

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

Evaluación del contenido de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante de los frutos maduros de Machamacha (*pernettya prostrata*), en diferentes estados de conservación (fresco, seco y congelado)

Presentado por:

Edith Carrasco Sauñe

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

Abancay, Perú

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS


“EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES,
ANTOCIANINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FRUTOS MADUROS
DE MACHAMACHA (*Pernettya prostrata*), EN DIFERENTES ESTADOS DE
CONSERVACIÓN (FRESCO, SECO Y CONGELADO)”

Presentado por **Edith Carrasco Sauñe**, para optar el título de:

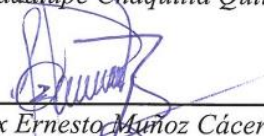
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Sustentado y aprobado el 09 de diciembre del 2020 ante el jurado evaluador:

Presidente:


Dra. Guadalupe Chaquilla Quilca

Primer Miembro:


Ing. Alex Ernesto Muñoz Cáceres

Segundo Miembro:


MSc. Cándida López Loayza

Asesor:


Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz

Co asesor:


Dr. Melquiades Barragán Condori

Agradecimientos

A mi querido papá “León Félix Carrasco Romero” que está en el cielo, por su gran sacrificio y apoyo incondicional en brindarnos las mejores oportunidades para culminar nuestra educación, y habernos enseñado lecciones sabias de la vida para afrontar las adversidades.

A mi mamá “Calixta Fortunata Sauñe Borda” por inculcarnos valores y ser nuestra mentora de la vida, demostrándonos su amor y orgullo por los hijos que ha forjado.

A mis hermanos “D, F, N, Z, E, K, E”, por la motivación permanente que me dieron para alcanzar mis objetivos y metas trazadas.

A mi asesor Dr. Melquiades barragán Condori, le agradezco profundamente, por el compromiso, tiempo, paciencia para hacer posible la ejecución de este estudio y se cumpla de manera exitosa.



Dedicatoria

A Dios por brindarme la oportunidad de vivir y guiarme por el camino que ha trazado para mí y mi familia. A mi padre que me protege y guía desde el cielo. A mi mamá y hermanos por impulsarme a ser mejor cada día y compartir conmigo mis sueños y formar parte de mis proyectos de vida. Con mucho amor y dedicación a todos ellos que son mi ejemplo de fortaleza y humildad.



“Evaluación del contenido de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante de los frutos maduros de Machamacha (*Pernettya prostrata*) en diferentes estados de conservación (fresco, seco y congelado)”

Línea de Investigación: Caracterización, desarrollo de procesos novación en la agroindustria

Esta publicación está bajo una licencia creative commos



ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
CAPÍTULO I	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.1 Descripción del problema.....	5
1.2 Enunciado del problema	6
1.2.1 Problema General	6
1.2.2 Problema Específico	6
1.2.3 Justificación	6
1.2.4 Delimitación	8
CAPÍTULO II	9
OBJETIVOS E HIPOTESIS	9
2.1 Objetivos de la investigación.....	9
2.1.1 General	9
2.1.2 Objetivos Específicos	9
2.2 Hipótesis de la investigación	9
2.2.1 Hipótesis general	9
2.2.2 Hipótesis específicos.....	9
2.3 Operacionalización de la variable.....	10
2.3.1 Definición de variables	10
2.3.2 Operacionalización de variables.....	11
CAPÍTULO III	12
MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	12
3.1 Antecedentes.....	12
3.2 Marco referencial.....	15
3.2.1 Machamacha (Pernettya prostrata).....	15
3.2.2 Nombre común	16
3.2.3 Sinónimos	16
3.2.4 Distribución y hábitat.	16
3.2.5 Clasificación botánica.....	17
3.2.6 Taxonomía 17	



3.2.7	Composición química del fruto de Machamacha	17
3.2.8	Generalidades de los frutos de Machamacha (<i>Pernettya prostrata</i>)	18
3.2.9	Compuestos fenólicos	18
3.2.10	Antocianinas	22
3.2.11	Polifenoles	30
3.2.12	Compuestos antioxidantes	34
3.2.13	Radicales libres	34
3.2.14	Capacidad antioxidante	36
3.3	Marco conceptual	37
CAPÍTULO IV		39
DISEÑO METODOLÓGICO		39
4.1	Tipo y nivel de investigación	39
4.1.1	Tipo de investigación	39
4.1.2	Nivel de investigación	39
4.2	Método y diseño de investigación	39
4.2.1	Método de investigación	39
4.2.2	Diseño de investigación	39
4.3	Población y muestra	40
4.3.1	Población	40
4.3.2	Muestra	40
4.4	Descripción de la investigación	42
4.5	Material de la investigación	49
4.5.1	Material vegetal	49
4.5.2	Material de laboratorio	49
4.5.3	Equipos	49
4.5.4	Reactivos	50
4.5.5	Solventes	50
4.5.6	Otros materiales	50
4.6	Diseño experimental	50
4.7	Plan de tratamiento de datos de la investigación	51
4.8	Modelo estadístico	51
3.9	Análisis estadístico	54
CAPITULO V		55
RESULTADOS Y DISCUSIONES		55
5.1	Análisis de resultados	55



5.1.1	Determinación del CAT (mg cianidina 3- glucósido/100g).....	55
5.1.2	Determinación del contenido de polifenoles totales (PFT (mg ácido gálico/100 g).....	56
5.1.3	Determinación de CA por DPPH (molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo.....	58
5.2	Comparación de hipótesis.....	60
5.2.1	Planteamiento de la hipótesis nula (H_0) e hipótesis alterna (H_A)Hipótesis nula (H_0)	60
5.2.2	Determinación de CAT (mg cianidina 3- glucósido/100g).....	61
5.2.3	Determinación de la presencia de PFT en (mg ácido gálico/100 g)	61
4.1.1.	Determinación de capacidad antioxidante DPPH (molécula 1,1-difenil-2-picril- hidrazilo)	62
5.3	Discusión de resultados	63
5.3.1	Determinación de antocianinas totales.....	63
5.3.2	Determinación del contenido de poli fenoles totales	64
5.3.3	Determinación de la capacidad antioxidante	65
CAPÍTULO VI		67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		67
6.1	Conclusiones.....	67
6.2	Recomendaciones	68
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA		69
ANEXOS		76



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 — Operacionalización de las variables.....	11
Tabla 2 — Composición química de los frutos de Machamacha (<i>Pernettya prostrata</i>)	17
Tabla 3 — Sustituyentes de las antocianinas.....	23
Tabla 4 — Antocianidinas que predomina en las principales bayas.....	26
Tabla 5 — Características organolépticas atribuidas a los compuestos fenólicos	31
Tabla 6 — Contenido de fenoles totales de algunos alimentos	32
Tabla 7 — Condiciones de conservación de la materia vegetal para análisis.....	43
Tabla 8 — Matriz de diseño experimental completamente al azar	51
Tabla 9 — Calculo para evaluar diferencias en las variables de estudio	53
Tabla 10 — CAT en los extractos de Machamacha según tipo de muestra (quintuplicado)	55
Tabla 11 — Diferencia de CAT de Machamacha en seco, fresco y congelado según la prueba Tukey	56
Tabla 12 — Muestras de Machamacha 3 tratamientos con 5 repeticiones (ácido gálico/100g)	57
Tabla 13 — Variación de media de PFT de muestras de Machamacha 3 tratamientos (prueba Tukey)	58
Tabla 14 — Antioxidante de muestras de Machamacha en seco, fresco y congelado, ($\mu\text{mol trolox /g}$)	59
Tabla 15 — Comparación capacidad antioxidante (Tukey) Machamacha en (fresco, seco y congelado).....	60
Tabla 16 — Varianza del efecto causado de los tratamientos de conservación * compuestos bioactivos.....	61
Tabla 17 — Varianza del efecto causado de los tratamientos de conservación * compuestos bioactivos.....	61
Tabla 18 — Varianza del efecto de los tratamientos evaluados * contenido de bioactivos.....	62
Tabla 19 — Variabilidad del contenido de antocianinas totales de frutos maduros de Machamacha	77
Tabla 20 — Medias del contenido de antocianinas de los frutos frescos, secos y congelado	77
Tabla 21 — Análisis de varianza de las medias para evaluar las hipótesis planteadas anteriormente.....	77
Tabla 22 — Variabilidad del contenido de polifenoles totales de frutos maduros de Machamacha	78
Tabla 23 — Promedio medias del contenido de polifenoles de los frutos frescos, secos y congelados	78
Tabla 24 — Análisis de varianza (ANOVA) de las medias para evaluar las hipótesis	78
Tabla 25 — Análisis de varianza de la capacidad antioxidante de frutos maduros de Machamacha	79
Tabla 26 — Promedio medias de la capacidad antioxidante de los frutos frescos, secos y congelados	79
Tabla 27 — Análisis de varianza de las medias para evaluar las hipótesis planteadas anteriormente.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 — Frutos maduros de Machamacha (<i>Pernettya Prostrata</i>)	16
Figura 2. — Estructura química del fenol	18
Figura 3 — Clasificación de los polifenoles	19
Figura 4 — Estructura básica de las antocianinas	23
Figura 5 — Principales antocianidinas de importancia en alimentos	23
Figura 6 — Conformación de las antocianinas a diferentes valores de pH.	24
Figura 7 — Curva espectrofotométrica de degradación de antocianinas del jugo de uva	26
Figura 8 — Formas de acción del reactivo del Folin Ciocalteau.....	33
Figura 9 — Frutos de Machamacha maduros y pintones recolectados en envases de vidrio.	40
Figura 10 — Frutos maduros secos en envases	41
Figura 11 — Frutos maduros secos (izquierdo), frutos frescos (medio) y frutos congelados (derecha)	41
Figura 12 — Diagrama del procedimiento del trabajo de investigación	42
Figura 13 — Muestras Machamacha fresco (izquierdo), seco (medio), congelado (derecha)	44
Figura 14 — Curva patrón ácido gálico para determinar PFT a través del método Folin Ciocalteau.	57
Figura 15 — Curva patrón Trolox para determinar capacidad antioxidante (TEAC DPPH)	59
Figura 16 — Reactivos para la preparación de buffer pH 1 y buffer pH 4.5.....	80
Figura 17 — Muestras a pH 1 y pH 4.5 (pH diferencial) para cuantificación de antocianinas totales	80
Figura 18 — Reactivos y muestras con Folin Ciocalteau para evaluar Polifenoles totales.....	81
Figura 19 — Muestras con folin ciocalteau seco. Fresco y congelado.....	81
Figura 20 — Lectura de absorbancia de las muestras en espectrofotómetro.	82
Figura 21 — Reactivos para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras de Machamacha.....	82
Figura 22 — Muestras de Machamacha con el reactivo DPPH listo para su lectura de absorbancia.	83

INTRODUCCIÓN

Nos encontramos en un periodo donde aumenta la despreocupación por una alimentación saludable y las personas buscamos alimentarnos de forma rápida sin la necesidad de ocupar tiempo en preparar nuestra ración alimentaria y recurrimos a consumir los “Fast food” o comidas rápidas, colorantes sintéticos, alimentos tóxicos, alimentos instantáneos excesivos en grasa, sodio, azúcar, etc., además del estrés laboral, cansancio, exposición frecuente a radiaciones solares y contaminaciones ambientales que son los causantes de los problemas oxidativos de las células y otras enfermedades.

Sin embargo en el Perú, y en la región Apurímac existen productos que nos pueden ayudar a prevenir enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, etc., los cuales son a causa del daño de las células que sufren por la actividad de los radicales libres, los cuales pueden verse neutralizados o debilitados gracias a la alimentación saludable con productos ricos en compuestos bioactivos, además de eso nos permite revalorar en la industria alimentaria dándole valor a largo plazo y en diversas formas de tratamiento para su aprovechamiento posterior.

Estudios recientes demostraron la existencia de antocianinas, polifenoles y por consiguiente capacidad antioxidante en frutos silvestres en la región Apurímac como son Machamacha (*Gaultheria glomerata* Sleumer), mio mio (*Coriaria Ruscifolia* L), condorpausan (*Monnina vargassi* Ferreyra), alaybili (*Vaccinium floribundum* Kunth), etc. Frutos cuyo crecimiento se da de forma silvestre y por tanto es poco conocido y el consumo de estos no solo puede estar direccionado a la dieta alimentaria, sino también a la transformación en colorantes naturales dentro de la industria, la gastronomía entre otras transformaciones.

El aprovechamiento de estos frutos conlleva a darle valor, pero no solo en su forma natural sino también al largo plazo cuando este no se encuentre en su temporada de fructificación, se busca evaluar la estabilidad a diferentes tratamientos (fresco, seco y congelado) de los antioxidantes, antocianinas y polifenoles totales de los frutos de Machamacha (*Pernettya Prostrata*). En la investigación realizada por (Barragán, 2018) en los frutos de mio mio en tres estados fresco, seco y congelado, estos frutos presentaron buen volumen de antocianinas y capacidad antioxidante y un elevado contenido de antocianinas en fresco y congelado y presentó menor cantidad y capacidad en seco el cual se vio influenciado por la acción de la deshidratación, así



mismo en la investigación de (Villano, 2018) evaluó los compuestos bioactivos en frutos silvestres de Machamacha, Condorpausan, Alaybilí y Frambuesa Silvestre, los cuales demostraron que estos frutos contienen dichas características, en relación a los frutos que se investigó tienen elevado contenido de antocianinas y capacidad inhibidora de radicales libres con diferencias que no desestiman para darle valor para la alimentación y reincorporación en nuestra ración diaria y en la industria alimentaria.



RESUMEN

El propósito de este estudio es evaluar el contenido de antocianinas totales, poli fenoles y capacidad antioxidante de los frutos maduros de Machamacha (*Pernettya prostrata*), en tres estados de conservación en (fresco, seco y congelado) los cuales se evaluaron con metodología estandarizada y confiable además del uso frecuente por otros investigadores; se utilizó el la metodología de la diferencia de pH para antocianinas totales, Folin Ciocalteau para polifenoles totales y TEAC DPPH para capacidad antioxidante; los datos fueron comparados con la prueba Tukey haciendo uso del software INFOSTAT. Para el caso de antocianinas totales las muestras presentaron las siguientes Medias, las muestras secas presentaron un 13.48 de CAT (mg/100g), muestra fresca 17.89 CAT (mg/100g), muestra congelada 20.95 CAT (mg/100g) donde se observa que existe diferencia significativa en muestras secas pudiendo ser afectados por altas temperaturas de secado y pH. En contenido de poli fenoles totales, las muestras congeladas presentaron menor contenido con 204.85 PFT (mg de ácido gálico/100g), y no se encontró diferencia significativa entre las muestras frescas con 395.11 PFT (mg de ácido gálico/100g) y 451.02 PFT (mg de ácido gálico/100g) en muestras secas sin embargo respecto en la capacidad de inhibición de radicales libres las muestras no presentan diferencia significativa mostrando 33.50 TEAC-DPPH ($\mu\text{mol/g}$), congelado 37.15 TEAC-DPPH ($\mu\text{mol/g}$), seca 38.35 TEAC-DPPH ($\mu\text{mol/g}$) fresco. A pesar que los datos muestran poca concentración de estos compuestos bioactivos en las muestras de Machamacha (fresco, seco y congelado) no desvalora su consumo y puede formar parte de nuestra ración diaria y en la industria alimentaria además de que podrían estar compuestos de otras propiedades que aún no fueron estudiados como son las vitaminas, ácidos, flavonoides, taninos, quercetinas, ácidos hidroxifilícos, etc.

Palabras clave: *Antocianinas, polifenoles totales, antioxidantes, Machamacha (Pernettya prostrata), Folin Ciocalteau, radicales libres, estrés oxidativo.*



ABSTRACT

The purpose of this study is the evaluation of the content of total anthocyanins, polyphenols and antioxidant capacity of the ripe fruits of machamacha (*Pernettya prostrata*), in three states of conservation in (fresh, dry and frozen) which were evaluated with standardized methodology and reliable in addition to frequent use by other researchers; for the evaluation of total anthocyanins the differential pH method was used, for the case of total polyphenols the folin ciocalteau methodology and to evaluate the antioxidant capacity the TEAC DPPH method; the data were compared with the Tukey test using the INFOSTAT software. In the case of total anthocyanins, the samples presented the following means, the dry samples presented a 13.48 CAT (mg / 100g), a fresh sample 17.89 CAT (mg/ 100g), a frozen sample 20.95 CAT (mg / 100g). In the case of the content of total polyphenols, the frozen samples presented lower content with 204.85 PFT (mg of gallic acid / 100g), and there is no significant difference between the fresh samples with 395.11 PFT (mg of gallic acid / 100g) and 451.02 PFT (mg of gallic acid / 100g) in dry samples, however with respect to free radical inhibition capacity, the samples do not show significant difference, showing 33.50 TEAC-DPPH ($\mu\text{mol} / \text{g}$) frozen, 37.15 TEAC-DPPH ($\mu\text{mol} / \text{g}$) dry 38.35 TEAC-DPPH ($\mu\text{mol} / \text{g}$) fresh. Although the data shows a low concentration of these bioactive compounds in the machamacha samples (fresh, dry and frozen), it does not devalue their consumption and can form part of our daily ration and in the food industry, as well as that they could be composed of other properties that have not yet been studied such as vitamins, acids, flavonoids, tannins, quercetins, etc.

Keywords: *anthocyanins, total polyphenols, antioxidants, machamacha (Pernettya prostrata), folin ciocalteau, free radicals, oxidative stress.*



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

En la actualidad los frutos de Machamacha son considerados como silvestres y por tanto suelen ser consumidos en su mayoría por los animales terrestres y aves, además de presentar en su composición sustancias alucinógenas si estas son consumidas en exceso por las personas; sin embargo tienen propiedades que pueden contribuir al eventual efecto protector, como alimentos ricos en polifenoles, poder antioxidante y contenido de antocianinas, compuestos azufrados, isoflavonas, vitamina C, limoneno, carotenos, luteína, licopeno, fibra dietética y vitamina E.

Así mismo pueden ser aprovechados en la industria alimentaria como colorantes naturales en la fabricación de bebidas, yogurt, salchichas, etc., para obtener productos con valor agregado con propiedades funcionales, sustancias bioactivas para prevenir procesos degenerativos de enfermedades cardio cerebrovasculares y cancerígenas, causados por muchos factores como el consumo de alimentos altos en calorías, grasa, bebidas gasificadas, y daños físicos por los rayos solares, etc.

La región Apurímac es considerado una de las regiones más pobres, sin embargo cuenta con una biodiversidad, de frutos silvestres, con propiedades saludables para el ser humano, siendo uno de ellos los frutos de Machamacha (*Pernettya prostrata*) que crece en las zonas altas de nuestra región y no son aprovechados por el desconocimiento de sus propiedades bioactivas en el organismo, en la actualidad es un producto no valorado en la industria alimentaria así como en la agroindustria por este motivo se propone investigar a los frutos en diferentes estados de conservación e incorporar en nuestra alimentación y aprovechamiento en la industria alimentaria.

Es por tales razones que se plantea los siguientes enunciados, como se presenta a continuación.



1.2 Enunciado del problema

1.2.1 Problema General

¿Cuál es el contenido de antocianinas, polifenoles totales y capacidad antioxidante de los frutos maduros de Machamacha (*Pernettya prostrata*) en diferentes estados de conservación (fresco, seco y congelado)?

1.2.2 Problema Específico

- ¿Cuál será el contenido de antocianinas totales de los frutos maduros de Machamacha en diferentes estados de conservación (fresco, seco y congelado)?
- ¿Cuál es el contenido de polifenoles totales de los frutos maduros de Machamacha en diferentes estados de conservación, (fresco, seco y congelado)?
- ¿Cuál será la idoneidad antioxidante de las muestras de Machamacha a diferentes estados de conservación (fresco, seco y congelado)?

1.2.3 Justificación

Son numerosos los estudios realizados por la importancia de consumir alimentos y frutos pigmentados con elevada influencia bioactiva, con la finalidad de promover su consumo por su positividad en la prevención de enfermedades degenerativas, como catarata, arterioesclerosis, muerte celular, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, y otros debido a que los antioxidantes contienen la capacidad de neutralizar los radicales libres previniendo que las células no sufran oxidación y preserven el equilibrio para los procesos de óxido – reducción que ocurre en forma natural en el organismo. Estas propiedades contribuyen a la obtención de productos coloreados con valor agregado para la alimentación. (Barragán, 2018); (Ames y otros,1993); (Martínez, 2008)

En la presente investigación se determinará el contenido de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante en diferentes estados de conservación (fresco, seco y congelado) de frutos maduros de Machamacha; estas se determinarán por métodos estandarizados los cuales nos brindarán resultados de estos componentes que reaccionan previniendo la oxidación de las células. De acuerdo a la investigación de (Barragán, 2018). Los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del mío – mío (*Coriaria ruscifolia* L) en tres estados de



conservación (fresco, seco y congelado). Se ha determinado el contenido de antocianinas totales (CAT) por el método de pH diferencial encontrando 440.22 (mg de cianidina 3-glucósido / 100 g), para la cuantificación de polifenoles PFT se utilizó el método Folin-Ciocalteu presentando un 1820.41 (mg de ácido gálico / 100 g); en cuanto a capacidad antioxidante TEAC – ABTS presentó 739.92 (μmol trolox / 100 g). Los datos obtenidos de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de los extractos de fruta (mio mio) fueron notablemente superiores a los reportados comúnmente.

