



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

ESCUELA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

**“POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ZUMOS DE FRUTAS
NATIVAS DEL ECUADOR”.**

**TRABAJO DE GRADUACION PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
INGENIERIA DE ALIMENTOS**

AUTOR:

María Verónica Abad Alvarez

DIRECTORA

Dra. María Elena Cazar.

**CUENCA, ECUADOR
2008**

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, a mi esposo que durante estos años
confiaron, y me apoyaron todo el tiempo de mi vida estudiantil,
A mi querida hija que me supo entender cuando más me necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios porque siempre está presente,

A mis padres, hermanos por el apoyo,

A las dos personas que amo porque nunca me abandonaron,

A la Dra. María Elena Cazar por brindarme sus conocimientos
desinteresadamente.

A mis familiares, amigos que me ayudaron para poder
culminar este trabajo.

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue establecer el potencial de los zumos de Tomate de árbol (*Solanum betacea*), naranjilla (*Solanum quitoensis*), chirimoya (*Annona chirimoya*), taxo (*Passiflora mollissima* L.) y babaco (*Vasconcella pentagona*), como antioxidantes naturales. Se prepararon extractos orgánicos y acuosos de las especies y se cuantificó su capacidad de atrapamiento del radical libre DPPH, y el contenido de fenólicos por el método de Folin – Ciocalteu.

Los resultados obtenidos identificaron al extracto orgánico de babaco y al extracto acuoso de tomate morado como las especies con mejor actividad antioxidante. El taxo y tomate morado fueron las especies con mayor contenido de fenólicos.

“ANTIOXIDANT POTENTIAL OF NATIVE ECUADORIAN FRUIT JUICES”**ABSTRACT**

The aim of the present work was to establish the potential of juices from “tomate de árbol” (*Cyphomandra betacea*), “naranjilla” (*Solanum quitoensis*), custard apple (*Annona chirimoya*), “taxo” (*Passiflora mollissima* L.) and “babaco” (*Vasconcella pentagona*), as natural antioxidants. Organic and aqueous extracts were prepared from these species and its ability to scavenge the free radical DPPH was quantified. The phenolic content was assayed with the Folin Ciocalteau method.

The organic extract from “babaco” and the aqueous extract from “tomate morado” were identified as the species with the highest antioxidant activity. “Taxo” and “tomate morado” were the fruits with the highest phenolic content.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar, mediante ensayos enzimáticos, el potencial de zumos de frutas nativas como fuentes de antioxidantes.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Evaluar el potencial antioxidante de zumos de: Tomate de árbol (*Solanum betacea*), naranjilla (*Solanum quitoensis*), chirimoya (*Annona chirimoya*), taxo (*Passiflora mollissima* L.) y babaco (*Vasconcella pentagona*).
- Establecer las especies con mayor potencial antioxidante, según los resultados de los ensayos enzimáticos, y correlacionados con su contenido de compuestos fenólicos.

Índice de Contenidos

Contenido	Paginas.
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Objetivos.....	vi
Indicé de contenidos.....	vii
Introducción.	1
 CAPITULO1: ANTIOXIDANTES	
1.1 Radicales libres y actividad antioxidante.....	4
1.2. Rol de los antioxidantes en la salud.....	8
1.3 Mecanismos de actividad antioxidantes.....	9
1.4 Métodos de cuantificación de actividad antioxidantes.....	11
 CAPITULO 2: ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO	
2.1 Tomate de árbol.....	12
2.1.1 Descripción Botánica.....	12
2.1.2 Propiedad.....	13
2.1.3 Valor Nutricional.....	14
2.2. Chirimoya	
2.2.1. Descripción Botánica.....	15
2.2.2 Propiedades.....	16
2.3 Babaco	
2.3.1. Descripción Botánica.....	18
2.3.2 Propiedades.....	19
2.4. Taxo	

2.4.1. Descripción Botánica.....	21
2.4.2. Propiedades.....	22
2.5. Naranja	
2.5.1. Descripción Botánica.....	24
2.5.2. Propiedades.....	25

CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales.....	27
3.2 Métodos.....	28
3.2.1 Recolección de material vegetal.....	28
3.2.2 Preparación de extractos y zumos de frutas.....	28
3.2.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método de decoloración del radical libre DPPH.....	29
3.2.4 Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu.....	32
3.2.4.1 Curva de Calibración como sustancia de referencia (Acido Gálico)	32
3.2.4.2 Evaluación de contenido de fenólicos en extractos orgánicos	32
3.2.4.3 Evaluación de contenido de fenólicos en extractos acuosos	33

CAPITULO 4 : RESULTADOS

4.1 Evaluación de actividad antioxidante por el método de DPPH: Extractos Orgánicos.....	34
4.2 Evaluación de actividad antioxidante por el método del DPPH: Extractos Acuosos.....	36
4.3 Evaluación de la cuantificación de fenoles por el método de Folin Ciocalteu.....	38
4.3.1 Curva de calibración para sustancia de referencia.....	38
4.3.2 Cuantificación de fenoles en extractos orgánicos.....	39

4.3.3 Cuantificación de fenoles en extractos acuosos (48 horas congelados)	40
4.3.4 Cuantificación de fenoles en extractos acuosos (procesamiento inmediato)	41

CAPITULO 5: DISCUSSION

5.1 Potencial antioxidante de frutas según el método de captura del radical libre DPPH	42
5.2 Contenido de compuestos fenólicos en frutas según distintos métodos de extracción	43
5.3 Comparación del potencial antioxidante vs. Contenido fenólico de extractos obtenidos para las frutas en estudio	45
5.3.1 Extractos Acuosos	45
5.3.2 Extractos Orgánicos	46
Conclusiones y recomendaciones	49
Bibliografía	51
Anexos	
Anexo 1	54
Anexo 2	57
Anexo3	58

Abad Alvarez María Verónica

Trabajo de graduación

Dra. M° Elena Cazar.

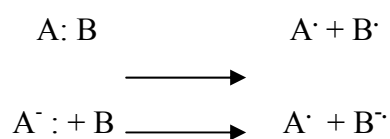
Noviembre 2008

“POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ZUMOS DE FRUTAS NATIVAS DEL ECUADOR”

INTRODUCCION

Los radicales libres de oxígeno causan daño oxidativo y este factor se ha visto implicado en la etiología o patología de más de cien enfermedades diferentes, entre las que se encuentran distintos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas , vasculares, diabetes y desórdenes neurovegetativos.

Un radical libre puede definirse como una molécula o un fragmento molecular con un electrón no apareado. Este electrón no apareado provee ciertas propiedades características al radical libre, las cuales les confieren una elevada reactividad. La presencia de un electrón no apareado en el radical libre es representada convencionalmente con un punto en superíndice: $R^\cdot$. Los radicales libres pueden ser formados por procesos que involucran ruptura de enlaces o reacciones de transferencia electrónica.



(Slater, 1984)

Los radicales inestables atacan componentes celulares causando daño sobre los lípidos, proteínas y ADN, los cuales pueden iniciar una cadena de eventos que dan como resultado lesión celular. Estos procesos reductivos son acelerados por la presencia de metales de transición como el hierro y el cobre y enzimas específicas, como las monoxigenasas y ciertas oxidasas.

Los radicales libres se producen continuamente en el organismo por medio de reacciones bioquímicas de oxidación reducción con oxígeno, que tienen lugar por el metabolismo normal de las células, por los fagocitos, en una reacción inflamatoria controlada y también en ocasiones, como respuesta a la exposición de radiaciones ionizantes, rayos ultravioletas, contaminación ambiental, humo de cigarrillos, hiperoxia y exceso de ejercicio e isquemia (Céspedes y Sánchez, 2000).

En forma natural, hay sustancias que evitan la auto-oxidación, como la lecitina, los tocotrienoles y los tocoferoles (vitamina E). (Badui, 2006). La vitamina E o alfa – tocoferol es una sustancia que, aparentemente, es el más importante antioxidante liposoluble, presente en las membranas de mamíferos. Es absorbido ineficientemente desde el intestino hacia los sistemas linfáticos y es transportado por vías metabólicas mediadas por la enzima lipoproteína lipasa (Burton, 1990). No se conoce bien la función biológica de esta vitamina en el humano, pero si los problemas que ocasiona su carencia. Debido a su estructura química actúa como antioxidante natural a nivel celular y reduce los peróxidos provenientes de la oxidación de los ácidos linolénico y linoléico. Cabe indicar que una teoría establece que el envejecimiento del hombre se debe a la acción de estos peróxidos sobre las proteínas (Baduí, 2006).

