

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA
BASTIDAS DE APURÍMAC**

**FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
DEL ZUMO DEL FRUTO DE TANKAR (*Berberis
boliviana L.*), EN DIFERENTES CONDICIONES DE
ALMACENADO”**

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

FREDDY ARANIBAR AGUILAR

Abancay, marzo del 2014.

PERÚ



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APIURIMAC	
CÓDIGO	MFN
	BIBLIOTECA CENTRAL
FECHA DE INGRESO:	16 ABR 2014
Nº DE INGRESO:	00359



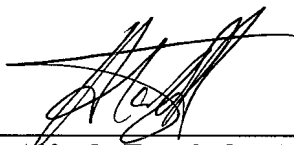
UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL

Jurado calificador integrado por:



Ing. Ruth Yety Ccopa Flores
Presidente



Ing. Alfredo Fernández Ayma
Primer Miembro

Ing. Alex Ernesto Muñoz Cáceres
Segundo Miembro



Ing. Jorge Beltrán Mendoza Cáceres
Asesor





**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DEL ZUMO DEL FRUTO DE
TANKAR (*Berberis boliviana L.*), EN
DIFERENTES CONDICIONES DE
ALMACENADO”**



DEDICATORIA

A Dios todopoderoso, por acompañarme siempre, por haberme dado todo lo que soy y lo que poseo, por darme paz y tranquilidad en tiempos difíciles. Como siempre te digo, gracias por darme un segundo, un minuto, una hora y un día más de vida Señor.

Para el ser más grande y maravilloso que Dios me ha dado, mi Madre, Isabel Aguilar Valenzuela, una súper mamá, que hizo mucho con poco, no hay Ingeniero, contador abogado, medico, ni cualquier profesional que se le compare, porque a pesar de no haber pisado nunca un centro de estudios, supo dar los consejos más sabios y sacar adelante a sus hijos y sin importarle las condiciones en que se encontraba, para ella era retroceder nunca y rendirse jamás. Chiripi, wayrapi, ruphaypi, parapi, yarkhaypi, ch'akiypipas, mamaykha nukaycco raycu llipinta paymanta juran. Esto es para ti madrecita linda.

Para el mejor hermano mayor del mundo que Dios me ha dado, Camilo Valenzuela Aguilar, un hermano que por sus hermanos hizo muchas cosas, con el fin de verlos sonreír y así fue. Si mi padre muy temprano nos dejó, él supo llenar ese vacío, conduciendo con toda certeza la familia. Quiso siempre dar todo a sus hermanos, privándose de muchas cosas, por eso estamos en deuda con él y esto también es para ti y para tu familia, en especial para mis sobrinos Illary Chaska, Qhori Inti y Camilito.

A mis hermanos, Margarita, Inocencio, Elías y José, por haberme apoyado infinitamente en mi formación personal y profesional. Por darme fuerzas para seguir adelante y por ser lo que son. Gracias a Dios por haberme dado de hermanos a ellos.



AGRADECIMIENTO

A mi papá, Inocencio Aranibar Villavicencio, por haberme dado la vida, se que mucho tiempo no lo tuvimos a nuestro lado, pero estoy seguro que desde donde se encuentre, el nos cuida y protege siempre.

A mi abuelo, Germán Aguilar Serrano, una persona con un fuerte carácter, pero gracias a el conocí lo maravilloso que es el campo y todo lo demás se sintetiza en las frases que alguna vez escuche de él, “llancacta ricuspaca llancapacuna, mijucta ricuspaca mijupacuna”.

Un agradecimiento especial para mi tía, Toribia Aguilar Valenzuela, quien me brindo y me brinda su apoyo incondicional en mi formación profesional y también de mis hermanos. Del mismo modo para su hijo, mi primo, Hans Cristopher Warthon Aguilar.

A mi tía, Felicitas Aguilar Valenzuela, por brindarme su apoyo incondicional en mi formación profesional y también de mis hermanos, y por acompañarme en el emprendimiento que iniciamos ya hace unos años. Del mismo modo a su hijo, mi primo Guillermo Renato Valenzuela Aguilar.

Para la mujer especial en mi vida, por brindarme su tiempo, su paciencia y su apoyo incondicional.



A todos mis familiares que fueron artífices de mi formación profesional brindándome su apoyo incondicional.

A mi asesor, Ing. Jorge Beltrán Cáceres, por haberme apoyado en el desarrollo de mi tesis.

A mis jurados por corregir los errores que hubo en el desarrollo de la tesis.

A la UNAMBA, por haberme acogido en sus aulas durante todo el tiempo que realice mis estudios y mi tesis, donde vaya con orgullo diré que soy Unambino. Estoy más que seguro que la Universidad no hace al alumno, sino el alumno hace a la Universidad.

Muchas gracias a todos.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

Sección	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Tankar (<i>Berberis boliviana</i> Lechler)	6
2.1.1 Taxonomía	6
2.1.2 Distribución	7
2.1.3 Familia berberidaceae	7
2.1.4 <i>Berberis boliviana</i> Lechler	8
2.1.5 Antocianinas del tankar (<i>Berberis boliviana</i> Lechler)	10
2.2 Actividad Antioxidante	10
2.2.1 Radicales Libres	12
2.2.1.1 Principales radicales libres	13
2.2.1.2 Fuentes productoras de radicales libres	13
2.2.2 Antioxidantes	16
2.2.2.1 Tipos de antioxidantes	17
2.2.3 Estrés oxidativo	18
2.2.4 Medida de la actividad antioxidante	19
2.2.5 Efectos de los antioxidantes	21
2.2.6 Antioxidantes naturales	21
2.2.7 Actividad antioxidante en frutas y vegetales	22



2.3 Antocianinas	22
2.3.1 Estabilidad de las antocianinas durante el proceso	24
2.3.2 Actividad antioxidante de las antocianinas	24
2.4 Conservación y Procesado por Frío	25
2.4.1 Distinción entre Refrigeración y Congelación	26
2.4.2 Refrigeración y Almacenamiento en Refrigeración	27
2.4.2.1 Cambios en los alim. durante el almac. en refrigeración	29
2.4.2.2 Otros beneficios distintos de la conservación	31
2.4.2.3 Consideraciones económicas	31
2.4.3 Congelación y Almacenamiento en Congelación	32
2.4.3.1 Punto inicial de congelación	32
2.4.3.2 Curva de congelación	33
2.4.3.3 Cambios que se producen durante la congelación	35
2.4.3.4 Velocidad de congelación	37
2.4.3.5 Selección de la temperatura final	38
2.4.3.6 Deterioro producido por la descongelación intermitente	39
III. PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1 Lugar de ejecución	40
3.2 Material Biológico	40
3.3. Materiales, equipos y reactivos	40
3.4 Metodología	43
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	48
4.1 Análisis fisicoquímico	48
4.2 Determinación de la Act. Antioxidante del zumo del fruto fresco	50



4.3 Determinación de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto, en diferentes condiciones de almacenamiento	51
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
VI. BIBLIOGRAFÍA UTILIZADA	61
ANEXOS	66



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 01: Enfermedades o procesos asociados al daño oxidativo en las moléculas biológicas.	12
Cuadro 02: Métodos de medida <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante.	20
Cuadro 03: Resultados del análisis fisicoquímico realizado al fruto del tankar (<i>Berberis boliviana L.</i>).	48
Cuadro 04: Resultado de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto fresco del tankar (<i>Berberis boliviana L.</i>).	50
Cuadro 05: Resultados de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto del tankar (<i>Berberis boliviana L.</i>), en diferentes condiciones de almacenamiento.	52
Cuadro 06: Análisis de Varianza para Actividad Antioxidante – Suma de Cuadrados Tipo III.	54
Cuadro 07: Pruebas de Múltiple Rangos para A.A. por Tiempo	55
Cuadro 08: Pruebas de Múltiple Rangos para Capacidad antioxidante por Temperatura.	56



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01: Estructura química de las antocianinas	24
Figura 02: Curva de congelación	35
Figura 03: Gráfico de dispersión del tiempo respecto a la A.A.	57
Figura 04: Gráfico de Interacciones	57
Figura 05: Gráfico de la variación de la CA (umolTE/g) en el tiempo a diferentes temperaturas.	58
Figura 06: Curva estándar de trolox para el ensayo de ABTS (Actividad antioxidante) a 734 nm.	78



RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se toma como muestra biológica de estudio al fruto del tankar (*Berberis boliviana L.*), al cual se le realizó un análisis fisicoquímico, teniendo como resultado: Humedad (%) 56.00 ± 0.85 ; pH 3.01 ± 0.06 ; Sólidos solubles totales (°Brix) 10.60 ± 0.40 ; Acidez titulable (Expresado en ácido cítrico) 2.86 ± 0.21 ; longitud de frutos inmaduros (mm) 7.13 ± 0.36 ; longitud de frutos maduros (mm) 7.05 ± 0.73 ; peso de frutos inmaduros (g) 0.0652 ± 0.0159 y peso de frutos maduros (g) 0.1025 ± 0.0170 . Luego de realizar el análisis fisicoquímico del fruto se realizó el estudio de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto fresco de tankar (*Berberis boliviana L.*), dando como resultado $15.573 \pm 0.214 \mu\text{molTE/g}$, del cual no se encontró estudio alguno, por lo cual se puede decir que se está determinando por primera vez. Finalmente se realizó el estudio de la actividad antioxidante del zumo del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*), almacenado en diferentes condiciones de tiempo y temperatura, con la finalidad de que estos datos sean utilizados posteriormente por las personas que puedan utilizar este fruto para el procesamiento de diferentes productos y necesiten almacenarlo ya que este fruto es estacional. Las condiciones de almacenamiento en cuanto al tiempo fueron 1 y 2 meses, y en cuanto a la temperatura fueron en refrigeración a $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y congelación $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se hizo el análisis de varianza (ANVA) y se pudo comprobar que los dos parámetros en estudio son estadísticamente no significativos sobre el tiempo y temperatura de almacenamiento del zumo del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) con un 95.0% de confiabilidad, este resultado es muy bueno ya que nos permite saber que en los tiempos y temperaturas almacenadas el zumo del fruto en estudio no varía su actividad antioxidante significativamente.



ABSTRACT

In the present research biological sample is taken as the result of study tankar (*Berberis Boliviana L.*), which was performed a physicochemical analysis, resulting in : Humidity (%) 56.00 ± 0.85 , pH 3.01 ± 0.06 ; Total soluble solids ($^{\circ}$ Brix) 10.60 ± 0.40 ; titratable acidity (expressed as citric acid) 2.86 ± 0.21 ; immature fruit length (mm) 7.13 ± 0.36 ; ripe fruit length (mm) 7.05 ± 0.73 , weight of immature fruit (g) 0.0652 ± 0.0159 and ripe fruit weight (g) 0.1025 ± 0.0170 . After making the physicochemical analysis of the study of fruit Antioxidant activity of fresh fruit juice tankar (*Bolivian Berberis L.*), resulting in $15.573 \pm 0.214 \mu\text{molTE/g}$, which no study found was done, so which it can be said that is being determined for the first time. Finally the study of the antioxidant activity of the juice of the fruit of tankar (*Bolivian Berberis L.*), stored under different conditions of time and temperature, in order that these data are subsequently used by people who can use this fruit to be performed processing different products and need to store it as this fruit is seasonal. The storage conditions for time was 1 to 2 months, and as for cooling the temperature was at 1°C and frozen -10°C . Analysis of variance (ANOVA) was done and I could see that the two parameters under study are not statistically significant over time and temperature of storage of fruit juice tankar (*Bolivian Berberis L.*) with a 95.0 % reliability, this result is very good because it lets us know that in the times and temperatures stored fruit juice in his study did not vary significantly antioxidant activity.



I. INTRODUCCIÓN

En nuestro país, especialmente en la sierra, hay una gran diversidad de flora con frutos comestibles que tienen diferentes propiedades funcionales como la Actividad Antioxidante, pero lamentablemente no los aprovechamos porque desconocemos de su existencia y porque no sabemos o no se estudiaron las propiedades que estos poseen.

El tankar (*Berberis boliviana* L.) es un fruto nativo alto andino que crece en la sierra de nuestro país en forma silvestre a más de los 3 300 msnm., en grandes cantidades y no es aprovechado de ninguna forma, salvo por consumo esporádico de los campesinos que viven donde crece este fruto. En la actualidad no existen muchos estudios de este fruto, solo se tiene un estudio en el cual determinaron los colorantes que este fruto posee, siendo estos las antocianinas y también se determinó que no es tóxico. Sabemos por teoría que los frutos que tienen presencia de antocianinas tienen una determinada actividad antioxidante y es sobre esto que no hay un estudio que diga que este fruto tiene una actividad antioxidante determinada, por lo que no se le da ningún tipo de uso en la Agroindustria, a falta de estos conocimientos que faltan investigar.

Este fruto es estacional pudiéndose encontrar solo en determinados meses del año, haciéndose una necesidad el cosechar grandes cantidades y almacenarlos para luego utilizarlo en la elaboración de productos agroindustriales como néctares y vinos. Si se quisiera disponer de todo o una parte del fruto meses después de su cosecha se tendría que utilizar un método de conservación, entre ellos estaría la refrigeración y congelación, por lo cual en esta investigación se propone almacenar estos zumos en refrigeración y congelación y en estas condiciones estudiar sus actividades antioxidantes, para ver si estos métodos de conservación harían variar en un margen

muy amplio la actividad antioxidante que este zumo de fruto tiene, con el pasar de los días.

Los antioxidantes provienen básicamente de la dieta. En particular de las frutas y verduras y de algunas bebidas. El consumo de estos alimentos protege a las células del daño oxidativo, protege al organismo de las enfermedades que este daño produce.

Los alimentos son importantes fuentes de tales antioxidantes, componentes y elementos traza. Además, se han desarrollado una gran cantidad de antioxidantes sintéticos y algunos de ellos se han empleado en la práctica como, por ejemplo, ciertos aditivos alimentarios, suplementos y fármacos. Sin embargo, suele asumirse que los antioxidantes naturales son más potentes, eficaces y seguros que los sintéticos. Al ser compuestos de origen natural también son mas favorablemente aceptados por los consumidores que los sintéticos.



OBJETIVOS

a. Objetivo General

- Estudiar la Actividad Antioxidante del zumo del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*), en diferentes condiciones de almacenamiento.

b. Objetivos Específicos

- Realizar análisis fisicoquímico al fruto fresco del tankar (*Berberis boliviana L.*).
- Determinar la Actividad Antioxidante del zumo de tankar (*Berberis boliviana L.*), por el Método de ABTS descrito por Arnao (2000).
- Determinar la Actividad Antioxidante del zumo del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*), almacenado en refrigeración a 1 °C y congelación a -10 °C, durante uno y dos meses, por el Método de ABTS descrito por Arnao (2000).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Tankar (*Berberis boliviana* Lechler)

El tankar es una especie silvestre del Perú, pertenece a la familia Berberidaceae, su fruto es una pequeña baya comestible de color morado. En el Perú existen muchas especies silvestres, una de ellas es *Berberis boliviana* Lechler, que crece especialmente alrededor de los campos de cultivo a maneras de protección, grandes y filudas, sus flores son amarillas y sus frutos morados. Existen información sobre dicha especie en Perú desde tiempos de la conquista, especialmente el cronista Bernabé Cobo describió a esta planta con el nombre común de quisca – quisca, que significa planta espinosa. Un análisis preliminar del pigmento determino la presencia de antocianinas. Estos pigmentos fueron consumidos por los hombres a lo largo de incontables generaciones sin causar aparentemente ningún efecto tóxico (Del Carpio *et al.*, 2005).