De acuerdo a ello indica que estas frutas pueden usarse como fuente de antioxidantes en forma de colorantes naturales. Los extractos de mio mio corresponden a estructuras de antocianinas con una alta capacidad antioxidante, con un futuro prometedor para uso agroindustrial. De acuerdo a la investigación de (Villano, 2017) titulado. “Capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de los frutos silvestres *Gaultheria glomerata* (cav.) Sleumer (Machamacha), *Monnina vargassi ferreyra* (condorpausan), *Vaccinium floribundum kunth* (alaybilí) y *Rubus roseus poir* (frambuesa silvestre)”. Demostraron ser una fuente importante de antioxidantes, donde la frambuesa silvestre ha demostrado que tiene mayor capacidad antioxidante, fenoles totales en comparación a los frutos Sleumer (Machamacha), (Condorpausan) respectivamente. No obstante, la diferencia mínima de capacidad antioxidantes y fenoles totales presentes en estos frutos han demostrado tener niveles elevados de capacidad antioxidante y fenoles totales en relación a otros frutos comerciales estudiados por otros autores por lo que nos va a permitir preservar, revalorar estos frutos desconocidos.

Del mismo modo en la investigación de (Price y otros, 2017) denominado “Efecto del congelado y refrigerado en el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de arándanos (*Vaccinium corymbosum*, variedad “biloxi”) cultivados en diferentes microclimas de Perú”. Concluye que los arándanos almacenados a temperaturas de refrigeración (28 días) y congelación (42 días) provenientes de dos localidades del Perú presentaron variación en los polifenoles totales, antocianinas totales, actividad antioxidante. Los niveles de polifenoles incrementaron en 85,5% y 61,2%, en refrigerado y congelado; y la actividad antioxidante incrementó en 56,7% en refrigeración y 58,6% en congelación, CAT disminuyó en 57,1% en la fruta refrigerada y 45,2% en congelado. Los arándanos evaluados almacenados en



frío, pueden considerarse alimentos funcionales por el alto nivel de antocianinas superiores a la recomendación de 50 mg/d, contribuyendo a contrarrestar y reducir las diferentes patologías crónicas no transmisibles.

Con estas investigaciones se contribuirá al consumo de alimentos bioactivos y benéficos, además de promover a los agricultores a producir dicho fruto, así mismo son resistentes y adaptables a climas como el de nuestra región, además de plagas y enfermedades.

1.2.4 Delimitación

1.2.4.1 Espacial

La investigación se ejecutó en los laboratorios de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

1.2.4.2 Temporal

La investigación se realizó en función a la recolección de muestras de los frutos maduros de Machamacha (*Pernettya prostrata*) recolectándose en el año 2019. Considerando tentativa los meses más lluviosos de entre (enero – marzo) de mayor producción sin desestimar que la producción se da durante todo el año en cantidad regular.

1.2.4.3 Tecnológica

Los resultados de evaluación del contenido de bioactivos estudiados será a través de la experimentación directa con muestras de frutos maduros en tres estados de conservación, identificados con métodos estandarizados, materiales y equipos de laboratorio para recopilación de datos.



CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPOTESIS

2.1 Objetivos de la investigación

2.1.1 General

Evaluar el contenido de polifenoles totales, antocianinas, y la capacidad antioxidante de los frutos maduros de Machamacha (*Pernettya prostrata*) en diferentes estados de conservación (fresco, seco y congelado).

2.1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar los Polifenoles totales de los frutos maduros de Machamacha en diferentes estados de conservación (fresco, seco y congelado) por la técnica del reactivo Folin Ciocalteau.
- Evaluar el CAT de las muestras maduras de Machamacha en diferentes estados de conservación (fresco, seco y congelado) a través de la diferencia de pH.
- Evaluar la eficiencia anti radical de las muestras maduras de Machamacha en diferentes estados de conservación (fresco, seco y congelado) utilizando el método de TEAC DPPH.

2.2 Hipótesis de la investigación

2.2.1 Hipótesis general

Si los frutos maduros de Machamacha (*Pernettya prostrata*) son sometidos a diferentes estados de conservación (seco, fresco, congelado) se verán influenciados en su CAT, polifenoles totales, y capacidad antioxidante.

2.2.2 Hipótesis específicos

- Si los frutos maduros de Machamacha son secados entonces existe la probabilidad de que se vean afectados en su CAT, PFT y capacidad antioxidante.
- Los frutos maduros de Machamacha fresco contienen antocianinas totales, PFT y actividad anti radicales.

- Si los frutos maduros de Machamacha son congelados entonces existe la probabilidad de que se vean afectados en su contenido de antocianinas totales, contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante.

2.3 Operacionalización de la variable

2.3.1 Definición de variables

De acuerdo al tipo de investigación experimental descriptivo las variables serán de la siguiente manera:

a) Variable independiente

- Frutos maduros frescos de Machamacha (*Pernettya prostrata*)
- Frutos maduros secos de Machamacha (*Pernettya prostrata*)
- Frutos maduros congelados de Machamacha (*Pernettya prostrata*)

b) Variable dependiente

Dependerán mucho del tipo de conservación de los frutos maduros de Machamacha.

- Contenido de antocianinas totales en frutos maduros (fresco, seco y congelado)
- Contenido de polifenoles totales en frutos maduros (fresco, seco y congelado)
- Capacidad antioxidante en frutos maduros (fresco, seco y congelado).

2.3.2 Operacionalización de variables

Tabla 1 — Operacionalización de las variables

Variables	Componente	Indicador
Independientes	Frutos maduros de Machamacha FRESCO	Gr
	Frutos maduros de Machamacha SECO	Gr
	Frutos maduros de Machamacha CONGELADO	Gr
Dependientes	Contenido de antocianinas totales	CAT (mg de cianidina 3-glucósido/gr)
	Contenido de polifenoles totales	PFT (mg ac. Gálico/100g)
	Capacidad de antioxidante	TEAC DPPH ($\mu\text{mol/gr}$)

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1 Antecedentes

- a) En la investigación de Barragán (2018), los “Compuestos Bioactivos y capacidad antioxidante del mío – mío (*Coriariaruscifolia L*) en tres estados de conservación (fresco, seco y congelado)”. Siendo el objetivo de esta investigación caracterizar las antocianinas por espectroscopia UV Vis, FTIR-ATR y HPLC, determinar el contenido antocianinas (AT), polifenoles totales (PFT) y capacidad antioxidante en frutos nativos de mio mio en tres estados (fresco, seco y congelado) (*Coriaria ruscifolia L*) de Abancay, Apurímac-Perú. Estas determinaciones se efectuaron por métodos de pH diferencial, Folin Ciocalteu y capacidad antioxidante TEAC DPPH y DPPH. La extracción de pigmentos fue realizada con metanol acidificado con HCl al 0.01% de concentración. Los espectros Uv Vis y FTIR mostraron características antociánicas, identificándose por HPLC la cianidina como antocianina mayoritaria. El contenido de (AT) fue de 440.22 (mg cianidina 3- glucósido/100g), PFT de 371.71 (mg ácido gálico/100g), TEAC DPPH 134.40 ($\mu\text{mol trolox/g}$) y TEAC DPPH 82.70 ($\mu\text{mol trolox/g}$). En conclusión, los extractos del mio mio corresponden a estructuras antociánicas con una gran capacidad antioxidante, con un futuro promisorio para uso agroindustrial. En este trabajo también se observó correlación significativa entre el contenido de antocianinas totales y la capacidad antioxidante TEACDPPH.
- b) En la presente investigación de tesis de Villano (2017), titulado “Compuestos bioactivos y Capacidad antioxidante (fenoles y antocianinas) de los frutos silvestres frescos: *Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer (Machamacha), *Monnina vargassi* Ferreyra (Condorpausan), *Vaccinium floribundum kunth* (Alaybilí) y *Rubus roseus* Poir (Frambuesa silvestre)”. Determinó la capacidad antioxidante utilizando la metodología de decoloración del radical DPPH y como estándar la curva de calibración de Trolox; para determinar los fenoles totales utilizó el método espectrofotométrico con el reactivo de Folin Ciocalteu y como estándar de fenoles, el ácido gálico, luego para determinar el contenido de antocianinas totales el método de pH diferencial. Los resultados obtenidos por quintuplicado, fueron tabulados y evaluados por la metodología de análisis de varianza de ANOVA, aplicando las diferencias mínimas



significativas (LSD) de Fisher como método de comparación múltiple con un nivel de confianza del 95 %, significancia de 0.05, para ello se utilizó el paquete estadístico de STATGRAPHICS Centurion XVI.I y Excel 2013, donde los valores obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativas; el nivel de la capacidad antioxidante mayor fue del fruto Frambuesa silvestre con 25010.87 ($\mu\text{g Eq}^* \text{Trolox}/100 \text{ g fruto fresco}$), seguido por Machamacha 23328.90 ($\mu\text{g Eq}^* \text{Trolox}/100 \text{ g fruto fresco}$) luego, Alaybilí con 22902.90 ($\mu\text{g Eq}^* \text{Trolox}/100 \text{ g fruto fresco}$) y Condorpausan 21924.65 ($\mu\text{g Eq}^* \text{Trolox}/100 \text{ g fruto fresco}$) resultaron tener menor nivel de capacidad antioxidante; en lo que respecta al contenido de fenoles totales el fruto con mayor nivel fue Frambuesa silvestre con 5370.42 (mg AGE/100 g fruto fresco) seguido por Machamacha 5187.77 (mg AGE/100 g fruto fresco), los frutos silvestres de Alaybilí 4817.80 (mg AGE/100 g fruto fresco) y Condorpausan 4707.21 (mg AGE/100 g fruto fresco) resultaron con menor contenido de fenoles totales; en cuanto al contenido de antocianinas totales en alto nivel correspondió al fruto Frambuesa silvestre con 2013.967 (mg cianidina-3 glucósido/100 g fruto fresco), seguido por Machamacha con 1033.184 (mg cianidina-3-glucosido/100 g fruto fresco), Alaybilí 914.875 (mg cianidina-3- glucósido/100 g fruto fresco) y Condorpausan con 862.006 (mg cianidina-3- glucósido/100 g fruto fresco), estos tres últimos frutos (Machamacha, Alaybilí y Condorpausan) resultaron con menor nivel del contenido de antocianinas; con alto nivel de captación de radicales libres fue el fruto *Rubus roseus* Poir (Frambuesa silvestre, de igual manera destacó en su alto contenido de fenoles y antocianinas los frutos silvestres: *Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer (Machamacha), *Vaccinium floribundum* kunth (Alaybilí) y *Monnina vargassi* Ferreyra (Condorpausan) demostraron su nivel elevado de la capacidad antioxidante, contenido de fenoles totales y antocianinas totales.

- c) En la investigación de (Price y otros, 2017), con título “Efecto del congelado y refrigerado en la cantidad de polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante de arándanos (*Vaccinium corymbosum*, variedad “biloxi”) cultivados en diferentes microclimas de Perú”. Determina el efecto del refrigerado a 4°C, congelado a -18°C sobre el contenido de polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante de arándanos (*Vaccinium corymbosum* var. Biloxi). Utilizando los métodos de Folin Ciocalteu, pH diferencial y Brand-Williams, respectivamente. Además, determinó el pH y grados Brix, así como la cinética de degradación de antocianinas en el tiempo. Obtuvo las medias empleando la prueba de Tukey, con una significación del 0.05%



para hallar las diferencias entre los grupos, haciendo uso del programa STATISTICA. Posteriormente encontró cambio significativo ($p < 0.05$ en las variables de estudio. El pH aumentó en 5.8% para refrigerado y 4.1% para congelado y con un incremento de grados Brix de 37% para refrigerado y 20.4% para congelado. El contenido de polifenoles aumentó (85.5% en refrigeración y 61.2% en congelación) y la actividad antioxidante incremento (56.7% en refrigeración y 58.6% en congelación), mientras que las antocianinas totales disminuyeron en ambos tratamientos (57.1% en refrigeración y 45.1% en congelación). El tratamiento de congelación presentó menor velocidad de degradación de antocianinas, mientras no hubo diferencia en refrigeración. No obstante, ambos tratamientos mantuvieron niveles óptimos de compuestos favorables para la salud humana.

- d) En la investigación de Aroni (2013), titulado “Evaluación de la estabilidad de antocianinas de los frutos de Capachu (*Hesperomeles escalloniifolia* Schldtl), Huancachu (*Berberis cummutata* Eichler) Cheqche (*Berberis humbertiana* J.F. Macbr) y Alaybilí (*Vaccinium floribundum* Kunthfrente) frente al pH y temperatura”. Se evaluó la estabilidad de las antocianidinas de los frutos utilizando Cromatografía (HPLC), cuantificó antocianinas totales a través del método del pH diferencial misma metodología para todos los frutos. Evaluó la estabilidad, aplicando el diseño experimental factorial en valores de temperaturas (20, 30 y 40 °C) y pH (3; 4 y 5). Obteniendo un CAT de 2026.201 mg/100 g (Capachu), 1271.809 mg/100 g (Huancachu), 2306.297 mg/100 g (Cheqche) y 319.170 mg/100 g (Alaybili).
- e) En la investigación de Martínez (2011), titulado “Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schldtl (zarzamora)”. Se evaluaron las antocianinas por HPLC resultando en fenoles 29.23 ± 1.4 mg equivalentes de ácido gálico, flavonoides 5.26 ± 0.25 mg equivalentes de catequina y antocianinas 12.3 mg por cada gramo de fruto seco. El alto contenido de antocianinas en esta especie nos permite recomendar su uso como antioxidante.
- f) En la investigación de (Heras y otros, 2013), titulado “Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.)”. Para la optimización del proceso de extracción de las antocianinas se empleó la metodología de superficie de respuesta con tres factores: concentración de solvente etanol acidificado 1% ácido ortofosfórico (50 a 90% v/v),



temperatura extracción (30 a 60°C) y tiempo extracción (4 a 12 horas). La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó empleando el método ABTS La optimización del modelo mostró que las condiciones de extracción con 50% de solvente acidificado, tiempo de proceso de 4 horas y temperatura de 30 °C presentó los mayores contenidos de antocianinas, alcanzando 62 mg/100g.

- g) En el presente trabajo de investigación Llimpe (2017), “Evalúa el CA por diferencia de pH hallando 0.519, 4.242 y 10.532 mg de Cianidina/g de muestra en estado verde, pintón y maduro en los frutos de Machamacha (*Vaccinium floribundum* Kunth)”. La AA detectada por el método radical DPPH, fue de 569.3637, 550.1427 y 323.9630 μ mol TE/g muestra en estado verde, pintón y maduro siendo en verde con mayor presencia. Las características fisicoquímicas de Machamacha maduro presento: pH 4, humedad 84.760%, 0.028 de acidez expresado en ácido cítrico, grasa 0.536%, proteína 0.897%, cenizas 0.478%, carbohidratos totales 13.329%. Estos valores consideran al Machamacha como promisorio, para su aprovechamiento agroindustrial e industrial.

3.2 Marco referencial

3.2.1 Machamacha (*Pernettya prostrata*)

“Machamacha”, arbusto pequeño, erecto o subprostrado, de hasta 50cm de altura. Hojas simples, alternas, elípticas, coriáceas, con la margen crenada y ligeramente revoluta, lamina aproximadamente de 0.7-1.7 x 0.3-07 cm. Flores axilares, solitarias tendiendo a agruparse al final de las ramas, de color rosado-encendido a rosado blanquecino, ovario súpero. Cáliz de 2-36mm de largo, verde claro; corola 5.6-6.8 mm de largo urceolada-cilíndrica. Tiene 10 estambres, fruto bayo, pequeña, sub globosa, carnosa y de color morado al madurar. 10. (Braul y otros, 2016)





Figura 1 — Fotografía tomada de frutos maduros de Machamacha (*Pernettya Prostrata*) Lado derecho representa un racimo y el lado izquierdo hojas y tallos con frutos maduros

3.2.2 Nombre común

Tomando en cuenta a (Pedraza y otros, 2004), el Mortiño, Borrachera, reventadera, venenoso, cimarrón, gateadero, colorado (Cauca), chirriadera (Cundinamarca), moridera (Nariño) o Bichacha (Santander).

3.2.3 Sinónimos

(Pedraza y otros, 2004), la *Gaultheria myrsinoides* Kunth; *Gaultheria sanmartensis* Rusby; *Pernettya leucantha* Linden ex *Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer; *Pernettya robusta* Wedd; *Pernettya pentlandii* DC. Var. *Parvifolia* (Benth.) Wedd. Subvar. *Humilis* Planch. Wedd.

3.2.4 Distribución y hábitat

De acuerdo a (Pedraza y otros, 2004), la especie de amplia variabilidad y distribución, se encuentra en todo tipo de ambientes, como pajonales, escarpes, matorrales y sitios descubiertos. Floración- fructificación: julio, agosto y diciembre-marzo.

Por otro lado, (Correa y otros, 1992), Es una de las familias características de los bosques montanos peruanos, está representada por 22 géneros y 132 especies. Asimismo, el género *Pernettya* está constituido por un total de 20 especies, 15 de ellas distribuida en américa.

3.2.5 Clasificación botánica

Según Surco, (2018) la universidad nacional de Colombia hace su clasificación taxonómica de Machamacha realizada en el año 2007 por la siguiente:

3.2.6 Taxonomía

Reino : Plantae

Phylum : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Orden : Ericales

Familia : Ericaceae

Género : *Pernettya*

Epíteto específico : *Prostrata*

Extraído de (Surco,2018)

3.2.7 Composición química del fruto de Machamacha

Tabla 2 — Composición química de los frutos de Machamacha (*Pernettya prostrata*)

Composición química	
Frutos	Cantidad cada 100 gramos
Proteínas	83.36%
Lípidos	0.45 g
Fibra cruda	2.80 g
Cenizas	0.50 g
Carbohidratos	11.11 mg
Calcio	100.00 mg
Sodio	1.54 mg
Potasio	1.61 mg
Fosforo	42.22 mg
Hierro	0.90 mg
Tiamina	1.10 mg
Riboflavina	0.82 mg
Ácido ascórbico	186.20 mg

Extraído de (Cortes, 2007)



3.2.8 Generalidades de los frutos de Machamacha (*Pernettya prostrata*)

Según el análisis proximal del calcio, hierro, sodio, potasio, fósforo, ácido ascórbico, tiamina y riboflavina encontrado en los frutos de la (*Pernettya prostrata*) muestran lo siguiente en la tabla N° 01.