El consumo de frutas y vegetales ha sido asociado con una menor incidencia y mortalidad por diferentes enfermedades crónicas. La protección que las frutas y vegetales brindan contra las enfermedades degenerativas como cáncer y enfermedades cardiovasculares y cerebro vasculares, ha sido atribuida a su alto contenido de varias sustancias antioxidantes.

Las frutas y las verduras contienen diferentes compuestos, entre los cuales se encuentran los antioxidantes. Los antioxidantes naturales se encuentran en todos los tejidos vegetales. Estos compuestos incluyen carotenoides, vitaminas, fenoles, flavonoides, entre otros. Estos compuestos funcionan por varios mecanismos: inhibición de oxígeno singlete y triplete; captura de radicales libres, descomposición de peróxido, inhibidores enzimáticos y sinergismo (Wang y Lin, 2000)

En la población ecuatoriana ha existido tradicionalmente un considerable consumo de frutas en la dieta. Esto se debe a la elevada diversidad y disponibilidad de frutas durante todo el año. No obstante, los cambios en los estilos de vida de la población y la introducción de costumbres foráneas han disminuido el consumo de frutas frescas. Toda información referente al potencial de las frutas ecuatorianas como fuentes de compuestos con efectos beneficiosos es un aporte válido para rescatar el consumo de frutas nativas de nuestro país.

Además, existe un gran interés en los posibles usos de plantas y frutas como suplementos alimenticios, especialmente en aquellas que son probada fuente de antioxidantes (Le *et al.*, 2007). Para este fin es necesario conocer el potencial antioxidante de las especies candidatas en fresco, y desarrollar metodologías que permitan conservar estas características en elaborados alimenticios.

El presente estudio se enfocó a la cuantificación de la actividad antioxidante en extractos orgánicos y acuosos de ocho especies de frutas comunes en la Sierra ecuatoriana. Los resultados presentados pretenden establecer las características antioxidantes de las especies estudiadas, estableciendo así una línea de base para trabajos futuros que se orienten a identificación de antioxidantes y posible desarrollo de productos alimenticios nutraceuticos.

CAPITULO I

Introducción

En el presente capítulo se presenta información referente a generalidades de antioxidantes, fuentes naturales, rol de los antioxidantes en la salud, mecanismo de la actividad antioxidante, y métodos de cuantificación de actividad antioxidante.

1. Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de proteger las células contra los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno (ROS). La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermediarios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores tales como tioles o polifenoles. Un desbalance entre antioxidantes y ROS produce estrés oxidativo, y consiguiente daño celular. El estrés oxidativo se vincula con cáncer, envejecimiento, arterioesclerosis, inflamación y procesos neurodegenerativos (enfermedad de Parkinson y Alzheimer) (Buhler y Miranda, 2008).

1.1 Radicales libres y actividad antioxidante.

En la vida de los organismos aerobios, es decir, aquellos que usan el oxígeno como medio para conseguir energía, existe el peligro de que sus defensas antioxidantes se vean sobrepasadas por las fuerzas oxidantes. Esta situación, denominada estrés oxidativo, es la base de una serie de aberraciones fisiológicas en los mamíferos, que incluye carcinogénesis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del sistema

inmune, cataratas, enfermedades cerebrales e incluso, el mismo proceso de envejecimiento. La causa de estas situaciones es el daño oxidativo originado en el DNA, lípidos y proteínas por los denominados oxiradicales. Frente a estas especies oxidantes, los organismos vivos han desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidantes, tanto de naturaleza enzimática como no enzimática, y que se hallan presentes tanto en el propio organismo como en la dieta ingerida. En recientes investigaciones se establece una relación entre la producción de oxiradicales y la aparición de enfermedades degenerativas, así como la posibilidad de usar la dieta como una terapia antioxidante (Montero, 2008)

Estas especies se denominan especies reactivas del oxígeno, oxi-radicales o intermediarios de la reducción del oxígeno. Se originan como consecuencia de la reducción parcial del oxígeno a través de una serie de transferencias mono electrónicas (Montero, 2008).

El oxígeno unicelular apareció en la atmósfera como contaminante en un ambiente reductor, siendo un subproducto de la descomposición del agua en hidrógeno. Entonces, ciertos organismos empezaron a usarlo como medio de obtención de energía, apareciendo así los seres aerobios. Por otro lado, estos crearon mecanismos de defensa antioxidantes, para protegerse de la toxicidad de las especies de oxígeno parcialmente reducidas.

El oxígeno es esencial para la vida de los seres humanos, pero tiene efectos indeseables, mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son varias formas de oxígeno activo, las que incluyen radicales libres como el ión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($OH^\cdot$), o especies no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En los organismos vivos los ROS se generan en diferentes procesos como la respiración aeróbica, en leucocitos polimorfonucleares y macrófagos y peroxisomas (Yildirim *et al.*, 2000, Del Rio *et al.*, 2002).

Las fuentes exógenas de radicales libres incluyen al humo del cigarrillo, radiaciones ionizantes, contaminantes ambientales, solventes orgánicos y pesticidas (Robinson, E, 2008).

En el siguiente cuadro se presentan las más conocidas especies reactivas de oxígeno. La actividad relativa se expresa como la proporción de la actividad entre el radical peroxilo y los lípidos.

Tipo de ROS	Nombre	Fórmula	Actividad relativa
Radicales	Superóxido	$O_2^{\cdot -}$	0
	Radical hidropéroxido	$HOO^{\cdot}$	1
	Radical hidroxilo	$HO^{\cdot}$	10^7
	Radical Alcoxilo	$LO^{\cdot}$	10^4
	Lipoperoxi radical	$LOO^{\cdot}$	1
	Oxido Nítrico	$NO^{\cdot}$	ND
	Dióxido de Nitrógeno	$NO_2^{\cdot}$	ND
No radicales	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	0
	Oxígeno singlete	1O_2	0
	Acido hipocloroso	$HOCl$	0
	Peroxinitrito	$ONOO^{\cdot}$	ND
	Lipohidropéroxido	$LOOH$	ND

Cuadro 1. Especies reactivas de oxígeno, nombre, fórmula y actividad relativa. ND: datos no disponibles (Nakazawa *et al.*, 1996).

Las especies vegetales superiores desarrollan su capacidad de adaptación a los ambientes terrestres mediante la biosíntesis de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos vegetales son metabolitos aromáticos que poseen grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático fenilo. En este grupo se incluyen los flavonoides, constituidos por un esqueleto difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$). La familia de los flavonoides está constituida por flavonas, flavanonas, flavonoles, flavanos, flavanoles, leucoantocianidinas, antocianidinas, auronas, charconas e isoflavonas. La diferencia estructural en cada flavonoide resulta de la variación y el número de grupos hidroxilo y el grado de glicosilación de estos grupos. En el metabolismo vegetal estos compuestos cumplen funciones variadas, entre ellas: defensa ante otras especies, pigmentación de flores y contribución sustancial a ciertos sabores de frutos (Buchanan *et al.*, 2000).

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en plantas comestibles y no comestibles, y se han reportado sus múltiples actividades biológicas, entre las que incluyen el efecto antioxidante. Extractos crudos de frutas, hierbas, y otros materiales vegetales ricos en fenólicos son de crecimiento interés en la industria de alimentos ya que pueden retardar la degradación oxidativa de lípidos, y por consiguiente mejorar la calidad y valor nutricional de los alimentos (Kahnkone et al ., 1999).

