación, posteriormente se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se realizaron las lecturas en orden de concentración de menor a mayor, este ensayo se realizó por triplicado y los resultados se muestran en la tabla 19 de curva de calibración.

Tabla 19 Resultados de la Curva de Calibración, método CUPRAC

N°	CC (mM)	Repeticiones			Promedio	Desviación Estándar	Dispersión relativa
		Abs 1	Abs 2	Abs 3			
1	0.01	0.143	0.143	0.147	0.1443	0.0023	1.6000
2	0.02	0.221	0.228	0.227	0.2253	0.0038	1.6802
3	0.04	0.407	0.401	0.408	0.4053	0.0038	0.9340
4	0.06	0.607	0.6	0.611	0.6060	0.0056	0.9188
5	0.08	0.847	0.838	0.844	0.8430	0.0046	0.5436

Fuente: Registro de Datos propios

Los resultados de la tabla 19, muestran una buena reproductibilidad de los datos para las cinco concentraciones de los estándares de ácido ascórbico, ya que para todos ellos se aprecia una desviación estándar baja que se refleja en una dispersión relativa inferior a 2%.

Los datos para la obtención de la ecuación de la recta, exige la realización de un análisis de regresión, este se realizó en el paquete estadístico SPSS.

Tabla 20 Resumen del Modelo de regresión

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	,998	,996	,994	.0218133

Fuente: Registro de Datos propios

La tabla 20 del resumen del modelo debido a que en nuestro modelo de estudio existe una sola variable independiente que es la concentración del estándar de ácido ascórbico y pocos casos, que son las absorbancias, el valor del R cuadrado ajustado y el coeficiente de determinación (R) toman valores similares ($0.994 \cong 0.996$). Por otra parte el coeficiente de correlación toma un valor de 0.998, lo que significa que el 99.8% de la variación o fluctuación en cuanto de las concentraciones de las absorbancias tienen explicación con la concentración de ácido ascórbico.

Tabla 21 Resumen del ANOVA

	Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
	Regresión	,323	1	,323	679,171	,000 ^b
1	Residuo	,001	3	,000		
	Total	,325	4			

Fuente: Registro de Datos propios

La tabla 21 del resumen del ANOVA, informa si existe o no relación significativa entre la variable independiente (concentraciones de ácido ascórbico) y la dependiente. El nivel crítico (Significancia) toma un valor de 0.000, por lo que se concluye que ambas variables están linealmente relacionadas.

Tabla 22 Coeficientes de Regresión

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
	B	Error estándar	Beta			
1	(Constante)	,028	,019		1,488	,233
	Concentración	9,926	,381	,998	26,061	,000

Fuente: Registro de Datos propios

La tabla 22 muestra los coeficientes de la recta de regresión. La columna que tiene como encabezado *Coeficientes no estandarizados* contiene los coeficientes de regresión parcial que definen la ecuación de regresión en puntuaciones directas.

El coeficiente no estandarizado correspondiente a la constante es el *origen* de la recta de regresión (B_0). Recibe el nombre de *constante*, porque según se verá, es la constante del modelo de regresión. Y el coeficiente no estandarizado correspondiente a *concentración* es la pendiente de la recta de regresión (B_1). Este último, indica el cambio medio que corresponde a la variable dependiente por cada unidad de cambio de la variable independiente. Según esto la ecuación de regresión de la recta se expresa de la siguiente manera.

$$y = 9.926 (x) + 0.028$$

Esta ecuación hallada mediante el programa estadístico SPSS, fue corroborada por la ecuación de la recta y su coeficiente de determinación, hallada mediante el generador de gráficos de Excel como se observa en la figura 24.

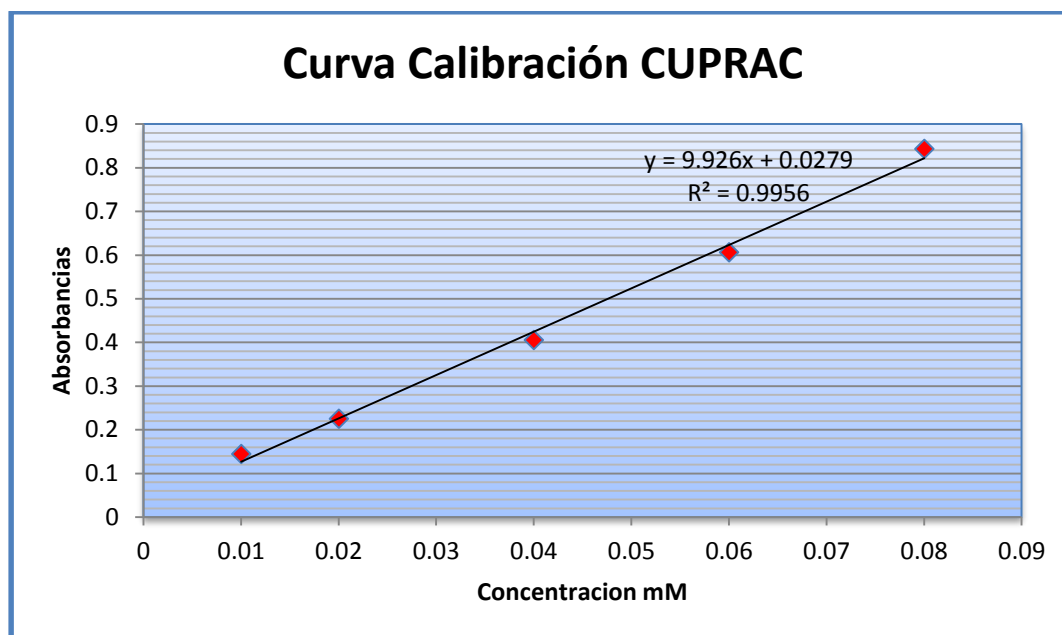


Figura 24 Curva calibración método CUPRAC

FUENTE: Elaboración propia.

Luego se determinó el límite de detección y el límite de cuantificación, calculando la concentración a un valor de 0. Reemplazando en la ecuación de la recta tenemos.

$$y = 9.926 (0) + 0.028$$

Entonces $Y_{bl} = 0.028$

Luego en el mismo programa Excel se elaboró la curva de calibración de concentraciones versus desviaciones estándar, en la ecuación de la recta para este análisis se reemplaza por la absorbancia con valor a 0.

$$y = 0.0338 (0) + 0.0026$$

Entonces $S_{bl} = 0.0026$

- **Límite de detección:**

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{5}}$$

Reemplazando en esta ecuación:

$$LDD = 0.0016 \text{ mM}$$

- **Límite de cuantificación:**

$$LDC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{5}}$$

Reemplazando en la ecuación tenemos que:

$$LDC = 0.0024 \text{ mM}$$

La curva de calibración con ácido ascórbico como estándar para la determinación de la capacidad antioxidante de la muestra presenta un límite de detección de 0.0016 mM y un límite de cuantificación de 0.0024 mM, por debajo de estas concentraciones halladas no son detectables ni cuantificables respectivamente, por el método descrito.

El ácido cítrico no es el único estándar que se puede usar como referencia para interpretar los datos de capacidad antioxidante por el método CUPRAC, existen varias opciones a esta como el ácido gálico que fue utilizado por Emille Flores para la creación de su curva de calibración en su investigación de capacidad antioxidante de alpechín, utilizando un gradiente de concentraciones de 2 ppm a 12.5 ppm de ácido gálico expresando sus resultados de capacidad antioxidante en gramos por litro (g/L) equivalentes de ácido gálico (Flores Rivera, 2014), otra opción ampliamente utilizada es TROLOX el cual es un análogo de la vitamina E y es utilizado para determinar la capacidad antioxidante en alimentos y bebidas, este compuesto cuenta con un análisis determinado TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) o ABTS, el cual al igual de CUPRAC es un método utilizado para medir la capacidad antioxidante (Apak R. , y otros, 2007), este compuesto como ya se mencionó se utiliza como referencia para expresar resultados de capacidad antioxidante como los resultados reportados por Apak Resat y su equipo de investigadores que estudiaron la capacidad antioxidante de algunos téis herbales, utilizando un gradiente de concentraciones de 0.01 mM a 0.125 mM de trolox para la creación de la curva de calibración con trolox y

expresando sus resultados en mM/g equivalentes a trolox (Apak, Güçlü, Özyürek, Karademir Çelik, & Erçağ, 2006).

3.4.1.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Se obtuvo el extracto de los tres frutos conforme al método descrito, posteriormente se tomó 1 ml de este extracto y se disolvió en 50 ml de etanol. Luego se trabajó considerando el procedimiento CUPRAC para la curva de calibración con ácido ascórbico, pero cambiando la solución de ácido ascórbico por la muestra diluida. Se trabajó con una alícuota de 0.1 ml de la solución alcohólica de la muestra. Este proceso se hizo para los tres frutos de passifloras (granadilla, tumbo y maracuyá) en tres estadios de crecimiento, que llamamos, desarrollo (al fruto “verde”), madurez comercial (al fruto comestible) y sobre madurez (al fruto en proceso inicial de marchitamiento); de cada uno se hizo una lectura por triplicado. La tabla 23 resume este tratamiento.

Tabla 23 Reactivos y sus cantidades para la evaluación antioxidante según el método CUPRAC

Reactantes	Estadio de desarrollo del fruto		
	Desarrollo	Madurez	Sobre madurez
Buffer acetato (ml)	1	1	1
Neocuproína (ml)	1	1	1
Cloruro cúprico (ml)	1	1	1
Muestra Extracto de Passiflora (ml)	0.1	0.1	0.1
Etanol (ml)	0.9	0.9	0.9

Fuente: Registro de Datos propios

3.4.1.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL TUMBO SEGÚN CUPRAC

Con las absorbancias halladas se calculó la concentración, utilizando la ecuación de la curva de calibración como se muestra en la tabla 24.

Por ejemplo, para la primera lectura del tumbo en desarrollo tenemos.

$$0.826 = 9.926x + 0.0279$$

Tabla 24 Concentraciones según la ecuación de la recta

Estadío	Absorbancias			Concentraciones mM		
	Lect. 1	Lect 2	Lect 3	CC1	CC2	CC3
Desarrollo	0.826	0.82	0.821	0.0804	0.0798	0.0799
Madurez	0.283	0.287	0.282	0.0257	0.0261	0.0256
Sobre madurez	0.217	0.215	0.21	0.0191	0.0189	0.0183

Fuente: Registro de Datos propios

Luego se determinó la concentración en la muestra considerando la dilución realizada de los zumos en alcohol a 50 ml de aforo. Siguiendo el ejemplo de la primera lectura tenemos:

$$C1 V1 = C2 V2$$

Donde reemplazamos con los datos obtenidos:

$$C2 = \frac{0.0804 \times 50}{1}$$

Los datos obtenidos luego de usar la formula previa se expresan en la tabla 25 de capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico.