En una investigación fármaco dinámico y toxicológico elaborado por Mezey en 1943, llega a que la naturaleza química de la sustancia activa de la planta es soluble en agua caliente y fría, menos soluble en alcohol, no se precipita en sales metálicas, tampoco reacción a alcaloides ni glucósidos. Esta actitud química, más el efecto tóxico (salivación, vómito, tambaleo, convulsiones y parálisis progresiva) relacionan al veneno común de un gran número de plantas de la familia Ericaceae, y por ende el principio tóxico de la *Pernettya prostrata* era este tipo de sustancia (andromedotoxina). (Torrenegra y otros, 1995)

3.2.9 Compuestos fenólicos

Principales metabolitos secundarios de las plantas, su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas, sintetizados y regulados genéticamente por las plantas. Además, actúan como fitoalexinas y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (p. ej. los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable. (Creus, 2004)

3.2.9.1 Estructura química y clasificación

El fenol, que es la molécula básica (Figura 02) y se compone de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH). La disposición del anillo aromático hace que los ácidos débiles, generen un efecto inductivo en el género hidroxilo. (Peñarrieta, 2014)

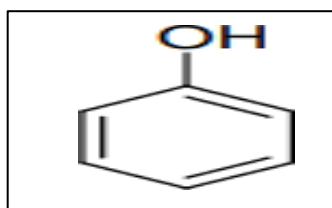


Figura 2.— Estructura química del fenol

Extraído de (Peñarrieta,2014)

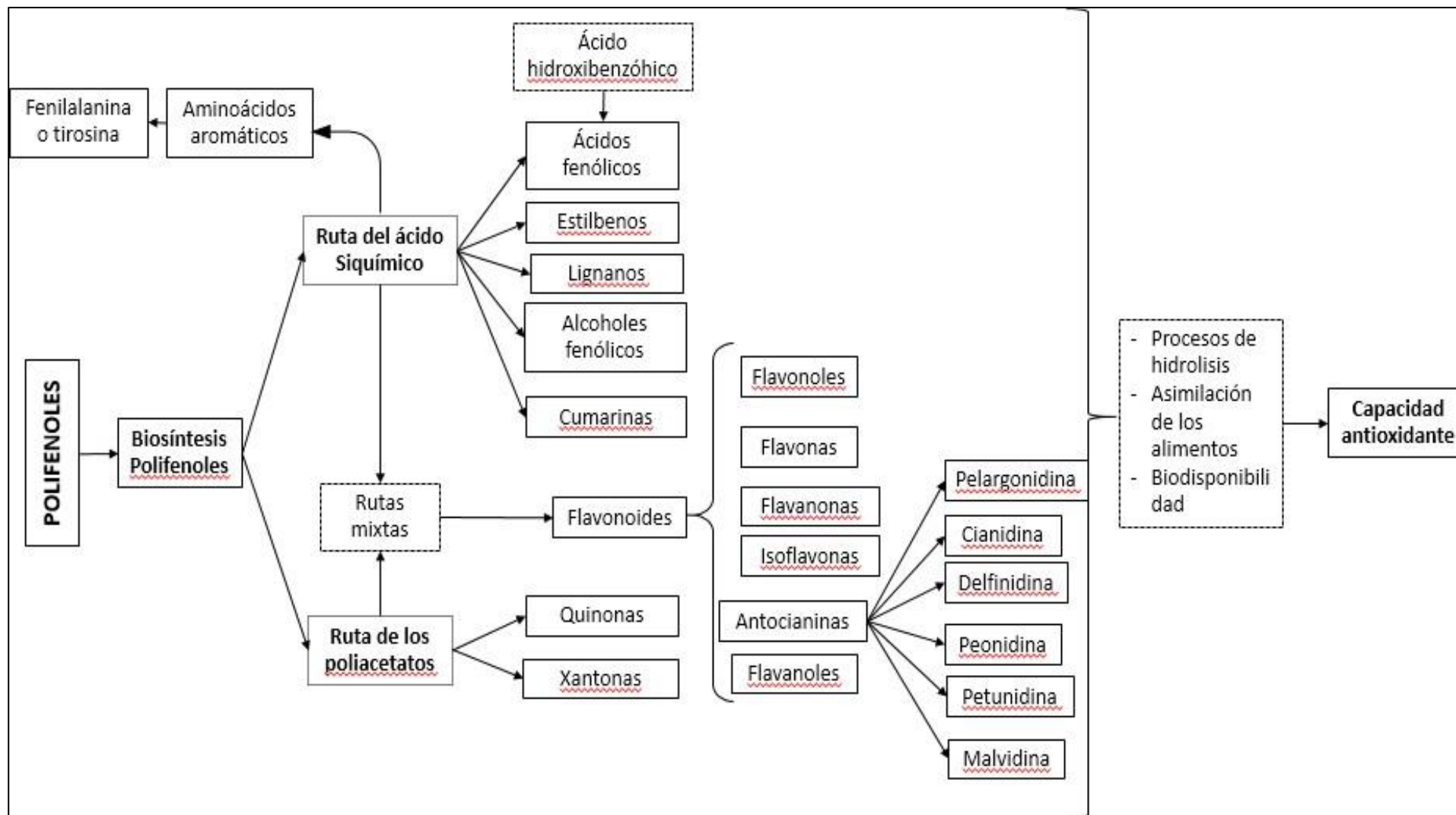


Figura 3 — Clasificación de los polifenoles

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural y biodisponibilidad. La estructura de los polifenoles se define por el número de anillos fenólicos. Siendo los principales los ácidos fenólicos (estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides). La asimilación de los polifenoles da lugar a la ruta del ácido si químico que confiere la síntesis de fenilalanina o tirosina, y de los ácidos cinámicos y sus derivados y finalmente la ruta de los poliacetatos que suministra las quinonas y las xantonas. Las rutas mixtas del ácido si químico y poli acetatos da lugar a los flavonoides siendo sus subgrupos los flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles.

a) No flavonoides

Entre ellos hay dos subgrupos:

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

b) Flavonoides (C6-C3-C6)

Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado. Subgrupos:

- Antocianos.
- Flaconas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- Flavonoles, taninos condensados y lignanos.

A. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se agrupan en: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Es necesario recordar que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos. (Peñarrieta, 2014)

B. Flavonoides

Son compuestos fenólicos y se encuentran en vegetales, semillas, frutas y bebidas como el vino y cerveza, además identificándose 5.000 flavonoides diferentes, inicialmente considerados como sustancias sin acción beneficiosa para la salud, no obstante, más tarde demostraron múltiples efectos positivos por su acción eliminadora de radicales libres. (Martínez y otros, 2002)

Son responsables del color natural de los alimentos, como las antocianinas de los colores rosa, escarlata, malva, rojo, violeta y azul de los vegetales, jugos de fruta y vinos. (Martínez y otros, 2002)

Se pueden clasificar en:

a) Flavanos

Existen tres tipos flavandioles: leucocianidina (plátano); leucopelargonidina (alfalfa de secano) y leucodelfinidina (castaño de indias).

b) Flavanonas

Son análogos de las flavonas con el anillo C saturado. Constituyen un grupo minoritario en los alimentos.

c) Isoflavonas

Se encuentran en la soja y los lupinos andinos y clasificados como fito-estrógenos debido a sus efectos estrogénicos, su consumo genera efectos en la salud, combatiendo enfermedades cardiovasculares y el cáncer. (Steiner y otros, 2008)

d) Flavonoles

Son sustanciales las quercetinas, miricetina y kaempferol con aspecto sin color o pajizo y se ubican en las hojas.

e) Flavonas

Son amarillas y pueden estar en algunas flores y frutos. Siendo indispensables la tricetina, apigenina y luteolina.



f) Antocianinas

colorantes hidrosolubles concurrente en el líquido vacuolar de las células, responsables de las coloraciones rojas, azules y violetas de las flores y hojas.

3.2.10 Antocianinas

Son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, unido por un azúcar por medio del enlace β -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ión flavilio, también llamado 2-fenilbenzopirilio agrupado en dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); el flavilio funciona como un catión. (Aguilera, 2011)

3.2.10.1 Clasificación

Se han reportado 635 antocianinas distintas. Las cuales son pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina. La tabla N° 02 muestra los sustituyentes de las antocianinas.

- La pelargonidina, responsable del color rojo por los dos sustituyentes de hidrogeno.
- La cianidina, es la más común, posee un sustituyente hidroxilo y un hidrógeno, imparte color magenta.
- La delphinidina contiene dos sustituyentes hidroxilo y es responsable del color azul.
- La peonidina deriva de la cianidina, petunidina y malvidina. (Mosquera y otros, 2015)

Se distribuye en un 30% de cianidina, 22% delphinidina, 18% de pelargonidina, peonidina y malvidina en un 7.5% y petunidina en un 5% en promedio en los vegetales.



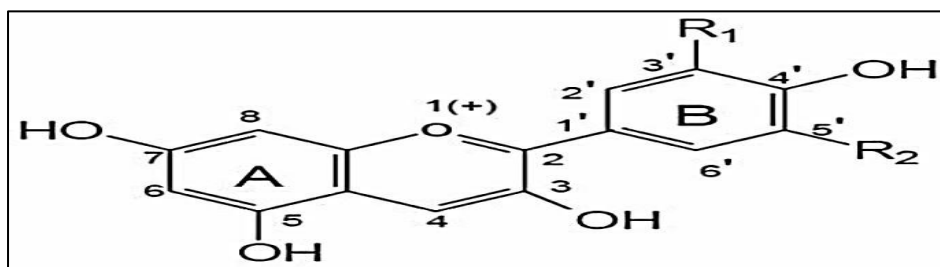


Figura 4 — Estructura básica de las antocianinas

Extraído de (Crozier y otros, 2009)

Tabla 3 — Sustituyentes de las antocianinas

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

Extraído de (Crozier y otros, 2009) y (Garzón, 2008)

Por otro lado, las antocianinas presentan sustitutos glucósidos que son moléculas adicionales de azúcar que pueden unir en las posiciones 5 y 7 y raramente en las posiciones 3' y 5' y un 90% de las antocianinas contienen glucosa como único azúcar acompañante. (Mosquera y otros, 2015)

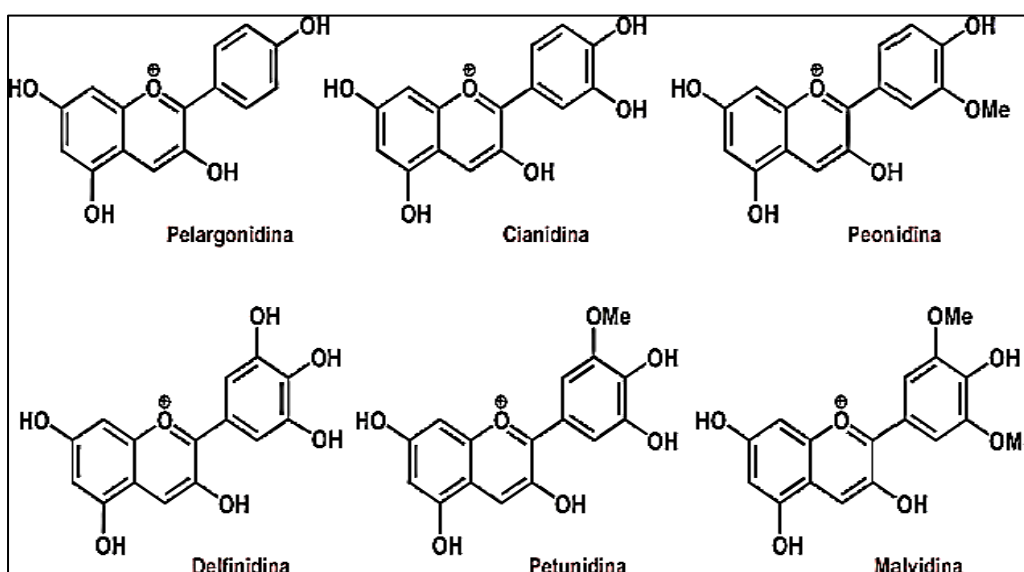


Figura 5 — Principales antocianinas de importancia en alimentos

Extraído de (Castañeda, 2009)

3.2.10.2 Componentes que afectan a la estabilidad de las antocianinas

A. Efecto del pH

A pH 1 predomina el catión flavilio, siendo la forma más estable de las antocianinas y a valores de pH 2 y 4 ocurre la pérdida de un protón, encontrándose las antocianinas preferentemente bajo las formas quinodales de color azul. A pH 5 y 6 se ubican las pseudobase carbinol y chalcona, que son incoloras y de color amarillo; ambas bastante inestables. A pH superiores a 7, las antocianinas se degradan rápidamente por oxidación con el aire. (Francis, 1982)

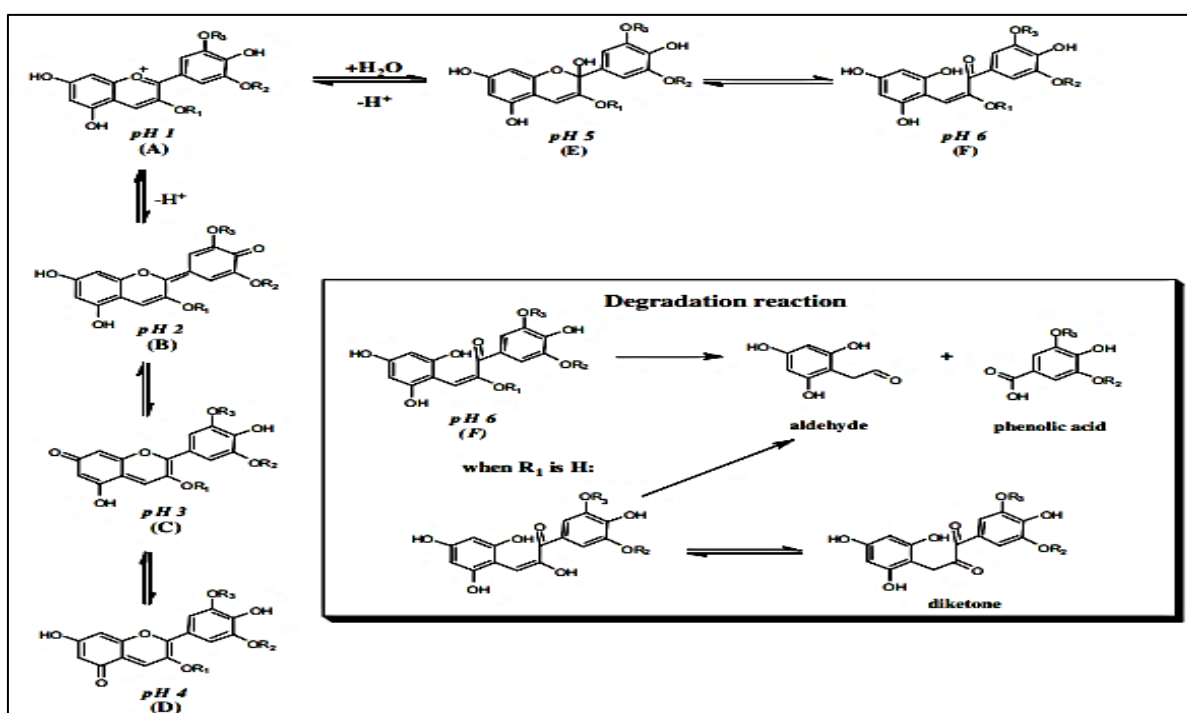


Figura 6 — Conformación de las antocianinas a diferentes valores de pH

Extraído de (Durst y otros, 2001)

B. Asociación con otros compuestos e iones

El intervalo de pH en las plantas y sus derivados es de 3 a 7, se encuentran como estructuras incoloras (Salvador, 2006).

Pueden cambiar de color cuando forman complejos con otros compuestos fenólicos (catequinas, taninos o flavonoides) favoreciendo la absorción a mayores longitudes de onda. La pigmentación intramolecular y copigmentación favorecen la intensidad y su estabilidad del color.

C. Efecto de las enzimas

Las enzimas polifenoloxidasas, peroxidasas, glicolasas y estearasas degradan a los compuestos fenólicos a través del oscurecimiento enzimático a causa del deterioro del tejido de los alimentos y reacciona con las o-quinonas generados por la oxidación enzimática de fenoles. (Salvador, 2006)

D. Efecto de los ácidos

Cuando el ácido ascórbico se degrada, forman el peróxido quienes reaccionan con el azúcar a un pH 2 decolorando a las antocianinas en presencia del ion cobre o fierro cuando estas se almacenan por tiempos prolongados.

E. Sulfitado

El proceso de sulfitado de frutas es preponderante para almacenar las frutas antes de producir jaleas o conservas. Sin embargo, puede quitar el color de las antocianinas, debido a la adición de sulfito, anhídrido sulfuroso para la conservación de los frutos, no obstante, las formas sulfónicas ejercen un efecto estabilizador sobre el enlace glucosídico y evitan la hidrólisis de la antocianina. (Salvador, 2006)

F. Temperatura

El tratamiento térmico influye en la destrucción de las antocianinas; presentando pérdida del color. La figura 06 demuestra la degradación de las antocianinas del jugo de uva cuando es calentado en diferentes condiciones; observándose una desigualdad entre la absorbancia de los productos tratados térmicamente. (Salvador, 2006)



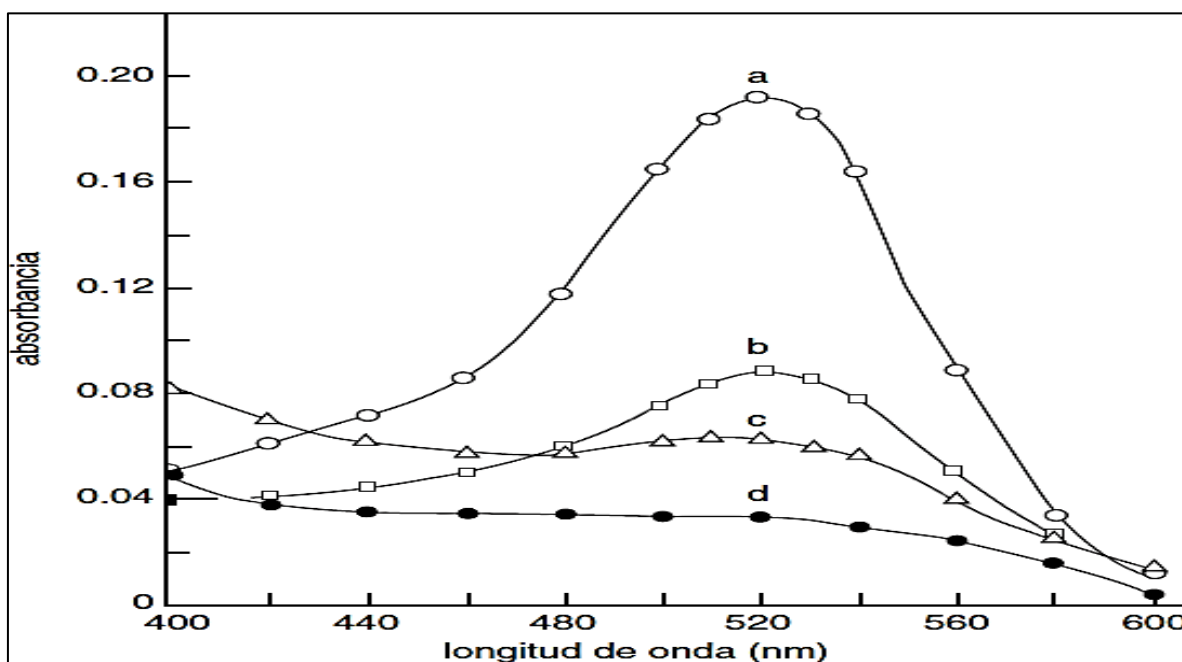


Figura 7 — Curva espectrofotométrica de degradación de antocianinas del jugo de uva durante el almacenamiento: (a) control sin calentar; (b) calentando a 90°C por 1 hora; (c) calentando a 99°C por dos horas; (d) jugo de uva comercial

Extraído de (Salvador, 2006)

3.2.10.3 Antocianinas en frutas

Químicamente son glucósidos de las antocianidinas y pueden ser encontradas en ciertos vegetales y cereales. Dentro de los frutos que contienen estos compuestos se pueden citar a la uva, fresa, arándano, cereza, mortiño, grosella. (Martínez y otros, 2008)

Tabla 4 — Antocianidinas que predomina en las principales bayas

Especie	Antocianina dominante
Arándano (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	Malvidina-3-glucósido
	Cianidina-3-glucósido
	Mirtilina
	Cianidina-3-galactósido
Mora (<i>Rubus fruticosus</i>)	Cianidina-3-glucósido
Grosella negra (<i>Ribes nigrum</i>)	Delfinidina-3-runitósido
Arándano azul (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	Malvidina-3-arabinósido
	Malvidina-3-glucósido
	Malvidina-3-galactósido
Frambuesa (<i>Rubus idaeus</i>)	Cianidina-3-soforósido
Frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Pelargonidina-3-glucósido
Mortiño a (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth)	Delfinidina hexóxido
	Cianidina hexósido

Extraído de (Francis, 1982)

3.2.10.4 Propiedades funcionales

El atractivo de estos pigmentos se ha desarrollado por los resultados terapéuticos y beneficiosos, como las reducciones de enfermedades coronarias, prevención de cáncer, tumores, inflamaciones y diabetes, dificultades visuales y el proceder intelectual. (Crozier y otros, 2009)

El consumo de alimentos ricos en antocianinas se está incrementando de manera significativa debido a los beneficios en la salud que llegaron a ser evidentes. (Zapata, 2014)

3.2.10.5 Extracción de las antocianinas

Se utiliza con frecuencia el metanol o etanol con una pequeña cantidad de ácido (15%, HCl 1M) a fin de obtener la forma del catión flavilio, el cual es estable en un medio altamente ácido. (Vasco, C. et al. 2009)
Es aconsejable usar etanol por ser menos tóxico, generalmente en usos alimenticios y ensayos clínicos. (Durst y otros, 2001)