Según el Instituto Nacional de Cáncer y la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU., se sugiere que dos frutas y tres verduras por día es una ingesta adecuada para inhibir procesos radicalarias. A continuación se citan algunos ejemplos de alimentos ricos en antioxidantes:

- Alimentos ricos en vitamina E: maní, germen de trigo, aceites vegetales, aceituna, margarinas y espárragos.
- Alimentos ricos en vitamina C, que también contienen β -caroteno: pimientos rojos y verdes, fresas, naranjas, brocoli, kiwi, zumo de tomate, naranja y uva, sandia, papa cocida y coles de Bruselas.
- Alimentos ricos, en β -caroteno, que contienen vitamina C: papa dulce cocida, papaya. Zanahorias, espinaca, tomates, albaricoque, manteca de maní y calabaza en lata.

Las frutas y verduras, además de proporcionar estos antioxidantes, poseen también micronutrientes, que pueden prevenir mutaciones. Así por ejemplo, el ácido fólico es necesario para la síntesis de nucleótidos en el DNA y se ha demostrado que su deficiencia causa ruptura cromosómica y es factor de riesgo en el infarto de miocardio. La niacina se requiere para formar la poli-ADP-ribosa, un componente del DNA (Montero.,2008).

A la hora de establecer los niveles, diarios recomendables de antioxidantes, hay que tener en cuenta dos factores: En primer lugar, si el individuo está sano o presenta algún tipo de patología. Por ejemplo, en el caso de fumadores, estos necesitan mucha mayor cantidad de ácido ascórbico que los no fumadores, ya que su catabolismo de

vitamina C es mayor. Asimismo, las embarazadas también precisan una mayor ingesta por la pérdida de vitamina C que sufren a través de la placenta. En segundo lugar los niveles de antioxidantes son un parámetro más adecuado que la ingesta diaria de antioxidantes, puesto que la metabolización en cada individuo es distinta, siendo los niveles recomendados, de 50 uM para la vitamina C, 30 uM para la vitamina E y 4 uM para el β -caroteno (Montero.,2008)

Las enfermedades comúnmente asociadas con los radicales libres son: cáncer, artritis, envejecimiento prematuro, cataratas, sensibilidad química.



Grafico 1: Balance entre estrés oxidativo y producción antioxidante.
(Montero., 2008).

1.2. Rol de los antioxidantes en la salud.

La gente en todas partes está adoptando una forma de vida saludable. Se están dando cuenta de que el interior de su cuerpo es tan importante como el exterior. La apariencia física es tan solo una parte de la imagen total, y es fundamental el combinar el ejercicio, una dieta nutritiva y equilibrada y rodearse de un entorno saludable. Los suplementos de antioxidantes son parte de esta forma de vida. Últimamente se refiere mucho a la inclusión de los antioxidantes en la dieta, particularmente de la vitamina C, vitamina E y beta caroteno. (Piergiorgio et al.1998)

Las frutas se constituyen en una importante fuente de micronutrientes y compuestos bioactivos. Entre los compuestos activos en frutas y hortalizas potencialmente

responsables de esos efectos se incluyen carotenoides, vitaminas C y E, folatos, compuestos fenólicos, glucosinolatos, fitosteroles y ciertos minerales (Fe, Zn, Ca). Estos componentes están en diversas formas químicas y presentan diferente susceptibilidad frente al almacenamiento y procesado y tienen distinta biodisponibilidad (Olmedilla, B., 2002)

Las frutas, los vegetales y los granos enteros contienen muchos componentes que son beneficiosos para la salud humana. Se ha comprobado que algunos de estos alimentos, como parte de una dieta saludable en general, tienen la capacidad de retrasar la aparición de muchas enfermedades. Estas observaciones han llevado a continuar realizando investigaciones orientadas a identificar componentes bioactivos específicos en los alimentos, como los antioxidantes, que pueden ser responsables de mejorar y mantener la salud.

El consumo de frutas y vegetales ha sido asociado con una menor incidencia y mortalidad por diferentes enfermedades crónicas. La protección que las frutas y vegetales brindan contra las enfermedades degenerativas como cáncer y enfermedades cardiovasculares, ha sido atribuida a su alto contenido de varios antioxidantes (Pineda et al, .2008)

En la actualidad se reconoce que varias enfermedades que aquejan a nuestra población se deben a un desplazamiento en el balance de las condiciones pro-oxidantes y antioxidantes del organismo. Las condiciones pro-oxidantes predominan debido a la creciente generación de especies reactivas de oxígeno o al exceso de estrés oxidativo en las condiciones de vida actuales (Govindarajan *et al.*, 2004).

1.3 Mecanismos de actividad antioxidantes.

Los antioxidantes aportados por la dieta disminuyen los efectos de las ROS. Son variados los alimentos que están constituidos por estas sustancia y cada vez más utilizados por las personas tanto por medio del consumo directo de vegetales y frutas que los incluyen, como también por medio del uso de fármacos. Entre los antioxidantes ingeridos por la dieta se destacan las vitaminas E y C, los betacarotenos, procianidinas y polifenoles.

Polifenoles

El término polifenol incluye a un amplio rango de metabolitos secundarios de plantas que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo. Las sustancias fenólicas son, en general, solubles en agua, ya que se encuentran combinadas con azúcares o glicósidos. Se encuentran localizadas en las vacuolas celulares (Harborne, 1998)

Los compuestos de esta familia presentan variados efectos beneficiosos para la salud: prevención contra cáncer, propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antitumorales, antimicrobianas, vasorelajantes y antioxidantes. Entre sus acciones antioxidantes encontramos la inhibición de la formación de ROS por medio de la inhibición de enzimas productoras de ROS como la xantino oxidasa, o la quelación de los elementos traza involucrados en la producción de ROS; el atrapamiento directo de ROS y la regulación de los sistemas antioxidantes endógenos.

Los polifenoles estabilizan las ROS al capturarlas formando el radical aroxilo (FI-O $\cdot$), para luego reaccionar con un segundo radical, con lo cual adquieren una estructura quinona estable.

Estudios clínicos demuestran que el uso terapéutico de los polifenoles, reducen la incidencia de enfermedades cardiovasculares; disminuye el riesgo de insuficiencia cardíaca (Muñoz *et al.*, 2005)

Antocianinas

Las antocianinas son el grupo más importante y ampliamente distribuido de colorantes en plantas. Se trata de pigmentos intensamente coloreados, solubles en agua, responsables de los colores rojo, escarlata, rosado, violeta y azul que se presentan en pétalos, hojas y frutas de plantas superiores (Harborne, 1998).

Las antocianinas poseen conocidas propiedades farmacológicas utilizadas

para la terapia de un amplio espectro de enfermedades. Las investigaciones realizadas con extractos de *Vitis vinifera* ricos en antocianinas, han mostrado que disminuyen la fragilidad y permeabilidad capilar; también efectos antiinflamatorios y actividad antiedema.

El estudio de la capacidad antioxidante de las antocianinas provenientes de vino tinto, muestran que son efectivos en el secuestro de ROS y también en la inhibición de la lipoperoxidación. La capacidad antioxidante se relaciona con el número de grupos –OH que presenten y el lugar de la sustitución (Muñoz *et al.*, 2005).

1.4 Métodos de cuantificación de actividad antioxidantes.

La cuantificación del efecto antioxidante de sustancias de origen natural se realiza por diferentes métodos, los cuales pueden dividirse en dos grupos:

Captura de radicales libres “in vitro”: En estos métodos, la actividad antioxidante se relaciona con la capacidad de la sustancia en estudio, para estabilizar un radical libre estable. La reacción radicalaria provoca un cambio de color, que puede ser medido espectrofotométricamente, e interpretado como la capacidad de esta sustancia de estabilizar radicales libres. Entre estos métodos podemos citar la capacidad atrapadora del radical DPPH (difenil picril hidrazil), ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina -6 -ácido sulfónico), entre otros (Fogliano *et al.*, 1999)

Aproximación a la actividad antioxidante con biomoléculas: La actividad antioxidante puede medirse como la habilidad de una sustancia para minimizar la oxidación del ácido linoléico y β -caroteno, en un sistema de emulsión acuosa. Existe además, un método que relaciona la capacidad antioxidante de sustancias naturales con un análogo sintético de la vitamina E (Parejo *et al.*, 2003)

CAPITULO II

Introducción.

En el presente capítulo se describieron cada una de las especies estudiadas en el trabajo presentado, enfocando hacia la descripción botánica, propiedades y su valor nutricional.