Tabla 25 Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico según el estadío del tumbo

Estadío	Concentraciones mM			Promedio	D. Estándar	D. Relativa
	CC1	CC2	CC3			
Desarrollo	4.020	3.990	3.995	4.002	0.016	0.400
Madurez	1.285	1.305	1.280	1.290	0.013	1.008
Sobre madurez	0.955	0.945	0.915	0.938	0.021	2.239

Fuente: Registro de Datos propios

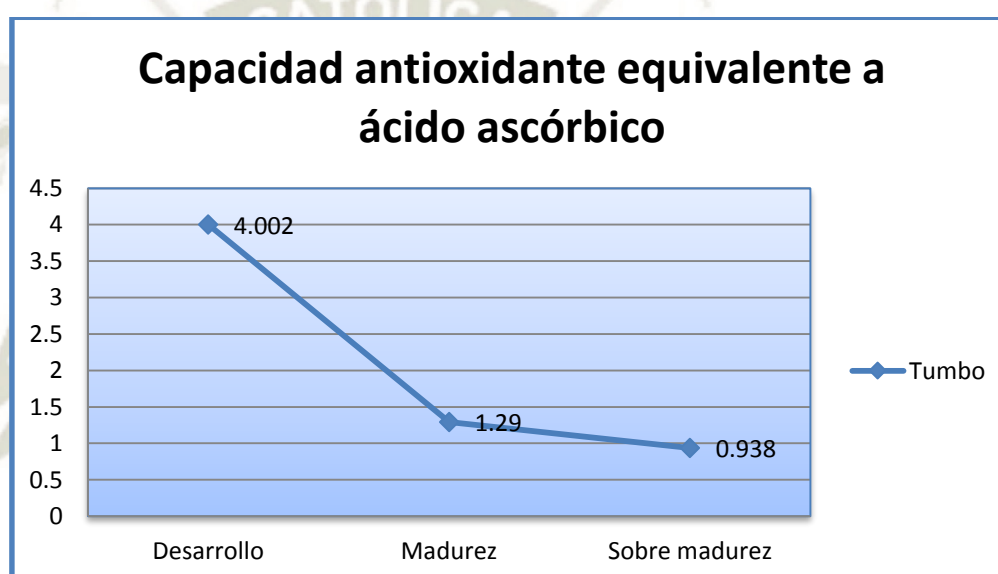


Figura 25 Capacidad antioxidante de tumbo expresado en mM de ácido ascórbico

FUENTE: Elaboración propia

La tabla 25 denota una buena reproductibilidad en las distintas mediciones según concentraciones, para los diferentes estadios de desarrollo del tumbo, esto debido a la dispersión relativa que tuvo como valor máximo de 2.239% en el caso del tumbo en estado de sobre madurez, la figura 25 representa de forma gráfica los resultados obtenidos.

La comparación que tiene por finalidad ver si existen similitudes o diferencias significativas entre los diferentes estadios de desarrollo del tumbo, fue realizada mediante el análisis estadístico conocido como ANOVA con su respectiva comparación múltiple o específica de Tukey.

La tabla 26 de resultados del ANOVA, presenta una significancia, que es menor al nivel aceptado de 0.05 por lo que deducimos que las capacidades antioxidantes equivalentes a ácido ascórbico de los diferentes tipos de tumbo, son diferentes.

La prueba de especificidad cuyos resultados se recogen en la tabla 27, indican que cada concentración según estadio es diferente una de la otra, por lo que deducimos que el tumbo en estado de desarrollo es el fruto que tiene mayor capacidad antioxidante.

Tabla 26 Anova para la comparación de las Concentraciones de ácido Ascórbico

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	16,861	2	8,430	29182,183	,000
Dentro de grupos	,002	6	,000		
Total	16,863	8			

Fuente: Registro de Datos propios

Tabla 27 Comparaciones específicas (Tukey) de las Concentraciones de ácido Ascórbico

Estadío	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Sobre Madurez	3	.93833		
Madurez	3		1.29000	
Desarrollo	3			4.00167
Sig.		1,000	1,000	1,000

Fuente: Registro de Datos propios

3.4.1.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA GRANADILLA SEGÚN CUPRAC

Con las absorbancias halladas se calculó la concentración, utilizando la ecuación de la curva de calibración como se muestra en la tabla 28, siguiendo el ejemplo del ensayo de capacidad antioxidante de tumbo.

Tabla 28 Concentraciones según la ecuación de la recta

Estadío	Absorbancias			Concentraciones mM		
	Lect. 1	Lect 2	Lect 3	CC1	CC2	CC3
Desarrollo	0.215	0.217	0.213	0.019	0.019	0.019
Madurez	0.268	0.267	0.263	0.024	0.024	0.024
Sobre madurez	0.232	0.234	0.226	0.021	0.021	0.020

Fuente: Registro de Datos propios

Así mismo se realiza el cálculo de capacidad antioxidante siguiendo el ejemplo de la formula desarrollada en el ensayo de tumbo, los datos obtenidos luego de usar la formula previa se expresan en la tabla 29 de capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico.

Tabla 29 Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico según el estadío de Granadilla

Estadío	Concentraciones mM			Promedio	Desviación Estándar	Desviación Relativa
	CC1	CC2	CC3			
Desarrollo	0.945	0.955	0.930	0.943	0.013	1.379
Madurez	1.210	1.205	1.185	1.200	0.013	1.083
Sobre madurez	1.030	1.040	1.000	1.023	0.021	2.053

Fuente: Registro de Datos propios

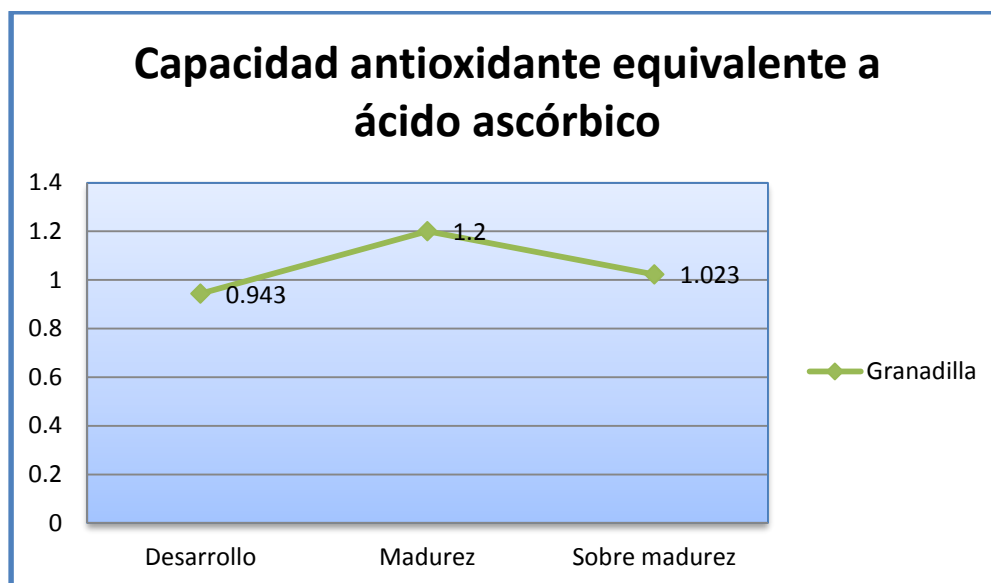


Figura 26 Capacidad antioxidante de granadilla expresado en mM de ácido ascórbico

FUENTE: Elaboración propia

La tabla 29 denota una buena reproductibilidad en las distintas mediciones según concentraciones, para los diferentes estadios de desarrollo de la granadilla, esto debido a la dispersión relativa que tuvo como valor máximo de 2.053% en el caso de la granadilla en estado de sobre madurez, la figura 26 representa de forma gráfica los resultados obtenidos.

La tabla de resultados 30 del ANOVA, presenta una significancia, que es menor al nivel aceptado de 0.05 por lo que deducimos que las capacidades antioxidantes equivalentes a ácido ascórbico de los diferentes tipos de granadilla, son diferentes.

La prueba de especificidad cuyos resultados se recogen en la tabla 31, indican que cada concentración según estadio es diferente una de la otra, por lo que deducimos que la granadilla en estado de madurez es el fruto según estadio de este vegetal que tiene mayor capacidad antioxidante.

Tabla 30 Anova para la comparación de las Concentraciones de ácido Ascórbico

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,103	2	,052	202,478	,000
Dentro de grupos	,002	6	,000		

Total	,105	8
--------------	------	---

Fuente: Registro de Datos propios

Tabla 31 Comparaciones específicas (Tukey) de las Concentraciones de ácido Ascórbico

Estadío	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
Desarrollo	3	.94333		
Sobre Madurez	3		1.02333	
Madurez	3			1.20000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Fuente: Registro de Datos propios

3.4.1.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL MARACUYA SEGÚN CUPRAC

Con las absorbancias halladas se calculó la concentración, utilizando la ecuación de la curva de calibración como se muestra en la tabla 32, siguiendo el ejemplo del ensayo de capacidad antioxidante de tumbo.

Tabla 32 Concentraciones según la ecuación de la recta

Estadío	Absorbancias			Concentraciones mM		
	Lect. 1	Lect 2	Lect 3	CC1	CC2	CC3
Desarrollo	0.361	0.366	0.359	0.034	0.034	0.033
Madurez	0.534	0.539	0.532	0.051	0.052	0.051
Sobre madurez	0.437	0.439	0.432	0.041	0.041	0.041

Fuente: Registro de Datos propios

Así mismo se realiza el cálculo de capacidad antioxidante siguiendo el ejemplo de la formula desarrollada en el ensayo de tumbo, los datos obtenidos luego usar la formula previa se expresan en la tabla 33 de capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico.

Tabla 33 Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico según el estadio del Maracuyá

Estadío	Concentraciones mM			Promedio	D. Estándar	D. Relativa
	CC1	CC2	CC3			
Desarrollo	1.680	1.705	1.670	1.685	0.018	1.068
Madurez	2.550	2.575	2.540	2.555	0.018	0.705
Sobre madurez	2.060	2.070	2.035	2.055	0.018	0.876

Fuente: Registro de Datos propios

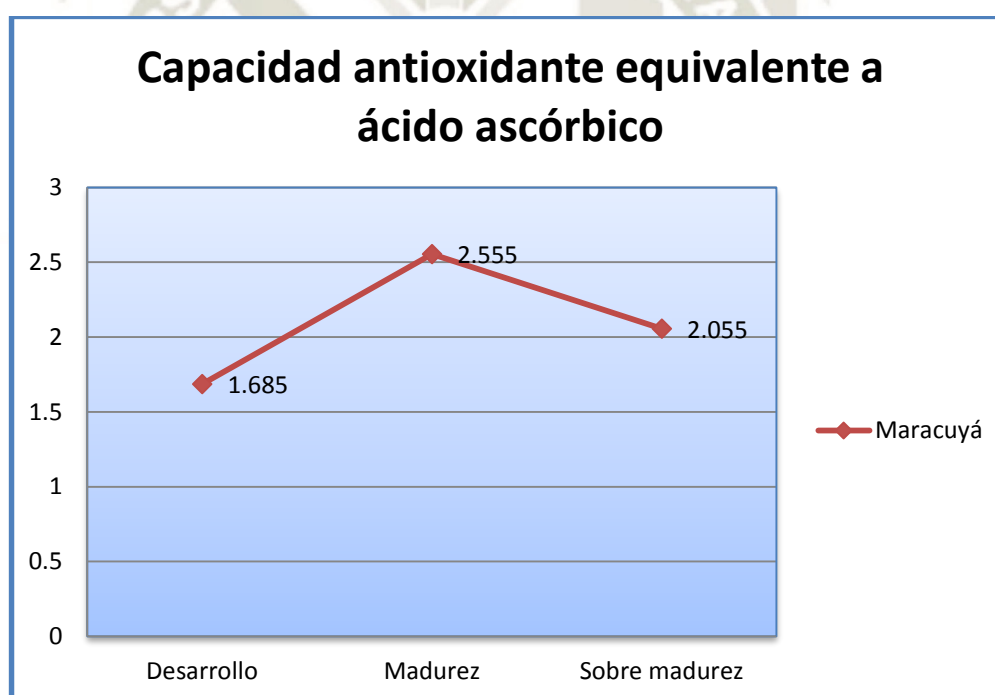


Figura 27 Capacidad antioxidante de maracuyá expresado en mM de ácido ascórbico

FUENTE: Elaboración propia

La tabla 33 denota una buena reproductibilidad en las distintas mediciones según concentraciones, para los diferentes estadios de desarrollo de la maracuyá, esto debido a la

dispersión relativa que tuvo como valor máximo de 1.068% en el caso del maracuyá en estado de desarrollo, la figura 27 representa de forma gráfica los resultados obtenidos.