A. Factores que influyen en la extracción de las antocianinas

El proceso de extracción se ve afectado por varios factores como:

a) Tamaño de partícula

El acortamiento del tamaño facilita la extracción de un constituyente deseado y por ello es importante el grado de molienda o fineza del producto para una buena difusión. difusión del soluto en el solvente. Cuanta más pequeños sean las partículas mucho mejor es el contacto entre es el área interfacial entre el sólido y el líquido. (Abdel y otros, 2003)

b) Temperatura

El calor permite el transcurso del agua a través de las membranas de las células vegetales. Debiendo ser lo suficientemente alta para una buena solubilidad del pigmento, previniendo la hidrólisis y solubilización del pigmento. (Abdel y otros, 2003)



c) Disolvente

Se utiliza etanol con frecuencia para extraer los principios activos de las plantas, no obstante, el agua es considerada el solvente universal por su capacidad de extracción en fase sólido-líquido. (Abdel y otros, 1993)

d) Tiempo de extracción

Tiene menor incidencia en la extracción del colorante, sin embargo, dependiendo de la técnica empleada, los volúmenes a tratar, y la temperatura utilizada, será un factor importante que deberá ser tomado en consideración en los procesos industriales y evaluar la incidencia en los costos, tanto de operación como de inversión. (Ibarz y otros, 2002)

e) Solventes para extracción

- **Agua destilada**

La capacidad del agua para diluir solventes iónicas y sustancias polares suministra la polaridad de la molécula interactuando sus dipolos con ella. Los solutos polares actúan como donadores y en otros como receptores, en los puentes de hidrógeno que establecen entre sus moléculas y las del agua. Esta hidratación ayuda a su separación y solubilización de las sustancias iónicas. (Ibarz y otros, 2002)

- **Etanol**

El etanol, cuya fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$, producto químico orgánico sintético más empleado por el hombre, es importante por sus usos más comunes en la industria, doméstico y medicinales, la industria emplea el Etanol como disolvente. (Ibarz y otros, 2002)

- **Metanol**

Compuesto químico del grupo de los alcoholes, conocido como alcohol metílico, y el más sencillo del grupo. Su fórmula es CH_3OH , cuando está a temperatura ambiente,



se presenta en estado líquido e incoloro, siendo bastante tóxico e inflamable. Con poca viscosidad y olor intenso, perceptible a partir de los 2 ppm. Puede ser usado como disolvente o combustible, siendo bastante miscible en agua, y otros solventes de tipo orgánico. (Ibarz y otros, 2002)

3.2.10.6 Cuantificación total de antocianinas mediante el método del pH diferencial

La metodología de pH-diferencial ayuda a la estimación del contenido de antocianinas totales, y en la presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias a través del uso de sistemas tampón que decolora a las antocianinas sin afectar a los compuestos interferentes obteniendo una medida de absorción máxima en la región visible. Los agentes blanqueadores más empleados son sulfito de sodio y peróxido de hidrogeno. (Ullauri, 2010)

Se determinó el contenido de antocianinas totales a través del uso del método de pH diferencial, de acuerdo a la decoloración y al pH en el que se encuentran, quienes presentan más coloración en su forma oxonio a pH 1.0 (KCl 0.025 M) e incoloro en su forma hemiacetal a pH 4.5 (CH₃COONa 0.4 M), esta diferencia de color nos permitirá medir las antocianinas a longitudes de onda de 520 y 700 nm y como blanco agua destilada. (Barragán, 2018)

Los cálculos para cuantificar las antocianinas totales se efectuaron de acuerdo a la fórmula:

Calculo de absorbancia de la muestra

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

Cálculo del contenido de antocianinas

$$\text{CAT} \left(\frac{\text{mg cianidina } -3\text{-glucósido}}{L} \right) = \frac{A \times \text{XPM} \times \text{FD} \times 100}{\text{ExL}}$$

Donde:

A : es el cambio de absorbancia

CAT: contenido de antocianinas totales (mg/L)

PM : masa molecular para cianidina-3-glucósido 444.2/mol

ϵ : coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido 26900 L/mol. cm l: camino óptico de celda 1cm

FD : factor de dilución

3.2.11 Polifenoles

Agrupado por sustancias con estructuras diversas, simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de elevada masa molecular, como los taninos hidrolizables y condensados. (Centeno, 2013)

Los polifenoles al tener un grupo alcohol y estar glicosilados por los monosacáridos y oligosacáridos dan lugar a una amplia variedad de compuestos, uniones formadas mediante enlaces glicosídicos por la pérdida de una molécula de azúcar y aglicón; estos glicósidos son solubles en agua, en etanol, metanol, o mezclas de ellos en agua. (Rafael, 2017)

3.2.11.1 Anabolismo de los polifenoles

Son producto del metabolismo secundario de las plantas que da lugar a la ruta del ácido siquímico que proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), además de sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano) y los poliacetatos proporcionan las quinonas y las xantonas. (Quiñones y otros, 2012)

3.2.11.2 Biodisponibilidad de los polifenoles

Referente a la proporción de nutrientes que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación. Siendo importante también conocer la cantidad de polifenoles que es biodisponible, dentro del contenido total de un alimento. (Quiñones y otros, 2012)



3.2.11.3 Factores que afectan al contenido de polifenoles de los alimentos

Por su gran valor en la prevención de enfermedades es importante conocer los factores que influyen en su distribución y contenido en los alimentos.

A. De origen genético

Las variedades de los productos conllevan a que la composición sea diferente en géneros o especies; siendo uno de ellos la lechuga y manzana de variedades romana contienen mínimas sustancias fenólicas, en el caso de la manzana pueden verse afectados por las enzimas. (Giusti y otros, 2001)

B. Factores agroambientales y condiciones de conservación posterior a la cosecha

Los factores agroambientales como el suelo, nutrientes, riego, minerales (calcio, boro), sustancias nitrogenadas, pueden ser causa del déficit de la disposición fotoquímica en las frutas y verduras además de la oxidación de los mismos (Giusti y otros, 2001). En la siguientes (tabla 4,5). Observamos a todos los alimentos con contenido fenólico e imparten calidad, aceptabilidad y estabilidad actuando como como colorantes, antioxidantes.

Tabla 5 — Características organolépticas atribuidas a los compuestos fenólicos

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

Extraído de (Creus, 2004)

Tabla 6 — Contenido de fenoles totales de algunos alimentos

Alimento	Cantidad de polifenoles totalesPFT (mg ácido gálico/100 g)
Especies molidas	
Clavo de olor	16550
Menta	491
Orégano	4980
Romero	
Frutas	
Árandonos	311
Banana	155
Cerezas	259
Ciruelas	332
Duraznos	133
Frambuesas	414
Frutillas	332
Kiwis	211
Limones	51
Manzanas	250
Melones	56
Naranjas	57
Peras	178
Uvas	170
Vegetales	
Ajo	92
Apio	42
Berenjena	63
Brócoli	316
Cebollas	23
Coliflor	93
Papas	163
Pepino	22
Perejil	77
Pimiento rojo	255
Remolachas	188
Repollo colorado	231
Tomate	80
Zanahorias	35
Legumbres	
Lentejas	628
Maníes	396
Porotos	94
Bebidas	
Jarabe de chocolate	417
Vino blanco	20
Vino tinto cabernet	203

Extraído de (García, 2012)

3.2.11.4 Análisis de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu

Se puede analizar por varios métodos conocidos, sin embargo, en esta investigación está basado en la reacción de los fenoles al folin en pH básico originando un color azul y ser determinada a 765nm en espectrofotometría.

Contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que reacciona con los fenoles presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles (Figura 7). Tomás, F. 2003)

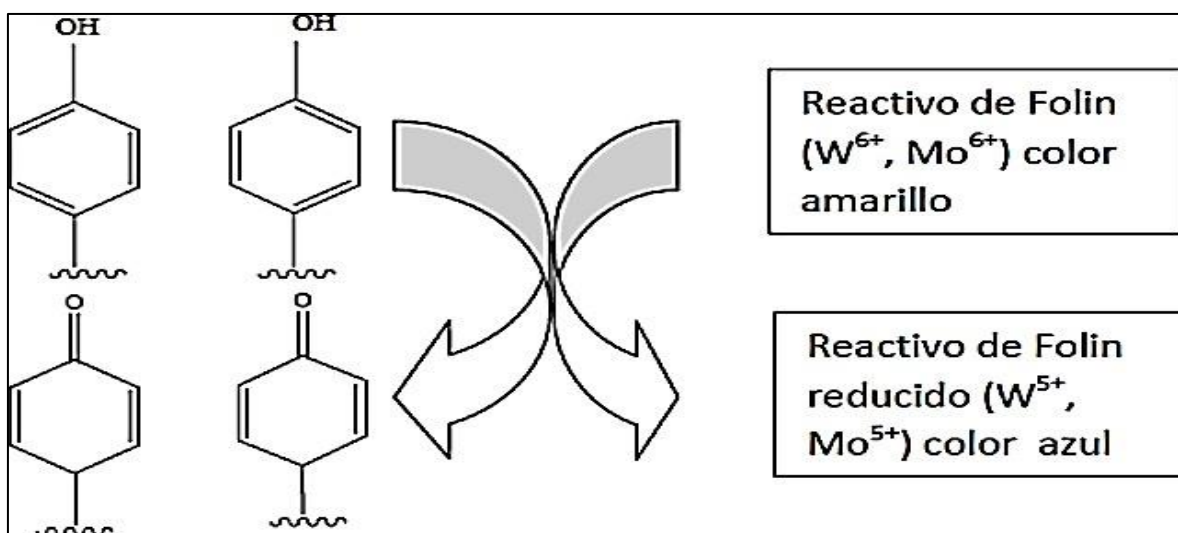


Figura 8 — Formas de acción del reactivo del Folin Ciocalteu

Extraído de (Tomás, 2003)

Este mecanismo es una reacción Redox, además puede considerarse, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, genera la aparición de una coloración azulada que se muestra 765 nm de absorción, y se cuantifica por espectrofotometría en relación a un patrón de ácido gálico (Figura 7). (Tomás, 2003)

Para la determinación del contenido de polifenoles totales se usó como patrón de referencia el ácido gálico desde 0 a 5 (mg/L) cuyo R2 fue 0.969 a partir de

la curva de calibración con una pendiente de $Y = 2.701X - 0.0354.000$. Los cálculos se efectuaron con la siguiente ecuación: (Barragán, 2018)

$$PFT \left(\frac{\text{mg ácido gálico}}{\text{litro}} \right) = \left[\frac{\text{Abs.muestra} - A}{B} \right] * FD$$

Donde:

Abs. Muestra	: Absorbancia de la muestra
A	: Intercepto
B	: Pendiente
FD	: Factor de dilución

3.2.12 Compuestos antioxidantes

Son compuestos de sustancias moleculares capaces de retardar y prevenir la oxidación y ceder electrones (agente reductor). Los seres humanos y los seres vivos en general estamos compuestos de células, que con el tiempo y otros factores (luz solar, problemas de alimentación, etc.) causan efectos secundarios como el estrés oxidativo a causa de la liberación de radicales libres y se componen de la siguiente forma:

- **Endógenos:** son bio-sintetizados por el organismo: catalasa, superóxido dismutasa y el glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasas y sulfoxido-metionina-reductasas. (Haytowitz y otros, 2010)
- **Exógenos:** conforman la parte activa del núcleo de las enzimas antioxidantes a través de la dieta no enzimáticos como las vitaminas E y C, los flavonoides, licopenos, beta-carotenos, fitoestrógenos, polifenoles, glutatión, ácido úrico, y melatonina, las vitaminas los oligoelementos como el cobre, zinc, manganeso, selenio y hierro deben ser añadidos al organismo a través de la dieta. (Haytowitz y otros, 2010)

3.2.13 Radicales libres

Átomos que tienen un electrón desapareado que ocasiona alta inestabilidad química confiriéndole reactividad oxidante para otras especies químicas que se encuentren cercanas las cuales reaccionan rápidamente. (García y otros, 2015)

Son muy reactivas y tienen una vida breve, por lo que actúan en el lugar donde se forman y son difíciles de dosificar, son pequeñas moléculas difusibles producidas por diferentes mecanismos, a nivel microsomal y en los cloroplastos, al interactuar con las biomoléculas del organismo producen daño celular (oxidativo). (Barragán, 2017)

3.2.13.1 Consecuencias nocivas de los radicales libres

Las diferentes macromoléculas se ven afectados por sustancias reactantes por el oxígeno y por ende el daño celular.

a) Lípidos.

Los lípidos afectan las estructuras de los ácidos grasos poliinsaturados, alterando la permeabilidad de la membrana celular, produciendo la muerte celular. Los ácidos grasos insaturados son fáciles de oxidarse por los radicales libres del oxígeno. (Salinas, 2006)

Los factores que influyen en la peroxidación lipídica son:

- Accesibilidad de las membranas en ácidos grasos poliinsaturados.
- Presencia de hierro.
- Naturaleza del agente inicializador cuali y cuantitativa.
- La tensión de oxígeno.
- Los betacarotenos, alfa tocoferoles, glutatión.
- La activación de enzimas del glutatión peroxidasa. (Venereo, 2002)

b) Proteínas

La oxidación de los aminoácidos como la fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas y grupos carbonilos. (Salinas, 2006)

c) Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Las modificaciones de las bases oxidativas, fragmentaciones de citosinas del ADN activadores de genes, son a causa de la pérdida de una proteína por daño, produciendo la inactivación y pérdida de genes supresores de tumores que producen la iniciación, progresión de carcinogénesis. (Really y otros, 1990)



d) Estrés oxidativo

Se produce debido a la exposición de la materia viva a fuentes que producen ruptura del equilibrio e incremento excesivo de especies reactivas de oxígeno. Provocando alteraciones en el organismo, sistema o grupo celular, conocido como mecanismo general de daño celular, relacionado a números crecientes de síndrome y anomalías médicas involucrado en la génesis. (Ames y otros, 1993)

3.2.14 Capacidad antioxidante

Sustancia que permite la inhibición o degradación oxidativa, donde un antioxidante actúa reaccionando con los radicales libres; debemos distinguir la actividad estabilizadora de radicales libres que hace mención a la reactividad de un antioxidante frente a los radicales libres midiéndose por la velocidad de reacción y actividad antioxidante evalúa la capacidad para retardar la degradación oxidativa. (Rangan y otros, 1993)

Las metodologías usadas para determinar la actividad antioxidante buscan cerciorarse si un agente oxidante produce daño oxidativo a un sustrato oxidable, deterioro que es frenado en presencia de un anti radical. (Rangan y otros, 1993)

Los métodos directos se basan en el efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, como: proteínas, ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, grasas, lipoproteínas, membranas biológicas. Los métodos indirectos estudian la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre, como las metas estables, coloreadas, con fuerte absorción en el espectro visible DPPH y ABTS.

3.2.14.1 Capacidad antioxidante con la técnica (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH))

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es un radical libre estable en medio metanólico el cual tiene un electrón desapareado sobre su molécula que no se dimeriza. La ausencia de electrón intensifica su color violeta intenso al reaccionar con el sustrato antioxidante, donando un átomo de hidrógeno y su color violeta se desvanece, este cambio de color se lee a 515 nm de absorbancia y cuantificado como capacidad antioxidante TEAC DPPH después de 30 a 120 minutos de reacción redox. (Barragán, 2018)



Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales, sin embargo, el más usado es la técnica del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH.

Para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de Machamacha, se han usado como patrón de referencia el trolox, por lo que tanto los extractos como el estándar actuaron reduciendo el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Para ello se ha preparado a 50 μM en 100 ml y esta solución se ajusta a una pendiente de 0.7 (± 0.02) con etanol. (Barragán, M. 2018)

Los cálculos se efectúan con la siguiente ecuación:

$$\text{TEAC DPPH} \left(\frac{\mu\text{mol trolox}}{\text{litro}} \right) = \left[\frac{\text{Abs.muestra} - A}{B} \right] * FD$$

Donde:

Abs. Muestra : Absorbancia de la muestra

A : Intercepto

B : Pendiente

FD : Factor de dilución

3.3 Marco conceptual

- a) **Antocianinas:** responsables de la gran cantidad de colores de las frutas, vegetales y cereales. Se intensificó la atracción por estos pigmentos por sus beneficios preventivos a enfermedades coronarias, anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorias y antidiabéticas, mejoramiento de la agudeza visual. Además de nuevas alternativas para la obtención de productos coloreados con gran valor agregado para la alimentación saludable.
- b) **Antioxidantes:** son compuestos de sustancias moleculares capaces de retrasar y contribuir a la prevención de la oxidación de un sustrato, actuando como un donador de electrones.
- c) **Machamacha:** arbusto pequeño, de hasta 50 cm de altura con hojas simples, flores axilares de color rosado-encendido a rosado blanquecino. Cáliz de 2-36 mm de

largo, verde claro. Tiene 10 estambres, fruto baya, pequeña, subglobosa, carnosa y de color morado al madurar.

- d) **Radicales libres:** Átomos que tienen un electrón desapareado que ocasiona alta inestabilidad química confiriéndole reactividad oxidante para otras especies químicas que se encuentren cercanas las cuales reaccionan rápidamente. (García y otros, 2015)
- e) **Estrés oxidativo:** ocasionado por la exposición de la materia viva a fuentes que producen ruptura del equilibrio, por un incremento excesivo de la producción de especies reactivas del oxígeno. Provocando alteraciones en el organismo, sistema o grupo celular, conocido como mecanismo general de daño celular. (Ames y otros, 1993)
- f) **Compuestos fenólicos:** son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático como las vitaminas, compuestos considerado importantes antioxidantes en la dieta, están presentes en frutas, hortalizas, raíces y cereales. Además, juegan una serie de funciones metabólicas en las plantas, en el crecimiento, reproducción, y protección contra patógenos externos y el estrés, como la radiación UV. Son responsables también del color y las características sensoriales de las plantas y alimentos.
- g) **Flavonoides:** son responsables de la coloración de las flores y frutas, haciendo un compuesto muy particular de polifenoles.
- h) **TEAC DPPH:** La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es un radical libre estable en medio metanólico por tener un electrón desapareado sobre su molécula que no se dimeriza. Funcionan como herramienta eficiente para la evaluación de la actividad antioxidante de los frutos de Machamacha.
- i) **Método Folin ciocalteu:** Es un ensayo utilizado para comprobar los compuestos fenólicos presentes en los productos naturales.

CAPÍTULO IV DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo y nivel de investigación

4.1.1 Tipo de investigación

Esta investigación corresponde al tipo descriptivo, donde se establecerán los efectos causados de las variables independientes (tratamientos), frente a las variables dependientes (componentes de evaluación).

4.1.2 Nivel de investigación

Explicativo correlacional está orientado a estudiar la relación causa y efecto que tiene los tratamientos de conservación de Machamacha (*Pernettya prostrata*) frente al contenido de antocianinas totales, contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante.

4.2 Método y diseño de investigación

4.2.1 Método de investigación

El método empleado es de carácter hipotético – deductivo de naturaleza experimental y cuantitativa donde se podrá evaluar los efectos de la variable independiente mediante la observación directa de los resultados que nos ayuden a responder las hipótesis planteadas.

4.2.2 Diseño de investigación

Corresponde al diseño experimental donde podemos identificar, medir y evaluar estadísticamente los efectos causados en el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante por procesos de secado, congelado y en fresco de los frutos maduros de Machamacha.



4.3 Población y muestra

4.3.1 Población

Considerada población a los frutos maduros de Machamacha (*Pernettya prostrata*) los cuales se recolectaron 2000 gr (constan de frutos, hojas, materia extraña y frutos sin madurar y dañados) frutos maduros de Machamacha de la zona de Sulimana del centro poblado de Sotapa del distrito de Huancarama, provincia de Andahuaylas región Apurímac. Observamos en la siguiente figura:



Figura 9 — Frutos de Machamacha maduros y pintones recolectados en envases de vidrio

4.3.2 Muestra

Se tomaron 1500gr de frutos de Machamacha con las siguientes características (maduros y pintones de color morado), posteriormente se fraccionaron 500 gr para cada tipo de estado de conservación (fresco, seco, congelado).