2. Especies vegetales en estudio.

2.1 Tomate de árbol



2.1.1 Descripción Botánica.

Nombres comunes: Tomate de árbol, tamarillo.

Nombre científico: *Solanum betacea*.

Familia: Solanaceae

(Morales, 2006).

El tomate de árbol es una planta arbustiva de tallo semileñoso que alcanza hasta 5 m de altura.

Raíz. Es profunda y con bastante raíces secundarias, cuando proviene de semilla, pero superficial, si es propagada por medios vegetativos.

Tallo. Inicialmente es suculento, pero a medida que se desarrolla y se ramifica, se empieza a tornar leñoso, sobre todo cuando alcanza entre 1.8 y 2.4 m de altura.

Hojas. Cordiformes, de 17-30 cm de largo y 12-19 cm de ancho, subcarnosas, con ligera pubescencia en el envés. La inflorescencia es caulinar.

Fruto. De color y forma variables, desde amarillo hasta morado oscuro, con formas redondas, ovaladas y acorazonadas, de cáscara lisa y brillante interior del fruto es jugoso anaranjado a rojizo, de sabor agri dulce, con 300-500 semillas pequeñas circulares y planas (Terranova, 2008).

La planta es perennifolia y la emisión de hojas es continua. Sin embargo, las hojas inferiores caen sucesivamente, quedando el tallo principal y la parte inferior de las ramas desprovistos de hojas (Sánchez y Tapia, 2008).

2.1.2. Propiedades.

Se adapta a climas desde templados hasta muy frío. Pero la zona óptima se encuentra entre los 1.700 y 2.400 m.s.n.s. con temperaturas entre 14 y 20 °C.

Requiere un ambiente sombreado o alta nubosidad, con una precipitación entre 1.500 y 2.000 mm, bien distribuida durante el año. Los veranos prolongados disminuyen los rendimientos y la calidad de la fruta.

Se necesitan suelos sueltos bien drenados, profundos y con alto contenido de materia orgánica. El pH debe ser ligeramente ácido (6-6.5). La textura del suelo puede variar de franco a francoarenoso, para garantizar una adecuada retención de humedad y, a la vez, un buen drenaje (Terranova, 2008).

2.1.3 Valor Nutricional

<i>Solanum Betacea</i>	<i>En 100 gr. de fruta</i>	
Componente	Unidad	Pulpa pura
Agua	gr	88.5
Proteínas	gr	1.28
Grasa	gr	0.1
Carbohidratos	gr	9
Fibra	gr	0.85
Cenizas	gr	0.7
Sodio	mg	1.6
Calcio	mg	9
Grasa	mg	23
Hierro	mg	0.8
Acido Ascórbico	mg	25
Calorías	mg	47
Riboflavina	mg	0.03

Cuadro 2. Composición química y valor nutricional de la pulpa de *S. betacea* (Terranova, 2008).

El tomate de árbol contiene niveles altos de fibra, vitaminas A, B, C y K. Es rico en minerales, especialmente calcio, hierro y fósforo; contiene niveles importantes de proteína y caroteno. Es además una buena fuente de pectina, y es bajo en calorías (Terranova, 2008).

El tomate se utiliza más en la elaboración de jugos, pero también se puede emplear en repostería, compotas, jaleas y mermeladas. Las semillas descortezadas contienen 46-48% de una sustancia que da forma a la gelatina que se usa en la industria algodonero, en la fase de acabado de la fibra. En algunos países de África y de Asia se lo da uso medicinal, o se utiliza para preparar refrescos.

La pulpa se usa en el relleno de pastelería y en la industria de chocolate. El polvo purificado de la fruta se usa en la industria alimenticia para elaborar jaleas, compotas y mermeladas, ya que gelatiniza rápidamente en los concentrados de azúcar. La

pulpa ácida que cubre las semillas se aprovecha para preparar bebidas refrescantes; está pulpa es laxante y contiene fermentos (Terranova., 2008).

2.2. Chirimoya

2.2.1. Descripción Botánica.



Nombre: Chirimoya
Nombre Científico: *Annona cherimola* Mill
Familia: Annonaceae

La chirimoya (*Annona cherimola* Mill) tiene su origen en los valles interandinos de Perú y Ecuador, situados entre los 1 500 y 2 000 msnm. (Ferrucci, F., 2007, Morales, 2006).

Es un árbol pequeño, de talo cilíndrico con corteza gruesa grisáceo verdosa; las ramas jóvenes son tomentosas; las hojas simples, enteras, estipuladas, con pecíolo tan largo como el limbo, tomentosas por el envés y con renovación anual; flores hermafroditas, generalmente solitarias, con tres sépalos triangulares y dos series de

pétalos insertos en un receptáculo carnosos; procedente de una sola flor, oviforme o acorazonado, pulpa blanca carnosa y semillas de tono café oscuro.

Las semillas frescas tardan cerca de un mes en germinar, igual si se recogen y secan el mismo día que si se almacenan en bolsas por una o dos semanas. La semilla que se almacena por dos o tres meses necesita cerca de seis meses para germinar. Los árboles de semilla comienzan a producir alrededor de los 4 años, cuando alcanza de 4 a 6 m de altura. La producción se inicia tres años después del trasplante. Se conocen numerosos cultivares de chirimoya, la mayoría seleccionada en regiones templadas. La forma de los carpelos en su exterior constituye un carácter constante que permite reconocer los cultivares, conociéndose cinco formas principales:

Impresa (forma botánica impresa), cuando presenta algunas depresiones suaves que semejan las impresiones de los dedos de la mano.

Lisa (forma leavis) casi sin relieves.

Umbronada (forma umbrinata), llamada chirimoya de púas, si los alvéolos son levantados y hundidos, formando unos puntos abruptos.

Apilonado o tetillado (forma mamillata), llamada chirimoya de tetillas, si los alvéolos son hundidos, formando un punto largo y carnosos.

Tuberculazo (forma tuberculata), fruta en forma de corazón, con tubérculos como verrugas cerca del ápice de cada alvéolo.

2.2.2 Propiedades

Se adapta muy bien a suelos fértiles, pero requiere aireación y drenaje, pues esta especie no tolera encharcamiento.

El rango óptimo de temperatura está entre 21 y 29 °C.

<i>Annona Chirimila Mill</i>	<i>En 100 gr. de fruta</i>	
Componente	Unidad	Pulpa pura
Agua	gr	77.1
Proteínas	gr	19
Carbohidratos	gr	18.2
Fibra	gr	20
Cenizas	gr	7
Grasa	gr	1
Hierro	mg	0.5
Niacina	mg	0.9
Calcio	mg	32
Fósforo	mg	37
Riboflavina	mg	0.14
Tianina	mg	0.1
Acido Ascórbico	mg	5
Calorías	mg	73

Cuadro 3. Composición nutricional de la pulpa de *Annona Chirimila* Mill.
(Terranova, 2008).

El potasio es un mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal, interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula.

La vitamina C interviene en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones. Además cumple una función antioxidante. Su aporte de fibra mejora el tránsito intestinal y beneficia a múltiples alteraciones y enfermedades. Generalmente se consume en fresco, pero puede utilizarse en la preparación de postres, helados y refrescos. Su uso se facilita porque la pulpa se puede procesar y refrigerar (Terranova, 2008).

2.3 Babaco.



2.3.1. Descripción Botánica.

Nombre: Chamburo – Babaco
 Nombre científico: *Vasconcella pentagona* Heilb
 Familia: Vasconcellaceae

(Morales, 2006).

Plantas arbustivas, cultivo semiperenne; de tallo mas de 2 metros de altura. Su sistema radical lo conforman raíces carnosas, verticales de las cuales se desprenden raíces absorbentes muy superficiales. El tronco es recto, cilíndrico, no leñoso, verde cuando joven para tornarse de tono castaño grisáceo en edad adulta.

Tiene hojas insertadas al tronco alternamente, limbo lobulado con cinco a siete lóbulos; nervadura marcada, pecíolo largo. Su verde cambia de tonalidades, según la fase de desarrollo.

Las flores aparecen de manera continua en las axilas de las hijas, femeninas de forma acampanada, solitarias, de pétalos blanco amarillentos verdosos y sépalos verde oscuros.