La tabla de resultados 34 del ANOVA, presenta una significancia, que es menor al nivel aceptado de 0.05 por lo que deducimos que las capacidades antioxidantes equivalentes a ácido ascórbico de los diferentes tipos de maracuyá, son diferentes. La prueba de especificidad cuyos resultados se recogen en la tabla 35, indican que cada concentración según estadio es diferente una de la otra, por lo que deducimos el maracuyá en estado de madurez es el fruto según estadio de este vegetal que tiene mayor capacidad antioxidante.

Tabla 34 Anova para la comparación de las Concentraciones de ácido Ascórbico

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,144	2	,572	1759,692	,000
Dentro de grupos	,002	6	,000		
Total	1,146	8			

Fuente: Registro de Datos propios

Tabla 35 Comparaciones específicas (Tukey) de las Concentraciones de ácido Ascórbico

Estadío	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Desarrollo	3	1.68500		
Sobre Madurez	3		2.05500	
Madurez	3			2.55500
Sig.		1,000	1,000	1,000

Fuente: Registro de Datos propios

3.4.1.6 COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ENTRE LAS TRES ESPECIES DE PASSIFLORA SEGÚN CUPRAC

Para la comparación de la capacidad antioxidante entre las tres especies estudiadas considerando el estadio de maduración fue imprescindible aplicar un análisis estadístico tipo ANOVA modelo de dos factores, ya que nuestro estudio se trata de un diseño que considera dos factores, un factor denominado entre sujetos (que para nuestro estudio son los tres frutos de especies distintas) con tres niveles (fruto 1 o tumbo, fruto 2 o granadilla y fruto 3 o maracuyá); y un factor dentro de sujetos (que para nuestro estudio denominados los estadios de desarrollo) también con tres niveles (desarrollo, madurez y sobre madurez). Como variable dependiente tenemos las concentraciones de ácido ascórbico finales halladas.

Tabla 36 Contrastes Multivariados

	Efecto	Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error	Sig.
Estadio	Traza de Pillai	1,000	18682,827 ^b	2,000	5,000	,000
	Lambda de Wilks	,000	18682,827 ^b	2,000	5,000	,000
	Traza de Hotelling	7473,131	18682,827 ^b	2,000	5,000	,000
	Raíz mayor de Roy	7473,131	18682,827 ^b	2,000	5,000	,000
* Fruto	Traza de Pillai	1,993	866,238	4,000	12,000	,000
	Lambda de Wilks	,000	4890,472 ^b	4,000	10,000	,000
	Traza de Hotelling	26439,004	26439,004	4,000	8,000	,000
	Raíz mayor de Roy	26294,328	78882,984 ^c	2,000	6,000	,000

Fuente: Registro de Datos propios

La primera tabla de resultados que según el modelo de ANOVA de dos factores presenta el paquete estadístico SPSS, es el de contrastes multivariados, tabla 36, esta tabla ofrece cuatro

estadísticos para poner a prueba cada una de las hipótesis nulas de interés en este diseño, y todos se interpretan de la misma manera.

En primer lugar puesto que el nivel crítico (Significancia =0.000) asociado al factor *estadio* es menor que 0.05 se puede rechazar la hipótesis de nulidad de igualdad de medias referida a ese factor y, por tanto, concluir que la concentración de ácido ascórbico no es la misma en cada estadio considerado para el desarrollo del fruto.

En la segunda línea se observa los resultados de la interacción *Fruto * estadio*, puesto que el nivel crítico (Sig=0.000) asociado es menor que 0.05 se rechaza la hipótesis de nulidad y se asume que las concentraciones de ácido ascórbico son diferentes, considerando dicha interacción.

Tabla 37 Contrastes de esfericidad de Mauchly

Efecto inter sujetos	W de Mauchly	Aprox.Chi- cuadrado	gl	Sig.	Épsilon ^b		
					Greenhouse- Geisser	Huynh- Feldt	Límite inferior
Estadio	,941	,302	2	,860	,945	1,000	,500

Fuente: Registro de Datos propios

La tabla 37 ofrece el estadístico W de Mauchly para contrastar la hipótesis de esfericidad, puestos que el nivel crítico (significancia) asociado al estadístico es mayor que 0.05 puede asumirse que las varianzas son esféricas, por lo que debemos basar nuestras decisiones sobre los efectos dentro de sujetos en la aproximación univariada, y no en la multivariada, ya que en condiciones de esfericidad la aproximación univariada, según se ha dicho, es más potente que la multivariada (particularmente con tamaños muestrales pequeños).

La tabla 38 muestra los estadísticos univariados referidos a los efectos dentro de sujetos. La información relativa al efecto individual *estadio* es consistente con la aproximación univariada de la tabla anterior, tanto como si se asume esfericidad como si no asumiéndola; y siendo Significancia < 0.05 se rechaza la hipótesis nulidad en cuanto a este efecto.

En lo referente al efecto de la interacción *estadio * fruto*, tanto si se asume esfericidad como si se aplica cualquiera de las estimaciones debajo, se obtienen niveles críticos por debajo de 0.05; por lo que puede concluirse que existe efecto significativo de la interacción, es decir bajo una aproximación univariada existe diferencias significativas de las concentraciones de ácido ascórbico en los distintos estadios de crecimiento para los distintos frutos, por lo tanto, para poder interpretar el efecto de la interacción es necesario llevar a cabo Comparaciones múltiples para los efectos simples.

Tabla 38 Efectos dentro de sujetos (o frutos para nuestro estudio)

	Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Estadio	Esfericidad asumida	3,466	2	1,733	18441,941	,000
	Greenhouse-Geisser	3,466	1,889	1,835	18441,941	,000
	Huynh-Feldt	3,466	2,000	1,733	18441,941	,000
	Límite inferior	3,466	1,000	3,466	18441,941	,000
Estadio * Fruto	Esfericidad asumida	14,642	4	3,660	38948,374	,000
	Greenhouse-Geisser	14,642	3,778	3,875	38948,374	,000
	Huynh-Feldt	14,642	4,000	3,660	38948,374	,000
	Límite inferior	14,642	2,000	7,321	38948,374	,000
Error Estadio	Esfericidad asumida	,001	12	9,398E-5		
	Greenhouse-Geisser	,001	11,335	9,949E-5		
	Huynh-Feldt	,001	12,000	9,398E-5		
	Límite inferior	,001	6,000	,000		

Fuente: Registro de Datos propios

La tabla de resultados de Anova y Test de Tukey, generados por el paquete estadístico SPSS, denota en la tabla 39 que la significancia es menor que 0.05, por lo que se asume que la

capacidad antioxidante de los distintos frutos en cuanto a estadio de desarrollo, son diferentes.

La prueba de especificidad de Tukey (tabla 40) señala que el fruto del tumbo junto al fruto del maracuyá son los que presentan mayor capacidad antioxidante, ya que son claramente diferentes del fruto de granadilla, a diferencia de los análisis estadísticos realizados individualmente donde tumbo tuvo capacidad antioxidante mayor en el estadio de desarrollo, en este estudio multivariable se considera la totalidad de los estadios de maduración, por lo que no existe diferencia entre maracuyá y tumbo.

Tabla 39 ANOVA de dos factores para el método CUPRAC

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	82,076	1	82,076	120437,806	,000
Fruto	6,392	2	3,196	4689,466	,000
Error	,004	6	,001		

Fuente: Registro de Datos propios

Tabla 40 Test de Tukey de dos factores para el método CUPRAC

Fruto	N	Subconjunto	
		1	2
Granadilla	3	1.0556	
Tumbo	3		2.0767
Maracuyá	3		2.0983
Sig.		1,000	,260

Fuente: Registro de Datos propios

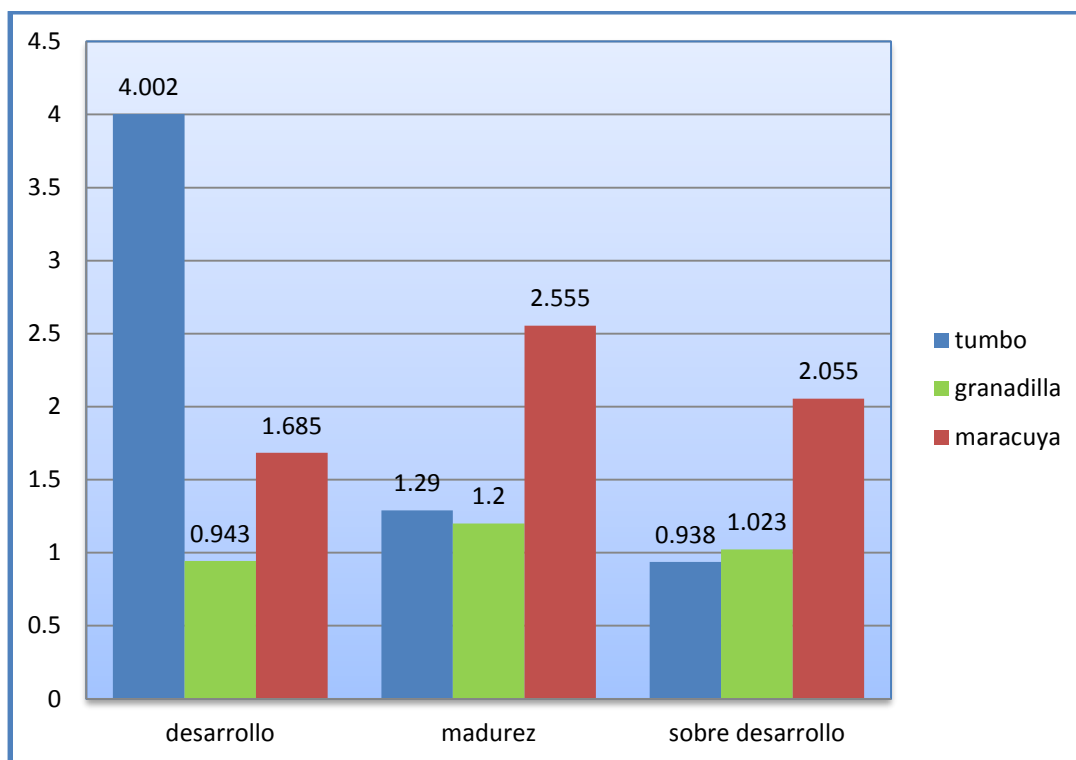


Figura 28 Relación de capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico entre las tres especies según su estadío de madurez

FUENTE: Elaboración propia

Recopilando los datos obtenidos por nuestra investigación de capacidad antioxidante mediante el método CUPRAC demostró que en el análisis individual de cada estadío de maduración para cada muestra existe diferencia entre los datos como puede observarse en la figura 28, resultando que el estadío de maduración en desarrollo del tumbo presenta mayor capacidad antioxidante que maracuyá y granadilla, sin embargo en los estadíos de maduración y sobre maduración el fruto de la maracuyá presenta mayor capacidad antioxidante que sus contrapartes en ambos estadíos y el estudio de dos variables correspondiente a la comparación de los tres frutos con respecto a su estadío de maduración y su capacidad antioxidante en sus tres estadíos de maduración, demostró que no existe diferencia significativa entre la capacidad antioxidante de tumbo y maracuyá englobando los datos en su totalidad, es decir, que englobando los resultados de los tres estadíos y su capacidad antioxidante no representan en conjunto una diferencia significativa entre ambas, pero si existe diferencia con el fruto de la granadilla.