Figura 10 — Frutos maduros secos en envases



Figura 11 — Frutos maduros secos (izquierdo), frutos frescos (medio) y frutos congelados (derecha)

4.4 Descripción de la investigación

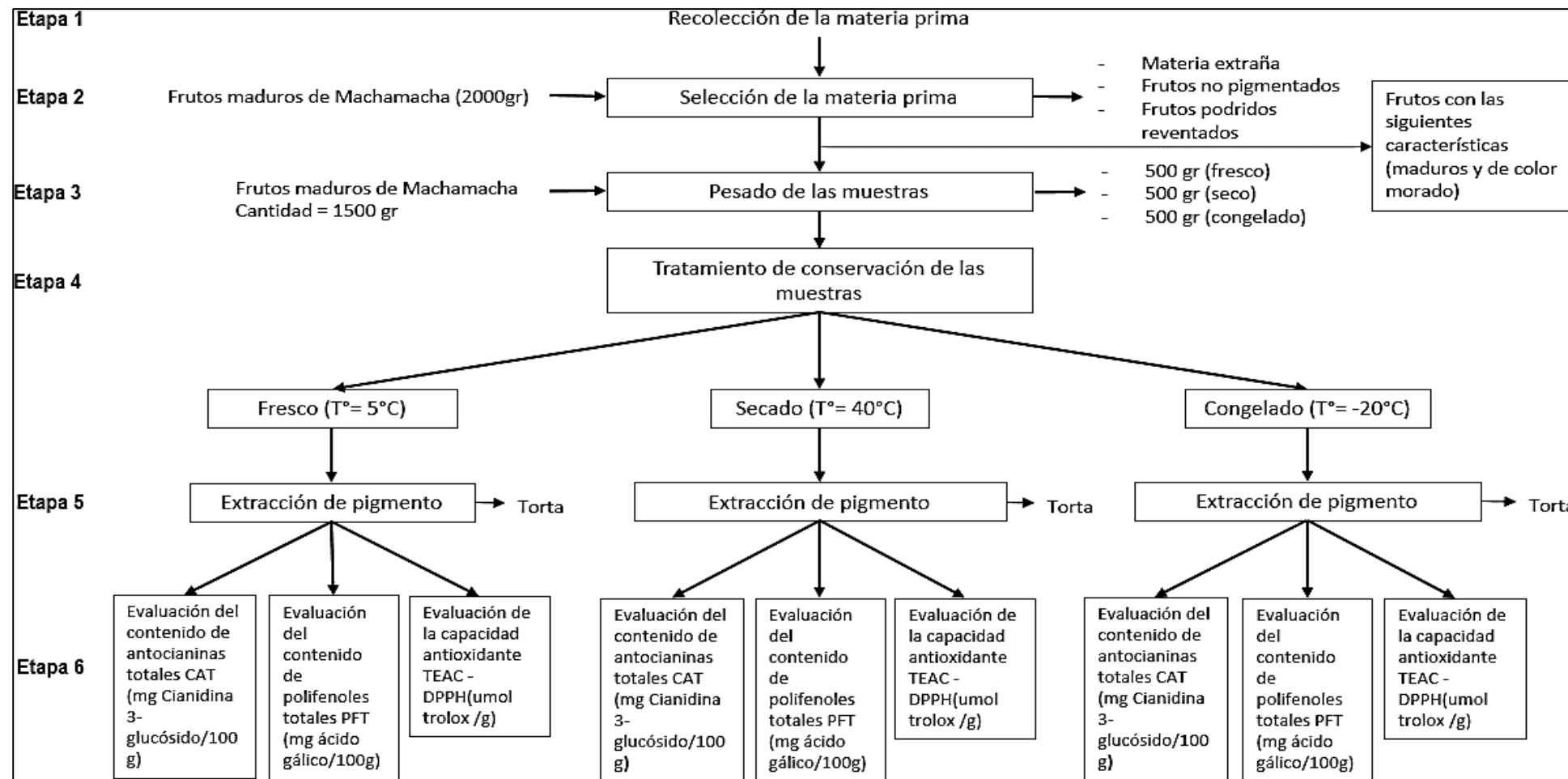


Figura 12 — Diagrama del procedimiento del trabajo de investigación

Etapa 1: Recolección de materia prima (frutos maduros de Machamacha)

Se recolectaron 2 kg forma manual en envases de vidrio los frutos maduros de Machamacha de la zona de Sulimana perteneciente a la comunidad de Sotapa pararani distrito de Huancarama provincia de Andahuaylas.

Etapa 2: Selección de materia prima (frutos maduros de Machamacha)

Se seleccionó 1500 gr de los frutos maduros y pigmentados de color morado de Machamacha de forma manual retirando aquellos frutos podridos, aplastados, no pigmentados y además de materia extraña (hojas secas, paja, piedrecilla, etc.)

Etapa 3: Pesado de los frutos (muestras) de Machamacha

Se pesó los frutos maduros de Machamacha seleccionados en fracciones iguales de 500 gr para muestras frescas, 500 gr para muestras secas y 500 gr para muestras congeladas almacenándose en frascos de vidrio para una mejor protección.

Etapa 4: Proceso de conservación de los frutos maduros de Machamacha

- Machamacha fresco: se seleccionaron los frutos en estado de madurez optimo (color morado) pigmentado y fueron conservados a una temperatura de 5°C por 48 horas para después extraer.
- Machamacha seco: los frutos maduros de Machamacha fueron secados en una estufa a una temperatura de 40°C, durante 16 horas.
- Machamacha congelado: los frutos maduros de Machamacha fueron congelados a una temperatura de -20°C por un tiempo de 48 horas.

Tabla 7 — Condiciones de conservación de la materia vegetal para análisis

Muestra	Estado	Temperatura °C	Tiempo
Frutos maduros Machamacha	Fresco	5°C	48 horas
Frutos maduros Machamacha	Seco	40 °C	16 horas
Frutos maduros Machamacha	Congelado	-20°C	48 horas

Etapa 5: Extracción del pigmento de las muestras de Machamacha

El extracto se obtuvo siguiendo la metodología usada por (Barragán, 2018) con algunas modificaciones:

A. Procedimiento

1. Se tomó en forma ordenada tomando primero las muestras de frutos de Machamacha, frescos, secos y congelados así respectivamente, se pesó 20gr de frutos maduros de cada estado, fueron triturados en un mortero de forma independiente, posteriormente se pesaron 2 gr de muestra triturada por quintuplicado de forma independiente para cada estado de conservación.
2. Se utilizó etanol acidificado con ácido acético concentrado (químicamente pura) como solvente, en una proporción materia prima /solvente 2:10 gr/gr, triturando en un mortero para su extracción sólido - líquido y posteriormente se filtró con papel Whatman número 40.
3. Seguido la muestra filtrada se almacenó en tubos cónicos de taba rosca y llevados a la centrífuga para separar el sobre nadante del líquido muestra.
4. Seguido se aforó a 10 ml ver figura 10. completando la cantidad perdida en el centrifugado y posteriormente fueron preservados en la refrigeradora a una temperatura de 3° C.

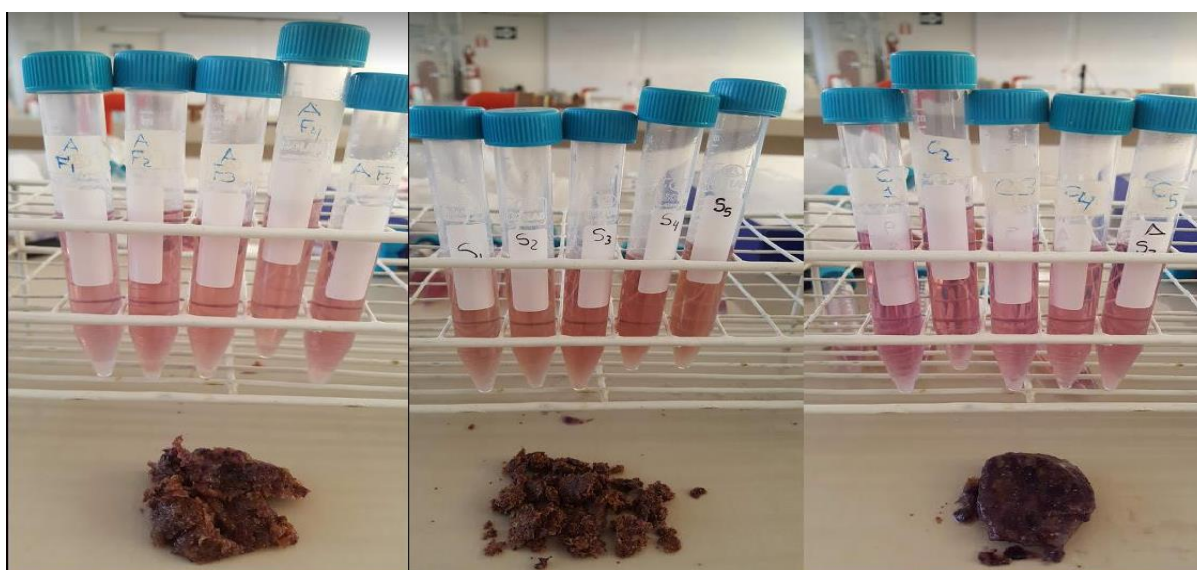


Figura 13 — Muestras filtradas de Machamacha fresco (izquierdo), Machamacha seco (medio), Machamacha congelado (derecha) por quintuplicado

Etapa 6: Evaluación y análisis de compuestos bioactivos de las muestras de Machamacha.

A. Determinación de antocianinas totales

El total de antocianinas monoméricas se determinó por el método de pH diferencial propuesto por (Giusti y otros, 2001). Para eso se cogió una alícuota de extracto de antocianina, y seguido se mezcló con solución tampón pH 1.0 cloruro de potasio 0.025 M y otro, contampón a pH 4.5 acetato de sodio 0.4 M. Siendo un método espectrofotométrico basado en la transformación estructural de las antocianinas con la variación de pH hipercloridias adquiere una estructura estable de catión colorido y cuando el pH va disminuyendo su acidez tienden a mostrarse incoloras (pH 1 coloreados y pH 4.5 incoloras). Esta variedad de color nos permitió cuantificar las antocianinas midiendo su captación a 520 nm y 700 nm, usando como blanco agua destilada (Barragán, 2018). Los resultados de diferencia de absorbancia se obtuvieron haciendo uso de los siguientes cálculos:

Los cálculos se efectuaron de la siguiente manera:

Cálculo de la absorbancia de la muestra

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

Cálculo del contenido de antocianinas.

$$CAT \left(\frac{\text{mg cianidina - 3 - glucocido}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{A \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l} * \left(\frac{V}{W} \right)$$

Donde:

- A** : Es el cambio de absorbancia
- CAT** : Contenido de antocianinas totales (mg/L)
- PM** : Masa molecular para cianidina-3-glucósido = 444.2/mol
- ϵ** : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido = 26900 L/mol. cm
- l** : Camino óptico de celda 1cm
- FD** : Factor de dilución
- V** : Volumen de aforo de extracto (ml)
- W** : Peso muestra (gr)

a) Procedimiento

- Se preparó los reactivos buffer pH 1.0 y pH 4.5, con una cantidad de 0.1863 gr de cloruro de potasio en estado sólido, mezclado en 100 ml de agua destilada, agitando de forma permanente, seguido se ajustó con ácido clorhídrico (HCl) a pH 1.0 concentrado y se aforó a 100 ml.
- Así mismo se preparó buffer pH 4.5 pesándose 5.44 gr de etanoato de sodio y se mezcló con agua destilada seguidamente a un aforo de 100 ml, se ajustó con etil acetato gota a gota hasta obtener un pH 4.5.
- Para la dilución se tomaron 100 μ l de muestra pura (fresco, seco, congelado) de forma independiente para cada estado de conservación en diferentes tubos y 1200 μ l de buffer cloruro de potasio (pH 1.0); seguido se hizo el mismo procedimiento con buffer etanoato de sodio (pH 4.5), dejando estas diluciones durante 15 min en un ambiente oscuro. ver anexo 05.
- Posterior a los 15 min se calculó la absorbancia en espectrofotómetro cada dilución a 520 nm y a 700 nm de longitud de onda, usando como blanco agua destilada.
- Se calculó la concentración de pigmentos antociánicos monoméricos en las muestras diluidas.

B. Determinación del contenido de poli fenoles totales

Los polifenoles totales se evaluaron por la metodología Folin Ciocalteu con algunas modificaciones el cual se fundamenta en la reacción de óxido reducción entre compuestos reductores y el reactivo Folin Ciocalteu formado por el ácido fosfomolibdotúngstico (W^{+6} , Mo^{+6}) en medio ácido (color amarillo), el mismo al ser reducido a (W^{+5} , Mo^{+5}) por los grupos fenólicos en medio básico causa un cambio a color azul el cual es medido la intensidad de la absorbancia en espectrofotómetro a 765 nm, cuantificando en base a la curva patrón de ácido gálico. (Barragán, M.



2018)

a) Procedimiento

- El procedimiento de extracción de muestras de Machamacha es la misma para todos los estados de conservación (fresco, seco, congelado) según la descripción anteriormente mencionada en el punto (extracción de pigmento).
- Para evaluar el contenido de polifenoles totales se tomó 100 µl de muestra extraída pura (alícuota líquida), 1600 µl de agua destilada, 100 µl de Folin Ciocalteau, 200 µl de carbonato de sodio (Na₂C₃) por quintuplicado para los tres estados de conservación (fresco, seco y congelado), de forma independiente, agitando de forma continua, dejando inactivo por 30 min en un lugar fresco y oscuro. ver anexo 07.
- Pasado el tiempo de reposo se evalúa la reducción de color (absorbancia) a 765 nm. Ver anexo 08
- Para evaluar el contenido de polifenoles totales se tomó como patrón de referencia el ácido gálico desde 0 a 5 (mg/L) cuyo R² fue 0.969 a partir de la curva de calibración

$Y = 2.701x - 0.0354$ (Barragán, 2018); (Fernandez y otros, 2006)

Seguidamente se efectuaron los cálculos con la ecuación.

$$PFT \left(\frac{mg \text{ ácido gálico}}{litro} \right) = \left[\frac{Abs.muestra - A}{B} \right] * FD$$

C. Determinación de la capacidad antioxidante TEAC DPPH

La capacidad antioxidante se evaluó por el método TEAC DPPH (molécula 1,1-difenil-2- picril-hidrazilo) el cual es un radical estable en medio metanólico por tener un electrón desapareado (color azul – violeta) sobre su molécula que no se dimeriza. En presencia de una sustancia antioxidante este dona un átomo de hidrógeno y su color (azul – violeta)



se desvanece tomando un color amarillo pálido después de 30 minutos en conservación en un ambiente fresco y oscuro, esta diferencia de color absorbancia se mide a 515 nm en un espectrofotómetro al cual llamaremos capacidad antioxidante.

Se han usado como patrón de referencia el trolox desde 100 a 800 ($\mu\text{mol/L}$) los extractos estándar actuaron reduciendo el radical DPPH ($50 \mu\text{M}$) y dando como resultado la capacidad antioxidante de los extractos. (Vilaño y otros, 2007)

a) Procedimiento

- Se tomó 1200 μl de reactivo DPPH el cual fue sometido a una lectura inicial en espectrofotómetro a 515nm, antes de agregar muestra alicuota de extracto de Machamacha. Ver anexo 09.
- Posterior a la lectura inicial se adicionó 100 μl de muestra alicuota de muestra de Machamacha, para los tres estados de conservación (fresco, seco y congelado) por quintuplicado de forma independiente, se almacenó en un ambiente fresco y oscuro durante 20 min. Ver anexo 10.
- Posteriormente se da lectura a la absorción a 515 nm, para la determinación de reducción de los radicales libres presentes.
- Para evaluar la capacidad antioxidante se utilizó como patrón equivalente al trolox TEAC DPPH se determinó con solución patrón de trolox cuyo R2 fue 0.9918 y su ecuación $y = 0.0008x + 0.0101$. Los cálculos se efectuaron con la siguiente ecuación. (Goupy y otros, 2003)

$$\text{TEAC DPPH} \left(\frac{\mu\text{mol trolox}}{\text{litro}} \right) = \left[\frac{\text{Abs.muestra} - A}{B} \right] * FD$$

4.5 Material de la investigación

4.5.1 Material vegetal

- 2kg de frutos maduros de Machamacha (*Pernettya prostrata*)

4.5.2 Material de laboratorio

- Vasos precipitados de 25 ml
- Vasos precipitados de 250 ml
- Fiolas marca Boeco Germany de capacidad 250 ml
- Fiolas marca Boeco Germany de capacidad de 50 ml a 100 ml
- Gradillas
- Pipetas marca Duran de capacidad 10 ml
- Pipetas marca kyndel de capacidad de 5 ml
- Pipetas de lectura en el espectrofotómetro.
- Baguetas
- Pizetas
- Tubos de ensayo cónico con tapa rosca de 15ml de capacidad.
- Mortero y pilón
- Micropipetas de capacidad de 10 μ l y 100 μ l marca BOECO
- Papel Watman N° 40

4.5.3 Equipos

- Balanza analítica marca sartorius de capacidad máxima de 200 gr
- Estufa marca memmet
- Refrigeradora domestica
- Congelador marca maxfrio, modelo Mapfrio (MX) max lujo, voltaje 230 VAC.
- pH metro marca SI ANALYTICS
- Espectrofotómetro marca GENESYS 10S modelo UV, Rango de medición: 450 a 770 nm.
- Decantador

- Centrífuga marca Centurion Scientific 5000 RPM X 10 MIN

4.5.4 Reactivos

- Ácido acético glacial QP (Químicamente Puro)
- Carbonato de sodio
- Cloruro de potasio
- Ácido hidrolórico al 37.6%
- Acetato sódico anhidro al 99.5%
- Alcohol puro comercial al 96% (etanol)
- DPPH
- Reactivo Folin Ciocalteau
- Buffer cloruro de potasio pH=1
- Buffer acetato de sodio pH=4.5

4.5.5 Solventes

- Agua destilada

4.5.6 Otros materiales

- Frascos de vidrio
- Papel aluminio
- Triturador

4.6 Diseño experimental

La tabla 07 muestra una matriz de un diseño completamente al azar donde se determinaron tres factores de investigación (tratamientos de conservación) y se evaluarán los efectos de cada tratamiento en 3 niveles de estudio (compuestos bioactivos) con 5 repeticiones cada uno haciendo un total de 45 unidades experimentales los cuales se realizaron en orden aleatorio completo y se usó como prueba estadística el análisis de varianza (ANOVA) que nos ayuda a confirmar si existe desemejanzas significativas en las medias de las variables de estudio de los tratamientos.



Tabla 8 — Matriz de diseño experimental completamente al azar

Tratamiento (variable entrada)	Nro. de repeticiones	Variable de respuesta			
		Compuesto bioactivo			
		Antocianinas totales	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante	
Machamacha seco	S1	CAT 1	PFT 1	CA 1	15
	S2	CAT 2	PFT 2	CA 2	
	S3	CAT 3	PFT 3	CA 3	
	S4	CAT 4	PFT 4	CA 4	
	S5	CAT 5	PFT 5	CA 5	
Machamacha fresco	F1	CAT 1	PFT 1	CA 1	15
	F2	CAT 2	PFT 2	CA 2	
	F3	CAT 3	PFT 3	CA 3	
	F4	CAT 4	PFT 4	CA 4	
	F5	CAT 5	PFT 5	CA 5	
Machamacha congelado	C1	CAT 1	PFT 1	CA 1	15
	C2	CAT 2	PFT 2	CA 2	
	C3	CAT 3	PFT 3	CA 3	
	C4	CAT 4	PFT 4	CA 4	
	C5	CAT 5	PFT 5	CA 5	
Total de unidades experimentales					45

Variable de entrada corresponde al estado de los frutos maduros de Machamacha, las siglas (S1, S2; F1....., F5; C, C5) donde S representa SECO, F representa FRESCO y C representa CONGELADO es decir corresponden a los estados de conservación los cuales se analizaron por quintuplicado lo que hizo un total de 45 unidades experimentales homogéneas y aleatorizadas.

4.7 Plan de tratamiento de datos de la investigación

El diseño experimental utilizado para evaluar el impacto que tienen los factores (tratamiento de conservación) en el contenido de antocianinas totales, contenido de polifenoles y actividad antioxidante en los frutos maduros de Machamacha (*Pernettya prostrata*) fueron analizados con la técnica (ANOVA) y comprobar si las medias presentan variabilidad los cuales fueron comparados con el método múltiple Tukey haciendo uso del software estadístico INFOSTAT versión 2013 con un nivel de trascendencia de $\alpha=0.05$, un 95% de confianza y una probabilidad del 5% de incurrir en error de tipo I y tipo II.

4.8 Modelo estadístico

Análisis de Varianza (ANOVA) para el DCA.