Los frutos del tankar están disponibles en los meses de marzo y abril de cada año y presentan un intenso color morado oscuro.

Algunas tradiciones orales cuentan que estos frutos eran utilizados por las ñustas incas como lociones naturales para lavar y cuidar sus cabellos (Cobo, 1653).

2.1.1 Taxonomía

La muestra sometida a diagnosis en base a análisis morfológico y comparación con ejemplares del Herbario Vargas, tiene la siguiente posición taxonómica, de acuerdo al Sistema de Judd, Campbell, Kellogg & Stevens (1 999):

División	: Magnoliophyta (= Angiosperms)
Clase	: Magnoliopsida (= Tricolpates - Eudicots)
Sub Clase	: Magnoliidae (=Magnoliid - Complex)
Orden	: Ranunculales
Familia	: Berberidaceae
Género	: Berberis
Especie	: <i>Berberis boliviana</i> Lechler

Nombres comunes.

En el sur de nuestro país, esta planta se conoce como “Tankar”, “Cheqche”, “Qeswa cheqche”, “Agracejo peruano”, “Ailampo”, “Uva – uva”, “Quisca – quisca”.

2.1.2 Distribución

En América Central y a lo largo de los Andes hasta el extremo sur de Sudamérica.

(Dueñas, 1992)

Teniendo la siguiente distribución:

- Mundo: 175 especies
- Perú: 32 especies
- Región: 12 especies

2.1.3 Familia berberidaceae (Dueñas, 1992)

Características morfológicas.

Plantas herbáceas o arbustivas inermes o espinosas, con rizomas arrastrados o gruesos tubérculos, plantas vivaces con hojas simples o compuestas, flores hermafroditas,

solitarias o en racimo, ramas erectas acanaladas provistas de espinas largas de 2 a 8 mm con 3 a 5 radios.

Su desarrollo varía de acuerdo a la especie, pueden alcanzar de 1 a 2 metros de altura, siendo raro que sean más altas pero pueden ser más bajas.

En el género *Berberis*, en las hojas, leño y corteza se encuentra presente el alcaloide berberina.

2.1.4 *Berberis boliviana* Lechler

Los frutos de *Berberis boliviana* L, están disponibles a partir del mes de marzo cada año y presentan un intenso color morado oscuro.

Algunas tradiciones orales cuentan que estos frutos eran utilizados por las ñustas incas como champús naturales para lavar y cuidar sus cabellos. Existe información sobre esta especie en Perú desde tiempos de la conquista, y algunos cronistas como Bernabé Cobo, describen esta planta con el nombre común de quisca quisca, que significa planta espinosa, con pequeñas flores amarillas y espinas filudas, dando un suave color morado cuando son usados para colorear. (Cobo, 1653)

Descripción. (Dueñas, 1992)

Presenta hojas fasciculadas de 12 mm de longitud y 5 mm de ancho, reticuladas, venación sobre ambos lados, sésiles o subsésiles de una coloración verde.

Inflorescencia, que nace en los braquioblastos, es decir regiones axilares, así como en regiones terminales, se presentan a manera de racimo o falso racimo, cimosas o a veces flores solitarias. El perianto es biseriado.

Flores, amarillas pequeñas, pedúnculas, bractiadas, actinomorfas, hermafroditas, sus miembros ordenados cíclicamente, el perianto formado por diversos verticilos, trímeros o dímeros a los cuales acostumbran seguir otros dos hectarios (base de los pétalos) pudiendo ser de origen estaminal. La flor es hipoginea, es decir presenta el ovario elevado con respecto a las demás piezas florales.

Androceo, presenta de 4 a 18 estambres libres, generalmente en 2 ciclos, uno interno y otro externo. Los externos opuestos a los pétalos. Las anteras basifijas o dorsales con dehiscencia bivalvar.

Gineceo, presenta un pistilo unilocular (derivado de 2 a 3 carpelos). El estigma es apical capitado, sésil o sostenido por un estilo corto o grueso, óvulos escasos o numerosos de placentación peristal (óvulos insertados en las paredes internas del ovario). Polen, básicamente tricolpado en Espiral.

Fruto, viene a ser una baya o cápsula dehiscente con una o varias semillas. Presenta una forma globulosa, de tamaño pequeño y una coloración que varía entre rojo y azul morado.

Las semillas, pueden ser una o varias, protegidas por un endospermo copioso carnoso y coriáceo.

El embrión diminuto y redondeado lineal o espatular, los cotiledones indiferenciados con una radícula ancha.

Polinización; generalmente entomógama, existiendo también autogamia.

Hábitat.

Vegeto espontáneo que crece entre matorrales de alturas, climas fríos de preferencia en zonas templadas en laderas y montañas. (Dueñas, 1992)



Producción.

La propagación de esta planta se realiza mediante reproducción vegetativa y por semillas. (Dueñas, 1992)

2.1.5 Antocianinas del tankar (*Berberis boliviana* Lechler)

El tankar (*Berberis boliviana* Lechler) tiene antocianinas en un promedio de de 7 g / 100 g en el tejido separado de las semillas del fruto seco. Además este fruto tiene presencia de 5 aglicones: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina.

En el tankar (*Berberis boliviana* Lechler) se confirmó la presencia de 10 antocianinas presentes en *Berberis boliviana* Lechler, las cuales son: delfinidina-3-glucósido, delfinidina-3-rutinósido, cianidina-3- glucósido, cianidina-3-rutinósido, petunidina-3-glucósido, petunidina-3-rutinósido, peonidina-3-glucósido, peonidina-3-rutinósido, malvidina-3-glucósido y malvidina-3- rutinósido.

La petunidina-3-glucósido es el principal pigmento, en una concentración de 24,43%. (Del Carpio *et al.*, 2005)

2.2 Actividad Antioxidante

Las células a medida que envejecen, sufren una disminución, en su eficiencia para sintetizar proteínas estructurales, enzimas, DNA, RNA y otros, ello está relacionado con su capacidad de captación de nutrientes necesarios para realizar las diversas reacciones metabólicas y su capacidad para reparar las lesiones que ocurren a nivel cromosómico. Aproximadamente, un 2% del oxígeno que utilizan las células son transformadas en “Especies reactivas de oxígeno” (EROs), compuestos que ocasionan daño oxidativo el cual progresivamente se va incrementando con la edad. Organismos aerobios como el



ser humano, no pueden prescindir del oxígeno, ya que este permite obtener la energía necesaria para realizar las diversas funciones propias de la célula, en contraposición a ello el oxígeno genera sustancias que dañan a los componentes celulares, pero a su vez, la célula dispone de sistemas que la protegen de la mencionada acción nociva, a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Ames y Hagen, 1993).

Los Radicales libres son compuestos caracterizados por tener uno o varios electrones desapareados, ello los torna en compuestos altamente reactivos debido a su natural tendencia a aparearlos. En contraposición a ello, existen radicales de naturaleza orgánica, tal como la hexafenil etano o el tris p-nitrofenil metilo, cuya deslocalización del electrón impar brinda una mayor estabilidad (Guilla y Troncoso, 2000).

En la respiración ocurre un fenómeno, donde la glucosa y los ácidos grasos, compuestos de carbono, se transforman en energía. Esta transformación se realiza al interior de la célula, en la mitocondria donde, se produce ATP, ácido adenosín - trifosfato, la molécula clave para la síntesis de los componentes y procesos celulares, por ello, se conoce al ATP como la “moneda” energética de la célula. En la respiración se consume oxígeno, se genera ATP, y quedan como residuos dióxido de carbono y agua. Pero, este proceso no es perfecto ya que se producen también otras moléculas contaminantes (Leighton, 2000).

Cuadro 01: Enfermedades o procesos asociados al daño oxidativo en las moléculas biológicas.

ENFERMEDAD	CAUSA
- Envejecimiento y daño del ADN.	- Peroxidación de los ácidos grasos de la membrana celular.
- Aterosclerosis	- Peroxidación de lípidos en las partículas de LDL con daño de otros de sus componentes.
- Cáncer	- Daño del ADN.
- Cataratas	- Modificaciones irreversibles de las proteínas
- Cuadros inflamatorios crónicos	- Activación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.

Fuente: Leighton (2000).

2.2.1 Radicales Libres

Los radicales libres son partículas tan ansiosas de superar su desequilibrio atómico, que no trepidan en “robar” electrones a las partículas vecinas. Una de las Especies Reactivas del Oxígeno que constituyen la principal causa del daño oxidativo. Radical Libre es un átomo o molécula que posee uno o más electrones no apareados girando en sus órbitas externas. Esta condición, químicamente muy inestable, lo torna sumamente activo puesto que el electrón impar o solitario “busca desesperadamente una pareja” para salir del desequilibrio atómico. Para lograr su objetivo, sustrae un electrón a cualquier molécula vecina, lo que en química quiere decir que “oxida” la molécula, alterando su estructura y convirtiéndola a su vez en otro radical libre ansioso por captar un electrón. Se genera así una reacción en cadena. (Frankel, 1995)

La principal fuente de origen de los Radicales Libres es la respiración, ya que entre un 1 y un 3 % del oxígeno consumido se transforma en EROs. Sin embargo, las Especies Reactivas de Oxígeno también se producen en el organismo como respuesta a la exposición a radiaciones ionizantes, rayos ultravioleta, contaminación ambiental, humo de cigarrillos, algunos fármacos, hiperoxia, exceso de ejercicio e isquemia, e incluso durante el proceso de digestión de los alimentos. (Frankel, 1995)

2.2.1.1 Principales radicales libres

Los radicales libres de mayor importancia en la patología humana son los derivados del oxígeno. Hay cuatro especies de oxígeno reactivo importantes: el hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el superóxido (O_2^-) que tienen electrones desapareados y el oxígeno molecular (singlete) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que tienen electrones apareados, pero que son más reactivos que el resto de las moléculas. (Huayhua, 2008)

- Anión superóxido (O_2^-).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).
- Radical peróxido ($\text{ROO}\cdot$).
- Oxígeno singlete (O_2).

2.2.1.2 Fuentes productoras de radicales libres

Existen diversos caminos por los cuales el organismo se expone a los efectos de los radicales libres derivados del oxígeno. Los radicales libres pueden producirse a través de diversos procesos químicos, tanto dentro como fuera del organismo, mediante mecanismos en los que están implicadas numerosas especies reactivas del oxígeno, las

enzimas y tipos celulares. Podemos hablar entonces de dos tipos de productoras de radicales libres u oxidantes, una endógena y otra exógena. (Freeman, 1982)

Entre las células que sintetizan radicales libres tenemos las endoteliales, los eosinófilos, los neutrófilos, los macrófagos y los monocitos, es decir células sanguíneas presentes en los fenómenos inflamatorios y células que revisten los tejidos del organismo. (Freeman, 1982)

a) Exógenas

Dentro de las fuentes productoras de radicales libres exógenas, están:

- El humo del tabaco.
- La contaminación.
- Fármacos.
- Los rayos ultravioleta.
- Los pesticidas y otras especies reactivas del oxígeno contaminantes químicos.
- El exceso de ejercicios.
- Las lesiones en las articulaciones y en los tejidos, incluidos los dolores y sobrecargas musculares.
- La tensión emocional.
- Isquemia, cuando la disponibilidad de oxígeno es restaurada en un tejido isquémico se producen una serie de reacciones cuyo resultado es la producción del radical superóxido y secundariamente, especies citotóxicas capaces de causar un masivo daño tisular.

b) Endógenas

Dentro de las fuentes endógenas se considera la producción de radicales libres de las propias células y que una misma célula tiene potencialmente más de una fuente de producción de radicales libres.

- Auto oxidación de pequeñas moléculas, existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación – reducción. Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario, a partir de la dismutación del radical superóxido, espontáneamente, o catalizado enzimáticamente por la superoxido dismutasa (SOD).
- Enzimas solubles y proteínas.
- Cadena de transporte electrónico mitocondrial, en los tejidos sanos una de las principales fuentes de radicales libres son las mitocondrias.
- Sistema de transporte electrónico del retículo endoplásmico y membrana nuclear. Ambos sistemas de membranas intracelulares contienen los citocromos que pueden oxidar ácidos grasos insaturados. De hecho, los citocromos son las más poderosas especies reactivas del oxígeno, los oxidantes in vivo, aunque también pueden actuar como agentes reductores.
- Peroxisomas, son potentes fuentes celulares de producción de peróxido de hidrógeno debido a su alta concentración en oxidasas, ninguna de las cuales utiliza el superóxido como precursor del mismo.
- Membrana plasmática, los radicales libres generados extracelularmente deben cruzar la membrana plasmática antes de reaccionar con otras especies reactivas del oxígeno componentes celulares y por lo tanto, pueden iniciar reacciones tóxicas en la misma. (Freeman, 1982)

2.2.2 Antioxidantes

Los antioxidantes, son compuestos de diverso tipo que frenan la formación de radicales libres al interior de la célula y neutralizan los ya existentes. La primera defensa antioxidante es de tipo enzimático. Se origina al interior del organismo y opera de dos formas: evita la formación de radicales libres a partir de otras moléculas, como en el caso del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o convierte los radicales libres existentes en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar y dañar otras moléculas vecinas. A esta primera barrera se suma otra: los antioxidantes no enzimáticos, que provienen de la dieta. Esta segunda defensa antioxidante está formada por distintos compuestos que neutralizan radicales libres, interrumpiendo las reacciones en cadena a través de las cuales se propaga el daño que éstos producen. Para lograrlo, los antioxidantes entregan un electrón a los radicales libres, con lo cual los desactivan y apagan el proceso, pero sin transformarse ellos mismos en radicales libres, dada la gran movilidad de sus electrones o por su transformación en radicales libres “flojos” o no reactivos.

La acción antioxidante la realizan diversas sustancias en diferentes lugares del organismo. Siendo muy distinta la naturaleza de su estructura química, los antioxidantes, difieren no solamente por su eficiencia como antioxidante, sino por sus propiedades físico-químicas, por ejemplo, la Vitamina C es un compuesto hidrosoluble, propiedad que le permite su efecto antioxidante en medio acuoso, en cambio la Vitamina E que es un compuesto liposoluble, cumple su acción de una manera eficiente en el interior de las membranas celulares. (Packer, 1994)

2.2.2.1 Tipos de antioxidantes

La acción antioxidante lo realizan diversas sustancias en diferentes lugares del organismo e inclusive dentro de una célula siendo muy distinta a la naturaleza de la estructura química de los antioxidantes, difieren no solamente por su eficiencia, sino por sus propiedades fisicoquímicas. (Packer, 1994)

Existen antioxidantes que protegen nuestro cuerpo de la formación de radicales libres, entre ellos tenemos al superóxido dismutasa, metionina reductasa, catalasa y glutatión peroxidasa. El cuerpo los procesa, pero pueden ser suplementados por una dieta rica en antioxidantes como la vitamina A, E y C, el selenio, el zinc, flavonoides. (Packer, 1994)

a) Antioxidantes enzimáticos

- Superóxido dismutasa.
- Glutatión peroxidasa.
- Catalasa.
- Tioredoxina.
- Glutaredoxina.

b) Antioxidantes no enzimáticos

- Vitamina E.
- Glutatión.
- Vitamina C (Acido Ascórbico).
- Carotenoides.
- Ácido Úrico.