3.4.2 MÉTODO DPPH

3.4.2.1 ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

La elaboración de la curva de calibración para el método DPPH también utilizó como reactivo antioxidante estándar ácido ascórbico, este estándar fue preparado según VCEAC (vitamin C equivalent antioxidant capacity) concentraciones equivalentes de ácido ascórbico de mg/100 ml, las concentraciones fueron 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/100 ml, estas concentraciones finales resultan de la adición de los reactivos que precisa este método, y cuyas concentraciones de dichos reactivos se señalaron en la sección Metodológica de la presente investigación, la tabla de concentraciones de estas diluciones – incluyendo el blanco se desarrolló también en ese apartado. Todas las soluciones fueron mezcladas y sometidas a agitación, posteriormente se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se realizaron las lecturas por triplicado, los resultados a continuación

Tabla 41 Resultados de la Curva de Calibración, método DPPH

N°	CC (mg /100 ml)	Repeticiones			Promedio	Desviación Estándar	Dispersión relativa
		Abs 1	Abs 2	Abs 3			
1	0.1	0.693	0.678	0.684	0.6853	0.0075	1.0944
2	0.2	0.596	0.584	0.587	0.5897	0.006	1.0175
3	0.3	0.473	0.46	0.481	0.468	0.007	1.4957
4	0.4	0.369	0.373	0.383	0.3723	0.0031	0.8327
5	0.5	0.261	0.265	0.247	0.261	0.004	1.5326

Fuente: Registro de Datos propios

Los resultados la tabla 41, muestran una buena reproductibilidad de los datos para las cinco concentraciones de los estándares de ácido ascórbico, ya que para todos ellos se aprecia una desviación estándar baja que se refleja en una dispersión relativa inferior a 1.49%.

Los datos para la obtención de la ecuación de la recta, exige la realización de un análisis de regresión, este se realizó en el paquete estadístico SPSS.

Tabla 42 Resumen del Modelo de regresión

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	,999	,999	,998	.0067954

Fuente: Registro de Datos propios

La tabla 42 del resumen del modelo debido a que en nuestro modelo de estudio existe una sola variable independiente que es la concentración del estándar de ácido ascórbico y pocos casos, que son las absorbancias, el valor del R cuadrado ajustado y el coeficiente de determinación (R) toman valores similares ($0.998 \cong 0.999$). Por otra parte, el coeficiente de correlación toma un valor de 0.999, lo que significa que el 99.9% de la variación o fluctuación en cuanto de las concentraciones de las absorbancias tienen explicación con la concentración de ácido ascórbico.

Tabla 43 Resumen del ANOVA

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1 Regresión	,114	2460,852	,000 ^b	,114	,000
1 Residuo	,000			,000	
Total					

Fuente: Registro de Datos propios

La tabla 43 del resumen del ANOVA, informa si existe o no relación significativa entre la variable independiente (concentraciones de ácido ascórbico) y la dependiente. El nivel crítico (significancia) toma un valor de 0.000, por lo que se concluye que ambas variables están linealmente relacionadas.

Tabla 44 Coeficientes de Regresión

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
	B	Error estándar	Beta			
1	(Constante)	,795	,007		111,555	,000
	Concentración	-1,066	,021	-,999	-49,607	,000

Fuente: Registro de Datos propios

La tabla 44 muestra los coeficientes de la recta de regresión. Según estos resultados ubicados en la columna de coeficientes no estandarizados la ecuación de regresión de la recta se expresa de la siguiente manera.

$$y = -1.066 (x) + 0.7951$$

Esta ecuación hallada mediante el programa estadístico SPSS, fue corroborada por la ecuación de la recta y su coeficiente de determinación, hallada mediante el generador de gráficos de Excel, como se puede observar en la figura 29.

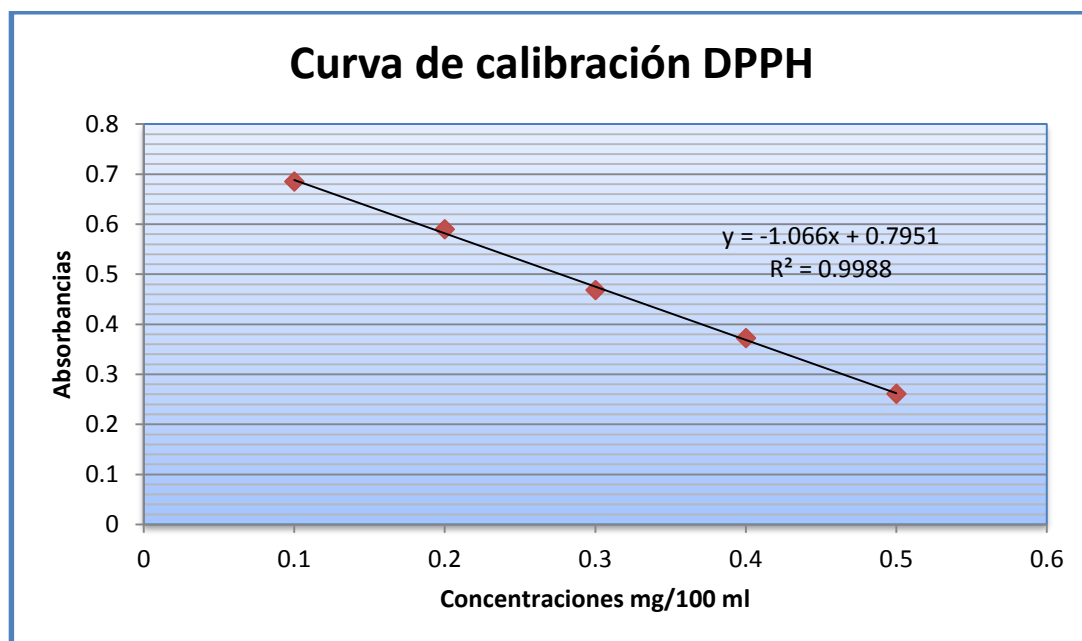


Figura 29 Curva de calibración método DPPH

FUENTE: Elaboración propia

Luego se determinó el límite de detección y el límite de cuantificación, calculando la concentración a un valor de 0. Reemplazando en la ecuación de la recta tenemos.

$$y = -1.066 (0) + 0.795$$

Entonces $Y_{bl} = 0.795$

Luego en el mismo programa Excel se elaboró la curva de calibración de concentraciones versus desviaciones estándar, en la ecuación de la recta para este análisis se reemplaza por la absorbancia con valor a 0.

$$y = 0.001 (0) + 0.0085$$

Entonces $S_{bl} = 0.0085$

Límite de detección:

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{5}}$$

Reemplazando en esta ecuación:

$$LDD = 0.344 \text{ mg/100 ml}$$

Límite de cuantificación:

$$LDC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{5}}$$

Reemplazando en la ecuación tenemos que:

$$LDC = 0.369 \text{ mg/ 100 ml}$$

La curva de calibración con ácido ascórbico como estándar para la determinación de la capacidad antioxidante de la muestra presenta un límite de detección de 0.344 mg/100 ml y un límite de cuantificación de 0.369 mg/ 100 ml, por debajo de estas concentraciones halladas no son detectables ni cuantificables respectivamente, por el método descrito.

3.4.2.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Se obtuvo el extracto de los tres frutos conforme al método descrito, posteriormente, se tomó 1 ml de este extracto y se disolvió en 50 ml de etanol.

Luego se añadió considerando el procedimiento DPPH para la curva de calibración con ácido ascórbico, pero cambiando la solución de ácido ascórbico por la muestra. Se trabajó con una alícuota de 0.1 ml de la solución alcohólica de la muestra a distintas concentraciones. Este proceso se hizo para los tres frutos de passifloras (granadilla, tumbo y maracuyá) en sus tres estadios de desarrollo. La tabla 45 resume este tratamiento.

Tabla 45 Reactivos y sus cantidades para la evaluación antioxidante según el método DPPH

Reactantes	Estadío de desarrollo del fruto		
	Desarrollo	Madurez	Sobre madurez
DPPH (ml)	2.9	2.9	2.9
Muestra Extracto de Pasíflora (ml)	0.1	0.1	0.1

Fuente: Registro de Datos propios

3.4.2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL TUMBO SEGÚN DPPH

Con las absorbancias halladas se calculó la concentración, utilizando la ecuación de la curva de calibración como se ve en la tabla 46. Por ejemplo, para la primera lectura del tumbo en madurez tenemos.

$$0.150 = -1.066x + 0.7951$$

Tabla 46 Capacidad de captación de radicales equivalentes a ácido ascórbico según la ecuación de la recta

Estadío	Absorbancias			Concentraciones mg/ 100 ml		
	Lect. 1	Lect 2	Lect 3	CC1	CC2	CC3
Desarrollo	0.150	0.131	0.141	0.610	0.620	0.610
Madurez	0.350	0.349	0.366	0.420	0.418	0.403
Sobre madurez	0.339	0.327	0.333	0.428	0.439	0.434

Fuente: Registro de Datos propios

Luego se determinó el porcentaje de inhibición según la siguiente ecuación como se puede observar en la tabla 47:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Abs } M}{\text{Abs } B}\right) * 100$$

Donde:

Abs M= Absorbancia de la muestra

Abs B= Absorbancia del blanco = 1.225

Tabla 47 Porcentaje de inhibición según el estadio del tumbo

Estadio	% Inhibición			Promedio	Desviación Estándar	Desviación Relativa
	Lect. 1	Lect 2	Lect 3			
Desarrollo	87.755	89.306	88.490	88.517	0.776	0.877
Madurez	71.429	71.510	70.122	71.020	0.779	1.097
Sobre madurez	72.327	73.306	72.816	72.816	0.490	0.673

Fuente: Registro de Datos propios

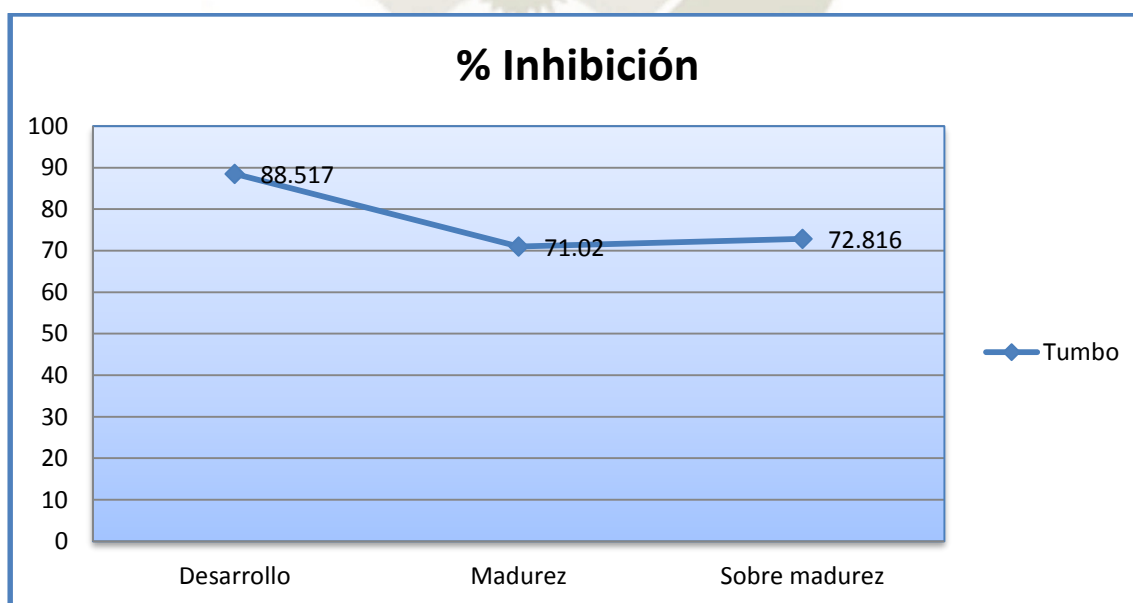


Figura 30 Gráfica de %Inhibición de tumbo

FUENTE: Elaboración propia

La tabla 47 denota una buena reproductibilidad en las distintas mediciones según concentraciones, para los diferentes estadios de desarrollo del tumbo, esto debido a la dispersión relativa que tuvo como valor máximo de 1.097% en el caso del tumbo en estado de madurez, la figura 30 representa de forma gráfica los resultados obtenidos.

La tabla 48 de resultados del ANOVA, presenta una significancia, que es menor al nivel aceptado de 0.05 por lo que deducimos que los porcentajes de inhibición de los diferentes tipos de tumbo, son diferentes. La prueba de especificidad cuyos resultados se recogen en la tabla 49, indican que cada concentración según estadio es diferente una de la otra, por lo que deducimos que el tumbo en estado de desarrollo es el fruto que tiene mayor capacidad antioxidante.