El modelo estadístico de un diseño experimental completamente al azar es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, \dots, t$
 $j = 1, 2, \dots, r$

Y_{ij} = ij – ésima variable de respuesta de la unidad experimental

μ = media general de la variable de respuesta

τ_i = efecto del i – ésimo (tratamiento) en la variable dependiente

ε_{ij} = error experimental asociado a la ij – ésima unidad experimental

La finalidad es evaluar si existe variación significativa en los tratamientos, comparando la “varianza del tratamiento” con la “varianza del error”, si la primera predomina claramente sobre la segunda, entonces los tratamientos tienen impacto y por ende las medias son diferentes.

En cambio, si los tratamientos no dominan o son igual o menos que el error, entonces las medias son iguales.

El Análisis de varianza en DCA busca demostrar la igualdad de la hipótesis de los tratamientos respecto a la media de la variable de respuesta. Entonces describimos de la siguiente manera las hipótesis de la investigación:

$$H_0: \mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D = \mu$$

$$H_A: \mu_i \neq \mu_j \text{ para algún } i \neq j$$

Por ende, se escribe como:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_k = 0$$

$$H_A: \tau_i \neq 0 \text{ para algún } i$$

Donde τ_i (variable independiente) es el efecto del tratamiento i sobre la variable de respuesta. Si se acepta H_0 entonces el producto de los n tratamientos son nulos estadísticamente (iguales a cero), y si se rechaza se estaría recabando que al menos un efecto es diferente de cero.

Hipótesis nula (H₀)

H₀₁= El CAT en las muestras de Machamacha no presentan diferencia significativa en (fresco, seco y congelado).

H₀₂= El contenido de contenido de polifenoles totales en los frutos maduros de Machamachano presentan diferencia significativa en ningún tratamiento (fresco, seco y congelado).

H₀₃= La capacidad antioxidante en los frutos maduros de Machamacha no presentan diferencia significativa en fresco, seco y congelado.

Hipótesis alterna (H_A)

H_{A1} = El CAT de los frutos maduros de Machamacha presentandiferencia significativa al menos en uno de los tratamientos (fresco, seco y congelado).

H_{A2}= El contenido de PFT en los frutos maduros de Machamacha presentandiferencia significativa al menos en uno de los tratamientos (fresco, seco y congelado).

H_{A3}= La capacidad antioxidante en los frutos maduros de Machamacha presentan diferencia significativa al menos en uno de los tratamientos (fresco, seco y congelado).

Se efectuó el análisis estadístico con el siguiente esquema de evaluación de prueba de hipótesis. (Kasay y otros, 2013)

Tabla 9 — Calculo para evaluar diferencias en las variables de estudio

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	Valor de F	Valor - p
Tratamientos	$t - 1$	$\sum_{i=1}^t Y_i^2 - \frac{Y^2}{tr}$	$CM = \frac{SC_{TRAT}}{gl_{TRAT}}$	$\frac{CM_{TRAT}}{CM_{ERROR}}$	$p (F > F_0)$
Error	$t(r - 1)$	$SC_{TOTAL} - SC_{TRAT}$	$CM = \frac{SC_{ERROR}}{gl_{ERROR}}$		
Total	$tr - 1$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r Y_{ij}^2 - \frac{Y^2}{tr}$			

Extraído de (Kasay y otros, 2013)

Tomaremos de la siguiente manera los criterios de rechazo del estadístico de prueba. Si la H_0 es verdad, entonces debería caer dentro de la región de aceptación. Si cae fuera del rango de valores en la región de rechazo, entonces se deduce que la H_0 debe ser falsa.

La ubicación de la región de rechazo depende de si la hipótesis es bilateral cuando la H_A es del tipo “no es igual” (\neq); o unilateral cuando la alternativa es del tipo “mayor que” ($>$) o “menor que” ($<$).

La probabilidad de cometer un riesgo de “error tipo I” se da cuando se rechaza H_0 cuando ésta es verdadera o un “error tipo II” cuando se acepta H_0 y ésta es falsa. Con α y β denotamos las probabilidades de los errores tipo I y II.

$\alpha = P \{ \text{error tipo I} \} = \text{probabilidad de rechazar } H_0 \text{ siendo verdadera}$

$\beta = P \{ \text{error tipo II} \} = \text{probabilidad de aceptar } H_0 \text{ siendo falsa}$

Por ende, utilizaremos un $\alpha = 0.05$ de probabilidad de cometer error, con un grado de confianza del 95%.

3.9 Análisis estadístico

Interpretamos el resultado a través de la comparación de tratamientos y el error, para determinar si los métodos de conservación presentan diferencias o es estadísticamente mayor a 0 de acuerdo al grado de confianza estimado; los promedios fueron cotejados con la prueba de Tukey con un grado de significancia de p-valor de 0.05, evaluados en el software estadístico INFOSTAT Versión 2013 (Brand y otros, 1995) y el uso de Microsoft Excel para procesamiento de datos, obtención de promedios y desviación estándar.



CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Análisis de resultados

5.1.1 Determinación del CAT (mg cianidina 3- glucósido/100g)

El (CAT), se evaluó utilizando el método de (Giusti y otros, 2001). En la Tabla N° 09 se evalúa en pH 1.0 y pH 4.5 basado en la alteración de color de las antocianinas donde a pH 1.0 en su forma oxonio presentan más coloración y contrariamente a pH 4.5 es incoloro en su forma hemiacetal, ver anexo 01, midiendo las muestras a dos longitudes de onda a 520nm y 700nm, esta diferencia nos permite medir los pigmentos monoméricos concentrados.

Tabla 10 — CAT en los extractos de Machamacha según tipo de muestra (quintuplicado)

Absorbancia					
Tratamiento	520 nm		700 nm		glucósido/100g)
	pH= 1	pH=4,5	pH= 1	pH=4.5	
S1	0.363	0.309	0.104	0.179	14.00201487
S2	0.428	0.311	0.154	0.170	14.43618587
S3	0.497	0.428	0.174	0.261	16.93266914
S4	0.493	0.406	0.215	0.228	10.85427509
S5	0.481	0.379	0.197	0.198	11.17990335
F1	0.266	0.145	0.089	0.086	12.80804461
F2	0.349	0.183	0.100	0.113	19.42915242
F3	0.346	0.213	0.090	0.114	17.0412119
F4	0.340	0.204	0.088	0.107	16.82412639
F5	0.404	0.158	0.116	0.085	23.33669145
C1	0.359	0.156	0.102	0.082	19.86332342
C2	0.417	0.131	0.107	0.069	26.91860223
C3	0.307	0.138	0.078	0.069	17.36684015
C4	0.307	0.135	0.060	0.066	19.32060967
C5	0.325	0.137	0.063	0.071	21.27437918

Seguidamente observamos en la Tabla 10 la dispersión de los datos en relación a los promedios del CAT en seco, fresco y congelado haciendo uso del software estadístico INFOSTAT, evaluándose el efecto de los tratamientos y un parámetro

de seguridad de $\alpha=0.05$ y una confianza de 95.0 %.

Tabla 11 — Diferencia significativa de CAT de Machamacha en seco, fresco y congelado según la prueba Tukey

Muestra	n	CAT (mg cianidina 3 - glucósido/100g)
Machamacha seco	5	13.48 ± 2.51 A
Machamacha fresco	5	17.89 ± 3.86 A B
Machamacha congelado	5	20.95 ± 3.62 B

Resultados expresados en media ± SD, n=5, p> 0.05

Podemos observar la diferencia significativa del contenido de antocianinas totales según la tabla anterior donde existe diferencia significativa del efecto del tratamiento de conservación sobre las variables de investigación, las muestras secas tienen una media de 13.48 ± 2.51 CAT (mg cianidina 3 - glucósido/100g) es significativamente diferente respecto a la media de muestras congeladas con 20.95 ± 3.62 CAT (mg cianidina 3 - glucósido/100g), no obstante las muestras congeladas tienen similitud con las muestras frescas 17.89 ± 3.86 CAT (mg cianidina 3 - glucósido/100g) las letras comunes indican que no existe diferencia significativa y letras diferentes indican diferencia significativa.

5.1.2 Determinación del contenido de polifenoles totales (PFT (mg ácido gálico/100 g)

En la tabla N° 11 se observa la cantidad de PFT en las muestras de Machamacha (seco, fresco y congelado), por quintuplicado, haciendo uso del método de Folin Ciocalteu basado en la reacción con el reactivo Folin a pH básico dando lugar a un color azul susceptible a evaluación a 765nm. El ácido fosfomolibdotúngstico de color amarillo, al ser reducido por los fenoles confiere un color azul intenso (Tomás, F. 2003) ver figura 07, cuya magnitud de color indica el contenido de fenoles presentes en la muestra, expresado en ácido gálico/100g muestra. Para evaluar el contenido de polifenoles totales se tomó como patrón de referencia el ácido gálico desde 0 a 5 (mg/L) cuyo R^2 fue 0.969 a partir de la curva de calibración según (Barragán, 2018; Juli y otros, 2011).

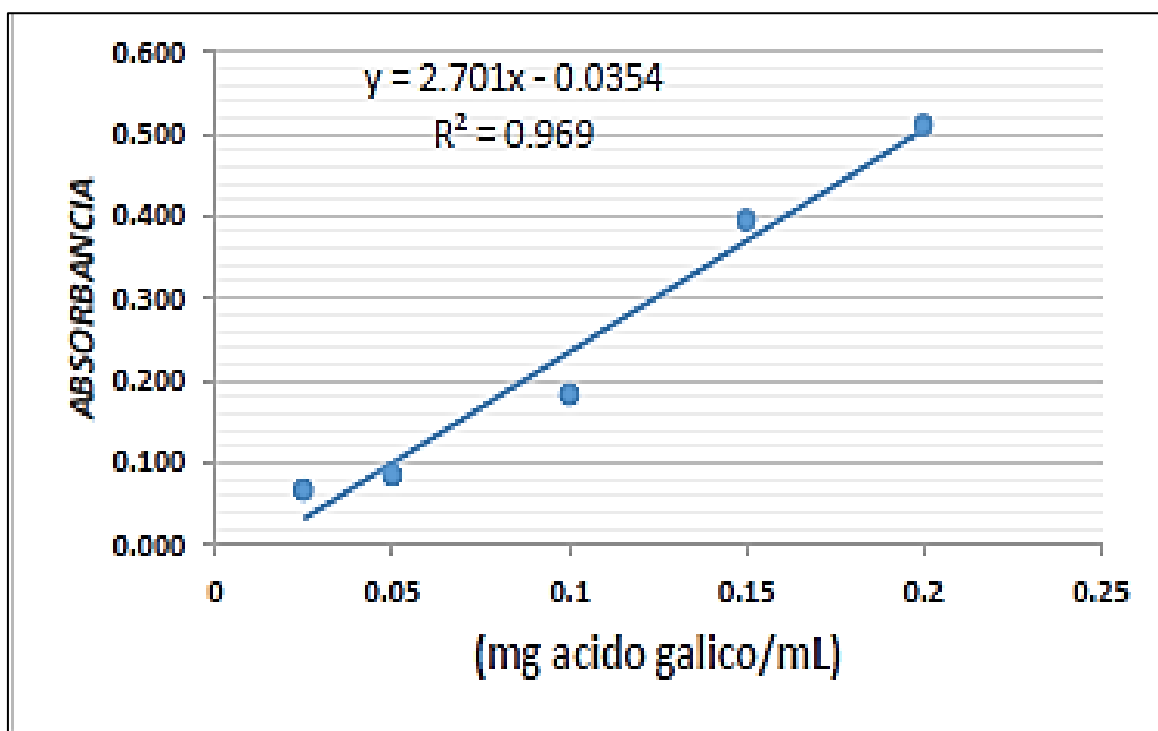


Figura 14 — Curva patrón de referencia de ácido gálico para determinar PFT a través del método Folin Ciocalteu

Extraído de (Barragán, 2018; Juli y otros, 2011)

Tabla 12 — Cantidad de PFT de muestras de Machamacha en tres tratamientos con 5 cinco repeticiones de forma aleatoria y expresados en ácido gálico/100g

Tratamiento	Absorbancia 765 nm	PFT (mg ácido gálico/100g)
S1	2.159	406.2199185
S2	2.051	386.2273232
S3	2.427	455.8311736
S4	3.229	604.2947057
S5	2.139	402.5175861
F1	1.602	303.1099593
F2	2.152	404.9241022
F3	2.211	415.845983
F4	2.230	419.3631988
F5	2.300	432.3213625
C1	1.117	213.3283969
C2	1.133	216.2902629
C3	0.907	174.453906
C4	1.103	210.7367642
C5	1.096	209.4409478

Observamos las medias según la prueba Tukey en la siguiente tabla 14 analizados a un grado de incertidumbre $\alpha = 0.05$ y un grado de seguridad del 95.0 %, dicha prueba nos arrojó un p – valor de $0.0001 < 0.05$ que nos manifiesta que existe diferencia significativa en una a más variables como se muestra a continuación.

Tabla 13 — Variación de media de la cantidad de PFT de muestras de Machamacha en tres tratamientos según la prueba Tukey

Muestra	n	PFT (mg ácido gálico/100g)
Machamacha congelado	5	204.85 ± 17.19 A
Machamacha fresco	5	395.11 ± 52.35 B
Machamacha seco	5	451.02 ± 89.55 B

Letras iguales no representan resultados diferentes ($p > 0.05$), $n=5$; resultados expresados en media ± SD.

Las Muestras de Machamacha congelado 204.85 ± 17.19 PFT (mg ácido gálico/100g) es significativamente diferentes en relación a las muestras de Machamacha fresco 395.11 ± 52.35 PFT (mg ácido gálico/100g) y seco 451.02 ± 89.55 PFT (mg ácido gálico/100g) sin embargo las muestras frescas y secas muestran una reacción oxido-reducción muy similar.

5.1.3 Determinación de CA por DPPH (molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

Se utilizó la metodología del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo TEAC (DPPH), consiste en la reducción del radical estable DPPH, leído a 515nm; el color violeta intenso que presenta este radical disminuye en presencia de un antioxidante u otro radical (R·). Por tanto, es realizable cuantificar la capacidad de captación de radicales libres. (Gutiérrez y otros, 2008)

En la tabla 12 se determinó su capacidad antioxidante se utilizó la ecuación N° 04 y como patrón el trolox ver figura 11, (Barragán, 2018; Goupy y otros, 2003) y expresado en microsoles de trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol trolox/g}$).

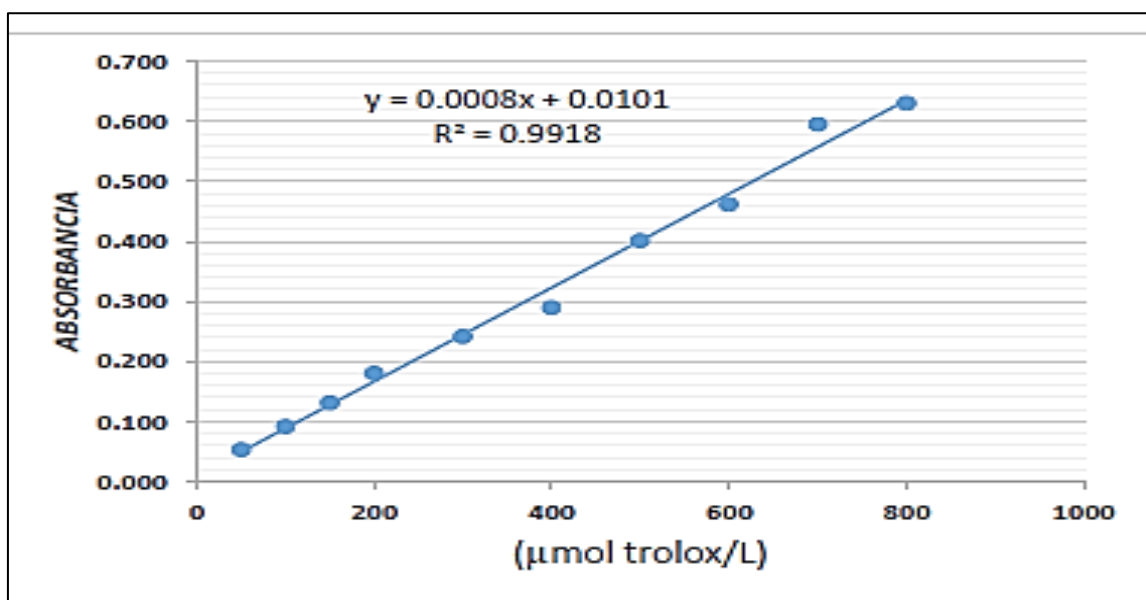


Figura 15 — Curva patrón de referencia de Trolox para determinar capacidad antioxidante por la técnica de TEAC DPPH

Extraído de (Barragán, 2018; Goupy y otros, 2003)

Tabla 14 — Capacidad antioxidante de muestras de Machamacha en seco, fresco y congelado, expresados en (μmol trolox /g)

Tratamiento	Abs. Inicial DPPH	Abs. Final/muestra	TEAC – DPPH (μmol Trolox /g)
S1	0.871	0.128	36.65
S2	0.889	0.126	37.65
S3	0.872	0.141	36.05
S4	0.895	0.136	37.45
S5	0.904	0.135	37.95
F1	0.895	0.137	37.40
F2	0.939	0.201	36.40
F3	0.990	0.142	41.90
F4	0.940	0.147	39.15
F5	0.886	0.138	36.90
C1	0.928	0.126	39.60
C2	0.935	0.144	39.05
C3	0.915	0.190	35.75
C4	0.861	0.417	21.70
C5	0.874	0.236	31.40

En la tabla 17, observamos los resultados arrojados por prueba Tukey con respecto a la capacidad antioxidante expresado en media \pm desviación estándar (SD) con un grado de rechazar la hipótesis nula utilizando $\alpha=0.05$ y un grado de seguridad del 95.0 % y un p – valor obtenido de 0.2420, donde se observa que es mayor a α sin embargo letras iguales no son significativamente diferentes no existe variación en las medias de las variables de estudio.

Tabla 15 — Comparación de la capacidad antioxidante mediante la prueba de Tukey de muestras de Machamacha en (fresco, seco y congelado)

Muestra	n	TEAC DPPH ($\mu\text{mol trolox/g}$).
Machamacha congelado	5	33.50 \pm 7.36 A
Machamacha seco	5	37.15 \pm 0.78 A
Machamacha fresco	5	38.35 \pm 2,24 A

Letras iguales no representan resultados diferentes ($p>0.05$)

El efecto del radical libre estable DPPH (difenil-picril-hidrazil) no se vieron afectados significativamente frente a los tratamientos se secado 37.15 \pm 0.78 ($\mu\text{mol trolox/g}$) y congelado 33.50 \pm 7.36 ($\mu\text{mol trolox/g}$) no obstante son menores a las muestras frescas 38.35 \pm 2.24 ($\mu\text{mol trolox/g}$), esta mínima diferencia de capacidad de inhibición de radicales libres frente al radical DPPH.

5.2 Comparación de hipótesis

5.2.1 Planteamiento de la hipótesis nula (H_0) e hipótesis alterna (H_A) Hipótesis nula (H_0)

H_{01} = El C.A.T en los frutos maduros de Machamacha no presentan desemejanza significativa en alguno de los tipos de conservación (fresco, seco y congelado). **H_{02}** = el contenido de contenido de polifenoles totales en los frutos maduros de Machamachano presentan desemejanza significativa en ninguno de los tipos de conservación (fresco, seco y congelado).

H_{03} = La capacidad antioxidante en los frutos maduros de Machamacha no presentan desemejanza significativa en ninguno de los tipos de conservación (fresco, seco y congelado).

Hipótesis alterna (H_A)

H_{A1} = El CAT en los frutos maduros de Machamacha presentan diferencia significativa al menos en uno de los tratamientos (fresco, seco y congelado).

H_{A2} = El contenido de polifenoles totales en los frutos maduros de Machamacha

presentan diferencia significativa al menos en uno de los tratamientos (fresco, seco y congelado).

H_{A3} = La capacidad antioxidante en los frutos maduros de Machamacha presentan diferencias significativa al menos en uno de los tratamientos (fresco, seco y congelado).

5.2.2 Determinación de CAT (mg cianidina 3- glucósido/100g)

Tabla 16 — Análisis de varianza del efecto causado de los tratamientos de conservación frente a los compuestos bioactivos

F.V	SC	gl	CM	F	p – valor
Modelo	140.94	2	70.47	6.15	0.0145
Machamacha	140.94	2	70.47	6.15	0.0145
Error	137.45	12	11.45		
Total	278.40	14			

En la tabla 15 se observa un cuadrado medio del error de 11.45 el cual implica responder la hipótesis nula (H_0) donde se planteó que no existe distinción en el volumen de antocianinas en fresco, seco y congelado, sin embargo la tabla nos muestra un F calculado de 6.15 es superior a p-valor estadístico 0.0145 entonces se niega la H_0 y por lo tanto se acepta la hipótesis alterna (H_A) donde existe variación de contenido de antocianinas totales en muestras frescas, secas y congelados de los extractos de los frutos de Machamacha considerando que la temperatura y el pH degradaron las antocianinas; contrariamente en congelado hubo incremento de antocianinas considerando que la temperatura de congelación de -20°C es favorable para conservar las frutas de Machamacha.