2.2.3 Estrés oxidativo

La producción de las Especies Reactivas del Oxígeno, entre ellas radicales libres, es un proceso natural, inevitable y constante; un continuo biológico. Todas las células, independiente de su tipo, están permanentemente produciendo estas moléculas con electrones desapareados. El daño que los radicales libres provoquen en los diferentes tejidos depende del balance entre las EROs y las defensas antioxidantes de que dispone el organismo humano. (Kinsella *et al.*, 1993)

El sistema antioxidante provee al organismo de defensas contra la acción dañina de los radicales libres. Estas defensas son múltiples, variadas y operan en diferentes niveles y momentos. La salud de las personas se relaciona con el adecuado balance oxidativo. Es decir, que radicales libres y antioxidantes se equilibren en modo tal que se minimice el daño y se retarde la aparición de enfermedades. (Kinsella *et al.*, 1993)

El estrés oxidativo, sin embargo, ocurre en los organismos que, por mala nutrición, enfermedad u otras causas, pierden el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes.

Estrés oxidativo se define como una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas del oxígeno como una disminución de los sistemas de defensa, lo que resulta en una mayor concentración, en estado estacionario, de EROs. Es en esta situación de estrés oxidativo en la que se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres. Estos reaccionan químicamente con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN al interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular. (Kinsella *et al.*, 1993)

Numerosas enfermedades han sido vinculadas a estrés oxidativo. En la actualidad se tienen evidencias que permiten postular mecanismos a través de los cuales se produce,



por ejemplo, la aterosclerosis. El desbalance entre oxidantes y antioxidantes está asociado a la fisiopatología de aterosclerosis, cáncer, porfirias, cataratas, sobrecarga de hierro y cobre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y otras demencias, diabetes, malaria, artritis, enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas y otras. Asimismo, el proceso biológico del envejecimiento se acelera en relación directa con la magnitud del estrés oxidativo. (Kinsella *et al.*, 1993)

2.2.4 Medida de la Actividad Antioxidante

Se han realizado numerosos estudios, la mayoría *in vitro*, para evaluar la capacidad antioxidante de sustancias naturales, tanto en sistemas acuosos como lipídicos, los métodos de medida de Actividad Antioxidante se basan generalmente en la inhibición de ciertas reacciones por la presencia del antioxidante. Estas reacciones suelen implicar la formación de radicales libres a partir de un sustrato adecuado, según el método instrumental, el sustrato, el iniciador de la oxidación y el punto final utilizado son posibles estrategias de control; así se puede controlar, la medida de la inhibición de la oxidación a un determinado tiempo; el estudio de la cinética de reacción y la medida de la fase de retraso de la oxidación. (Fernández *et al.*, 2001).

En el Cuadro 3 se presentan algunos métodos de cuantificación de la actividad antioxidante más empleados.



Cuadro 02: Métodos de medida *in vitro* de la Actividad Antioxidante.

Método	Sustrato	Oxidante	Detección	Efecto del antioxidante
Radical DMPD+	DMPD	FeCl ₂	Absorvancia a 505 nm.	Caída de absorvancia
Radical ABTS+	ABTS	H ₂ O ₂ /peroxidasa	Absorvancia a 414 nm.	Caída de absorvancia
Radical DPPH+	Radical DPPH+		Absorvancia a 515 nm.	Caída de absorvancia
ORAC	β-ficoeritrina	AAPH	Fluorescencia	Retraso de la Caída de absorvancia
TRAP	ABAP	Descomposición térmica	Electrodo de oxígeno	Retraso del consumo de O ₂
Luminol	Luminol	Peroxidasa	Quimio luminiscencia	Retraso de la emisión de luz

Fuente: Fernández *et al.* (2001).

2.2.5 Efectos de los antioxidantes

Los antioxidantes pueden retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres (antioxidantes primarios) o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres (antioxidantes secundarios). Dentro de los antioxidantes primarios incluyen a los compuestos fenólicos, tales como la vitamina E (α – tocoferol) y se destruyen durante el periodo de inducción. Los antioxidantes secundarios operan a través de un cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxido a especies no radicales, absorción de la radiación UV. (Huayhua, 2008)

2.2.6 Antioxidantes naturales

Son aquellas sustancias de importancia presentes en los alimentos, capaces de preservar los alimentos que los contienen y en el aporte in vivo de antioxidantes esenciales. Este tipo de antioxidantes se presentan o pueden ser adquiridas de los tejidos de las plantas, los animales y aquellos que se forman durante el proceso de compuestos alimenticios de origen vegetal o animal. Estos antioxidantes se encuentran presentes en prácticamente en todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animal.

El ser humano está protegido del estrés oxidativo gracias a la acción de varios antioxidantes que poseen diferentes funciones. Algunos son enzimas y proteínas y otros son pequeñas moléculas antioxidantes. Se asume que los antioxidantes naturales son más potentes, eficaces y seguros que los sintéticos. (Huayhua, 2008)

2.2.7 Actividad Antioxidante en frutas y vegetales

Las frutas y las verduras vienen limitada por otros factores, a parte de la oxidación de los lípidos. El contenido lipídico de las frutas y verduras es del 1% o menos, de tal forma que el efecto de su enranciamiento puede quedar enmascarado por otras sustancias más activas desde el punto de vista sensorial.

Las frutas contienen aceites esenciales que poseen Actividad Antioxidante pero que también son fácilmente oxidables. Algunos pigmentos con características antioxidantes se estabilizan con ácido ascórbico y ácido fenólico y a través de su pasterización.

El efecto benéfico de las legumbres y frutas se atribuye principalmente a los polifenoles, la vitamina C, los Carotenoides y la vitamina E, por su acción antioxidante. En general, las frutas son los vegetales más ricos en compuestos polifenólicos, pero algunas frutas los contienen como antioxidantes en mayor concentración. La información que relaciona a los antioxidantes con una buena salud es ya conocida y manejada por un amplio sector de la población, que se preocupa por adquirir alimentos con alto contenido de antioxidantes. (Murillo, 2006)

2.3 Antocianinas

El término antocianina se deriva de las palabras griegas “anto” = flor y “cianin” = azul y fue utilizado por Marquart en 1835 para designar el pigmento azul de las flores. Después se noto que no sólo era el color azul, sino también el púrpura, violeta, magenta y casi todos los tonos rojos que aparecen en muchas flores, frutos, algunas hojas, tallos y raíces. (Bridle, P; Timberlake C.F. 1997)



Las antocianinas se consideran dentro del grupo de los flavonoides, pues poseen el esqueleto característico $C_6 - C_3 - C_6$ y tienen el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro. (Swain, T. 1986)

Las antocianinas son pigmentos que presentan características químicas de glucósidos, generalmente son de color rojo y violeta, solubles en agua, están formadas por una molécula de antocianidina (aglicón) que se une a una fracción de carbohidratos a través de un enlace β - glucosídico. Solamente se han hallado 5 azúcares como parte de las moléculas de antocianinas (glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa y arabinosa).

La coloración de las antocianinas es muy inestable, especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo cambios con mucha facilidad; cambios durante el procesamiento del material crudo y en almacenaje, los que se manifiestan en pérdidas de color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos. Son sensibles a las variaciones de pH; a pH 3 el pigmento está presente como sales de flavilo de color rojo, a pH 8 es de color violeta y a pH 11 de color azul.

Las antocianinas, pigmentos flavonólicos, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática. Una Actividad Antioxidante óptima se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B (figura 01) los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado. Los grupos hidroxilo libres en las posiciones 3 del anillo C (figura 01) y en la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en la posición 4 son donadores de electrones. La diversidad estructural contribuye favorablemente a la existencia de unos 300 antocianos con diferentes sustituciones glucosídicas. (Kuskoski *et al.*, 2004)

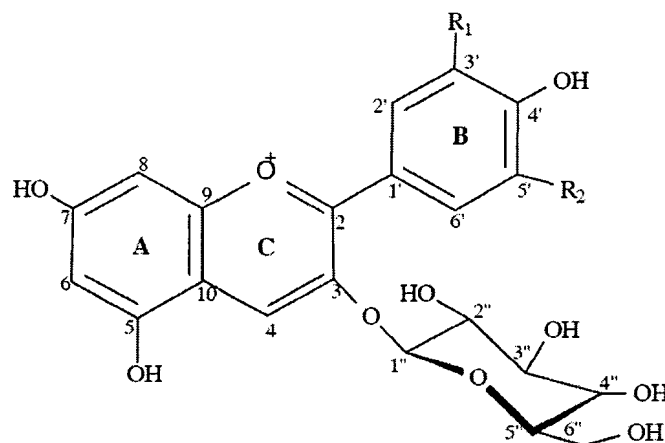


Figura 01: Estructura química de las antocianinas.

2.3.1. Estabilidad de las antocianinas durante el proceso

El color de las antocianinas depende de su estructura química, del pH al que se encuentre y de la presencia de sales con las que interacciona. Los cambios fisiológicos en la maduración de los frutos llevan consigo cambios en el pH, y por tanto, cambios de color en el tejido vegetal por efecto de los compuestos reactivos tales como los azúcares reductores, fenoles y aminoácidos.

La solubilidad de las antocianinas en los frutos vegetales, permite su pérdida con mucha facilidad a través de su lixiviación en agua, utilizada en los diferentes procesos de tratamiento. (Huayhua, 2008)

2.3.2. Actividad Antioxidante de las antocianinas

Estudios realizados con compuestos polifenólicos y especialmente los flavonoides demuestran su capacidad antioxidante y su significativa contribución en la dieta, así como su efecto en la prevención de diversas enfermedades tales como: enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y enfermedades neurológicas. Algunos estudios han demostrado que los flavonoides pueden extinguir de forma eficiente las especies

reactivas de nitrógeno. La capacidad de captar ONOO – de algunos flavonoides es diez veces mayor que las del ebselen, un captor de peroxinitritos muy eficiente. Las antocianinas son potentes absorbedores de NO y ONOO- es decir tiene la capacidad para interactuar con las especies de nitrógeno. El pH del sistema también determina la Actividad Antioxidante. Las antocianinas son tanto menos efectivas como quelantes de metales cuando más acidas son las soluciones donde se encuentran. Sin embargo, la capacidad para donar hidrogeno de las antocianinas aumenta al disminuir el pH de la disolución. La ionización de los grupos OH en condiciones básicas promueven la formación de complejos metálicos. Otros factores que pueden influir en la actividad de los antioxidantes naturales son el calor, la frecuencia y presencia de metales. La utilidad de los antioxidantes naturales dependerá de si un extracto crudo puede llegar a proporcionar una Actividad Antioxidante suficiente o es necesario emplear alguna fracción concreta. (Huayhua, 2008)

2.4 Conservación y Procesado por Frío

La congelación y la refrigeración (esto es, el almacenamiento a bajas temperaturas) son dos de los métodos más antiguos empleados para la conservación de los alimentos. Desde el momento en que los frigoríficos y los congeladores se convirtieron en electrodomésticos habituales de los hogares, la industria moderna de los alimentos congelados creció rápidamente.

Actualmente la refrigeración influye mucho en las prácticas agrícolas y de mercadotecnia y determina el ambiente económico de la industria alimentaria. La mayor parte del comercio mundial de alimentos perecederos sería imposible si no se aplicase refrigeración mecánica durante su transporte. Las grandes ciudades, alejadas de las

áreas de producción, no disfrutarían de frutas y hortalizas en abundancia. La refrigeración y el almacenamiento a bajas temperaturas estabilizan los precios de los alimentos a lo largo de todo el año y permiten disponer de muchos productos en cualquier estación. De no existir esta tecnología los precios de algunos productos serían muy bajos en el momento de la recolección, extremadamente caros después y en algunas épocas ni siquiera se encontrarían en el mercado. (Potter y Hotchkiss, 1995)

2.4.1 Distinción entre Refrigeración y Congelación

Es importante señalar la diferencia que existe entre refrigeración y almacenamiento en refrigeración, por una parte, y congelación y almacenamiento en congelación, por otra. Por almacenamiento en refrigeración se entiende generalmente aquél que mantiene los productos a temperaturas superiores a las de congelación, desde aproximadamente 16°C hasta -2°C. Los frigoríficos comerciales y domésticos habitualmente operan entre 4,5 y 7°C. Los equipos comerciales a veces mantienen una temperatura ligeramente inferior cuando se quiere favorecer a conservación de un determinado alimento. El agua pura se congela a 0°C, pero la mayoría de los alimentos no comenzarán a hacerlo hasta cerca de -2°C o menos. El almacenamiento en congelación implica el empleo de temperaturas que mantengan los alimentos en estado congelado, siendo las condiciones óptimas las de -18°C o menores. El almacenamiento en refrigeración o en frío permitirá conservar los alimentos perecederos durante días o semanas, dependiendo del alimento, mientras que si es en congelación se conservarán durante meses e incluso años, si están envasados adecuadamente. (Potter y Hotchkiss, 1995)

La mayoría de los microorganismos alterantes crecen rápidamente a temperaturas superiores a 10°C, pero algunos lo hacen incluso a temperaturas menores de 0°C



mientras haya agua no congelada disponible. Un alimento mantenido a una temperatura de refrigeración correcta puede, a pesar de todo, deteriorarse por el crecimiento de microorganismos. Hasta hace poco se pensaba que aunque los alimentos refrigerados podían alterarse por cambios indeseables del color, flavor y aspecto, esto no comprometía la seguridad del alimento ya que a estas bajas temperaturas los microorganismos causantes de enfermedad no se multiplicaban apreciablemente. Y, en efecto, esto es cierto para muchos de esos microorganismos. En los últimos años, sin embargo, los bromatólogos han comprobado que algunos microorganismos patógenos crecen, aunque lentamente, a temperaturas tan bajas como 3,3°C. Se conocen como microorganismos patógenos psicrotrofos (es decir, causantes de enfermedad y tolerantes al frío). Éste es un problema grave porque implica que no puede asegurarse que con una refrigeración adecuada los alimentos estén protegidos completamente en cualquier circunstancia. A temperaturas menores de -9,5°C no se detecta en los alimentos crecimiento significativo de microorganismos alterantes o patógenos. Pero, como se ha señalado anteriormente, la congelación no los destruye completamente; cuando el alimento se descongela, pueden multiplicarse y producir rápidamente su alteración. (Potter y Hotchkiss, 1995)

2.4.2 Refrigeración y Almacenamiento en Refrigeración

La refrigeración, y el almacenamiento en refrigeración en general, es actualmente el método más suave de conservación de los alimentos. Tiene pocos efectos adversos en el sabor, textura, valor nutritivo y otros atributos de los alimentos, siempre que se sigan unas simples reglas y los períodos de almacenamiento no sean excesivamente largos. No se puede decir lo mismo del calor, la deshidratación, la irradiación y otros métodos

de conservación que, a menudo y de forma inmediata, provocan cambios en los alimentos aunque sean pequeños.