Tabla 48 Anova para la comparación de los Porcentajes de Inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	555,870	2	277,935	575,653	,000
Dentro de grupos	2,897	6	,483		
Total	558,767	8			

Fuente: Registro de Datos propios

Tabla 49 Comparaciones específicas (Tukey) de los Porcentajes de Inhibición

Estadio	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Madurez	3	71.02033		
Sobre Madurez	3		72.81633	
Desarrollo	3			88.51700
Sig.		1,000	1,000	1,000

Fuente: Registro de Datos propios

3.4.2.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA GRANADILLA SEGÚN DPPH

Con las absorbancias halladas se calculó la concentración, utilizando la ecuación de la curva de calibración como se ve en la tabla 50, siguiendo el ejemplo del ensayo de capacidad de captación de radicales libres de tumbo.

Tabla 50 Capacidad de captación de radicales equivalentes a ácido ascórbico según la ecuación de la recta

Estadío	Absorbancias			Concentraciones mg/ 100 ml		
	Lect. 1	Lect 2	Lect 3	CC1	CC2	CC3
Desarrollo	0.697	0.677	0.689	0.092	0.111	0.100
Madurez	0.657	0.654	0.651	0.130	0.132	0.135
Sobre madurez	0.670	0.679	0.673	0.117	0.109	0.115

Fuente: Registro de Datos propios

Así mismo se realiza el cálculo de capacidad antioxidante siguiendo el ejemplo de la formula desarrollada en el ensayo de tumbo, los datos obtenidos luego usar la formula previa se expresan en la tabla 51 de Porcentajes de inhibición según la el estadío de desarrollo Granadilla.

Tabla 51 Porcentajes de inhibición según la el estadío de desarrollo Granadilla

Estadío	Concentraciones mM			Promedio	Desviación Estándar	Desviación Relativa
	CC1	CC2	CC3			
Desarrollo	43.102	44.735	43.755	43.864	0.822	1.874
Madurez	46.367	46.612	46.857	46.612	0.245	0.526
Sobre madurez	45.306	44.571	45.061	44.979	0.374	0.832

Fuente: Registro de Datos propios

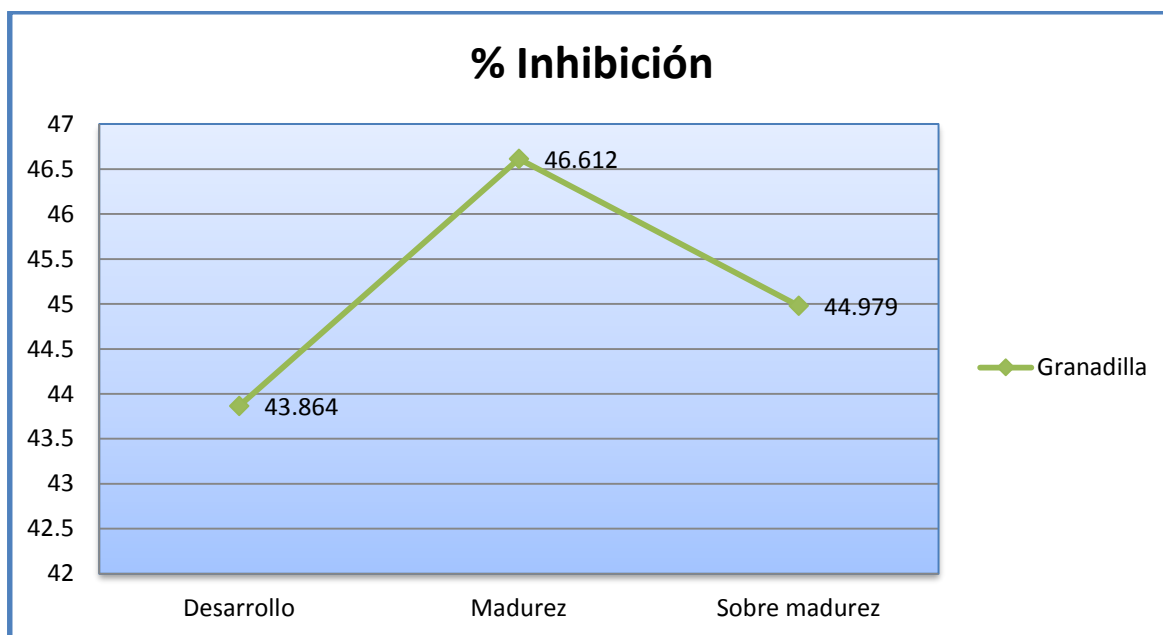


Figura 31 Gráfica de %Inhibición de granadilla

FUENTE: Elaboración propia

La tabla 51 denota una buena reproductibilidad en las distintas mediciones según porcentajes de inhibición, para los diferentes estadíos de desarrollo de la granadilla, esto debido a la dispersión relativa que tuvo como valor máximo de 1.874 % en el caso de la granadilla en estado de desarrollo, la figura 31 representa de forma gráfica los resultados obtenidos.

La tabla de resultados 52 del ANOVA, presenta una significancia, que es menor al nivel aceptado de 0.05 por lo que deducimos que los porcentajes de inhibición de los diferentes tipos de granadilla, son diferentes.

La prueba de especificidad cuyos resultados se recogen en la tabla 53, indican que cada porcentaje de inhibición según estadío es diferente una de la otra, por lo que deducimos que la granadilla en estado de madurez es el fruto según estadío de este vegetal que tiene mayor capacidad antioxidante.

Por su parte y considerando ambos factores no hay diferencias significativas en los porcentajes de inhibición entre el fruto en desarrollo y el fruto con sobre madurez.

Tabla 52 Anova para la comparación de los Porcentajes de Inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11,461	2	5,731	19,633	,002
Dentro de grupos	1,751	6	,292		
Total	13,212	8			

Fuente: Registro de Datos propios

Tabla 53 Comparaciones específicas (Tukey) de los Porcentajes de inhibición

Estadío	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Desarrollo	3	43.86400	
Sobre Madurez	3	44.97933	
Madurez	3		46.61200
Sig.		,098	1,000

Fuente: Registro de Datos propios

3.4.2.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL MARACUYA SEGÚN DPPH

Con las absorbancias halladas se calculó la concentración, utilizando la ecuación de la curva de calibración como se ve en la tabla 54, siguiendo el ejemplo del ensayo de capacidad de captación de radicales libres de tumbo.

Tabla 54 Capacidad de captación de radicales equivalentes a ácido ascórbico según la ecuación de la recta

Estadío	Absorbancias			Concentraciones mM		
	Lect. 1	Lect 2	Lect 3	CC1	CC2	CC3
Desarrollo	0.586	0.575	0.581	0.196	0.206	0.201
Madurez	0.481	0.485	0.484	0.295	0.291	0.292
Sobre madurez	0.657	0.654	0.651	0.130	0.132	0.135

Fuente: Registro de Datos propios

Así mismo se realiza el cálculo de capacidad antioxidante siguiendo el ejemplo de la formula desarrollada en el ensayo de tumbo, los datos obtenidos luego usar la formula previa se expresan en la tabla 55.

Tabla 55 Porcentajes de Inhibición según el estadío de desarrollo para el Maracuyá

Estadío	Concentraciones mM			Promedio	Desviación Estándar	Desviación Relativa
	CC1	CC2	CC3			
Desarrollo	52.163	53.061	52.571	52.598	0.450	0.856
Madurez	60.735	60.408	60.490	60.544	0.170	0.281
Sobre madurez	46.367	46.612	46.857	46.612	0.245	0.526

Fuente: Registro de Datos propios

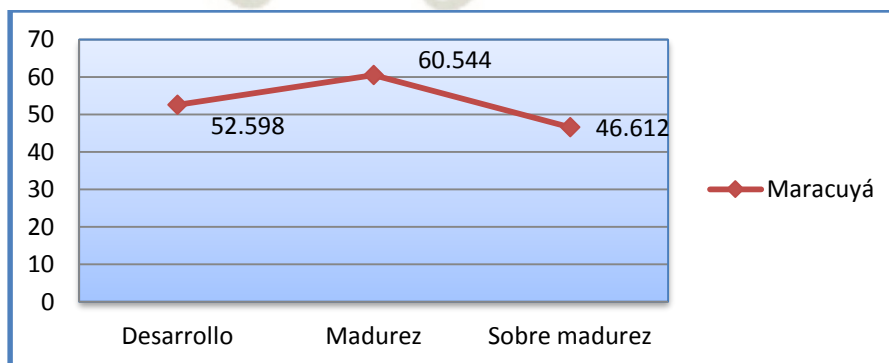


Figura 32 Gráfica de %Inhibición de maracuyá

FUENTE: Elaboración Propia

La tabla 55 denota una buena reproductibilidad en las distintas mediciones según porcentajes de inhibición, para los diferentes estadios de desarrollo del maracuyá, esto debido a la dispersión relativa que tuvo como valor máximo de 0.856% en el caso del maracuyá en estado de desarrollo, la figura 32 representa de forma gráfica los resultados obtenidos.

La tabla de resultados 56 del ANOVA, presenta una significancia, que es menor al nivel aceptado de 0.05 por lo que deducimos que los porcentajes de inhibición de los diferentes tipos de maracuyá, son diferentes. La prueba de especificidad cuyos resultados se recogen en la tabla 57, indican que cada porcentaje de inhibición según estadio es diferente una de la otra, por lo que deducimos el maracuyá en estado de madurez es el fruto según estadio de este vegetal que tiene mayor capacidad antioxidante.

Tabla 56 Anova para la comparación de los Porcentajes de inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	293,085	2	146,543	1510,059	,000
Dentro de grupos	,582	6	,097		
Total	293,667	8			

Fuente: Registro de Datos propios

Tabla 57 Comparaciones específicas (Tukey) de los Porcentajes de inhibición

Estadio	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Sobre Madurez	3	46.61200		
Desarrollo	3		52.59833	
Madurez	3			60.54433
Sig.		1,000	1,000	1,000

Fuente: Registro de Datos propios

3.4.2.6 COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ENTRE LAS TRES ESPECIES DE PASSIFLORA SEGÚN DPPH

Para la comparación de la capacidad antioxidante entre las tres especies estudiadas considerando el estadio de maduración fue imprescindible aplicar un análisis estadístico tipo ANOVA modelo de dos factores, ya que nuestro estudio se trata de un diseño que considera dos factores, un factor denominado entre sujetos (que para nuestro estudio son los tres frutos de especies distintas) con tres niveles (fruto 1 o tumbo, fruto 2 o granadilla y fruto 3 o maracuyá); y un factor dentro de sujetos (que para nuestro estudio denominados los estadios de desarrollo) también con tres niveles (desarrollo, madurez y sobre madurez).

Como variable dependiente tenemos las concentraciones de ácido ascórbico finales halladas.

Tabla 58 Contrastes Multivariados

	Efecto	Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error	Sig.
Estadío	Traza de Pillai	,994	400,660 ^b	2,000	5,000	,000
	Lambda de Wilks	,006	400,660 ^b	2,000	5,000	,000
	Traza de Hotelling	160,264	400,660 ^b	2,000	5,000	,000
	Raíz mayor de Roy	160,264	400,660 ^b	2,000	5,000	,000
Estadío * Fruto	Traza de Pillai	1,984	368,474	4,000	12,000	,000
	Lambda de Wilks	,000	367,205 ^b	4,000	10,000	,000
	Traza de Hotelling	351,226	351,226	4,000	8,000	,000
	Raíz mayor de Roy	272,170	816,509 ^c	2,000	6,000	,000

Fuente: Registro de Datos propios

La primera tabla de resultados que según el modelo de ANOVA de dos factores presenta el paquete estadístico SPSS, es el de contrastes multivariados, tabla 58, esta tabla ofrece cuatro

estadísticos para poner a prueba cada una de las hipótesis nulas de interés en este diseño, y todos se interpretan de la misma manera.