El fruto es una baya sin semilla, no necesita polinización para desarrollarse; es alargado de sección pentagonal; mediano, de unos 20 cm de largo por 6 cm de diámetro; pesa entre 300 y 1.200 g. En una misma planta pueden encontrarse frutos

de diferentes tamaños .El numero de frutos por planta varia, pues los produce a medida que va creciendo; cada planta puede producir anualmente 25-30 frutos.

La epidermis de fruto es verde cuando esta en crecimiento y a la madurez es amarillo; la pulpa es de color crema, acuosa y con olor especial, sobre todo cuando está madura. Su sabor es similar al de la piña, la fresa y la naranja.

El cultivo comienza a producir a los 10 o 12 meses, luego de la siembra, y se alarga hasta los 18 o 36 meses.

Es originaria de Ecuador y, en forma natural, se encuentra desde hace varios decenios en los valles interandinos, y es un hibrido natural proveniente de las especies *Carica Stipulata* B. y *C. Pubescens*.

Para diversificar cultivos, varios especialistas de Nueva Zelandia viajaron en 1980 a Ecuador, y fundaron la Asociación del Babaco en este país. Este cultivo se introdujo a Italia en 1985, a Francia en 1987, y en España Hay plantaciones comerciales desde 1989.

2.3.2 Propiedades

Se desarrolla bien dentro de la franja altitudinal de los 1.900 a 2.300 m.s.n.m. de la zona tropical, con precipitaciones anuales de 800 a 1.500 mm, donde existan suelos francos, de buena fertilidad y profundos, bien drenados con un ph entre 5.5 y 6.8.

<i>Vasconcella Pentagona Helib</i>	<i>En 100 gr. De fruta</i>	
Componente	Unidad	Pulpa pura
Agua	gr	93
Proteínas	gr	0.9
Carbohidratos	gr	6
Fibra	gr	0.7
Grasa	gr	0.2
Sodio	mg	1.3
Potasio	mg	2.20
Calcio	mg	12
Fosforo	mg	17
Riboflavina	mg	0.03
Azufre	mg	12
Carotenos	mg	0.09
Tianina	mg	0.02
Piridoxina	mg.	0.05
Acido ascórbico	mg.	31
Calorías	mg.	8

Cuadro 4. Composición química de la pulpa de *Vasconcella Pentagona Heilb* (Terranova, 2008).

La fruta suele consumirse fresca, pero también es excelente en jugos, néctares, conservas, y tajadas en almíbar. Por su contenido de papaina se utiliza para la industria farmacológica y como ablandador de carnes (Terranova, 2008)

2.4. Taxo

2.4.1. Descripción Botánica.



Nombre: Taxo, o Curuba.

Nombre Científico: *Passiflora mollissima* L.

Familia: Passifloraceae

El taxo, es originaria de los Andes. Su forma es similar a la del banano, e inclusive en muchos mercados se la identifica como “banano de la pasión”. Su cáscara es suave y comestible, a diferencia de la mayoría de las frutas de la pasión, de color amarillo – naranja cuando madura. Su interior está lleno de semillas redondeadas cubiertas de un mucílago anaranjado de pulpa jugosa, aromática y de sabor dulce – ácido.

La producción de taxo en el país ha sido artesanal, casi doméstica y solamente para cubrir una incipiente demanda del mercado interno. Colombia abrió mercados internacionales para esta fruta denominada curuba, pero no ha tenido una gran demanda, siendo todavía un producto de difícil acceso como fruta fresca, al tener igualmente que ser procesada para su consumo. En los países tropicales del sudeste de Asia y América es ampliamente conocida, por lo que se considera a los mercados étnicos en el resto del mundo como importantes mercados objetivos.

El cultivo se desarrolla en el Callejón Interandino: Tufiño, San Gabriel, Mira, Ibarra, Tabacundo, San José de Minas, Puéllaro, Pifo, Tambillo, Pelileo, Chambo, Penipe, San Andrés, Pallatanga, Sibambe, Gualaceo y Loja.

Los principales canales de distribución para la exportación de taxo fresco son las empresas importadoras / distribuidoras de frutas especiales; la pulpa de taxo se comercializa principalmente a través de importadores / distribuidores de frutas semi elaboradas para la industria de jugos especiales y alimenticia en general.

Las mismas áreas para el cultivo del babaco, tomate de árbol y granadilla son agroecológicamente aptas para este cultivo.

El diámetro mínimo es de 35 mm y la longitud puede llegar hasta 6 cm. El taxo puede pesar entre 50 y 120 g (Ferrucci, F., 2007, Morales, 2006).

2.4.2. Propiedades.

El taxo se cultiva por sus frutos, ricos en vitaminas A y C, que se consumen cuando están ligeramente arrugados. Pueden tomarse al natural, en macedonias de frutas, o como base de cremas, gelatinas, helados, salsas, sorbetes. El zumo se toma al natural, o forma parte de numerosas preparaciones como siropes o cócteles.

Las flores se utilizan en fitoterapia por su contenido en flavonoides y alcaloides: son sedantes (para combatir las alteraciones del sueño), antiespasmódicas y calmantes (tratamiento de ansiedades, angustia y estados nerviosos). En algunos lugares, por ejemplo las Antillas, las hojas se utilizan para el tratamiento de la hipertensión (Ferrucci, F., 2007, Morales, 2006).



Los datos de la composición nutricional se deben interpretar por 100 g de la porción comestible.

<i>Passiflora Mollissima L.</i>	<i>En 100 gr. De fruta</i>	
Componente	Unidad	Pulpa pura
Agua	gr	92
Proteínas	gr	0..60
Carbohidratos	gr	6.30
Fibra	gr	0.3
Grasa	gr	0.1
Calcio	mg	12
Fósforo	mg	17
Hierro	mg	0.40
Acido ascórbico	mg	70
Calorías	mg	25

Cuadro 5. Composición nutricional de *Passiflora mollissima* L (Ferruci, F., 2007, Morales, 2006).

La fruta se consume en fresco y brinda posibilidades de consumo en la forma de jugo, néctar, concentrados y licores. Adicionalmente, se considera que una serie de productos amerita ser evaluados a partir de la fruta producida en los Andes, los cuales incluyen: mezcla con jugos de otras frutas, sorbetes y utilización como ingrediente en la fabricación de crema glase y artículos de pastelería y confitería

La curuba tiene propiedades comprobadas científicamente, los extractos del género *Pasiflora* tienen efectos depresores sobre el sistema nervioso central y actúan como sedantes, tranquilizantes, calmantes y contra el insomnio.

También se utiliza como antiespasmódico, diaforético, hipotensor, diurético, febrífugo. La cocción de las hojas se emplean para el dolor de cabeza y tratar afecciones de hígado y riñones (Ferrucci, F., 2007, Morales, 2006).

2.5. Naranjilla



2.5.1. Descripción Botánica.

Nombre: Naranjilla o Lulo

Nombre Científico: *Solanum quitoense* Lam

Familia: Solanaceae

La planta se propaga fácilmente por semilla, es de rápido crecimiento, fructifica a los 10 ó 12 meses y crece hasta 1.50 a 2.50 metros de altura. Se ramifica desde el suelo y los tallos son muy robustos, semileñosos, cilíndricos y velludos. (Vive de 3 a 4 años en constante producción. La pulpa de color verde a amarillo anaranjado, en algunas variedades verde intenso, se utiliza en la preparación de refrescos, helados, mermeladas, conservas y otros dulces. El jugo tiene sabor agrio y color verde.

La cosecha del fruto se inicia generalmente entre los 6 y 8 meses después del trasplante y alcanza su mayor productividad entre los 2 y 3 años de edad y disminuye en cuanto a cantidad y calidad del fruto a partir de los 4 años aproximadamente.

En la determinación de la madurez, los índices utilizados para la recolección o cosecha de las frutas son una combinación de criterios objetivos y subjetivos; en general se puede afirmar que a partir del leve cambio del color verde a amarillo de la cáscara, se puede iniciar la cosecha

2.5.2. Propiedades.

La naranjilla (*Solanum quitoense*) es una especie de la familia de las solanáceas, nativa del Ecuador y el sur de Colombia. Es una fruta rica en minerales y vitamina C con excelentes cualidades para la preparación, principalmente, de jugos.