A pesar de que la refrigeración y el almacenamiento en refrigeración reducen la velocidad de deterioro de los alimentos, en la mayoría de los casos no lo impiden tan efectivamente como el calor, la deshidratación, la irradiación, la fermentación o incluso la congelación. A una temperatura de 0°C, menor que la que mantienen la mayoría de los frigoríficos comerciales o domésticos, la vida útil de los alimentos perecederos como carne, pescado, aves y muchas frutas y hortalizas es generalmente inferior a 2 semanas. A 5,5°C, la temperatura de refrigeración más corriente, la validez del almacenamiento no suele superar una semana. Estos productos, por otra parte, pueden deteriorarse al cabo de un día, e incluso menos, si se mantienen a temperaturas de 22°C o mayores.

En condiciones ideales la refrigeración de los alimentos perecederos debe comenzar en el momento de su recolección o sacrificio y mantenerse durante su transporte, almacenamiento, comercialización y almacenamiento previo a su empleo final. Esto no sólo es necesario desde el punto de vista de la alteración microbiana, sino también para mantener el flavor, la textura y otros atributos de calidad de muchos alimentos.

El retraso de unas pocas horas entre la recolección o el sacrificio y la refrigeración es suficiente para que se produzca un acusado deterioro del alimento. Esto se aprecia claramente en algunas frutas y hortalizas que son metabólicamente activas: no sólo generan calor por respiración, sino que transforman los metabolitos de una forma a otra. Para reducir al mínimo estas pérdidas, hay que trasladar los sistemas de refrigeración al punto de recogida de la cosecha en el campo. Cuando se recolectan, las frutas y hortalizas atraviesan este hidrogenfriador (*hydro-cooler*) donde se rocían con chorros de

agua fría. El agua puede contener además un germicida para inactivar los microorganismos de la superficie del producto. Los productos enfriados se cargan a continuación en camiones o en vagones de tren refrigerados y se transportan a almacenes refrigerados.

El enfriamiento rápido no significa simplemente introducir los productos a granel en un vagón de ferrocarril o en un almacén refrigerados. Refrigerar es quitar o extraer el calor de un cuerpo. Si el cuerpo es grande, el tiempo necesario para eliminar su calor puede ser tan largo que permita un gran deterioro antes de que se alcancen las temperaturas de conservación efectivas. . (Potter y Hotchkiss, 1995)

2.4.2.1 Cambios en los alimentos durante el almacenamiento en refrigeración

El deterioro de los alimentos durante su almacenamiento en refrigeración está influido en las plantas por las condiciones de cultivo y la variedad vegetal, en los animales por la alimentación, así como por las condiciones de recolección y de sacrificio, por la higiene y el daño experimentado por los tejidos, por la temperatura de almacenamiento en refrigeración, por la mezcla de alimentos durante su almacenamiento y por otras variables.

Por ejemplo, la temperatura de almacenamiento más adecuada para los pomelos de la variedad Florida es de 0°C, mientras que para los de la variedad Texas Marsh es preferible una temperatura de 11 °C. Las manzanas McIntosh se almacenan bien a 2-5°C, pero para la variedad Delicious es preferible 0°C.

La temperatura de refrigeración demasiado baja produce lesiones en frutas y hortalizas denominadas «daño por frío», incluso aunque la congelación no las deteriore físicamente. Esto es lógico ya que es de esperar que las plantas vivas, al igual que los



animales requieran una temperatura óptima. Por otra parte, el almacenamiento de plátanos y tomates a temperaturas inferiores a 13 °C retarda la actividad de las enzimas madurativas naturales e impide el desarrollo de un buen color. No obstante, en la mayoría de los alimentos perecederos generalmente es mucho más perjudicial no aplicar refrigeración que emplear temperaturas demasiado bajas.

El almacenamiento en refrigeración permite el intercambio de aromas y sabores entre muchos alimentos. La mantequilla y la leche absorberán los olores del pescado y la fruta, y los huevos el de las cebollas. Es mejor que los alimentos se almacenen por separado, especialmente los olorosos, aunque esto no siempre sea factible económicamente. En muchos casos este intercambio de olores puede evitarse mediante un buen envasado.

Algunos cambios que ocurren en los alimentos durante el almacenamiento en refrigeración sí representan verdaderas pérdidas de nutrientes. Un ejemplo importante es la pérdida de vitamina C y de otras vitaminas, que es frecuente en muchos alimentos mantenidos en refrigeración durante períodos de tiempo relativamente cortos. Otros cambios habituales que se producen durante el almacenamiento en refrigeración tienen como consecuencia la pérdida de la firmeza y de la textura crujiente de frutas y hortalizas los cambios de color de las carnes rojas, la oxidación de las grasas, el ablandamiento de los tejidos y el goteo del pescado, el endurecimiento del pan y de las tartas, el apelmazamiento y endurecimiento de los alimentos granulares, las pérdidas de flavor y una multitud de alteraciones microbianas a menudo características de cada alimento y debidas al predominio de un determinado microorganismo alterante. Algunos alimentos no se deben refrigerar, siendo el pan un ejemplo. El endurecimiento puede detenerse mediante la congelación. Todas estas diferencias, y alguna otra, entre los distintos

alimentos que se mantienen a temperaturas de refrigeración son las que determinan las condiciones más adecuadas para su almacenamiento. (Potter y Hotchkiss, 1995)

2.4.2.2 Otros beneficios distintos de la conservación

El frío se emplea generalmente en la industria alimentaria por su capacidad conservante. Hay muchas situaciones, sin embargo, en las que la refrigeración proporciona otras ventajas y mejora las propiedades de los alimentos para su procesado. Las bajas temperaturas son útiles para controlar la velocidad de ciertas reacciones químicas y enzimáticas así como la velocidad de crecimiento y del metabolismo de algunos microorganismos que son deseables en los alimentos. El frío facilita, además, el pelado y deshuesado de los melocotones para enlatar, disminuye los cambios de sabor y aroma durante la extracción y filtración de los zumos cítricos, facilita el cortado de la carne y la obtención de rebanadas del pan y precipita las ceras de los aceites comestibles.

2.4.2.3 Consideraciones económicas

Desde un punto de vista económico o práctico, cuando para la conservación de múltiples alimentos de un almacén, supermercado o frigorífico doméstico se aplica frío no siempre es posible separar los distintos alimentos proporcionándole a cada uno ambiente con su temperatura y humedad relativa óptimas. La solución que se suele adoptar es mantener la temperatura del área de refrigeración alrededor de 2-7°C, sin tener ningún cuidado especial para controlar la humedad. Incluso en estas condiciones, la refrigeración mejora significativamente la seguridad, el aspecto, el flavor y el valor nutritivo de nuestros alimentos. Y, además, reduce las pérdidas ocasionadas por insectos, parásitos y roedores. (Potter y Hotchkiss, 1995)

2.4.3 Congelación y Almacenamiento en Congelación

La congelación, como método de conservación, se inicia en el momento en que terminan la refrigeración y el almacenamiento refrigerado. La congelación ha permitido disponer de comidas más cómodas tanto a nivel doméstico, como en restaurantes y establecimientos de restauración colectiva. Puesto que la congelación realizada adecuadamente conserva los alimentos sin provocar grandes cambios en su tamaño, forma, textura, color, aroma y sabor, ha permitido que una gran parte del trabajo necesario para la preparación de un producto o de una comida entera se ejecute antes de su congelación. Así se han transferido a la industria operaciones que antes se desarrollaban en el hogar o en los restaurantes. La gran variedad de productos congelados disponibles, muchos de ellos comercializados en los mismos recipientes en los que se consumen, representa una gran revolución en la industria alimentaria y refleja los enormes cambios que han experimentado los hábitos alimenticios.

La calidad de los alimentos congelados se basa, por supuesto, en principios científicos bien establecidos. (Potter y Hotchkiss, 1995)

2.4.3.1 Punto inicial de congelación

Una propiedad básica de las soluciones acuosas es que al aumentar la concentración de sólidos disueltos disminuye su punto de congelación. Cuanto mayor sea la concentración de azúcar, minerales o proteínas de una disolución, más bajo será su punto de congelación y más tiempo tardará en congelarse cuando se introduzca en una cámara de congelación. Si se colocan en un congelador, por ejemplo, agua y zumo de fruta, el agua se congelará antes que el zumo de fruta. Es más, a no ser que la temperatura del congelador sea considerablemente inferior al punto de congelación del



agua pura, el zumo nunca se congelará completamente solo que se convertirá en un líquido pastoso y frío con cristales de hielo. Sucede que lo primero que se congela en el zumo es el agua que contiene, dejando los sólidos disueltos en una solución más concentrada que requiere para congelarse una temperatura aún más baja.

Como los distintos alimentos difieren en su contenido de agua y en los tipos y cantidades de sólidos disueltos, la temperatura a la que se iniciará la congelación será diferente para cada uno y en las mismas condiciones, requerirán tiempos distintos para alcanzar el estado de congelación completa. Esto explica en gran parte que las variedades de cultivo de una misma fruta u hortaliza, que tienen una composición ligeramente diferente, no se comporten igual durante la congelación. Por esta razón, los fabricantes de alimentos congelados que desean tener un control estricto sobre el proceso de la congelación especifican la variedad a cultivar e, incluso, suministran las semillas y el fertilizante para asegurar el control de la composición y de otras propiedades de la materia prima. (Potter y Hotchkiss, 1995)

2.4.3.2 Curva de congelación

Ninguna porción de alimento se congela uniformemente, es decir, no pasa repentinamente de estado líquido al sólido. Cuando se introduce leche en un congelador, lo primero que se congela es el líquido más próximo a la pared del envase y los primeros cristales que se forman serán de agua pura. A medida que se congela más agua, la leche se concentra en minerales, proteínas, lactosa y grasa. Este concentrado, que se congela gradualmente, también se concentrará progresivamente a medida que avanza la congelación. Al final, queda un núcleo central de líquido sin congelar muy

concentrado, que también terminará congelándose si la temperatura es lo suficientemente baja.

El punto de congelación del agua pura es el de 0°C , aunque realmente el agua no empieza a congelarse a 0°C . Lo que sucede generalmente es que se sobreenfría a una temperatura de varios grados por debajo de 0°C antes de que algún estímulo, como la nucleación de cristales o la agitación, inicie el proceso de congelación. Cuando esto ocurre, aumenta bruscamente la temperatura de sobreenfriamiento hasta los 0°C debido a la producción de calor latente de cristalización. Mientras exista agua libre congelándose y liberando calor latente de cristalización (o de fusión), la temperatura de la mezcla de agua pura y hielo no descenderá por debajo de 0°C , ni siquiera cuando la temperatura del ambiente es muy inferior a 0°C . Sólo después de que se haya congelado toda el agua, la temperatura del sistema descenderá por debajo de la temperatura de equilibrio, los 0°C , y se aproximará, entonces, rápidamente a la del ambiente de congelación.

Gran parte de lo expuesto se puede aplicar igualmente a los alimentos que contienen agua, si bien la congelación es algo más compleja al tener, además de agua, sólidos disueltos.

Puesto que los alimentos varían en composición, cada uno tendrá una curva de congelación característica con una forma diferente. En estas curvas normalmente se puede identificar la zona de sobreenfriamiento, el punto de inflexión hacia el punto de congelación y la caída posterior de la temperatura siempre que haya un diferencial de temperatura suficiente entre el alimento que se está congelando y el ambiente del congelador. Esta diferencia de temperatura proporciona la fuerza motriz para que prosiga la transmisión de calor del alimento al exterior. (Potter y Hotchkiss, 1995)



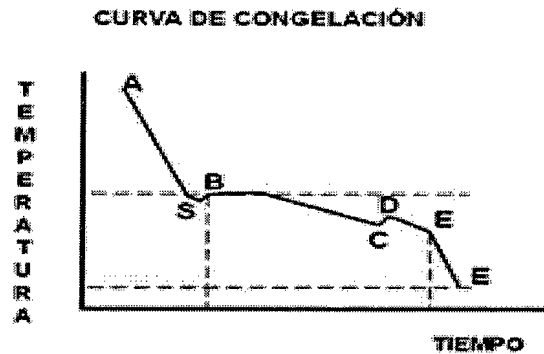


Figura 02: Curva de congelación.

2.4.3.3 Cambios que se producen durante la congelación

Las conducciones de agua pueden estallar cuando el agua se congela en su interior. No debería sorprender, por lo tanto, que la congelación de los alimentos pueda desbaratar su textura, romper emulsiones, desnaturalizar proteínas y provocar otros cambios de naturaleza tanto física como química, a no ser que se controle adecuadamente. Muchos de estos cambios están relacionados con la composición del alimento que depende, a su vez, de las prácticas agrícolas empleadas mucho antes del proceso de congelación. (Potter y Hotchkiss, 1995)

a) Efectos de la concentración

Para que se mantenga la calidad de los alimentos durante su almacenamiento en congelación, la mayoría deben estar completa o casi completamente congelados. Su textura, color, sabor, aroma y otras propiedades se alterarán si en el producto queda un núcleo sin congelar o una zona sólo parcialmente congelada. Además del posible crecimiento de microorganismos psicrotrofos y de la mayor actividad enzimática que se observa cuando el agua no se congela, una de las principales causas del deterioro de los alimentos parcialmente congelados es la elevada concentración de solutos en el agua restante. (Potter y Hotchkiss, 1995)



El daño debido a los efectos de la concentración puede ser de varios tipos:

- Si los solutos precipitan de la solución.
- Los solutos que no precipitan sino que permanecen en la solución concentrada pueden provocar la desnaturalización de las proteínas por un efecto de «precipitación por salado» (*salting out*).
- La concentración de solutos ácidos puede causar un descenso del pH por debajo del punto isoeléctrico (punto de mínima solubilidad), dando lugar a la coagulación de las proteínas.
- Las suspensiones coloidales se encuentran en un delicado equilibrio con respecto a la concentración de aniones y cationes. Algunos de esos iones son esenciales para mantener los coloides y su concentración o precipitación puede romper dicho equilibrio.
- Los gases en solución también se concentran cuando el agua se congela. Esto puede ocasionar la sobresaturación de los gases y, en último término, forzarlos a salir de la solución. La cerveza o los refrescos carbonatados congelados pueden tener este defecto.
- El efecto de concentración también puede causar una deshidratación de los tejidos adyacentes a nivel microambiental. Cuando los cristales de hielo se forman en el líquido extracelular, la concentración de los solutos en la cercanía de los cristales de hielo provoca la difusión del agua del interior de las células, a través de las membranas, hacia la región de mayor concentración de solutos para restablecer el equilibrio osmótico. Este desplazamiento del agua rara vez revierte durante la descongelación y puede causar pérdida de turgor tisular.

b) Daño producido por los cristales de hielo

Los alimentos sólidos constituidos por tejidos vivos como carnes, pescado, frutas y hortalizas tienen una estructura celular con paredes y membranas celulares delicadas. Tanto en el interior de las células como en el espacio intercelular existe agua. Cuando el agua se congela rápidamente, forma diminutos cristales de hielo; cuando se congela lentamente, forma cristales de hielo de gran tamaño y grupos de cristales. Los cristales de hielo grandes, formados en el interior o entre las células, causan mayor ruptura física y separación de las células que los de pequeño tamaño. Un ejemplo de ello es el cambio que experimenta la textura de las fresas como consecuencia de la congelación. (Potter y Hotchkiss, 1995)

2.4.3.4 Velocidad de congelación

La importancia relativa del efecto de la concentración y del daño físico producido por los grandes cristales de hielo durante la congelación y el almacenamiento en congelación dependerá de cada alimento. Sin embargo, para obtener productos de gran calidad la congelación siempre ha de ser rápida.