En primer lugar puesto que el nivel crítico (Significancia =0.000) asociado al factor *estadio* es menor que 0.05 se puede rechazar la hipótesis de nulidad de igualdad de medias referida a ese factor y, por tanto, concluir que el porcentaje de inhibición no es el mismo en cada estadio considerado para el desarrollo del fruto.

En la segunda línea se observa los resultados de la interacción *Fruto * estadio*, puesto que el nivel crítico (Sig=0) asociado es menor que 0.05 se rechaza la hipótesis de nulidad y se asume que los porcentajes de inhibición son diferentes, considerando dicha interacción.

Tabla 59 Contrastes de esfericidad de Mauchly

Efecto inter sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi- cuadrado	gl	Sig.	Épsilon ^b		
					Greenhouse- Geisser	Huynh- Feldt	Límite inferior
Estadio	,912	,459	2	,795	,919	1,000	,500

Fuente: Registro de Datos propios

La tabla 59 ofrece el estadístico W de Mauchly para contrastar la hipótesis de esfericidad, puesto que el nivel crítico (significancia) asociado al estadístico es mayor que 0.05 puede asumirse que las varianzas son esféricas, por lo que debemos basar nuestras decisiones sobre los efectos dentro de sujetos en la aproximación univariada, y no en la multivariada, ya que en condiciones de esfericidad la aproximación univariada, según se ha dicho, es más potente que la multivariada (particularmente con tamaños muestrales pequeños).

Tabla 60 Efectos dentro de sujetos (o frutos para nuestro estudio)

	Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Estadío	Esfericidad asumida	219,685	2	109,843	399,415	,000
	Greenhouse-Geisser	219,685	1,839	119,478	399,415	,000
	Huynh-Feldt	219,685	2,000	109,843	399,415	,000
	Límite inferior	219,685	1,000	219,685	399,415	,000
Estadío *	Esfericidad asumida	640,731	4	160,183	582,465	,000
	Greenhouse-Geisser	640,731	3,677	174,234	582,465	,000
	Huynh-Feldt	640,731	4,000	160,183	582,465	,000
	Límite inferior	640,731	2,000	320,365	582,465	,000
Error (Estadío)	Esfericidad asumida	3,300	12	,275		
	Greenhouse-Geisser	3,300	11,032	,299		
	Huynh-Feldt	3,300	12,000	,275		
	Límite inferior	3,300	6,000	,550		

Fuente: Registro de Datos propios

La tabla 60 muestra los estadísticos univariados referidos a los efectos dentro de sujetos. La información relativa al efecto individual *estadío* es consistente con la aproximación univariada de la tabla anterior, tanto como si se asume esfericidad como si no asumiéndola; y siendo Significancia < 0.05 se rechaza la hipótesis nulidad en cuanto a este efecto.

En lo referente al efecto de la interacción *estadío * fruto*, tanto si se asume esfericidad como si se aplica cualquiera de las estimaciones debajo, se obtienen niveles críticos por debajo de 0.05; por lo que puede concluirse que existe efecto significativo de la interacción, es decir bajo una aproximación univariada existe diferencias significativas de los porcentajes de inhibición en los distintos estadíos de crecimiento para los distintos frutos. Por supuesto,

para poder interpretar el efecto de la interacción es necesario llevar a cabo comparaciones múltiples para los efectos simples.

La tabla de resultados de Anova y Test de Tukey, generados por el paquete estadístico SPSS, denota en la tabla 61 que la significancia es menor que 0.05, por lo que se asume que la capacidad antioxidante de los distintos frutos en cuanto a estadio de desarrollo, son diferentes.

La prueba de especificidad de Tukey en la tabla 62 señala que el fruto del tumbo es el que presenta mayor capacidad antioxidante, seguido del fruto de maracuyá y finalmente la granadilla.

Tabla 61 ANOVA de dos factores para el método DPPH

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	92774,474	1	92774,474	288358,988	,000
Fruto	5083,453	2	2541,727	7900,122	,000
Error	1,930	6	,322		

Fuente: Registro de Datos propios

Tabla 62 Test de Tukey de dos factores para el método dpsh

Fruto	N	Subconjunto		
		1	2	3
Granadilla	3	45.1518		
Maracuyá	3		53.2516	
Tumbo	3			77.4512
Sig.		1,000	1,000	1,000

Fuente: Registro de Datos propios

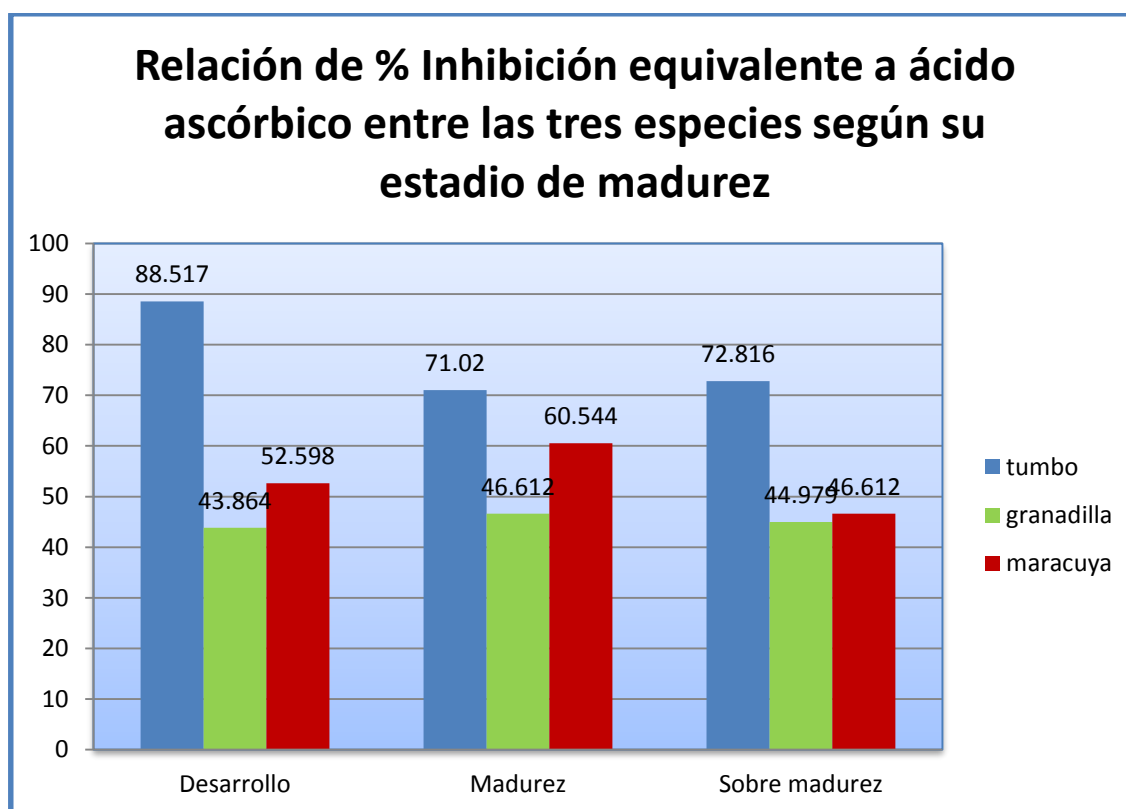


Figura 33 Relación de % Inhibición equivalente a ácido ascórbico entre las tres especies según su estadio de madurez

FUENTE: Elaboración propia

Recopilando los datos obtenidos por nuestra investigación de capacidad antioxidante mediante el método DPPH demostró que en el análisis individual de cada estadio de maduración para cada muestra existe diferencia entre los datos como puede observarse en la figura 33, resultando que el fruto de tumbo presenta mayor capacidad captadora de radicales libres en sus tres estadios de maduración que maracuyá y granadilla, además demostró que maracuyá presenta mayor capacidad de captación de radicales libres que granadilla y el estudio de dos variables correspondiente a la comparación de los tres frutos con respecto a su estadio de maduración y su capacidad captadora de radicales libres en sus tres estadios de maduración, demostró que existe diferencia significativa entre la capacidad antioxidante de tumbo, maracuyá y granadilla englobando los datos en su totalidad, es decir, que englobando los resultados de los tres estadios y su capacidad captadora de radicales libres representan en conjunto una diferencia significativa entre las tres especies, siendo el tumbo el fruto con mayor capacidad captadora de radicales libres en los tres estadios de maduración, seguido de maracuyá y finalmente granadilla.

Los métodos CUPRAC y DPPH evalúan la capacidad antioxidante mediante distintos mecanismos, mientras que DPPH evalúa la capacidad captadora de radicales libres el método CUPRAC evalúa la capacidad de reducir iones de cobre (Apak R. , y otros, 2007), por ello en nuestro estudio al comparar los datos recopilados entre ambos ensayos determinamos algunas diferencias entre los frutos, siendo el tumbo un fruto con buena capacidad reductora en específico en estadio de maduración en desarrollo, el cual sobrepasa la capacidad antioxidante de los otros dos frutos estudiados (granadilla y maracuyá), sin embargo presento menor capacidad reductora en sus estadios de maduración y sobre maduración, estadios en los que maracuyá tuvo mayor capacidad antioxidante que los otros frutos estudiados, por otra parte, tumbo demostró tener mayor capacidad captadora de radicales libre en los tres estadios de maduración en comparación con los otros frutos estudiados mediante el método DPPH, seguido de maracuyá que en los tres estadios de maduración presento mejor capacidad captadora de radicales libre que granadilla, esto puede deberse a la diversidad de componentes bioactivos en las especies que como se mencionó en el ensayo de cromatografía en capa fina es posible que tengan diferencias.

El uso de ácido ascórbico como antioxidante de referencia para la determinación de la capacidad antioxidante en alimentos es el más adecuado por ser un componente bioactivo más común y estable que la vitamina E (Dae-Ok, Lee Ki, Lee Hyong, & Chang, 2002), por lo que se encuentra en la bibliografía, varias investigaciones del género *Passiflora* utilizando este antioxidante para expresar los resultados de capacidad antioxidante como en este trabajo de investigación, así como Carvajal y su equipo de investigadores que reportaron una capacidad antioxidante de granadilla de 145.692 mg de ácido ascórbico en 100g de extracto seco con el método FRAP y 177,608 mg de ácido ascórbico en 100g de extracto seco con el mismo método con frutos provenientes de la ciudad Huila en Colombia (Carvajal L. M., y otros, 2014), así como Muñoz y su equipo de investigadores Peruanos que hicieron una comparación de la capacidad antioxidante de varias frutas con el método DPPH donde se incluyó también al fruto tumbo, en su estudio comparan al fruto tumbo proveniente de la costa con el proveniente de la sierra dando como resultados las capacidades antioxidantes de 0.35 mg de ácido ascórbico en 100 g para la muestra costeña y 285,33 mg de ácido ascórbico en 100g de muestra serrana (Muñoz Jáuregui, Ramos-Escudero, Alvarado-Ortiz Ureta, & Castañeda Castañeda, 2007), dilucidando que existe una diferencia significativa entre estos frutos que pese a ser de la misma especie, presentan diferentes capacidades antioxidantes.

Al igual que en nuestra investigación existen muchos trabajos que expresan sus resultados en % de Inhibición como (Rojas & Tomás, 2010) que evaluaron la capacidad antioxidante de la maracuyá proveniente de Trujillo – Perú mediante el método DPPH, otorgando resultados a diferentes concentraciones del jugo siendo el valor máximo de 75.85 % de inhibición para una concentración de 200 ug/ml de extracto metanolito del fruto y un valor mínimo de 4,33% de inhibición para una concentración de 10 ug/ml del mismo extracto.



CONCLUSIONES

1.- Comparando la capacidad antioxidante *in vitro* entre los tres frutos de la familia *passifloraceae* en diferentes estadios de madurez se determinó que existe diferencia entre los frutos estudiados mediante los dos métodos utilizados (CUPRAC Y DPPH).