En cuanto a la industrialización de este fruto, se pueden obtener los siguientes productos: néctares y jugos, pulpas congeladas, concentrados de 65° Brix, mermeladas y jaleas (Ferrucci, F., 2007, Morales, 2006).

Composición química y valor nutricional La composición de 100 gr. De pulpa pura comparada con 100 gr. De pulpa y semillas juntas, se presenta en el Cuadro 6.

<i>Solanum Quitoense Lam</i>	<i>En 100 gr. De fruta</i>		
<i>Componente</i>	<i>Unidad</i>	<i>Pulpa Pura</i>	<i>Pulpa semilla</i>
Valor energético	cal	28.0	45.0
Proteína	gr	0.7	1.2
Grasa	gr	0.1	0.2
Carbohidratos	gr	6.8	10.9
Fibra	gr	0.4	4.0
Ceniza	gr	0.6	0.7
Vit.A. Actividad	mg	50.0	70.0
Tianina	mg	0.6	0.7
Riboflavina	mg	0.4	0.4
Niacina	mg	1.5	1.5
Acido ascórbico	mg	65.0	48.0
Calcio	mg	8.0	11.0
Fósforo	mg	14.0	41.0
Hierro	mg	0.4	0.6

Cuadro 6. Composición Química y valor nutricional de Naranjilla (*Solanum Quitoense Lam*), (CONCOPE, 2008).

CAPITULO III

Introducción.

En este capítulo se describe los materiales que fueron utilizados para la elaboración de este trabajo, la preparación de extractos y zumos de frutas y la utilización de dos métodos como es el método de decoloración del radical libre del DPPH y el método de Folin- Ciocalteau.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales:

Los materiales que se utilizaron para la elaboración de este trabajo fueron materiales de vidrio (vasos, embudos, probetas, tubos de ensayo, etc), para la mediación de la absorbancia de muestras se utilizó celdas de cuarzo de 1 ml de capacidad.

Los reactivos utilizados para la extracción de los extractos fueron metanol, acetona, acetato de etilo, para la determinación del DPPH se utilizó el reactivo de Difenil Pricil Hidracil, para la determinación de compuestos fenólicos fue el reactivo de Folin-Ciocalteau, como reactivo de comparación el ácido gálico, y el carbonato de calcio para adaptar el medio de la reacción de Folin- Ciocalteau.

Los equipos utilizados fueron: rota vapor para la obtención de extractos orgánicos, centrífuga (5000 rpm) para la obtención de extractos acuosos, balanza analítica, Vórtex, espectrofotómetro monohaz para la obtención de la absorbancia de las muestras y UV visible.

Como material vegetal se utilizó el tomate de árbol (pulpa morada, amarilla), naranjilla (dos ecotipos: común y silvestre), Chirimoya, taxo, babaco, chamburo.

3.2 Métodos

3.2.1 Recolección de material vegetal.

Para evaluar el potencial antioxidante de zumos de frutas se seleccionaron cinco frutas ecuatorianas: *Solanum betacea* (Tomate de árbol), *Solanum quitoensis* (Naranjilla), *Annona chirimoya* (chirimoya), *Pasiflora mollissima* L (taxo) y *Vasconcella pentágona* (babaco). El material vegetal recolectado fue procesado en el Laboratorio de Producción Vegetal de la Facultad de Ciencia y Tecnología.

Cabe recalcar que se realizó el análisis de potencial antioxidante en dos eco tipos de la naranjilla (común A, silvestre B) , tomate de árbol (morado, amarillo) y el chamburo.

Las frutas utilizadas para este estudio fueron adquiridas en los mercados locales, su disponibilidad varía de acuerdo a las épocas del año, en especial en el caso de taxo y chamburo.

3.2.2 Preparación de extractos y zumos de frutas.

- Preparación de extractos orgánicos.

Para la preparación de extractos con las frutas recolectados, se pesaron las frutas en fresco y se sometió a maceración con metanol por 24 horas en la oscuridad. Después de ese tiempo se procedió a filtrar y se evaporó el solvente en un evaporador rotatorio.

La fruta concentrada en estas condiciones fue extraída con una mezcla de acetato de etilo: acetona 1:1, para obtener los compuestos de mediana polaridad. Estos extractos fueron utilizados la para la evaluación de captura del radical libre DPPH y la determinación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteau.

- Preparación de extractos acuosos

Una cantidad previamente pesada de la pulpa del material vegetal en estudio fue macerada con agua, en un proceso similar a la elaboración de un zumo. Este fue el material de estudio en los ensayos biológicos de cuantificación de la actividad

antioxidante. Los extractos acuosos fueron utilizados en las determinaciones planteadas para este estudio.

3.2.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método de decoloración del radical libre DPPH

Los diferentes extractos orgánicos y acuosos fueron medidos por su capacidad de donar iones hidronio (H^+) o habilidad atrapadora de radicales usando al radical estable DPPH.

La metodología usada para los diferentes extractos obtenidos tiene un principio general. Se preparó un gradiente de concentración de soluciones y se mezcló con 250 ml de solución metanólica de DPPH (20mg/L). La mezcla fue colocada en oscuridad por 30 minutos, para permitir el desarrollo de la reacción. Transcurrido este período se registró la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Perkin Elmer ($\square\square517$ nm). Para el efecto se utilizó una celda de cuarzo con metanol (blanco) y otra con la mezcla de reacción. El porcentaje de decoloración fue estimado estableciendo una comparación con el control positivo (solución metanólica de DPPH), y expresando el resultado como porcentaje (Parejo et al. 2003).

El porcentaje de decoloración es expresado según la siguiente expresión:

$$\frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}} * 100$$

El porcentaje de decoloración se relaciona con la concentración de la sustancia evaluada, y se expresan como la capacidad de capturar el 50% de los radicales libres presentes en la reacción. Este parámetro se define como IC_{50} y se calcula estableciendo una relación lineal entre la concentración de la muestra y el porcentaje de decoloración.

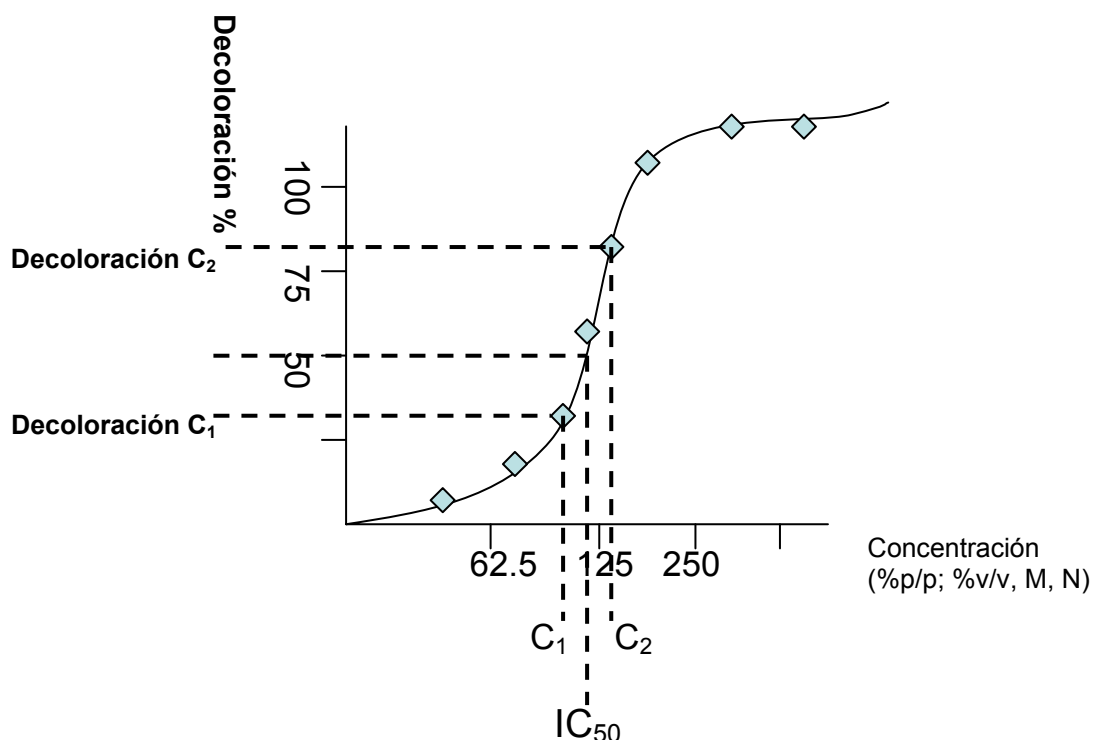


Gráfico 2: Expresión de IC_{50} en ensayos de capacidad antioxidante (Cazar., 2005).