Durante la congelación rápida se forman cristales de hielo diminutos. La congelación rápida, además, reduce al mínimo los efectos de la concentración al disminuir el tiempo que los solutos concentrados están en contacto con los tejidos, los coloides y los distintos constituyentes individuales durante la transición desde el estado inicial no congelado al completamente congelado. Por estas razones, los métodos y los equipos modernos de congelación están diseñados para llevar a cabo una congelación muy rápida, pudiéndose justificar el mayor coste por la gran calidad del alimento. Generalmente cuanto más rápida sea la velocidad de congelación, mayor será la calidad



del producto. Sin embargo, desde el punto de vista práctico, una velocidad de congelación equivalente a unos 1,3 cm por hora es satisfactoria para la mayoría de los productos. Esto significa que en un paquete plano de alimento de 5 cm de espesor, que se congela exponiendo sus dos superficies principales al medio frío, su centro estará congelado (a -18°C o menos) en unas 2 h. (Potter y Hotchkiss, 1995)

2.4.3.5 Selección de la temperatura final

Si se consideran todos estos factores – cambios de textura, reacciones químicas enzimáticas, no enzimáticas, cambios microbiológicos y coste – se llega a la conclusión general de que los alimentos deben congelarse a una temperatura interna de -18°C o menos y mantenerse a la misma durante su transporte y almacenamiento. Las consideraciones económicas generalmente excluyen el empleo de temperaturas inferiores a -30°C durante el transporte y el almacenamiento, aunque muchos alimentos se congelen normalmente a temperaturas inferiores a ésta para obtener las ventajas de una congelación rápida.

La elección de -18°C o menos como condición recomendada para la congelación y el almacenamiento se basa en una gran cantidad de datos y representa un compromiso entre la calidad y el coste. Desde el punto de vista microbiológico no sería estrictamente necesario mantener la temperatura de almacenamiento a -18°C , ya que los microorganismos patógenos no crecen por debajo de los $3,3^{\circ}\text{C}$ y los alterantes habituales de los alimentos no lo hacen por debajo de $-9,5^{\circ}\text{C}$. Pero es de esperar que, cualquiera que sea su valor, la temperatura seleccionada y establecida en los medios de transporte y en las instalaciones de almacenamiento experimente alguna variación. El empleo de -18°C proporciona un margen de seguridad razonable respecto a los



microorganismos alterantes y más que razonable frente a los patógenos. De hecho, los alimentos congelados han gozado de una excelente reputación a lo largo de los años en lo que respecta a su incidencia en la salud pública. (Potter y Hotchkiss, 1995)

En cuanto al control de las reacciones enzimáticas, -18°C no es una temperatura excepcionalmente baja puesto que algunas enzimas retienen su actividad incluso a -73°C , si bien la velocidad de su reacción es extremadamente lenta.

2.4.3.6 Deterioro producido por la descongelación intermitente

Los daños que se producen en los alimentos durante la congelación lenta, se producen igualmente durante la descongelación lenta. Los ciclos repetidos de congelación y descongelación son muy perjudiciales para los alimentos almacenados. Para que se produzca este daño no es necesario que las sucesivas descongelaciones sean completas. Sólo en muy contadas ocasiones, y debido a una avería total del equipo de almacenamiento en frío, se produce la descongelación completa durante el almacenamiento. Esta situación es fácilmente reconocible y se puede corregir con rapidez. Sin embargo, todos los sistemas comerciales de distribución o de almacenamiento de alimentos congelados tienen unos ciclos de temperatura mensurables. Tales ciclos son parte de los sistemas de control de la temperatura y no es raro que en una cámara de almacenamiento en congelación la temperatura oscile del máximo a mínimo y vuelva a subir de nuevo en aproximadamente un ciclo de 2 h. Una fluctuación de tan sólo 3°C , por encima o por debajo de los -18°C , en la temperatura de almacenamiento del congelador puede ser perjudicial para muchos alimentos. (Potter y Hotchkiss, 1995)



III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se desarrollo en las instalaciones de la Universidad Nacional “Micaela Bastida de Apurímac” – Abancay. La determinación de la Actividad Antioxidante se llevó a cabo en el laboratorio de Química y el almacenado en condiciones de congelación se desarrollo en el laboratorio de Procesamiento de Productos Agroindustriales, Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1. Muestra

Frutos maduros de tankar (*Berberis boliviana L.*), colectados en la comunidad campesina de Utupalla, distrito de Chuquibambilla, provincia de Grau, región de Apurímac, ubicada a una altitud de 3500 m.s.n.m. La cantidad total que se empleo durante toda la investigación fue de 20 Kg.

3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1. Materiales de laboratorio

- Micropipeta
- Matraz Erlenmeyer de 100, 250, 500 y 1000 ml
- Pipetas de 0.5, 1, 2, 5 y 10 ml
- Vasos de precipitado de 100, 250, 500 y 1000 ml
- Fiolas de 25, 50, 100 y 250 ml

- Probetas de 50, 100 y 250 ml
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Embudo
- Bagueta
- Termómetro
- Gradillas
- Bombilla de succión
- Pizeta
- Mortero y pistón
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Botellitas de vidrio con tapa hermética de capacidad de 120 y 150 ml.

3.3.2. Reactivos

- 2,2' – azino – bis (3 – etilbenzotiazolina – 6 – ácido sulfónico) o ABTS
- Persulfato de potasio
- Metanol al 96% de pureza
- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N
- Indicador fenolftaleína ($C_2O_4H_4$)
- Agua destilada

3.3.3. Equipos

- Refrigeradora, COLDEX AUTOFROST
- Congeladora, FAEDA ARTICA PLUS



- Espectrofotómetro UV-Visible
- Balanza analítica, OHAUS ADVENTURER, 0.0001g de exactitud
- Balanza digital, ACU BALANCE JR, 0.001g de exactitud
- Refractómetro, ATAGO N-50E, rango de medición 0% a 50%
- Potenciómetro (pH metro), 016 MCA HITECH
- Estufa, MEMMERT GERMANY
- Destilador, GFL 2008

3.3.4. Utensilios y otros materiales en general

- Jarra medidora
- Baldes pequeños
- Envases de plástico con tapa hermética de capacidad de 500gr.
- Tijera
- Lapicero de tinta indeleble
- Etiqueta para rotular las muestras
- Pañuelos desechables
- Franela
- Cinta maski y de embalaje

3.3.5. Indumentaria

- Mandil
- Cubre cabellos
- Guantes descartable
- Tapaboca



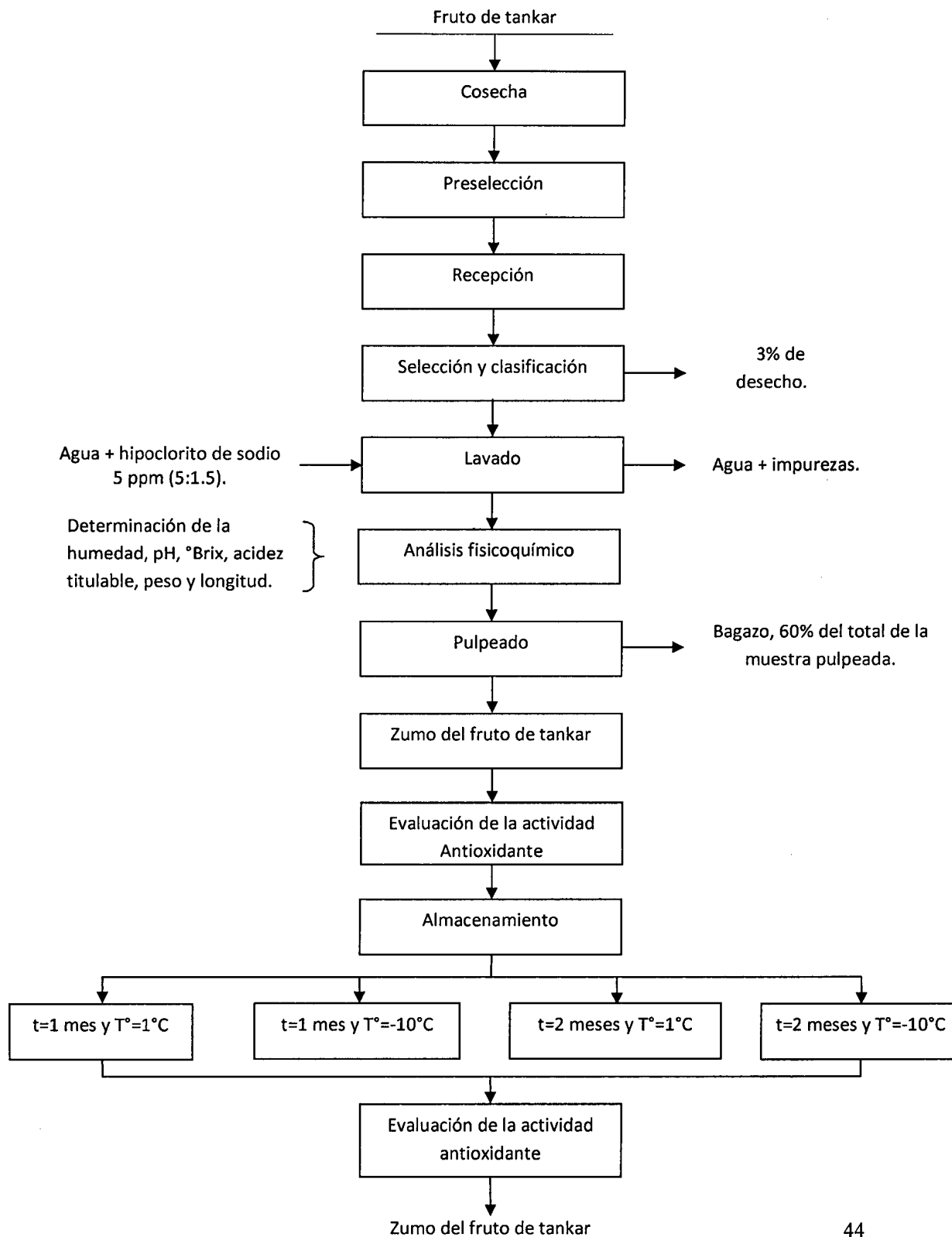
3.4. METODOLOGÍA

En la presente investigación se determinó la Actividad Antioxidante del zumo del fruto maduro de tankar (*Berberis boliviana L.*) en su estado natural y posteriormente estos frutos fueron almacenados en condiciones de refrigeración y congelación durante un mes y dos meses para cada caso. Una vez transcurrido los tiempos determinados se volvió a medir la Actividad Antioxidante del zumo del fruto maduro de tankar (*Berberis boliviana L.*), para ver si los tiempos y temperaturas de almacenamiento tuvieron efecto en la Actividad Antioxidante inicial del fruto.

La investigación se desarrolló teniendo en cuenta la secuencia mostrada en el siguiente diagrama de flujo:



Diagrama 01: Esquema experimental con la que se realizó el Estudio de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*), en diferentes condiciones de almacenado.



3.4.1. Cosecha

La recolección de los frutos se realizó en el mes de Marzo del 2012, en la comunidad campesina de Utupalla, distrito de Chuquibambilla, provincia de Grau, región de Apurímac, ubicada a una altitud de 3500 m.s.n.m. Para la recolección de los frutos se tomo en cuenta el índice de madurez, recogiénose solo aquellos frutos maduros, otro aspecto que se tomo en cuenta para la recolección fue que los frutos no presentaran ningún tipo de daño físico, químico, mecánico ni microbiológico; también se recogió una cantidad de frutos no maduros para realizar la comparación de peso y longitud con los frutos maduros. Los frutos colectados se cosecharon y transportaron hasta el lugar de la ejecución de la investigación en envases de plástico de capacidad de 4 Lt. rígidos y con tapas herméticas, con la finalidad de que los frutos lleguen viables para la investigación. Los envases fueron rotulados indicando la hora y fecha en la que fue recogido los frutos y el lugar donde fue recogido.

3.4.2. Recepción

Una vez llegado al laboratorio de Procesamiento de la E.A.P.I.A. – UNAMBA, el tankar (*Berberis boliviana L.*) cosechado, fue recepcionado en un ambiente adecuado, donde inmediatamente se le realizo un hidrogenfriamiento con la finalidad de bajar la temperatura del producto, ya que una vez que este fue cosechado sufre un estrés por que fue desprendido del arbusto que le brinda su alimento y agua, por lo tanto el fruto tendera a aumentar su temperatura y sufrir algunos cambios fisicoquímicos.



3.4.3. Selección y clasificación

La selección se realizó manualmente y con la finalidad de separar todos aquellos frutos que presentaban daños mecánicos, físicos y microbiológicos y toda materia extraña (hojas, tallos, insectos, etc.); y la clasificación se realizó con la finalidad de poder separar los frutos que no estaban maduros, ya que la investigación es estudiar la Actividad Antioxidante de los frutos maduros, los frutos inmaduros solo se requirieron para hacer una comparación en el diámetro longitudinal y peso.

3.4.4. Lavado

El lavado de los frutos de tankar (*Berberis boliviana L.*) se realizó con la intención de quitar todas las materias extrañas e impurezas adheridas a la superficie del fruto. Para esta operación se utilizó agua potable con una solución de hipoclorito de sodio a 5 ppm con una relación de agua: fruto de 5: 1.5, se hizo manualmente para lo cual se utilizó recipientes de plástico o tinas, el lavado se hizo 3 veces para asegurar la desinfección del fruto ya que esta va a ser almacenado por un periodo de 2 meses. Después de realizar el lavado se hizo un secado a temperatura ambiente hasta eliminar el agua presente en la superficie del fruto a consecuencia del lavado.

3.4.5. Análisis fisicoquímico

A los frutos de tankar (*Berberis boliviana L.*) se le hicieron los siguientes análisis fisicoquímicos: Se determinó el porcentaje de humedad, el pH, sólidos solubles (°Brix), acidez titulable según lo recomendado por la AOAC (1997), y también se determinó la longitud y peso de los frutos maduros e inmaduros. La descripción de los



procedimientos de cada análisis fisicoquímico se menciona en los anexos 01, 02, 03, 04 y 05.

3.4.6. Pulpeado

El pulpeado se realizó con el fin de obtener el zumo del fruto fresco. El equipo que se utilizó para esta operación es la Pulpeadora.

3.4.7. Determinación de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto fresco del tankar (*Berberis boliviana L.*)

La determinación de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) fresco, se realizó con el protocolo mencionado en el anexo N° 06. El análisis se realizó por triplicado.

3.4.8. Almacenamiento del zumo del fruto del tankar (*Berberis boliviana L.*)

El zumo del fruto del tankar (*Berberis boliviana L.*) fue almacenado a una temperatura de 1 °C y -10 °C, durante un tiempo de uno y dos meses, para luego de este tiempo ser valorado la Actividad Antioxidante que presentaba el mencionado zumo.

3.4.9. Determinación de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto del tankar (*Berberis boliviana L.*) almacenado

La determinación de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*), almacenado a una temperatura de 1 °C y -10 °C, durante un tiempo de uno y dos meses, se realizó con el mismo protocolo mencionado en el anexo N° 06. El análisis se realizó por triplicado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Análisis Físicoquímico

Los resultados del análisis físicoquímico realizado al fruto fresco del tankar (*Berberis boliviana L.*), expresado en promedio aritmético de tres repeticiones \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm SD$), se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 03: Resultados del análisis físicoquímico realizado al fruto del tankar (*Berberis boliviana L.*).