2.- Se determinó con el ensayo de índice de maduración que tanto los resultados obtenidos para índice de sólidos solubles como acidez titulable presentan valores exponencialmente crecientes y decrecientes respectivamente, que según la bibliografía es lo esperado y posiciona a nuestras muestras dentro de los estadios esperados (estadio de desarrollo, maduración y sobre maduración) para luego determinar la capacidad antioxidante de los frutos en sus diferentes estadios de maduración y su posterior comparación.

3.- Se definió con el ensayo de identificación cualitativa de cromatografía en capa fina la presencia de fenoles, terpenos y flavonoides en los zumos de cada especie, los cuales difieren entre sí, pudiéndose observar manchas de diferentes diámetros y a diferentes R_f.

4.- Se evaluó con los ensayos de capacidad antioxidante mediante el método CUPRAC que en el análisis individual de cada estadio de maduración para cada muestra existe diferencia entre los datos resultando que el estadio de maduración en desarrollo del tumbo presenta mayor capacidad antioxidante que maracuyá y granadilla, sin embargo en los estadios de maduración y sobre maduración el fruto de la maracuyá presenta mayor capacidad antioxidante que sus contrapartes en ambos estadios. El estudio de dos variables correspondiente a la comparación de los tres frutos con respecto a su estadio de maduración y su capacidad antioxidante en sus tres estadios de maduración, demostró que no existe diferencia significativa entre la capacidad antioxidante de tumbo y maracuyá englobando los datos en su totalidad, es decir, que englobando los resultados de los tres estadios y su capacidad antioxidante no representan en conjunto una diferencia significativa entre ambas, pero si existe diferencia con el fruto de la granadilla.

5.- Se evaluó con los ensayos de capacidad de captación de radicales libres mediante el método DPPH que en el análisis individual de cada estadio de maduración para cada muestra existe diferencia entre los datos resultando que el fruto de tumbo presenta mayor capacidad captadora de radicales libres en sus tres estadios de maduración que maracuyá y granadilla, además demostró que maracuyá presenta mayor capacidad de captación de radicales libres que granadilla. El estudio de dos variables correspondiente a la comparación de los tres frutos con respecto a su estadio de maduración y su capacidad captadora de radicales libres en sus tres estadios de maduración, demostró que existe diferencia significativa entre la

capacidad antioxidante de tumbo, maracuyá y granadilla englobando los datos en su totalidad, es decir, que englobando los resultados de los tres estadios y su capacidad captadora de radicales libres representan en conjunto una diferencia significativa entre las tres especies, siendo el tumbo el fruto con mayor capacidad captadora de radicales libres en los tres estadios de maduración, seguido de maracuyá y finalmente granadilla.



SUGERENCIAS

1.- Se sugiere proseguir con las investigación comparativas de estos frutos *in vivo*, como se mencionó en el marco teórico se necesita de varios métodos de investigación para determinar con mayor eficiencia la capacidad antioxidante de un fruto comestible.

2.- Se sugiere realizar estudios fitoquímicos en las tres especies analizadas en este trabajo, ya que como se describió en la bibliografía aún existen muchos componentes bioactivos sin identificar.

3.-Se sugiere realizar investigaciones de capacidad antioxidante de estos frutos utilizando diferentes métodos de extracción tanto *in vitro* como *in vivo* y comparar los resultados obtenidos con los resultados de esta investigación.



Bibliografía

Acero de mesa, N., Linares Pinel, F., & Muñoz-Mingarro Martinez, D. (2007). Principios activos de las drogas vegetales. Metabolitos secundarios. Propiedades. En I. M. Encarna Castillo Garcia, *Manual de fitoterapia* (págs. 25-45). Barcelona: Elsevier España.

- Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Gómez, E., Valverde, L., & Benavides, D. (2014). Efecto de la concentración de albedo y sacarosa sobre las características fisicoquímicas, reológicas y aceptabilidad general en cremogenado de granadilla (*Passiflora ligularis*). *Agroindustrial Science*, 7-18.
- Alvarado, L. (2007). *Passifloraceae* L. *Flora del valle de Tehuacán - Cuicatlán.*, 1-28.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Ozyürek, M., Celik, S. E., Bektaşoğlu, B., y otros. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules.*, 1496-1547.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir Çelik, S., & Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and polyphenolic content of some herbal teas. *International journal of food sciences and nutrition.*, 292-304.
- Beserra Almeida, M. M., Machado de Sousa, P. H., Campos Arriaga, A. M., Matias do Prado, G., de Carvalho Magalhaes, C. E., Maia, G. A., y otros. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 2155-2159.
- Blé-Castillo, J. L., Díaz-Zagoyab, J. C., & Méndezc, J. D. (2008). Suplementación con vitamina E, ¿benéfica o dañina? *gaceta medica de mexico*, 147-154.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 25-30.
- Brito Arias, M. (2016). *Synthesis and Characterization of Glycosides*. Switzerland: Springer International.
- Carvajal Rojas, L., Hata Uribe, Y., Sierra Martinez, N., & Rueda Niño, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* krukoff). *Colombia Forestal*, 161-170.
- Carvajal, L. M., Turbay, S., Alvarez, L. M., Rodriguez, A., Alvarez, M., Bonilla, K., y otros. (2014). PROPIEDADES FUNCIONALES Y NUTRICIONALES DE SEIS ESPECIES DE PASSIFLORA (PASSIFLORACEAE) DEL DEPARTAMENTO DEL HUILA, COLOMBIA. *Caldasias*, 1-15.

- Carvajal, L., Turbay, S., Marelli, L., Rodriguez, A., Alvarez, J., Bonilla, K., y otros. (2014). Relacion entre los usos populares de la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) y su composicion fitoquimica. *Biotecnologia en el sector agropecuario y agroindustrial.*, 185-196.
- Carvajal, L., Turbay, S., Rojano Benjamin, M. L., Restrepo, S., Alvarez Julie, B. K., Ochoa, C., y otros. (2011). Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.*, 354-363.
- Castañeda Castañeda, B., Ramos Llica, E., & Ibáñez Vasquez, L. (2008). EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE SIETE PLANTAS MEDICINALES PERUANAS. *Horizonte médico*, 56-72.
- Chaparro, D., Maldonado, M., Franco, M., & Urango, L. (2015). CARACTERISTICAS NUTRICIONALES Y ANTIOXIDANTES DE LA FRUTA CURUBA LARGA (*Passiflora mollissima* Bailey). *Biotecnologia en el sector agropecuario y agroindustrial*, 120-128.
- Chaparro, D., Maldonado, M., Urango, L., & Rojano, B. (2015). Propiedades quimiopreventivas de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey (banana passion fruit). *Revista Cubana de plantas medicinales*, 62-74.
- Coronado, M., Vega, S., Gutierrez, R., Vazquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud. *revista chilena de nutricion*, 206-212.
- Dae-Ok, K., Lee Ki, W., Lee Hyong, J., & Chang, L. (2002). Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal of agricultural and food chemistry.*, 3713-3717.
- del Pilar Pinzón, I. M., Fischer, G., & Corredor, G. (2007). Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). *Agronomía Colombiana*, 83-95.
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. .. (2004). *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 1-23.
- Esquerre, B., Rojas, C., Llatas, S., & Delgado, G. (2014). El género *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) en el departamento de lambayeque, Perú. *Acta BOTÁNICA Malacitana*, 55-70.

- Feuillet, C., & MacDougal, J. (2007). *Passifloraceae. The Families and Genera of Vascular Plants.*, 270-281.
- Fina, B. (21 de 04 de 2010). *Laboratorio de biología osea y metabolismo mineral*. Recuperado el 14 de 03 de 2018, de Biología Osea: <http://biologiaosea.com.ar/files/seminarios/sem%20ESTRÉS%20oxidativo.pdf>
- Flores Rivera, E. d. (2014). DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y SU RELACION CON LOS COMPONENTES FENOLICOS PRESENTES EN EL ALPECHIN. *Tesis de pregrado*. Arequipa, Arequipa, Perú.
- Franco, G., Cartagena, J., Correa, G., Rojano, B., & Piedrahita, A. (2014). Actividad antioxidante del jugo de passiflora edulis sims (gulupa) durante la poscosecha. *Revista Cubana de plantas medicinales*, 154-166.
- Ganaderia, M. d. (2017). *MAG Ministerio de Agricultura y Ganadería*. Recuperado el 11 de marzo de 2018, de http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_maracuya.pdf
- García Peña, C. M., Kim Bich, N., Bich Thu, N., Tillan Capo, J., Romero Díaz, J. A., Darío López, O., y otros. (2009). Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recuta* L. y *Morinda citrifolia* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 1-7.
- Garcia, A. A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolitos secundario de plantas. *REDUCA, Serie Fisiología Animal*, 119-145.
- Garcia, A., Girones, A., Leon, P., Moreno, D., Stinco, C., Meléndez, A., y otros. (2017). Banana Passion Fruit (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey): Microencapsulation, Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity. *Molecules*, 1-12.
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., & Caristi, C. (2007). Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules*, 1641-1673.
- Grozeff, G. E. (01 de marzo de 2016). *facultad de ciencias agrarias y forestales*. Recuperado el 01 de 09 de 2018, de aula virtual: <http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/321/course/section/261/%C3%ADndices%20de%20madurez%202016-%20modif%2011-3.pdf>

- Gülçin, I., Huyut, Z., Elmastas, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 43-53.
- Gutowski, M., & Kowalczyk, S. (2013). A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica*, 1-16.
- Hernández, J., Licea, M., Hernández, P., Marcel, E., & Yanes, M. (2011). ESTRÉS oxidativo y diabetes mellitus. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 4-15.
- Hevia, E. M. (13 de Abril de 2011). *Sociedad para la investigación de bioquímica, biología molecular y nutrición*. Recuperado el 09 de Septiembre de 2018, de metabolismo: <http://www.metabolismo.biz/web/vitamina-c/>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1841-1856.
- ICONTEC. (02 de Mayo de 1979). NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 1262. *CURUBA*. Bogotá, Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- ICONTEC. (02 de Mayo de 1979). NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 1267. *MARACUYA*. Bogotá, Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- ICONTEC. (16 de Abril de 1997). NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 4101. *FRUTAS FRESCAS . GRANADILLA, ESPECIFICACIONES*. Bogotá, Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- ICONTEC. (21 de Noviembre de 2012). NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 5468. *JUGO (ZUMO), PULPA, NÉCTAR DE FRUTAS Y SUS CONCENTRADOS*. Bogotá, Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- Inocente, M., Tomas, G., Huamán, J., Palomino, M., & Bonilla, P. (2014). Compuestos fenólicos, actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una crema gel elaborada con extracto estabilizado de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* HBK). *REVISTA PERUANA DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA*, 27-33.
- Long, Q., Wilson, W., & Pang, J. (2007). The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. *Lipids*, 87-96.

- Kanu, A., Okorie, A., Uche, C., & Awa, U. (2017). Phytochemical screening and antimicrobial activity of ethanoic extract of passiflora edulis var. flavicarpa seed on selected pathogens. *Universal journal of microbiology research*, 35-39.
- Kehrer, J., & Klotz, L. (2015). Free radical and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Critical reviews in toxicology*, 1-34.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 726-732.
- La Rosa Toro, A., Vigo López, F., & Muedas Taipe, G. (2011). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PISCO. *Revista de la sociedad quimica del Perú.*, 127-134.
- Landete, M. (2013). Dietary Intake of Natural Antioxidants: Vitamins and Polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 706-721.
- Li, W., Hydamaka, A. W., Lowry, L., & Beta, T. (2009). Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. *Central European Journal of Biology*, 499–506.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 118-126.
- Lock de Ugaz, O. (01 de 01 de 2001). *Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental*. Recuperado el 12 de Agosto de 2018, de ANÁLISIS fitoquímico y metabolitos secundarios: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/fitoterapia.html>
- Luna, J. M., Garau, M. C., Negre, A., March, J., & Martorell, A. (14 de Mayo de 2010). Composición fenólica y actividad antioxidante de variedades minoritarias de vid de las islas baleares. Logroño, La rioja, España.
- Marroquín, M., Cruz, S., & Cáceres, A. (2012). ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOUNDS IN THREE SPECIES OF PASSIFLORACEAE (PASSIFLORA EDULIS, P. INCARNATA, P. LIGULARIS) FROM GUATEMALA. En M. K.-K. J. Ghaemghami (Ed.), *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants IMAPS2010 and History of Mayan*

Ethnopharmacology IMAPS2011. 964, págs. 93-98. Shiraz, Iran and Antigua, Guatemala: ISHS.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 271-278.