Del presente gráfico podemos observar que se trata de una curva sigmoide en la que existe una relación lineal de una zona comprendida entre un rango de concentraciones C_1 y C_2 y sus porcentajes de decoloración (ver gráfico 2). Al seleccionar este rango es posible calcular el efecto de las sustancias evaluadas, en la captura del 50% de los radicales libres presentes en la reacción en base a su relación lineal.

Para expresar la capacidad antioxidante como IC_{50} , se identifican las concentraciones de sustancia que producen una captura superior e inferior al 50% de los radicales libres, y se interpola a la concentración que es responsable del 50% de la captura de DPPH.

Para el efecto se utilizan las siguientes expresiones matemáticas:

$$a = \frac{\text{Decoloración (Conc 2)} - \text{Decoloración (Conc 1)}}{\text{Conc 2} - \text{Conc 1}}$$

$$b = \text{Decoloración (conc 1)} - a * \text{conc 1}$$

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Concentración 1: La más alta concentración que da menos del 50 % de actividad que el control.

Concentración 2: La más baja concentración que da más del 50 % de la actividad que el control.

A continuación se describen las variantes de esta técnica empleadas para extractos orgánicos y acuosos:

Extractos Orgánicos

Se preparó un gradiente de concentración con: 250 µl, 125 µl, 75 µl y 25 µl de los extractos en evaluación. Las soluciones fueron aforadas a 500 µl mediante la adición de etanol. Después de la adición del radical libre estable DPPH en solución (250 µl) se procedió a incubar las muestras por 30 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo la absorbancia de las soluciones fue determinada en el espectrofotómetro ($\lambda = 517 \text{ nm}$). Las muestras fueron evaluadas por triplicado.

Extractos Acuosaos.

La pulpa de las frutas en estudio fueron centrifugadas (5000 rpm, por 20 minutos). El líquido sobrenadante fue colocado en tubos de eppendorf, siguiendo el esquema de dilución utilizado para extractos orgánicos. La determinación del DPPH fue realizada con los parámetros descritos en el literal anterior.

3.2.4 Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu.

La cantidad de compuestos fenólicos totales se determinó de acuerdo al procedimiento de Folin-Ciocalteu.

La descripción general del método es como sigue. Las muestras se colocaron en tubos de ensayo y se añadieron: 1 ml de carbonato de sodio saturado, 500 μ l del extracto orgánico que se va analizar, 8 ml de agua destilada, 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu dejar reposar por 30 minutos en la oscuridad.

La absorbancia de las soluciones se registró a 765 nm. El contenido de fenólicos totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (GAE) en miligramos por gramo de material seco (Amarowickz *et al.*, 2004)

Para los extractos estudiados, la metodología se adaptó a las condiciones de trabajo, y se reporta a continuación:

3.2.4.1 Curva de calibración como sustancia de referencia (Acido Gálico): Se preparó una solución madre de Acido gálico (10 000 μ g/mL). De esta solución se preparó un gradiente de 150, 125, 75 y 50 μ g/mL. Se realizó la cuantificación de fenoles totales en estas soluciones, de acuerdo a la metodología descrita en 3.2.4. La determinación se realizó por triplicado, obteniéndose media y desviación estándar de las cuantificaciones obtenidas.

3.2.4.2 Evaluación del contenido de fenólicos en extractos orgánicos: Los extractos orgánicos fueron adicionados a la mezcla de reacción sin diluciones previas, siguiendo la técnica descrita en 3.2.4. Las determinaciones fueron realizadas en triplicado.

3.2.4.3 Evaluación del contenido de fenólicos en extractos acuosos: Para evaluar posibles diferencias en el contenido de compuestos fenólicos en extractos acuosos frescos y los sometidos a refrigeración, se realizaron determinaciones del contenido de fenólicos para extractos acuosos en fresco y congelados. Ambos extractos fueron centrifugados previamente, y el sobrenadante fue adicionado a la mezcla de reacción, según se describe en 3.2.4.

CAPITULO 4

Introducción.

En este capítulo se describe los resultados obtenidos de los ensayos practicados en este trabajo, la evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH: Extractos orgánicos y extractos acuosos, Evaluación de la cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu; extractos orgánicos y acuosos (procesamiento inmediato, y congelación), curva de calibración para la sustancia de referencia.

4. Resultados

4.1 Evaluación de actividad antioxidante por el método de DPPH: extractos orgánicos

Los extractos orgánicos obtenidos para las frutas en estudio, según se describe en la sección Materiales y Métodos (ver 3.2.2); fueron evaluados en su capacidad de atrapar el radical libre DPPH. Por la naturaleza polar de estos extractos, no fue posible concentrarlos a sequedad en las condiciones de trabajo experimental. Por este motivo se ensayaron separaciones con solventes de mediana polaridad (Eje: Acetato de Etilo). Los extractos que se presentan a continuación no se separaron en dos fases con este tratamiento, y los resultados de su actividad antioxidante se presentan a continuación.

Extractos	Concentración [μL/mL]	Absorbancia media	% decoloración	IC₅₀
Naranjilla B (silvestre)	250	1,005	265,81	ND
	125	1,005	265,81	
	75	0,344	90,92	
	25	0,29	76,65	
Tomate	250	0,07	18,5	159.07
	125	0,258	68,37	
	75	0,36	95,33	
	25	0,467	143,27	
Tomate Morado	250	0	0	ND
	125	2,06	544,58	
	75	0,712	188,28	
	25	0,657	173,79	
Chamburo	250	1,002	265,02	ND
	125	1,002	265,02	
	75	0,588	155,5	
	25	0,396	104,75	
Babaco	250	0,049	12,95	94.02
	125	0,041	10,92	
	75	0,28	74	
	25	0,288	76,21	
Taxo	250	0,394	104,31	ND
	125	0,629	166,43	
	75	0,301	79,64	
	25	0,313	82,9	
Blanco		0,378		

Cuadro 6. Actividad antioxidante por el método del DPPH, Extracto Orgánico. (ND: no detectado; IC₅₀: concentración que atrapa el 50% de DPPH)

Del cuadro 6 se puede observar que, en los extractos orgánicos activos, el IC₅₀ varía en un rango de 159 a 94 μL/mL. La especie que presenta mejor actividad antioxidante en estas condiciones es el babaco, con una IC₅₀ de 94.02 μL/mL.

Extractos	Concentración [μL/mL]	Absorbancia Media	% decoloración	IC₅₀
Naranja A (común)	250	0,0806	21,32	ND
	125	0,062	16,56	
	75	0,061	16,29	
	25	0,061	16,29	
Naranja A (silvestre)	250	1,8	477,7	ND
	125	1,8	477,7	
	75	0,471	124,58	
	25	0,471	124,58	
Chirimoya Fase superior	250	0,401	106,07	ND
	125	0,381	100,79	
	75	0,332	87,84	
	25	0,305	80,7	
Chirimoya Fase inferior	250	0,344	90,92	66.22
	125	0,333	88,04	
	75	0,21	55,68	
	25	0,177	46,62	

Cuadro 7. Actividad antioxidante por el método del DPPH, para los extractos que presentaron dos fases en proceso de separación con solventes.

(ND: no detectado; IC₅₀: concentración inhibitoria del 50% de DPPH)

La concentración Inhibitoria del 50% del DPPH (IC₅₀), no se detecto en ambas fases de Naranja A. En la chirimoya la fase inferior, que corresponde a la fase acuosa de la de la extracción con Acetato de Etilo, presenta una IC₅₀ de 66.22 μL/mL.