Análisis	Resultados
Humedad (%)	56.00 \pm 0.85
pH	3.01 \pm 0.06
Sólidos solubles totales (°Brix)	10.60 \pm 0.40
Acidez titulable (Expresado en ácido cítrico)	2.86 \pm 0.21
Longitud de frutos inmaduros (mm)	7.13 \pm 0.36
Longitud de frutos maduros (mm)	7.05 \pm 0.73
Peso de frutos inmaduros (g)	0.0652 \pm 0.0159
Peso de frutos maduros (g)	0.1025 \pm 0.0170

El agua es parte inherente de la mayoría de las sustancias biológicas y constituye más del 90% del material fresco en algunas materias vegetales (Wrolstad y Acree 2001), en efecto esta afirmación es verdadera y por eso se debe tener cuidado con las frutas y en especial con las hortalizas quienes tienen mayor cantidad de agua en su composición. Según las Tablas Peruanas de Composición de Alimentos, el promedio mínimo de porcentaje de humedad de las frutas está sobre 70%, pero vemos en el resultado que la humedad del tankar (*Berberis boliviana L.*) es 56.00 \pm

0.85, lo cual es mucho menor al promedio mínimo de la bibliografía mencionada, esto debe ser porque este fruto tiene gran parte de su volumen cubierto de semillas y las semillas cuando el fruto llega a su estado de madurez tienen menos porcentaje de humedad.

El pH del jugo de los frutos frescos del tankar (*Berberis boliviana L.*) es de 3.01 ± 0.06 , siendo este valor un pH ácido. Por el pH determinado en los frutos frescos del tankar (*Berberis boliviana L.*), en estos las antocianinas se encuentran en la forma de catión flavilio (forma oxonio) por lo que presenta el color rojo vino intenso. (Brouillard, 1983)

Los sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) de los frutos frescos de la baya en estudio es de 10.60 ± 0.40 , se sabe que las frutas durante el proceso de maduración van aumentando los $^{\circ}$ Brix, debido al Aumento de la sacarosa y azúcares reductores, por la hidrólisis del almidón.

La acidez titulable (expresado en ácido cítrico) de los frutos frescos del tankar (*Berberis boliviana L.*), es de 2.86 ± 0.21 , la acidez va descendiendo debido a que los ácidos orgánicos van desapareciendo y la relación azúcar / acidez, aumenta.

La longitud de los frutos frescos del tankar (*Berberis boliviana L.*) cuando están inmaduros es de 7.13 ± 0.36 mm. y cuando están maduros es 7.05 ± 0.73 mm., en tanto que el peso de los frutos inmaduros es 0.0652 ± 0.0159 g. y de los frutos maduros es 0.1025 ± 0.0170 g. La bioquímica de la maduración de los frutos (bayas) puede explicar las diferencias halladas, así; la diferencias de pesos puede deberse a la mayor cantidad de sustancias de síntesis y al mayor contenido acuoso presentes en los frutos maduros. (Hernandez R. y Bautista D., 2005)

4.2 Determinación de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto fresco

Los resultados de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto fresco del tankar (*Berberis boliviana L.*), expresado en promedio aritmético de tres repeticiones \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm SD$), se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 04: Resultado de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto fresco del tankar (*Berberis boliviana L.*).

Nombre	Actividad Antioxidante ($\mu\text{molTE/g}$)
Tankar (<i>Berberis boliviana L.</i>)	15.573 \pm 0.214

Los resultados del análisis para la determinación de la Actividad Antioxidante (Cuadro 04) dieron valores para el zumo del fruto fresco de 15.573 $\mu\text{molTE/g}$, no habiendo estudios anteriores de la Actividad Antioxidante de este fruto, con las que se pueda contrastar y decir si es o no similar a los estudios previos. Investigadores como Kuskoski *et al.* (2005) han reportado valores de Actividad Antioxidante de 13.2 $\mu\text{molTE/g}$ para el mango, 12.0 $\mu\text{molTE/g}$ para la fresa, 9.2 $\mu\text{molTE/g}$ para la uva y 7.1 $\mu\text{molTE/g}$ para la mora; mientras tanto Troncoso *et al.* (2006) han reportado valores de Actividad Antioxidante de 19.31 $\mu\text{molTE/g}$ para la pulpa de mango, 14.07 $\mu\text{molTE/g}$ para la pulpa de la uva y 6.38 $\mu\text{molTE/g}$ para la pulpa de mora.

Como podemos ver la Actividad Antioxidante del zumo del fruto fresco del tankar (*Berberis boliviana L.*) es igual o mayor a los valores reportados como de la uva, mora, fresa y otros; entonces este resultado obtenido nos da más luces para aprovechar este fruto alto andino en la obtención de productos con propiedades

funcionales como es la Actividad Antioxidante elevada en comparación a los frutos ya mencionados.

4.3 Determinación de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto, en diferentes condiciones de almacenamiento

Los resultados de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto del tankar (*Berberis boliviana L.*), almacenado en diferentes condiciones de tiempo (1 y 2 meses) y temperatura (1°C y 2°C), expresado en promedio aritmético de tres repeticiones \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm SD$), se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 05: Resultados de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto del tankar (*Berberis boliviana L.*), en diferentes condiciones de almacenamiento.

Nº Tratamiento	Repeticiones	Actividad Antioxidante ($\mu\text{molTE/g}$)	Actividad Antioxidante ($\mu\text{molTE/g}$) $\bar{X} \pm \text{SD}$
T ₁	R1	14.186	14.220 \pm 0.039
	R2	14.262	
	R3	14.212	
T ₂	R1	14.968	14.724 \pm 0.214
	R2	14.640	
	R3	14.565	
T ₃	R1	13.808	13.909 \pm 0.101
	R2	14.010	
	R3	13.909	
T ₄	R1	14.565	14.481 \pm 0.077
	R2	14.413	
	R3	14.464	

T₁=1 mes de almacenamiento a 1°C, T₂=1 mes de almacenamiento a -10°C, T₃=2 meses de almacenamiento a 1°C y T₄=2 meses de almacenamiento a -10 °C.

En cuanto a los resultados que se muestra en el cuadro 05, del análisis de la Actividad Antioxidante del zumo del fruto del tankar (*Berberis boliviana L.*), podemos apreciar que respecto a la Actividad Antioxidante inicial del zumo que fue de 15.573 $\mu\text{molTE/g}$, la variación no es significativo tanto en el almacenamiento en refrigeración a 1°C por 1 y 2 meses y en el almacenamiento en congelación a -10°C por 1 y 2 meses. Los tratamientos con mas reducción de la Actividad Antioxidante



durante el tiempo y temperatura de almacenamiento fueron el T₁ (1 mes de almacenamiento a 1°C) con 14.220 μmolTE/g y T₃ (2 mes de almacenamiento a 1°C) con 13.909 μmolTE/g. El tratamiento en el cual la reducción de la Actividad Antioxidante fue menor que los demás es el T₂ (1 mes de almacenamiento a -10°C) con 14.724 μmolTE/g, seguido de T₄ (2 mes de almacenamiento a -10°C) con 14.481 μmolTE/g.

Mejía *et al.* (2006) encontró que la Actividad Antioxidante de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitaca* Mc Vaugh) almacenado en congelación a -20°C, durante los primeros 45 días de almacenamiento este atributo no disminuye de manera significativa, por lo que el potencial antioxidante de este fruto congelado sigue siendo equivalente al de la fruta fresca. Luego de 60 días, la Actividad Antioxidante tiene un descenso significativo: en este momento la actividad representa 72% de la inicial. Dentro del grupo de prooxidantes pueden existir productos de la degradación de los compuestos lipídicos, entre los que se pueden encontrar radicales libres. Este tipo de compuestos puede generarse en el tratamiento de congelación y por causa del almacenamiento prolongado (Jan *et al.*, 2001).

Cuadro 06: Análisis de Varianza para Actividad Antioxidante - Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	0.005292	1	0.005292	0.04	0.8408
B:Temperatura	0.231296	1	0.231296	1.88	0.2073
INTERACCIONES					
AB	0.0103253	1	0.0103253	0.08	0.7793
RESIDUOS	0.982787	8	0.122848		
TOTAL (CORREGIDO)	1.2297	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tabla ANVA descompone la variabilidad de Actividad Antioxidante en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún Valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores ó interacciones tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la Actividad Antioxidante con un 95.0% de nivel de confianza.

Cuadro 07: Pruebas de Múltiple Rangos para Actividad Antioxidante por Tiempo

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	6	14.3125	0.14309	X
1	6	14.3545	0.14309	X

Contraste	Significancia	Diferencia	+/- Límites
1 - 2		0.042	0.466644

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Cuadro 08: Pruebas de Múltiple Rangos para Actividad Antioxidante por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	6	14.1947	0.14309	X
2	6	14.4723	0.14309	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 – 2		-0.277667	0.466644

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

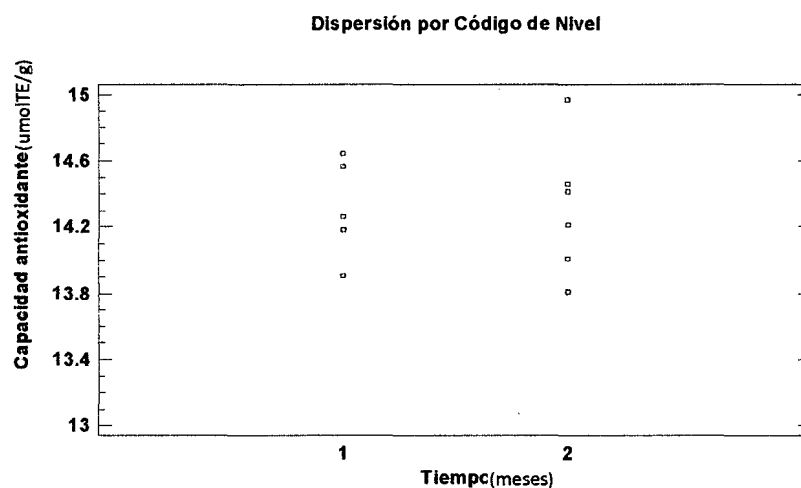


Figura 03: Gráfico de dispersión del tiempo respecto a la Actividad Antioxidante.

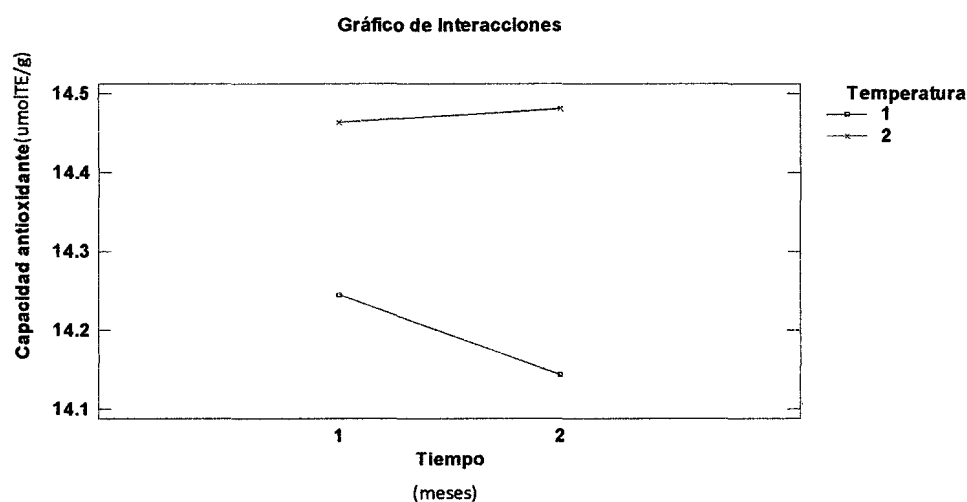


Figura 04: Gráfico de Interacciones.

En la figura 04, se muestra el gráfico de la variación de la CA (umolTE/g) en el tiempo a diferentes temperaturas. Como se puede apreciar durante el tiempo de almacenamiento que fue por un periodo de 1 mes y dos meses, la reducción de la Capacidad Antioxidante durante el tiempo en refrigeración que es a 1 °C, es mayor al almacenamiento en congelación a -10 °C.

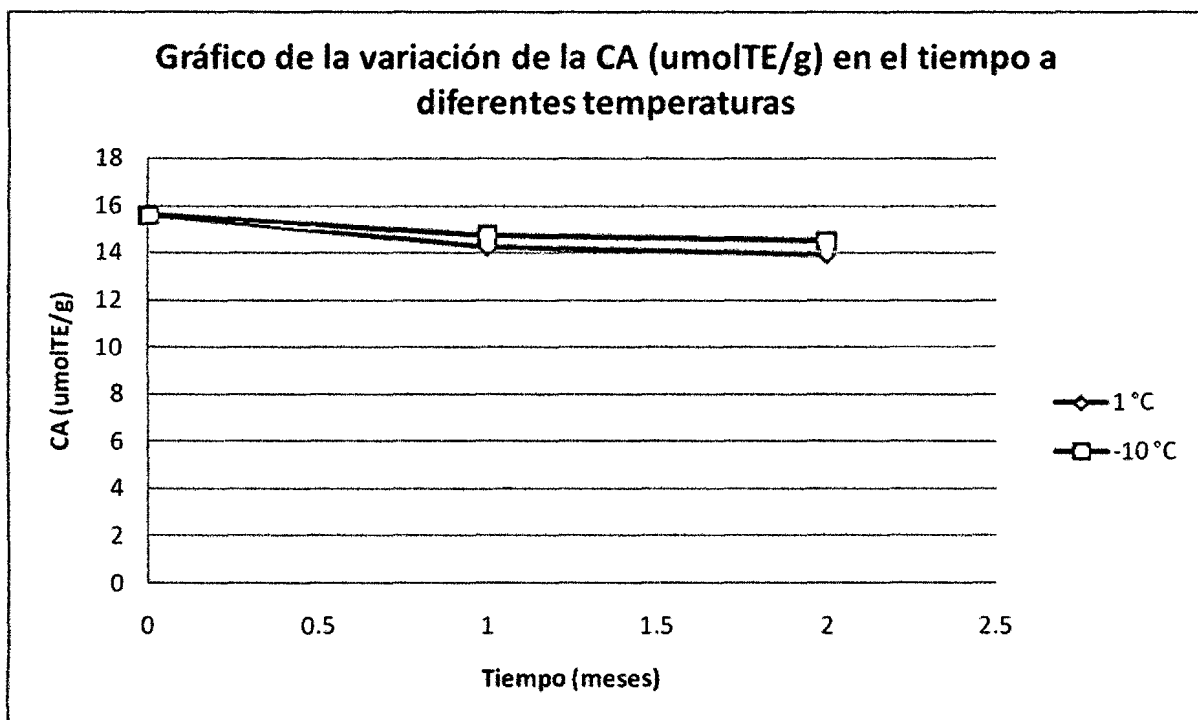


Figura 05: Gráfico de la variación de la CA ($\mu\text{molTE/g}$) en el tiempo a diferentes temperaturas.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La Actividad Antioxidante del zumo del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) fresco, determinado por el Método de ABTS descrito por Arnao (2000), es de $15.573 \pm 0.214 \mu\text{molTE/g}$.