5.2.3 Determinación de la presencia de PFT en (mg ácido gálico/100 g)

Tabla 17 — Análisis de varianza del efecto causado de los tratamientos de conservación frente a los compuestos bioactivos

F.V	SC	gl	CM	F	p – valor
Modelo	166540.13	2	83270.07	22.60	0.0001
Machamacha	166540.13	2	83270.07	22.60	0.0001
Error	44219.53	12	13684.96		
Total	210759.66	14			

Se presentó un cuadrado medio de error de 13684.96 y un F calculado de 22.60 siendo superior a p-valor estadístico de 0.0001 esto indica que debemos rechazar la hipótesis nula (H_0) y dar por verdadera la hipótesis alterna (H_A) ya que al menos uno de los tratamientos de conservación causa diferencia significativa en el volumen de polifenoles totales en los frutos de Machamacha con un nivel de seguridad del 95% y un nivel de incertidumbre del 5%.

4.1.1. Determinación de capacidad antioxidante DPPH (molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Tabla 18 — Análisis de varianza del efecto de los tratamientos evaluados frente al contenido de bioactivos de los frutos de Machamacha

F.V	SC	gl	CM	F	p – valor
Modelo	63.81	2	31.90	1.60	0.2420
Machamacha	63.81	2	31.90	1.60	0.2420
Error	239.22	12	19.93		
Total	303.02	14			

La tabla nos muestra un error de 19.93 el cual implica responder la hipótesis de la investigación planteándose como (H_0) de que no existe diferencia significativa en la capacidad antioxidante de los extractos de Machamacha en fresco, seco y congelado sin embargo la tabla muestra un F calculado de 1.60 es superior a p-valor estadístico 0.2420 entonces se rechazaría la H_0 y por lo tanto se aceptaría la hipótesis alterna (H_A) no obstante incurrimos en un error tipo I donde existe la probabilidad de rechazar la hipótesis H_0 siendo esta verdadera sin embargo utilizamos $\alpha=0.05$ el cual representa el 5% de error que aceptamos en la investigación que implica poder rechazar la H_0 pero se espera que en un nivel de confianza de 95% tal decisión sea la correcta o no, el cual podemos controlar directamente con la comparación de medias de la prueba Tukey efectuado y por consiguiente se determinó que los tratamientos de secado, congelado y en frutos frescos no presentan diferencia significativa en su capacidad inhibidora de radicales libres.

5.3 Discusión de resultados

5.3.1 Determinación de antocianinas totales

En la investigación realizado por (Barragán, 2018) determina el CAT en fruto de Mio mio (*Coriaria ruscifolia L*) mostraron 440.22 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso fresco), los mismos que se incrementan a 1102.88 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso seco) y disminuyen a 236.96(mg cianidina 3-glucosido/100g en congelado (-20°C), las muestras de Machamacha demostraron tener menor contenido de CAT con 13.48 mg cianidina 3-glucosido/100g en seco, 17.89 mg cianidina 3-glucosido/100g en fresco y por el contrario existe un incremento de 20.95 mg cianidina 3-glucosido/100g en congelado, a temperaturas por encima de los 60°C se degradan según una cinética de primer orden y esta degradación es mayor a pH mayores a 3 convirtiendo al ion flavilio más vulnerable debiéndose a dos mecanismos uno es la hidrólisis del enlace glucósido que da lugar a la formación de aglicona o por la ruptura hidrolítica que origina la formación de chalconas, además la cinética de degradación de las Antocianinas se deben al tiempo prolongado ocasionando reacción degradativa por efecto del proceso de senescencia de los frutos donde se recomienda el secado por un corto tiempo, por otro lado a pH elevados el ion flavilio se degrada con rapidez a causa del ataque generando pseudobase incolora carbinol y después chalcona de color amarillento, por ello es recomendable la aplicación de las antocianinas en alimentos con acidez elevada a fin de que predomine el catión flavilio.

Por otra parte, el incremento de antocianinas en congelado de -20°C favorece la estabilidad de las antocianinas ya que la acción de las enzimas es más lenta, las temperaturas que fluctúan de -18°C a -22°C son consideradas temperaturas óptimas de congelación para alimentos favoreciendo la congelación rápida para la formación de cristales de hielo pequeños sin cambiar la estructura celular. En la investigación de Aroni, (2013), evaluó la estabilidad de las antocianinas en diferentes frutos nativos de la región Apurímac utilizando la metodología de diferencia de pH. (Ullauri, P. 2010) Resultando 2026.201 mg/100 g en Capachu, 1271.809mg/100 g Huancachu, 2306.297 mg/100 g Cheqche y 319.170 mg/100 g Alaybili. La interacción del pH =5 y temperatura (30°C), influye significativamente en la estabilidad de las antocianinas presentes en la variedad cheqche. En cambio, los frutos de (*Pernettya prostrata*) presentan menor CAT en seco a causa de la temperatura de secado (40°C) y el tiempo

prolongado de secado.

Así mismo en la investigación de (Villano, 2017), determinó el contenido de AT utilizando el método de pH diferencial de Giusti y determina que los frutos de Machamacha (*Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer) Monnina vargassi Ferreyra (Condorpausan), *Vaccinium floribundum* Kunth (Alaybilí), resultaron tener menor contenido de AT en frutos frescos con 1033.184 (mg cianidina-3-glucosido/100 g fruto Machamacha fresco) no obstante los frutos de Machamacha evaluados presentan antocianinas y los convierte en alimentos enriquecedoras en la industria alimentaria, y promover el aprovechamiento de frutos silvestres ricos en compuestos bioactivos.

5.3.2 Determinación del contenido de poli fenoles totales

En los frutos de mio mio investigado por (Barragán, 2018) “Antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del mío – mío (*Coriaria ruscifolia* L) en tres estados de conservación (fresco, seco y congelado)”, se encontró la presencia de polifenoles totales en los tres estados con resultados de 371.71 (mg ácido gálico/100g), 576.25 (mg ácido gálico/100g), 545.64 (mg ácido gálico/100g) en fresco, congelado y seco respectivamente datos expresados con el método de Tukey muestran diferencia significativa las muestras frescas respecto a las muestras congeladas y secas. Los frutos congelados de Machamacha presentaron menor contenido de polifenoles con una media de 204.85 mg ácido gálico/ 100 g respecto a las muestras secas que presentaron un incremento con 451.02 mg ácido gálico/ 100 g y en fresco con 395.11 mg ácido gálico/ 100 g siendo menores a los frutos de mio mio los polifenoles son inestables a cambios de temperatura por lo cual se vieron afectados por la temperatura baja de -20° ocasionando una pérdida de humedad y por el contrario no fueron afectados por la temperatura de secado de 40°C, esto nos indica que algunas de las sustancias que componen a los polifenoles totales son resistentes a temperaturas de 40°C y presentan una reacción metabólica de óxido reducción.

En el estudio efectuado por (Villano, 2017) “Capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de los frutos silvestres *Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer (Machamacha), Monnina vargassi Ferreyra (Condorpausan), *Vaccinium floribundum* Kunth (Alaybilí) y *Rubus roseus* Poir (Frambuesa silvestre)”, en lo



que respecta al contenido de fenoles totales el fruto con mayor nivel fue Frambuesa silvestre con 5370.42 (mg AGE/100 g fruto fresco) seguido por Machamacha 5187.77 (mg AGE/ 100 g fruto fresco), los frutos silvestres de Alaybilí 4817.80 (mg AGE/ 100 g fruto fresco) y Condorpausan 4707.21 (mg AGE/ 100 g fruto fresco) en relación a los resultados obtenidos las muestras frescas estudiados son menores a todos estos frutos con 1580.45 (mg ácido gálico/100g de muestra fresca) los frutos de Machamacha son considerablemente bajos en comparación con estos frutos estudiados pero no desestima su consumo y su valor en la industria alimentaria.

En la investigación de (Price y otros, 2017) denominado “Efecto del refrigerado y congelado en el contenido de polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante de arándanos (*Vaccinium corymbosum*, variedad “biloxi”) cultivados en diferentes microclimas de Perú” se obtuvieron medias empleando la prueba de Tukey, con un grado de significancia de 0.05% para hallar las diferencias entre los grupos. Al final del almacenamiento se encontró cambio significativo $p < 0,05$ en las variables de estudio. Las reacciones metabólicas celulares de óxido– reducción se ven afectados en su estructura por efecto de la congelación, los polifenoles están compuestos por taninos, flavonoides, quercetinas, vitaminas además de la pérdida del porcentaje de humedad.

5.3.3 Determinación de la capacidad antioxidante

Los resultados expresados en la investigación de (Barragán, 2018) “Antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del mío – mío (*Coriaria ruscifolia* L) en tres estados de conservación (fresco, seco y congelado)”, determinaron la capacidad antioxidante con la metodología TEAC DPPH de frutos de Mio mio arrojaron un 82.70 $\mu\text{mol trolox/g}$ fresco, 85.95 $\mu\text{mol trolox/g}$ congelado, 44.57 $\mu\text{mol trolox/g}$ seco respectivamente, la actividad antiradical de Machamacha (*Pernettya prostrata*) presentaron los siguientes resultados 33.50 $\mu\text{mol trolox/g}$ en congelado, 37.15 $\mu\text{mol trolox/g}$ en seco, 38.15 $\mu\text{mol trolox/g}$ en fresco, las muestras evaluadas en la presente investigación son menores a los frutos de Mio mio, la actividad antioxidante puede incrementarse por las reacciones de polimerización pero en caso de exceder, el incremento de la complejidad molecular y la reducción de la disponibilidad de grupos hidroxilos junto con el impedimento estérico, reducen la disponibilidad de los mismos en la reacción con los radicales DPPH, el secado y congelado pueden inducir a un agotamiento enzimático rápido de varios

antioxidantes naturales como resultado de la interrupción celular que permite el contacto entre sustratos y enzimas y generalmente son más bajos que muestras frescas causado por exposición al calor degradando las enzimas y disminuye su contenido por unidad de peso. Sin embargo, no existe considerable diferencia significativa en su capacidad de inhibición de radicales libres frente al radical libre DPPH en seco, fresco y congelado.

Por otro lado en la investigación de (Villano, 2017) nombrado Capacidad antioxidante y compuestos bioactivos (fenoles y antocianinas) de los frutos silvestres frescos: *Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer (Machamacha), *Monnina vargassi* Ferreyra (Condorpausan), *Vaccinium floribundum* Kunth (Alaybilí) y *Rubus roseus* Poir (Frambuesa silvestre)”; determinó la capacidad antioxidante empleando diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher como método de comparación múltiple con un nivel de confianza del 95 % y significancia de 0.05, para ello utilizaron el paquete estadístico de STATGRAPHICS Centurion XVI.I y Excel 2013 donde los valores obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativas; el nivel de La Frambuesa silvestre presentó mayor actividad antioxidante con 25010.87 ($\mu\text{g Eq}^* \text{Trolox}/100 \text{ g fruto fresco}$), seguido por Machamacha 23328.90 ($\mu\text{g Eq}^* \text{Trolox}/ 100 \text{ g fruto fresco}$) luego, Alaybilí con 22902.90 ($\mu\text{g Eq}^* \text{Trolox}/ 100 \text{ g fruto fresco}$) y Condorpausan 21924.65 ($\mu\text{g Eq}^* \text{Trolox}/ 100 \text{ g fruto fresco}$). Los frutos de Machamacha de la especie *Pernettya* presentan menor capacidad de inhibición de radicales libres en comparación a los frutos antes mencionados. Sin embargo, existe frutos como la palta con 29.44 $\mu\text{g Eq}^* \text{Trolox}/100 \text{ g}$ y el chayote con 8.54 $\mu\text{g Eq}^* \text{Trolox}/ 100 \text{ g}$ que presentan menor capacidad antioxidante lo que permite que los frutos de Machamacha pueden ser incluidos en nuestra dieta alimentaria y aplicados en la industria alimentaria como productos funcionales.

Por otra parte, en el estudio *“Evaluación el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante del fruto de Machamacha (*Vaccinium floribundum Kunth*) en tres estados de maduración”*, (Llimpe, 2017) se obtuvo valores de 569.3637 $\mu\text{mol TEC/g}$, 550.1427 $\mu\text{mol TEC/g}$ y 323.9630 $\mu\text{mol TEC/g}$ muestra en estado verde, pintón y maduro, respectivamente utilizando el radical DPPH. Según estudio el estado de madurez de los frutos influye de manera preponderante en su actividad antioxidante.



CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

1. La calidad de los alimentos procesados es importante por el impacto en la salud de los consumidores. Los frutos de Machamacha constituyen una fuente rica en antocianinas, polifenoles y actividad antioxidante presentando un 13.48 (mg cianidina 3-glucósido/100g) en seco y 20.95 (mg cianidina 3-glucosido/100g) en congelado, el ion Flavio de las antocianinas son inestables a temperaturas mayores a 60°C y muestran estabilidad a pH ácidos, debiéndose tomar cuidado en estos indicadores para extracciones a nivel industrial.
2. Los polifenoles están compuestas por un conjunto de sustancias y muchos de ellos son responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal, además de los derivados de ácidos hidroxicinámicos, cafeico, ferúlico y sinápico, al ser constituyentes mayoritarios pueden alterar la calidad, al ser oxidados por enzimas encontrados naturalmente en los tejidos vegetales, dando lugar a polímeros pardos que imparten un aspecto no siempre deseable, sin embargo a través del aislamiento de los ácidos hidroxicinámicos podemos sus efectos farmacocinética y farmacodinámica.
3. El secado y congelado influyen significativamente en la biodisponibilidad de los polifenoles, los extractos de Machamacha mostraron 204.85 (mg ácido gálico/100g) en congelado, frente a 451.02 (mg ácido gálico/100g) en seco, presentando diferencia significativa debido a la inestabilidad frente a temperaturas de congelado de -20°C, sin embargo, presentan mayor contenido de polifenoles en relación a otros frutos que comúnmente consumimos. Detrás de la causa de muchas enfermedades no transmisibles se encuentra el poco consumo de productos ricos en antioxidantes, llevando relación con la cantidad de polifenoles biodisponibles en los alimentos y en el organismo; por otro lado el consumo excesivo de sustancias fotoquímicas podría llevar a producir efectos tóxicos al tratarse de sustancias bioactivas como las que se encuentran en los flavonoides, no obstante tenemos otras sustancias que proporcionan protección al organismo del ataque de los radicales libres y su posterior estrés oxidativo ocasionando la muerte celular. Respecto a la capacidad de inhibición de radicales libres en seco, fresco y congelado los frutos de Machamacha, no presentaron

diferencia significativa y por tanto se puede aprovechar su consumo en sus tres estados, incorporando en nuestra dieta diaria, además del valor agregado en la industria a largo plazo.

6.2 Recomendaciones

1. Evaluar con la metodología de HPLC de masas el CAT, PFT y actividad antioxidante a fin de profundizar y precisar los resultados de los frutos de Machamacha en sus tres estados (seco, fresco, congelado).
2. Evaluar la estabilidad de las antocianinas totales, capacidad antioxidante en diferentes tiempos y temperaturas.
3. Estudiar y evaluar las otras sustancias que lo componen a los frutos de Machamacha en el contenido de polifenoles totales y antocianinas y la capacidad antioxidante.
4. Evaluar el efecto del proceso de maduración con el fin de comprobar la implicancia frente en el contenido de compuestos bioactivos.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDEL-AAL, El-Sayed M. y HUCL, Pierre. 2003. Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. 8, Journal of Agricultural and food Chemistry, Vol. 51, págs. 2174-2180.

ABDEL-AAL, E.-SM y HUCL, P. 19993. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. 3, Cereal chemistry, Vol. 76, págs. 350-354.

AGUILERA-OTÍZ, Miguel, et al. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. 2, Biotecnía, Vol. 13, págs. 16-22.

ALVAREZ PICO, Diego Fernando y CÁRDENAS VILLACRES, Julio Roberto. 2011. Aplicación del método químico dpph para determinar la capacidad antioxidante presente en una mermelada de tuna. Facultad Ingeniería Química., Universidad de Guayaquil. s.l.: Tesis de Licenciatura. Tesis de Licenciatura.

AMES, Bruce N. shigenaga MK and Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 90, págs. 7915-7922.

ARONI HUAMANÍ, Jimmy. 2013. Evaluación de la estabilidad de antocianinas presentes en los frutos de hesperomeles escalloniifolia schldl (capucha), berberis cummutata eichler (huancachu), berberis humbertiana jf macbr (cheqche) Y vaccinium floribundum kunth (alaybilí) frente al ph. Universidad nacional jose maría arguedas . Informe de tesis de pregrado.

BARRAGÁN CONDORI, Melquiades et al. 2018. Antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del mio-mio (Coriaria ruscifolia L). Nro 4, Revista de investigaciones altoandinas, Vol. Vol. 20, págs. p. 419-428.

BARRAGAN CONDORI, Melquiades. 2017. Evauacion y caracterizacion decompuestos bioactivosdel mio mio (coriaria ruscifolia) por espectroscopía FTIR y HPLC. Universidad Nacional del Altiplano. Puno: s.n. Tesis doctoral.

BRAND-WILLIAMS, Wendy, CUVELIER, Marie-Elisabeth y BERSET, C. L. W. T. 1995. Use of a freeradical method to evaluate antioxidant activity. 1, s.l. : LWT-Food science and Technology, Vol. 28, págs. 25-30.



CORREA H., BERNAL J. 1992. Especies vegetales promisorias de los países del convenio andrés bello. [ed.] cartagena C de AB en coedición con la J. Cartagena: s.n. págs. 156-180.

CORTÉS CASAS, J. Y. 2007. Estudio químico de frutos de *Pernettya prostrata* (Cavan) Sleumer y su evaluación en la producción de hipercalcemia. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de pregrado.

CREUS, Eva Gimeno. 2004. Compuestos fenolicos. 6, nutricion, Vol. 23, págs. 80-84.

CROZIER, Alan, JAGANATH, Indu B. y CLIFFORD, Michael N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. 8, Natural product reports, Vol. 26, págs. 1001-1043.

CASTAÑEDA-OVANDO, Araceli, et al. 2009. Chemical studies of anthocyanins. 4, Food chemistry, Vol. 113, págs. 859-871.

CENTENO ALVAREZ, Monica. 2013. Extracción y estabilización y evaluaciones analíticas del carmín. Instituto Politécnico Nacional. México D.F: s.n. Tesis Doctoral.

DURST, Robert W. y WROLSTAD, Ronald E. 2001. Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. 1, 2001, Current protocols in food analytical chemistry, Vol. 3, págs. F1. 3.1- F1. 3.13.

DI RIENZO, Julio Alejandro, MACCHIAVELLI, Raúl Edgardo y CASANOVES, Fernando. 2011. Modelos lineales mixtos: aplicaciones en InfoStat. Córdoba: Grupo Infostat. Vol. 193.

DEL CARPIO JIMÉNEZ, Carla, SERRANO FLORES, Carlos y GIUSTI, Mónica. 2009. Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler. 1, Revista de la Sociedad Química del Perú, Vol. 75, págs. 76-86.



FERNANDEZ-PACHON, Soledad. M., VILLAFIO, D., TRONCOSO, AM, & GARCIA PARRILLA, M. 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. 2, s.l.: Archivos latinoamericanos de nutrición. Vol. 56, págs. 110-122.

FRANCIS, F. J. 1982. Anthocyanins as food colors. Analysis of anthocyanins. michigan: New York-london, pág. 280. Vol. 1.

GUTIÉRREZ PULIDO, Humberto y DE LA VARA SALAZAR, Román. 2008. Análisis y diseño de experimentos. [ed.] Pablo E. Roig Vázquez. Segunda edición. México: MG Graw - Hill Interamericana, pág. 564. 736.

GARZÓN, Gloria Astrid. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. 3, Colombia: s.n. Acta biológica colombiana, Vol. 13, págs. 27-36.

GIUSTI, M. Mónica y WROLSTAD, Ronald E. 2001. Caracterización y medición de antocianinas por espectroscopía UV-visible. 1, Protocolos actuales en química analítica de alimentos, págs. F1. 2.1-F1. 2.13.

GARCÍA, Mirian C. 2012. Perfil de compuestos funcionales en zumos de frutas rojas. Universidad Politecnica de Cartagena. Cartagena: s.n. Tesis de pregrado.