Mast, D., Sandeep, K., Chander, P., Raj, K., Siddharth, M., & Sunita, S. (2017). Determination of Phytochemical and Antioxidant Activities in Edible Flowers. *International Journal of Horticulture.*, 26-32.

Melgarejo, L. M., Espinosa, D. S., Pérez, W. H., Hernández, M. S., Miranda, D., Fischer, G., y otros. (2015). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL FRUTO DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis* Juss). En L. M. Melgarejo, *GRANADILLA (Passiflora ligularis Juss): CARACTERIZACIÓN ECOFISIOLÓGICA DEL CULTIVO*. (págs. 91-118). Bogotá: Disonex S.A.

Mercado-Mercado, G., de la Rosa Carrillo, L., Wall-Medrano, A., López Díaz, J. A., & Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutricion Hospitalaria*, 36-46.

Mohammed, M., Mohammed, S., Mohammed, A., & Isam, S. (2015). Free radicals and human health. *International journal of innovation sciences and research*, 218-223.

Muñoz Jáuregui, A. M., Ramos-Escudero, D. F., Alvarado-Ortiz Ureta, C., & Castañeda Castañeda, B. (2007). Evaluacion de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la sociedad quimica del Perú*, 142-149.

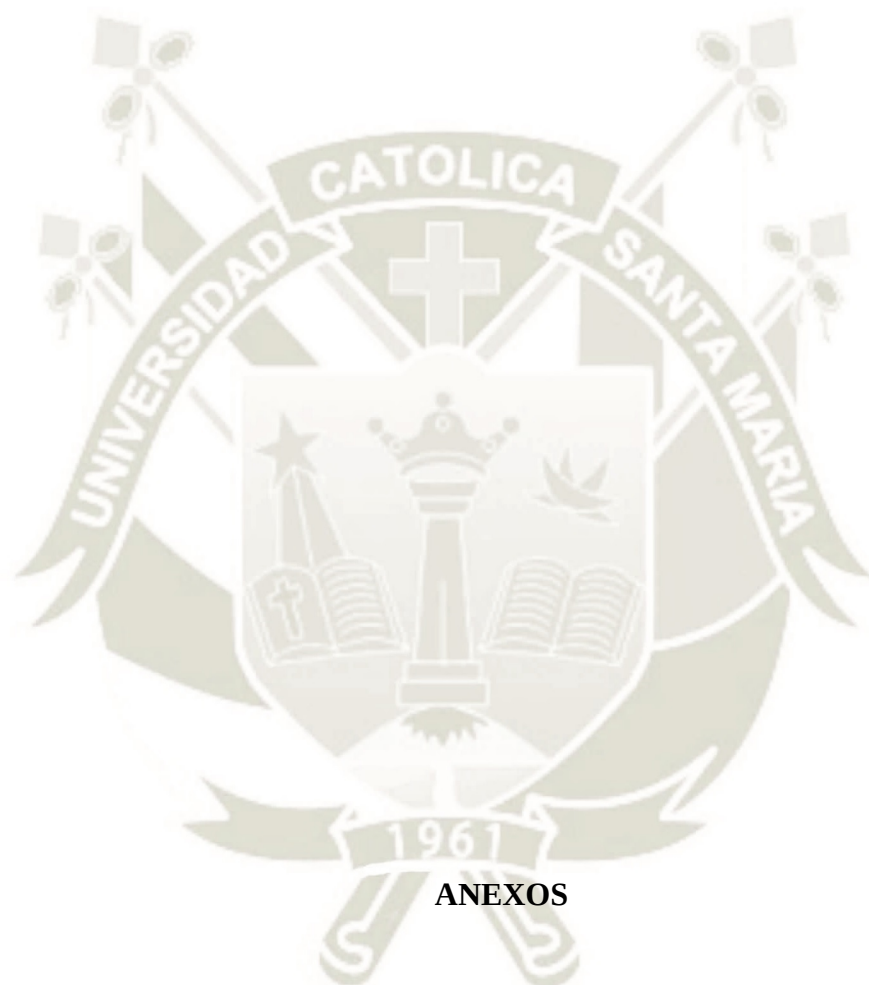
Naturales. (06 de marzo de 2017). *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos*. Recuperado el 12 de marzo de 2018, de gob.mx: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/221040/Passiflora_mollissima_final.pdf

Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Esin Çelik, S., y otros. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*, 2439-2453.

- Pássaro Carvalho, C. P., & Londoño-Londoño, J. (2012). Industrialización de cítricos. En C. P. Carvalho, *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización*. (págs. 307-342). Itagüí: Editorial Artes y Letras S.A.S.
- Perea Dallos, M., Fischer, G., & Miranda, D. (2010). *Passifloraceae* passifloras Maracuyá, Granadilla, Curuba, Gulupa. *Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales*, 350-390.
- Petkova, N., Ivanov, I., Mihaylova, D., & Krastanov, A. (2017). Phenolic acids content and antioxidant capacity of commercially available *Melissa officinalis* L. teas in Bulgaria. *Bulgarian Chemical Communications*, 69-74.
- Piura, W., Maradiaga, J., Palacios, N., Ponce, R., & Medina, L. (2014). Tamizake fitoquímico de las hojas de *passiflora edulis* *passifloraceae*. *Revista Portal de la ciencia*, 62-67.
- Prácticas, S. (2009). *Soluciones Prácticas*. Recuperado el 11 de marzo de 2018, de Soluciones Prácticas: <https://www.solucionespracticas.org.pe/ficha-tecnica-29-cultivo-de-maracuya>
- Preethi, J., Harita, B., & Rajesh, T. (2017). Review on Thin Layer Chromatography. *Journal of Formulation Science & Bioavailability*, 1-4.
- Primot, S., Coppens, G., Rioux, V., Ocampo, J., & Garcin, F. (2005). Variacion morfologica de tres especies de curubas (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*, *P. tarminiana* y *P. mixta*) y sus hibridos en el valle del cauca (Colombia). *revista brasileira fruticultura jaboticabal*, 467-471.
- Raisman, J., & Gonzalez, A. M. (2013). *Hipertextos del Area de Biología* . Recuperado el Noviembre de 2017, de <http://www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/21.%20Passifloraceae.pdf>
- Ramadan-Hassanien, M. F. (2008). Total antioxidant potential of juices, beverages and hot drinks consumed in Egypt screened by DPPH in vitro assay. *Grasas y Aceites*, 254-259.
- Ramos, M., Batista, C., Gomez, B., & Zamora, A. (2006). diabetes, ESTRÉS oxidativo y antioxidantes. *Investigacion en salud*, 7-15.

- Reina, C. E. (01 de 01 de 1995). *MANEJO POSTCOSECHA Y EVALUACION DE LA CALIDAD DE CURUBA (passiflora mollisima) QUE SE COMERCIALIZA EN LA CIUDAD DE SEIVA*. Recuperado el 21 de septiembre de 2018, de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/>:
<http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4691/1/Manejo%20poscosecha%20y%20evaluacion%20de%20la%20calidad%20en%20Curuba.pdf>
- Rodriguez, L., Lopez, L., & Garcia, M. (2010). DETERMINACIÓN de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, Mora (*Rubus glaucus* B.), Maracuyá (*Passiflora edulis* S.), Guayaba (*Psidium guajava* L.) y Papayuela (*Carica cundinam*. *Alimentos Hoy*, 16-34.
- Rojano, B., Zapata, K., & Cortes, F. (2012). Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora Mollisima* (kunth) L.H. Bailey (curuba). *Revista Cubana de plantas medicinales*, 408-419.
- Rojas, J., & Tomás, G. (2010). Tamizaje fitoquímico y actividad antioxidante in vitro de *passiflora edulis sims* (maracuyá). *Revista peruana de quimica e ingenieria quimica*, 23-29.
- Rojas, J., Ronceros, S., Palomino, R., Salas, M., Azañero, R., Cruz, H., y otros. (2012). Efecto coadyuvante del extracto liofilizado de *Passiflora edulis* (maracuyá) en la reducción de la presión arterial en pacientes tratados con enalapril. *Anales de la Facultad de Medicina*, 103-108.
- Sagar, B., Kedare, R., & Singh, P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Food Science & Nutrition*, 412–422.
- San miguel, A., & Martin gil, F. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106-113.
- Santos, O., Varon, E., & Salamanca, J. (2009). Prueba de extractos vegetales para el control de *Dasiops spp.*, en granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) en Huila, Colombia. *Corpoica ciencia y tecnologia agropecuaria.*, 141-151.

- Saravanan, S., & Parimelazhagan, T. (2014). In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of poluphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. *Food Science and Human Wellness*, 56-64.
- Sherma, J., & Fried, B. (2005). *Handbook of Thin-Layer*. New York: MARCEL DEKKER, INC.
- Simirgiotis, M., Schmeda, G., Bórquez, J., & Kennelly, E. (2013). The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. *Molecules*, 1672-1692.
- Sinclair, W. B., Bartholomew, E. T., & Raamsey, R. C. (01 de enero de 1945). *plant physiology*. Recuperado el 5 de septiembre de 2018, de <http://www.plantphysiol.org/>:
<http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/20/1/3.full.pdf>
- Taiz, L., Zeiger, E., M. Møller, I., & Murphy, A. (01 de Enero de 2014). *Plant Physiology and Development*. Recuperado el 14 de Agosto de 2018, de Secondary Metabolites: <http://6e.plantphys.net/PlantPhys6e-appendix04.pdf>
- Urquiaga, I., & Leighton, F. (2000). Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological research*, 55-64.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44-84.
- Villena, C., Arroyo, J., Cisneros, B., Espinoza, E., Varas, R., & Fernandez, B. (2013). Efecto del extracti etanolico del fruto de passiflora edulis sims "maracuya" en le nivel de glicemia de ratas normales. *Conocimiento para el desarrollo*, 69-76.
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R., & Miron, A. (2016). Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, S29-S45.
- Zucolotto, S. M., Fagundes, C., Reginatto, F. H., Ramos, F. A., Castellanos, L., Duque, C., y otros. (2011). Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical analysis*, 232-239.



ANEXOS



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



CONSTANCIA Nro. 30 -2017-HUSA

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

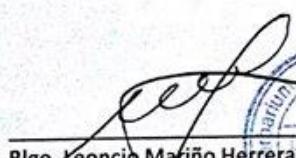
HACE CONSTAR:

Que las muestras proporcionada por los egresados Aaron Parisaca Soto y Gina Quispe Quispe de la a Universidad Católica de Santa María, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímica y Biotecnológica, de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, para su investigación. Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION: Magnoliophyta
CLASE: Magnoliopsida
SUBCLASE: Rosidae
ORDEN: Malpighiales
FAMILIA: Passifloraceae
GENERO: Passiflora
ESPECIE 1: *Passiflora ligularis* A. L. Juss N.V. "granadilla"
ESPECIE 2: *Passiflora tripartita* (A.L. Juss) Poir Var. *mollissima* (HBK) Holm Nielsen & Jorgensen N.V. "tumbo"
ESPECIE 3: *Passiflora edulis* Sims. forma *flavicarpa* Degener N.V. "maracuyá"

Se expide la presente constancia a solicitud de los interesados para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 14 de Noviembre del 2017


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



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