La Actividad Antioxidante del zumo del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*), almacenado a una temperatura de refrigeración ($1\text{ }^{\circ}\text{C}$) y congelación ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$), por un tiempo de uno y dos meses, es como sigue: para T_1 es de $14.220 \pm 0.039 \mu\text{molTE/g}$; para T_2 es de $13.909 \pm 0.101 \mu\text{molTE/g}$; para T_3 es de $14.724 \pm 0.214 \mu\text{molTE/g}$ y para T_4 es de $14.481 \pm 0.077 \mu\text{molTE/g}$.

El tiempo y la temperatura en estudio estadísticamente no tienen un efecto significativo sobre la variación de la Actividad Antioxidante, durante el tiempo de almacenamiento. Entonces es factible almacenar el zumo del fruto del tankar (*Berberis boliviana L.*), por un tiempo de uno y dos meses, a una temperatura de refrigeración de $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y congelación de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, para ambos casos; con la seguridad de que no disminuirá significativamente la Actividad Antioxidante, que es una propiedad funcional que se está tomando mucho en cuenta en la actualidad.

5.2 Recomendaciones

Realizar el estudio de la Actividad Antioxidante de este fruto por otros métodos como el DPPH, para hacer una comparación de los valores que se obtienen por diferentes métodos.

Realizar estudios de cómo varía la Actividad Antioxidante del tankar (*Berberis boliviana L.*), debido a otros factores como la luz, temperaturas altas, etc.

Realizar productos a partir de este fruto y estudiar la Actividad Antioxidante que presenta en el producto final.



VI. BIBLIOGRAFIA UTILIZADA

1. ALCAZAR DEL CASTILLO, JORGE. (2002). Diccionario técnico de industrias alimentarias. Perú.
2. AMES, B., M. SHIGENAGA & T. HAGEN. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Nac. Acad. Sci., 90: 7915-7922.
3. BRAND, W.; CUVELIER, M. and BERSET. J. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm-wiss-u-technol 28, 25-30
4. BRIDLE, P; TIMBERLAKE C.F. (1997). Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. Food chem.
5. BROUILLARD, R. (1983). The in vivo expression of anthocyanin colour in plants, Phytochemistry 22, 1311 – 1323.
6. BURNEO PALACIOS, ZAYDA LORENA. (2009). “Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del sur del ecuador” Loja, Ecuador. Escuela de Ingeniería Química, Universidad Técnica Particular de Loja, 64 p.
7. CHUQUIMIA, FELIPE; ALVARADO J. ANTONIO; PEÑARRIETA, J. MAURICIO; BERGENSTÅHL, BJÖRN; ÅKESSON, BJÖRN. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonóicos de cuatro especies vegetales de la región andina de Bolivia. Bolivia. Instituto de Investigaciones Químicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.



8. COBO, BERNABÉ, Historia del Nuevo Mundo (1653), BOOK V, CHAPTER LXIII, pág. 501, in E. Yacovleff and Herrera F.L, el mundo vegetal de los antiguos peruanos, Revista del Museo Nacional, Tomo IV N° 1, 1er semestre 1935.
9. DE LA TORRE BARONAT, M.C.; TAMAMES, E.L. (1997). El papel de los antioxidantes: 1. En la tecnología de alimentos, 2. En la biodegradación oxidativa del organismo. *Alimentaria*, 06: 19-27.
10. DEL CARPIO JIMÉNEZ, CARLA; SERRANO FLORES, CARLOS Y GIUSTI, MÓNICA. (2005). Estudio del colorante de los frutos de *Berberis Boliviana* L (Cheqche). Cusco. Escuela de Post Grado, Maestría en Ciencias, mención Química, Especialidad Productos Naturales, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, 118 p.
11. DUEÑAS MALPARTIDA, NOEMI. (1992). Botánica Fanerogámica, Investigación realizada en la facultad de biología de la UNSAAC.
12. FENEMA, OWEN R. (1993). "Química de alimentos", Editorial Acribia Zaragoza, España.
13. FRANKEL EN. (1995). Natural and biological antioxidants in foods and biological systems. Their mechanism of action, applications and implications. *Lipid Technology* 7: 77 - 80.
14. FREEMAN. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab. Investing.
15. GENOVA, G., IACOPINI, P., BALDI, M., RANIERI, A., STORCHI, P. Y SEBASTIANI, L. (2011). Efectos de la temperatura y el almacenamiento en la actividad antioxidante del zumo de uvas tintas y blancas. *International Journal of Food Science & Technology*. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02801.x



16. HALLIWEL, B; AESCHBACH, R; LOLIGER, J and ARUOMA, O. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 33(/), 601-617.
17. HERNANDEZ, GIL R. Y BAUTISTA, D. (2005). Crecimiento y cambios bioquímicos durante el proceso de maduración de la mora (*Rubus glaucus* Benth).
URL: <http://www.mora.ou.doc>
18. HONG, W.; GUOHUA, C. AND PRIOR L. (1996). Total Antioxidant Capacity of Fruits. *J Agric. Food Chem.*, 44, 701-705.
19. HUAYHUA PAUCAR, TATIANA ALBIS. (2008). Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en la elaboración de una bebida refrescante a partir del extracto de tusa de maíz morado (*zea mays* L.). Tesis el título profesional de Ingeniero en Industrias Alimentarias en la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga – Perú.
20. JAN, P., N. YANISHLIEVA Y M. GORDON. (2001). Antioxidantes de los alimentos. Primera edición. Editorial Acribia, España. pp. 1, 37-39, 319-324
21. KINSELLA JE, FRANKEL E, GERMAN B AND KANNER J. (1993). Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technology* 85 - 89. April, 1993.
22. KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. (2006). Antioxidant capacity (ORAC_{FL}) of frozen fruits' pulps. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.=J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP, v. 31, n. 1, p. 53-64, abr. 2006.
23. KUSKOSKI MARTA E.; AGUSTÍN G. ASUERO; M. CARMEN GARCÍA – PARILLA; ANA M. TRONCOSO ROSEANE FETT. (2004). Ciencia y Tecnología de Alimentos, Departamento de Análisis Químico y Departamento de



Bioquímica, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

24. KUSKOSKI, E. MARTA; ASUERO, AGUSTIN G.; TRONCOSO, ANA M. Y OTROS. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia Tecnología, Campinas*, 25-(4): 726-732, out.-dea.
25. LOCK SING, O. (1998). *Colorantes Naturales*, Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.
26. MEJÍA, LILIANA J.; NARVÁEZ, CARLOS E. Y RESTREPO, PATRICIA L. (2006). Cambios físicos, químicos y sensoriales durante el almacenamiento congelado de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). *Agronomía Colombiana* 24(1):87-95.
27. MURILLO FRANCO, E. (2006). Universidad de Panamá, Instituto de Nutrición y Alimentación. Laboratorio de Bioquímica de Alimentos y Nutrición.
28. NORMAN N. POTTER Y JOSEPH H. HOTCHKISS. (1995). *Ciencia de los alimentos*. 5ª ed. Edit. Acribia S.A. Zaragoza (España).
29. PACKER, L. (1994). Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complication and cataracts. *Ann. n. y. acad. Sci.* 738: 257 – 264.
30. SWAIN, T. (1986). *Plant flavonoids in biology and medicine*. Progress in clinical and biological research, ed V. Cody, E. Middleton Jr. and J.B Harborne.
31. TRONCOSO G. ANA M., *et al.* (2005). Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*paullinia cupana*). *Revista de la Facultad de Química*



- Farmacéutica. ISSN 0121-4004 Volumen 12 número 2, año 2005. Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia. págs. 45-52.
32. VALENZUELA A, NIETO S. (1995). Los antioxidantes: protectores de la Calidad en la Industria Alimentaria. *Aceites y Grasas*, 310-321.
 33. VAYA J, AVIRAM, M. (2001). Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Curr. Med. Chem.* 1:99-117.
 34. VILLAÑO D, FERNÁNDEZ-PACHÓN MS, TRONCOSO AM, GARCÍA-PARRILLA MC. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time. *Talanta* 2004; 64: 501-509.
 35. WROLSTAD, RONALD E.; ACREE, TERRY E. (2001). *Current protocols in food analytical chemistry*, volume 1; John Wiley and Sons Inc.



ANEXOS



ANEXO N° 01

DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

1.1. Principio

El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles.

No obstante, antes de utilizar este procedimiento deben estimarse las posibilidades de error y tener en cuenta una serie de precauciones:

1.2. Materiales y equipos de laboratorio

- Frutos frescos del tankar
- Placa petri
- Estufa
- Desecador de vidrio
- Pinzas de metal
- Balanza digita

1.3. Procedimiento

Se peso una placa petri y se anoto dicho peso, se taro la balanza, luego se peso 10 gramos de fruto fresco en dicha placa petri, las mismas que fueron introducidas a una estufa a temperatura de 40 a 50°C hasta obtener un peso constante, se tomo todos los



datos. Por las diferencia de pesos se realizo en cálculo del porcentaje de humedad mediante la siguiente formula.

$$\%H = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

Donde:

%H = Porcentaje de humedad en el fruto fresco del Tankar

W_1 = Peso de la muestra fresca (10g)

W_2 = Peso de la muestra seca



ANEXO N° 02

DETERMINACIÓN DEL pH

3.1. Principio

Sorensen en 1909, introdujo el término pH como forma conveniente para expresar la concentración de H^+ , por medio de una función logarítmica.

El término pH puede definirse así:
$$pH = \log \frac{1}{H^+}$$

El pHmetro es un sensor utilizado en el método electroquímico para medir el pH de una disolución. La determinación de pH consiste en medir el potencial que se desarrolla a través de una fina membrana de vidrio que separa dos soluciones con diferente concentración de protones. En consecuencia se conoce muy bien la sensibilidad y la selectividad de las membranas de vidrio delante el pH.

Una celda para la medida de pH consiste en un par de electrodos, uno de calomel (mercurio, cloruro de mercurio) y otro de vidrio, sumergidos en la disolución en la que queremos encontrar el pH.

La precisión en la medida del pH debe ser de 0.05 unidades.

3.2. Materiales y equipos de laboratorio

- Frutos frescos del tankar
- Vaso precipitado 100ml
- Piton
- Papel Watman #01
- Potenciómetro

3.3. Procedimiento

Se utilizó un potenciómetro digital calibrado a 20 °C. Se dejó que el electrodo del potenciómetro se atempere antes de usar de acuerdo a las instrucciones de manufactura, el otro detalle a tomar en cuenta fue el calibrar dicho equipo, para ello se utilizó una solución buffer pH 4.002 a temperatura ambiente, una vez calibrado se enjuagó el electrodo con agua destilada y se realizó la medición del pH del zumo del fruto fresco del tankar, registrando dichos valores.

ANEXO N° 03

DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES (°BRIX)

2.1. Principio

Un grado Brix es 1 gramo de sacarosa disuelto en 100 gramos de solución, así se representa la densidad que tiene, a 20° C. Así pues, se dice que un zumo tiene una concentración de sólidos solubles disueltos de un grado Brix, cuando su índice de refracción es igual al de una solución de sacarosa al 1 % (p/v).

A menudo Brix se conoce como el "azúcar" o contenido de sacarosa de la planta, pero esta es una visión muy simplista e incompleta. Aunque un alto valor Brix ciertamente indica el contenido de azúcar, en realidad se refiere a los sólidos solubles totales en el jugo o la savia de la planta. El total sólidos solubles en frutas y verduras se refiere no sólo a la sacarosa (azúcar), sino también a la fructuosa, vitaminas, minerales, aminoácidos, proteínas, hormonas y otros sólidos. Cuanto mayor sea el valor Brix más valor nutritivo tiene el fruto. Los grados Brix son, por tanto, un índice comercial, aproximado, de esta concentración que se acepta convencionalmente como si todos los sólidos disueltos fueran sacarosa.

2.2. Materiales y equipos de laboratorio

- Frutos frescos del tankar
- Vaso precipitado 100ml
- Pitón
- Papel toalla
- Refractómetro

2.3. Procedimiento

Se utilizó un refractómetro calibrado a 20°C. Se tomó frutos al azar, uno en uno se fue realizando la medida de % de sacarosa con el refractómetro, este proceso consistió en sacar el zumo del fruto, solo una a dos gotas, estas gotas se pusieron en el prisma del refractómetro que consta solo de un lente, para ello el refractómetro tiene que estar en posición horizontal, se cubrió con la tapa y se hizo la observación respectiva para cada fruto tomado al azar, es bueno recalcar que las gotas deben cubrir todo el prisma y así fue, la parte blanca indica que hay presencia de azúcar; mientras que la parte azul indica que no hay la presencia de este. La escala del refractómetro va de 0% a 50% de °Brix.



ANEXO N° 04

DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL

4.1. Principio

La acidez total se considera como la suma de los ácidos valorables cuando se lleva una muestra a pH 7 por adición de una solución alcalina valorada. El dióxido de carbono no se considera comprendido en la acidez total. En la determinación de la acidez en alimentos vegetales mediante volumetrías ácido-base, los resultados que se obtienen corresponden a la suma de los ácidos minerales y orgánicos, aunque de manera general en el caso de las frutas y hortalizas, estos ácidos son el cítrico, málico, oxálico y tartárico. La acidez se valora con NaOH y se expresa en gramos del ácido x/100 ml de zumo, x viene hacer el ácido que predomina en dicho fruto o también se puede expresar en porcentaje.

4.2. Materiales y equipos de laboratorio

- Frutos frescos del tankar
- Vaso precipitado 100ml
- Pitón
- Papel Watman #01
- Potenciómetro

4.3. Procedimiento

Se tomó 1ml de jugo de tankar en un vaso precipitado o matraz de 250ml, se aforo a 100ml con agua destilada, se agrego 2 a 3 gotas de fenolftaleína y se titulo con NaOH

0.1N, se tomó como dato el gasto del hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N. Los resultados se reportaron en porcentaje de ácido cítrico.

$$\text{Acidez titulable} = \frac{V_1 \times N \times me}{V} \times 100$$

Donde:

V_G = Volumen del gasto del NaOH (ml)

V_m = Volumen de la solución de la muestra (ml)

N = Normalidad de la solución del NaOH

me = Mili equivalente del ácido en el cual se expresa la acidez (ácido cítrico)

ANEXO N° 05

DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD Y PESO

Para la determinación de la longitud y peso se tomo un total de 10 unidades de frutos frescos maduros e inmaduros de tankar (*Berberis boliviana L.*). Estos frutos frescos se tomaron al azar e inmediatamente se procedió a medir el diámetro longitudinal del fruto fresco utilizando un vernier. Luego se procedió a pesar los frutos frescos utilizando una balanza de precisión con una sensibilidad de 0,001g.

ANEXO N° 06

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SEGÚN EL MÉTODO DESCRITO POR ARNAO (2000)

Se tomaron partes iguales en volumen del reactivo 2,2' - azino - bis (3 - etilbenzotiazolina - 6 - ácido sulfónico) o ABTS y del reactivo persulfato de potasio; al mezclarse ambas soluciones toman el nombre de solución madre, la cual fue preparada 12 horas antes del análisis, esta solución madre permaneció en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente hasta su dilución con metanol (1:60). La solución diluida se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm, la lectura obtenida osciló entre $1,1 \pm 0,02$. Una vez obtenida la solución de ABTS correctamente preparada se contaron 4 horas para realizar el análisis antes de que el reactivo pierda efectividad.