GARCÍA MARTÍNEZ, Eva María, FERNÁNDEZ SEGOVIA, Isabel y FUENTES LÓPEZ, Ana. 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

GOUPY, Pascale, et al. 2003. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. 3, Vol. 51, págs. 615-622.

HERAS, Irina, ALVIS, Armando y ARRAZOLA, Guillermo. 2013. Optimización del proceso de extracción de antocianinas y evaluación de la capacidad antioxidante de berenjena (Solana meloneraL. 5, Información tecnológica, Vol. 24, págs. 93-102.

HAYTOWITZ, David B. y BHAGWAT, Seema. 2010. USDA database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, Release 2. US Department of Agriculture, págs. 10-48.



IBARZ, Albert y BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V. 2002. Unit operations in food engineering.

JULI MAMANI, Deysi Margarita y ARIAS JORDÁN, Esdenka. 2011. Antocianinas polifenoles totales y capacidad antioxidante en dos clones de papa nativa del género Solanum de pulpa azul y roja.

KASAY, M. I., HUAMÁN, J. y GUERRERO, M. 2013. Estudio cualitativo y cuantitativo de taninos de la *Oenothera rosea* L'her. ex aiton. 1, Revista Peruana de Química e Ingeniería Química, Vol. 16, págs. 13-19.

LONDOÑO LONDOÑO, Julián. 2012. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medirse su actividad. S.I. Corporación Universitaria Lasallista. En Desarrollo y transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia.

LLIMPE PEREZ, Peter. 2017. “Estudio del contenido de antocianinas y capacidad antioxidante de frutos de Machamacha (*Vaccinium floribundum* Kunth) durante la maduración. Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica: s.n. pág. 105, Informe de tesis de pregrado.

MARTÍNEZ-NAVARRETE, Nuria, VIDAL, M. del Mar Camacho y LAHUERTA, Juan José Martínez- 2008. Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. 2, Actividad dietética, Vol. 12, págs. 64-68.

MARTÍNEZ-CRUZ, NIEVES DEL SOCORRO, et al. 2011. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schlttdl (Zarzamora). 4, Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, Vol. 42, págs. 66-71.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. GONZÁLEZ-GALLEGO, J. CULEBRAS J. M. y TUÑÓN M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. 6, Nutrición hospitalaria, Vol. 17, págs. 271-278.

MOSQUERA, Ricardo A., ESTÉVEZ, Laura y BUGARÍN, Mercedes García. 2015. Computational studies on conformation, electron density distributions, and antioxidant properties of anthocyanidins.



OTEIZA, Patricia I. 1995. Modificación oxidativa de proteínas. 6, Antioxid. calid. Vida, Vol. 2, págs.12-20.

PRICE PASSALACQUA, Daniella Selma, LUQUE CASTAÑEDA, Evelyn Janet y MEZA DAVEY, Bárbara.2017. Efecto del refrigerado y congelado en el contenido de polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante de arándanos (*Vaccinium Corymbosum*, Variedad “Biloxi”) cultivados en diferentes microclimas de Perú. Universidad privada de ciencias aplicadas. Informe de tesis de pregrado.

PEÑARRIETA, J. Mauricio, et al.2014. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. 2, Revista Boliviana de Química, Vol. 31, págs. 68-81.

PEDRAZA PEÑALOSA Paola, BETANCUR Julio, FRANCO-ROSSELLI Pilar. 2004. Chisacá, un recorrido por los páramos andinos. Segunda edición. Bogotá-Colombia: Instituto de ciencias naturales, pág. 340.

QUIÑONES, Mar, MIGUEL, Marta y ALEIXANDRE, Amaya. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. 1, Nutrición hospitalaria, Vol. 27, págs. 76-89.

RAFAEL SÁNCHEZ, Emerita. 2017. Extracción y Cuantificación de Antocianinas de maíz morado (*Zea mays L.*) utilizando dos solventes a diferentes temperaturas y tiempos de extracción. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca-Perú: s.n. Tesis de pregrado.

REILLY, P. M. y BULKLEY, G. B. 1990. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. 12, The British Journal of Surgery, Vol. 77, págs. 1323-1324.

RANGAN, U. y BULKLEY, G. B. 1993. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. 3, British medical bulletin, Vol. 49, págs. 700-718.

SINGLETON, Vernon L. y ROSSI, Joseph A. 1965. Colorimetría de fenólicos totales con reactivos de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico. 3, Revista estadounidense de enología y viticultura, Vol. 16, págs. 144-158.



SURCO BELLIDO, Heber. 2018. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho: s.n. Tesis de pregrado.

STEINER, Claudia y col. 2008. Isoflavonas y la prevención del cáncer de mama y próstata: nuevas perspectivas abiertas por la nutrigenómica. E-S1, *British Journal of Nutrition*, Vol. 99, págs. ES78- ES108.

SALVADOR BADUI, Dergal. 2006. Química de los alimentos. [ed.] Enrique Quintanar Duarte. 4 ta. Naucalpan de Juárez: s.n., 2006. pág. 736. 1031.

SALINAS, José Gutiérrez. 2006. ¿Qué sabe usted acerca de los radicales libres? 4, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol. 37, págs. 69-73.

TORRENEGRA, R., ROBLES, J., & PEDROZO, J. 1995. Terpenos y flavonoides de *Ageratina fastigiata* (HBK) King & Robinson. 24, *Revista Colombiana de Química*, Vol. 1, págs. 9-16.

TOMÁS BARBERÁN, Francisco. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. 2, *Alimentacion, Nutrición y Salud*, Vol. 10, págs. 41-53.

ULLAURI, Patricia Gabriela. 2010. transporte de masa en extracción fase sólido-líquido. reciteia. Quito-ecuador: *Revista ReCiTeIA*, págs. 2027-6850.

VILLANO SALAS, Tania Sayori. 2017. Capacidad antioxidantes y compuestos bioactivos de los frutossilvestres (*Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer (*Machamacha*), *Monnina vargassi* Ferreyra (*Condorpausan*), *Vaccinium floribundum* Kunth (*Alaybili*) y *Rubus roseus* Poir (*Frambuesa silvestre*). Universidad Nacional Jose María Arguedas. Andahuaylas: s.n. pág. 128, Informe de tesis de pregrado.

VENEREO GUTIÉRREZ, Justo R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. 2, *Revista Cubana de medicina militar*, Vol. 31, págs. 126-133.

VILLAÑO, Debora, et al. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. 1, s.l. *Talanta*, Vol. 71, págs. 230-235.

VASCO, Catalina, et al. 2009. Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). 18, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 27, págs. 8274- 8281.

Yoriani, BRAUL, PORRAS Edgar Gilmer y DIAZ PAICO Lunda. 2016. Características farmacognósticas del fruto de *pernettya prostrata* (cav) DC. (machamacha) procedentes de la regionde ayacucho. Ayacucho, Universidad Nacional de Trujillo. Ayacucho s.n. págs. 9-50, tesis de pregrado.

ZAPATA, L. 2014. Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizadocomo antioxidante y colorante en la industria alimentaria. Universidad Politécnica de Valencia. pág. 204, Tesis Ph.D.



ANEXOS



Anexo 01. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) con el diseño completamente al azar para evaluar la variabilidad del contenido de antocianinas totales de los frutos maduros de Machamacha (fresco, seco y congelado).

Tabla 19 — Análisis de variabilidad del contenido de antocianinas totales de frutos maduros de Machamacha en (fresco, seco y congelado)

Muestras observadas (orden aleatorio)	Tratamientos (Machamacha)		
	Fresco CAT (mg de cianidina-3-glucósido/100g)	Seco CAT (mg de cianidina-3-glucósido/100g)	Congelado CAT (mg de cianidina-3-glucósido/100g)
1	12.80804461	14.00201487	19.86332342
2	19.42915242	14.43618587	26.91860223
3	17.0412119	16.93266914	17.36684015
4	16.82412639	10.85427509	19.32060967
5	23.33669145	11.17990335	21.27437918

Tabla 20 — Promedio de las medias del contenido de antocianinas de los frutos frescos, secos y congelados de Machamacha

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fresco	5	89.44	17.89	14.93
Seco	5	67.41	13.48	6.32
Congelado	5	104.74	20.95	13.10

Tabla 21 — Análisis de varianza de las medias para evaluar las hipótesis planteadas anteriormente

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	140.927506	2	70.4637528	6.15336603	0.014478649	3.88529383
Dentro de los grupos	137.415039	12	11.4512533			
Total	278.342545	14				

Entonces determinamos si existe diferencia significativa de los tratamientos con la hipótesis planteada inicialmente donde se indicaba que no hay diferencia significativa entre las medias, observamos que 11.4512533 indica el promedio de la suma que corresponde al cuadrado medio del error, entonces comparamos el estadístico de F calculado con el estadístico de F de valor crítico donde se observa que el F calculado es de 6.15336603 es superior al F de valor crítico con 3.88529383, por lo tanto no se puede aceptar la hipótesis nula (H_0) donde las medias son iguales y por ende se rechaza ya que al menos una de las medias difieren significativamente y se acepta la (H_A), se muestra en la Tabla 20 que la media de frutos congelados 20.95 (mg de cianidina-3-glucósido/100g) es significativamente diferente con la media de los frutos secos 13.48 (mg de cianidina-3-glucósido/100g) no obstante existe similitud cercana entre los frutos congelados con las muestras frescas 17.89 (mg de cianidina-3-glucósido/100g).

Anexo 02. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) con el diseño completamente al azar para evaluar la variabilidad del contenido de polifenoles totales de los frutos maduros de Machamacha en (fresco, seco y congelado).

Tabla 22 — Análisis de variabilidad del contenido de polifenoles totales de frutos maduros de Machamacha en (fresco, seco y congelado)

MUESTRAS observadas (orden aleatorio)	TRATAMIENTOS (Machamacha)		
	FRESCO PFT (mg ac. Gálico/100g)	SECO PFT (mg ac. Gálico/100g)	CONGELADO PFT (mg ac. Gálico/100g)
1	303.1099593	406.2199185	213.3283969
2	404.9241022	386.2273232	216.2902629
3	415.845983	455.8311736	174.453906
4	419.3631988	604.2947057	210.7367642
5	432.3213625	402.5175861	209.4409478

Tabla 23 — Promedio de las medias del contenido de polifenoles de los frutos frescos, secos y congelados de Machamacha

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fresco	5	1975.56	395.11	2740.80
Seco	5	2255.09	451.02	8018.48
Congelado	5	1024.25	204.85	295.60

Tabla 24 — Análisis de varianza (ANOVA) de las medias para evaluar las hipótesis planteadas anteriormente

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	166540.13	2	83270.0652	22.597273	8.5302E-05	3.88529383
Dentro de los grupos	44219.5295	12	3684.96079			
Total	210759.66	14				

En la tabla N°23 observamos que nos arroja el promedio de la suma que corresponde al cuadrado medio del error de 3684.96079 y por los tanto comparamos el estadístico de F calculado con el estadístico de F de valor crítico donde se observa que el F calculado es de 22.597273 es superior al F de valor crítico con 3.88529383, no indica que no se puede aceptar la hipótesis nula (H_0) donde las y por ende se rechaza ya que al menos una de las medias difieren significativamente entonces se acepta la hipótesis alterna (H_A) planteado.

Anexo 03. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) con el diseño completamente al azar para evaluar capacidad antioxidante de los frutos maduros de Machamacha en (fresco, seco y congelado).

Tabla 25 — Análisis de varianza de la capacidad antioxidante de frutos maduros de Machamacha en (fresco, seco y congelado)

MUESTRAS observadas (orden aleatorio)	TRATAMIENTOS (Machamacha)		
	FRESCO	SECO	CONGELADO
	TEAC - DPPH ($\mu\text{mol/g}$)	TEAC - DPPH ($\mu\text{mol/g}$)	TEAC - DPPH ($\mu\text{mol/g}$)
1	37.40	36.65	39.60
2	36.40	37.65	39.05
3	41.90	36.05	35.75
4	39.15	37.45	21.70
5	36.90	37.95	31.40

Tabla 26 — Promedio de las medias de la capacidad antioxidante de los frutos frescos, secos y congelados de Machamacha

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fresco	5	191.73	38.35	5.01
Seco	5	185.73	37.15	0.61
Congelado	5	167.48	33.50	54.18

Tabla 27 — Análisis de varianza de las medias para evaluar las hipótesis planteadas anteriormente

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	63.8083333	2	31.9041667	1.60044312	0.24203269	3.88529383
Dentro de los grupos	239.215	12	19.9345833			
Total	303.023333	14				

Observamos en la tabla N°26 nos arroja el promedio de la suma que corresponde al cuadrado medio del error de 19.9345833 y por lo tanto comparamos el estadístico de F calculado con el estadístico de F de valor crítico donde se observa que el F calculado es de 1.60044312 es inferior al F de valor crítico con 3.88529383, nos indica que se acepta la hipótesis nula (H_0) ya que no existe en las medias diferencia significativa por lo tanto se rechaza la hipótesis alterna (H_A) planteado.

Anexo 04. Reactivos para la preparación de buffer pH 1 y buffer pH 4.5



Figura 16 — Reactivos para la preparación de buffer pH 1 y buffer pH 4.5

Anexo 05. Preparación de muestras a pH 1 y pH 4.5 (pH diferencial) para cuantificación de antocianinas totales



Figura 17 — Preparación de muestras a pH 1 y pH 4.5 (pH diferencial) para cuantificación de antocianinas totales

Anexo 06. Reactivos y muestras con Folin Ciocalteu para evaluar Polifenoles totales



Figura 18 — Reactivos y muestras con Folin Ciocalteu para evaluar Polifenoles totales

Anexo 07. Muestras con folin ciocalteu seco. Fresco y congelado



Figura 19 — Muestras con folin ciocalteu seco. Fresco y congelado

Anexo 08. Lectura de absorbancia de las muestras en espectrofotómetro.



Figura 20 — Lectura de absorbancia de las muestras en espectrofotómetro

Anexo 09. Reactivos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras de Machamacha.

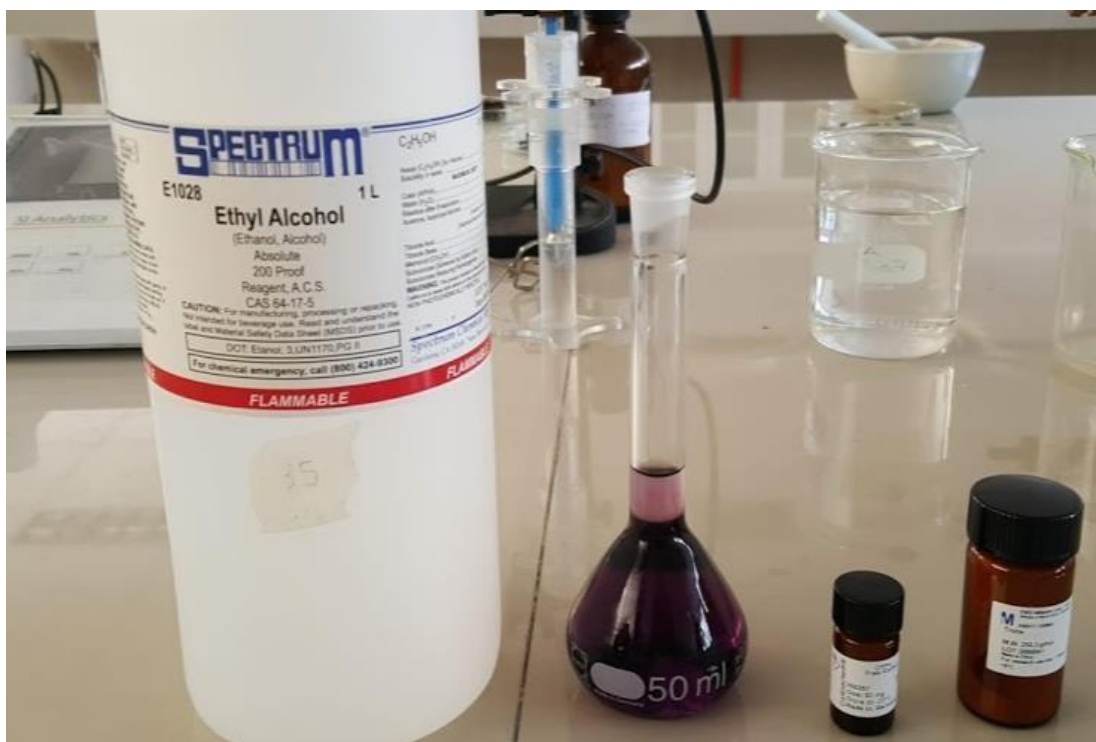


Figura 21 — Reactivos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras de Machamacha

Anexo 10. Muestras de Machamacha con el reactivo DPPH listo para su lectura de absorbancia.

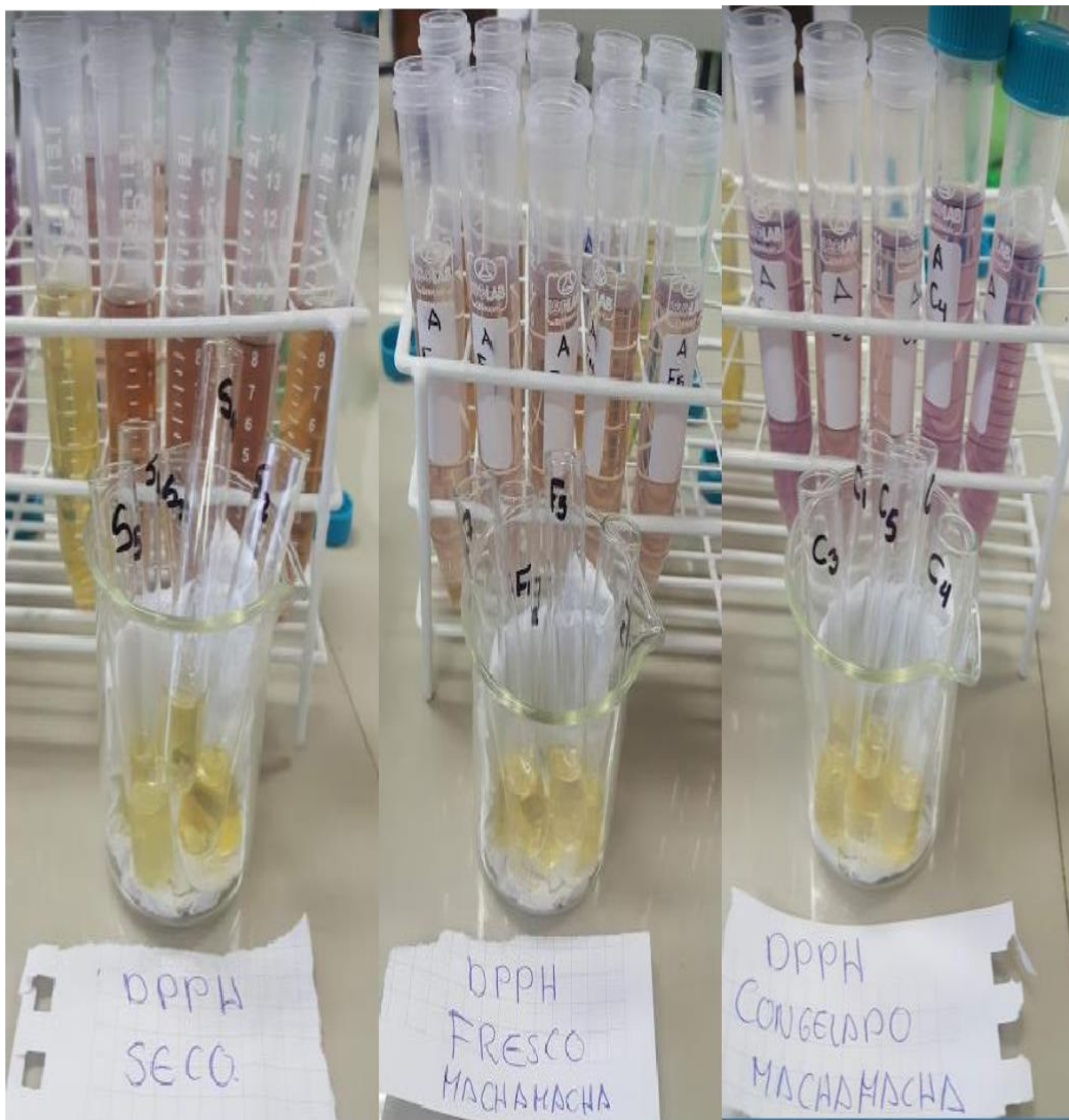


Figura 22 — Muestras de Machamacha con el reactivo DPPH listo para su lectura de absorbancia