Luego se tomaron 150 μ l de la muestra y se colocaron en un tubo de ensayo, seguidamente se adicionaron 2850 μ l del reactivo ABTS, seguidamente se agitaron los tubos, las muestras se dejaron reaccionar por un periodo de 1.5 hrs., en un ambiente oscuro y con agitación constante. Al concluir este tiempo se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 734 nm. El análisis requirió de un blanco, el cual se preparó reemplazando los 150 μ l de muestra por metanol y se siguió el mismo procedimiento arriba mencionado.

La Actividad Antioxidante fue calculada a partir de una curva estándar, utilizando como estándar al Trolox (anexo N° 07). Los resultados fueron expresados como μ mol de trolox equivalente (TE)/g de muestra.

La ecuación de la curva estándar para la cuantificación de la capacidad antioxidante en etanol fue la siguiente:

$$Y = 0.7506 \times (\Delta \text{ Abs} - 0.0065)$$

Donde:

Y = Micromol (μmol) de Trolox equivalente (TE)/ml

$\Delta \text{ Abs}$ = Variación de la absorbancia ($\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}$)_{734 \text{ nm}}}

Para expresar los resultados en μmol de Trolox equivalente (TE)/g (b.s) se procederán de la siguiente forma:

$$AA = \frac{Y \times (\text{Volumen extracto} \times Fd \times \% H)}{\text{g. muestra}}$$

Donde:

CA = Micromol (μmol) de Trolox equivalente (TE)/g (b.s)

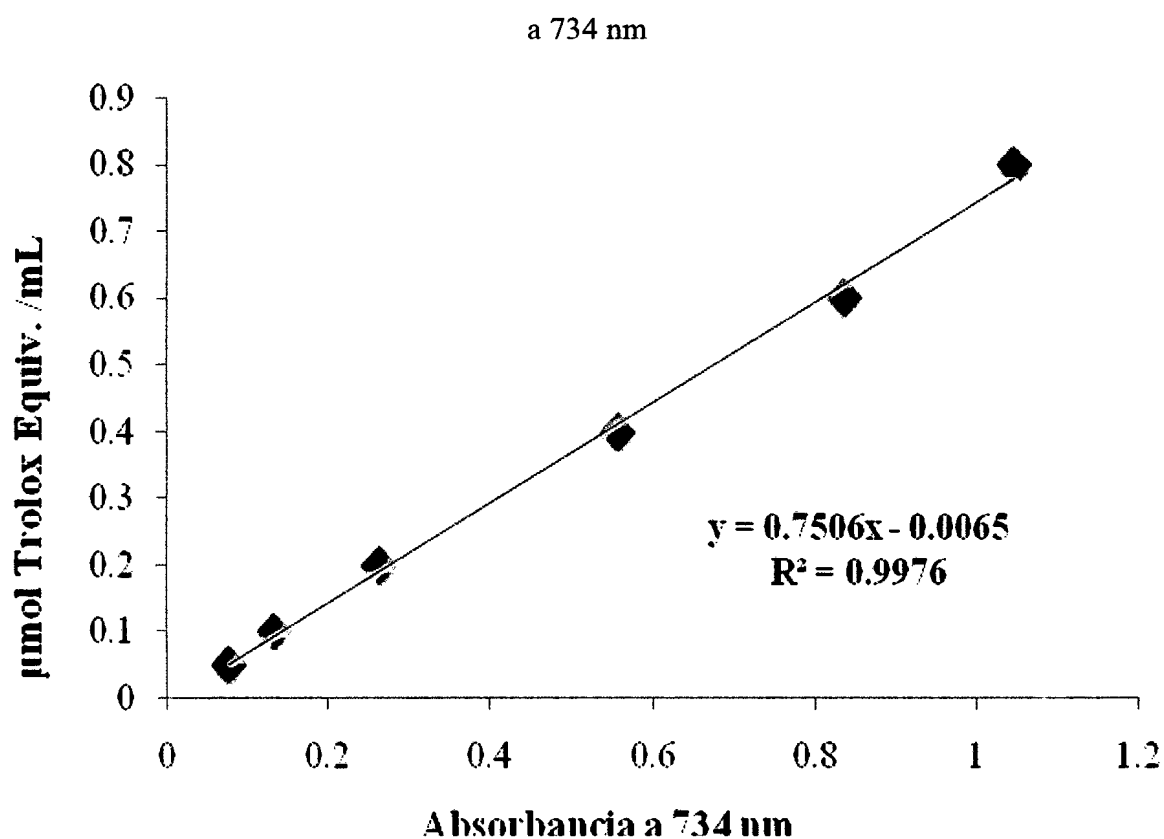
Fd = Factor de dilución

% H = Porcentaje de humedad

ANEXO N° 07

CURVA ESTÁNDAR PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Figura 06: Curva estándar de trolox para el ensayo de ABTS (Actividad Antioxidante)



$$Y = 0.7506 \times \Delta \text{ Abs} - 0.0065$$

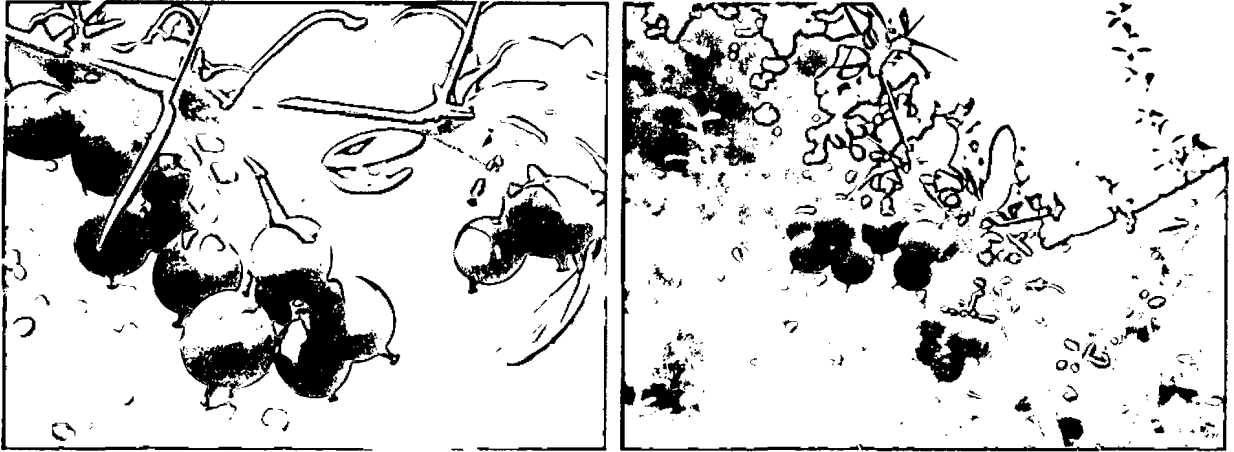
Donde:

Y = Micromol (μmol) de trolox equivalente (TE)/ ml.

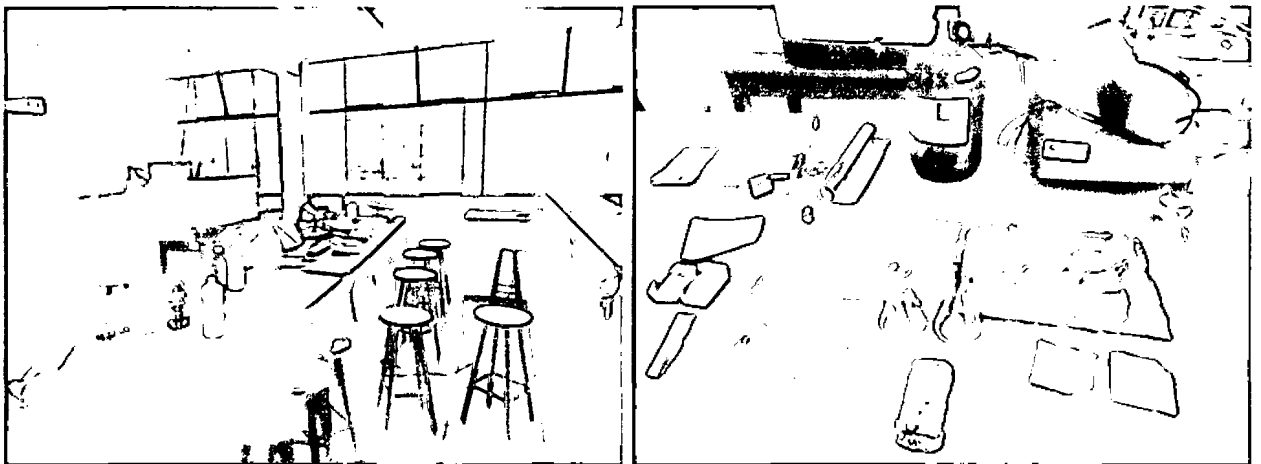
$\Delta \text{ Abs}$ = Variación de la absorbancia.

ANEXO N° 08

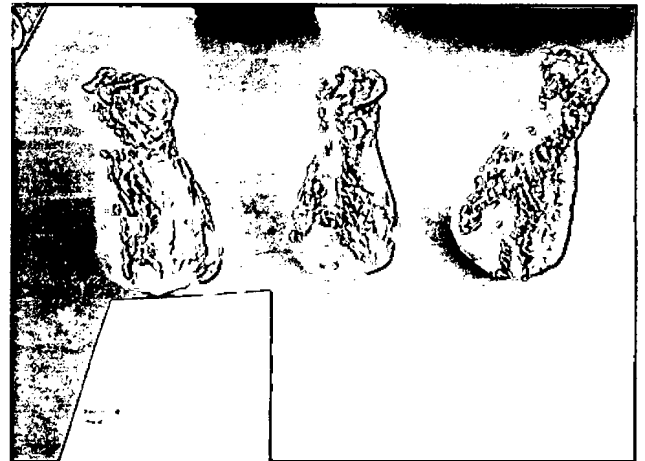
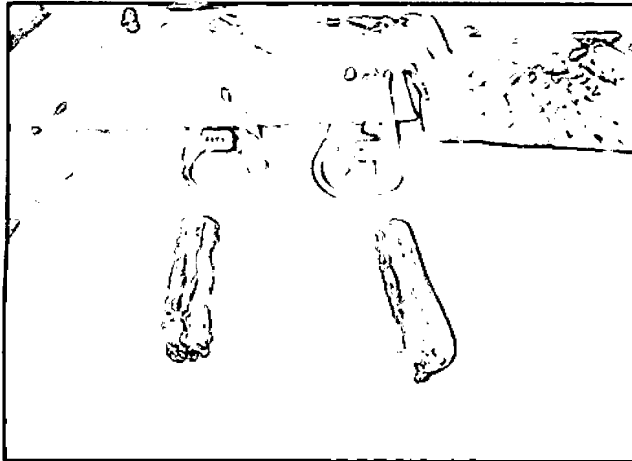
FOTOGRAFÍAS DEL DESARROLLO DE LA TESIS



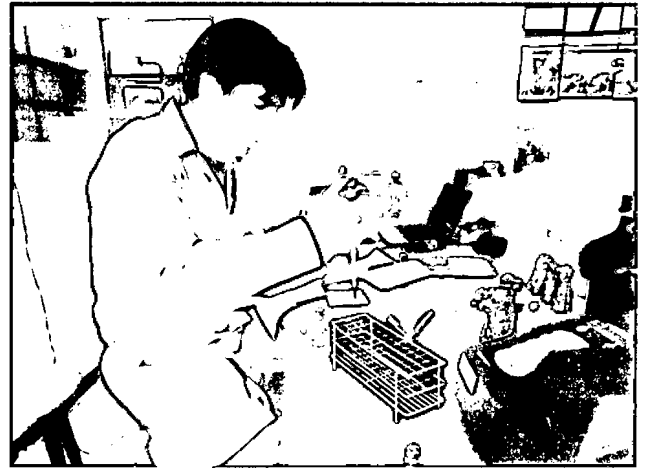
Anexo 8.1: Fotografías del fruto maduro del tankar (*Berberis boliviana* L.)



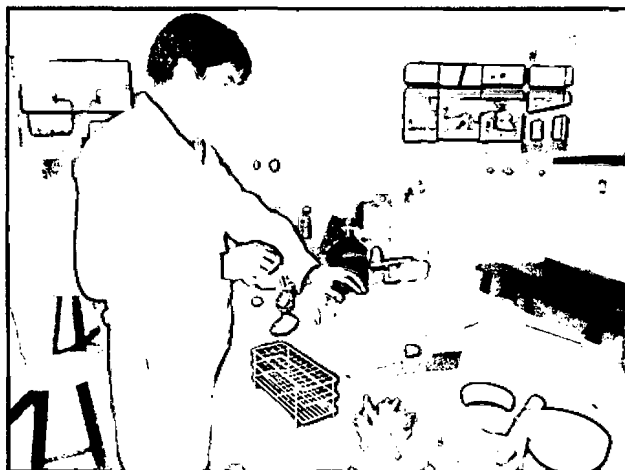
Anexo 8.2: Fotografías de la preparación de los insumos, materiales, instrumentos y equipos.



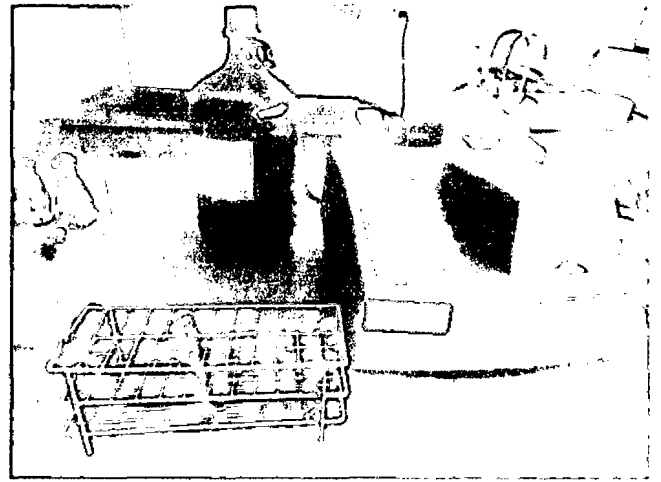
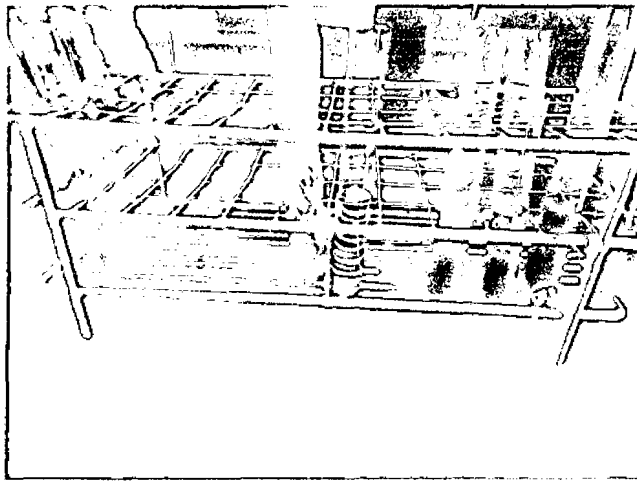
Anexo 8.3: Fotografías de la preparación de la solución madre.



Anexo 8.4: Fotografías de la preparación de la solución de trabajo.



Anexo 8.5: Fotografías de la lectura de la absorbancia.



Anexo 8.6: Fotografías de muestras con absorbancia ya leídas.