4.2 Evaluación de actividad antioxidante por el método de DPPH: extractos acuosos

Los extractos acuosos obtenidos de las frutas para este estudio, según se describe de la sección de Materiales y métodos (ver 3.2.2); fueron evaluados en la capacidad atrapadora del radical libre DPPH. Los datos que presentamos a continuación son los resultados obtenidos durante este ensayo (promedio de tres repeticiones)

Extractos	Concentración [μL/mL]	Absorbancia Media	% decoloración	IC₅₀
Naranjilla A (común)	250	0,11	29,95	88,833
	125	0,08	21,321	
	75	0,23	60,969	
	25	0,24	62,378	
Naranjilla B (silvestre)	250	0,04	11,453	94,705
	125	0,03	9,162	
	75	0,29	76,563	
	25	0,29	77,709	
Tomate	250	0,19	51,189	ND
	125	0,23	61,409	
	75	0,21	54,185	
	25	0,21	54,273	
Tomate Morado	250	0,49	129,95	87,129
	125	0,3	79,295	
	75	0,15	40,616	
	25	0,17	47,048	
Chamburo	250	0,084	22,378	ND
	125	0,078	20,616	
	75	0,06	43,436	
	25	0,059	47,048	
Chirimoya	250	0,058	82,46	ND
	125	0,051	89,25	
	75	0,024	25,814	
	25	0,026	23,964	
Babaco	250	0,034	16,563	92,09
	125	0,031	14,625	
	75	0,068	68,37	
	25	0,068	71,453	
Taxo	250	0,007	16,828	ND
	125	0,002	17,18	
	75	0,001	0,792	
	25	0,0042	0,8105	
Blanco		0,378		

Cuadro 8. Actividad antioxidante por el método del DPPH, Extracto Acuoso.(ND: no detectado; IC₅₀: concentración inhibitoria del 50% de DPPH)

Del cuadro 8 se puede observar que, en los extractos acuosos activos, el IC_{50} varía en un rango de 94,705 a 87,129 $\mu\text{L/mL}$. La especie que presenta mejor actividad antioxidante en estas condiciones es el tomate morado, con una IC_{50} de 87,129 $\mu\text{L/mL}$.

4.3 Evaluación de la cuantificación de fenoles por el método de Folin Ciocalteu

4.3.1 Curva de calibración para sustancia de referencia

Concentración [$\mu\text{g/mL}$]	Absorbancia			Media	Desviación estándar
	1	2	3		
150	0,996	0,779	0,999	0,925	0,126
125	0,8505	0,899	0,802	0,851	0,049
75	0,484	0,416	0,473	0,458	0,037
50	0,379	0,309	0,344	0,344	0,035

Cuadro 9. Sustancia de referencia de la curva de calibración.

Los datos que se presentan en el cuadro 10 fueron sometidos al análisis de regresión por mínimos cuadrados, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = 0.0062 * \text{Concentración} + 0.0225$$

Para expresar el contenido de fenólicos como Unidades de Ácido Gálico (UAG), la lectura de absorbancia obtenida en los extractos de las frutas en estudio fue relacionada con la ecuación anterior, por la siguiente expresión:

$$UAG = \frac{\text{Absorbancia} - 0.0225}{0.0062}$$

Los resultados obtenidos mediante la evaluación de la cuantificación de fenoles por el método de Folin Ciocalteu son los siguientes;

4.3.2 Cuantificación de fenoles en extractos orgánicos.

Extractos	Absorbancia Media	Desviación	UAG
Naranjilla B (silvestre)	0,79	0,1650	123,34
Tomate	0,74	0,0790	115,19
T.Morado	1,985	0,1960	315,73
Chamburo	0,036	0,00321	2,218
Babaco	0,5713	0,02030	88,277
Taxo	2,0003	0,464	318,14
Blanco	0,378	0,0055	

Cuadro 10. Cuantificación de fenoles, Extractos orgánicos.

(UAG; unidades de ácido gálico, %INH; porcentaje de inhibición)

Del cuadro 10 se puede observar que, en los extractos orgánicos activos, la UAG varía en un rango de 318 a 2.2 $\mu\text{L/mL}$. La especie que presenta mayor concentración de ácido gálico en estas condiciones es el taxo con 318.14 UAG.

Extractos	Absorbancia Media	Desviación	UAG
Naranjilla A (común) Fase superior(orgánica)	0,72	0,0987	112,83
Naranjilla A (silvestre) Fase inferior (acuosa)	1.62	0,1480	256,32
Chirimoya Fase superior	0,48	0,0252	73,96
Chirimoya Fase inferior	0	0	0

Cuadro 11. Cuantificación de fenoles. Parte orgánica. (UAG; unidades de ácido gálico, %INH; porcentaje de inhibición).

Los contenidos fenólicos, cuantificados como UAG para los extractos que se fraccionaron con solventes se presentan en el Cuadro 12. Los rangos de concentración de fenoles oscilan entre 0 – 256 UAG. La fase inferior de la Naranja A, que corresponde a su fracción acuosa, tiene la concentración más elevada. La chirimoya concentra todo su contenido fenólico en la fase orgánica, según los resultados obtenidos mediante este tipo de extracción con 73.96 UAG.

4.3.3 Cuantificación de fenoles en extracto acuosos (48 Horas de congelación)

<i>Extracto</i>	<i>Absorbancia Media</i>	<i>Desviación</i>	<i>UAG</i>
Naranja A(común)	0,49	0,0275	74,5509
Naranja B(silvestre)	0,38	0,0311	56,8
Tomate	0,64	0,1079	99,75
T.Morado	1,55	0,0243	245,7
Chamburo	1,100	0,08159	173,26
Chirimoya	1,018	0,13432	160,12
Babaco	0,0767	0,30070	8,7064
Taxo	0	0	ND
Blanco	0,378	0,0055	

Cuadro 12. Cuantificación de fenoles, Extracto acuoso (48 horas de congelación) (UAG; unidades de ácido gálico, %INH; porcentaje de inhibición)

Del cuadro 12, que presenta los resultados obtenidos en la cuantificación de fenoles en extractos acuosos (congelados), esta concentración puede variar desde 56.8 a 245.70. El extracto que presenta mayor contenido fenólico fue el de Tomate Morado con 245.7 UAG.

4.3.4 Cuantificación de fenoles en extracto acuoso fresco (procesamiento inmediato)

<i>Extractos</i>	<i>Absorvancia Media</i>	<i>Desviación</i>	<i>UAG</i>
Naranjilla A (común)	0,40	0,0488	61,146
Naranjilla B (silvestre)	0,54	0,9820	83,398
Tomate	0,70	0,0282	108,86
T.Morado	1,99	0,1209	316,963
Chamburo	1,100	0,08150	173,264
Chirimoya	0	0,00000	ND
Babaco	1,0800	0,00361	13,746
Taxo	0	0	ND
Blanco	0,378	0,0055	

Cuadro 13. Cuantificación de fenoles, Extracto acuoso fresco (procesamiento inmediato)
(UAG; unidades de ácido gálico, %INH; porcentaje de inhibición).

Los extractos acuosos frescos (procesamiento inmediato) presentan contenidos fenólicos que oscilan desde 316 a 13 UAG. El extracto que presenta mayor cantidad de compuestos fenólicos fue el Tomate Morado con 316.963 UAG.

CAPITULO 5

5. Discusión

5.1 Potencial antioxidante de frutas según el método de captura del radical libre DPPH

Para comparar la posible relación entre la actividad antioxidante y los métodos de extracción empleados para las frutas en estudio, se realizó el siguiente cuadro de los resultados obtenidos y de forma se realizaron los gráficos de barras.

FRUTAS ESTUDIADAS	Extracto Orgánico 1	Extracto Orgánico 2	Extracto Acuoso
	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
Naranja A (Común)	0	0	88,833
Naranja B (silvestre)	0	0	94,705
Tomate	159,07	0	0
T.Morado	0	0	87,129
Chamburo	0	0	0
Chirimoya	0	0	0
Babaco	94,02	0	92,09
Taxo	0	0	0

Cuadro 14. Comparación de los extractos de las frutas en estudio vs. El método de DPPH.

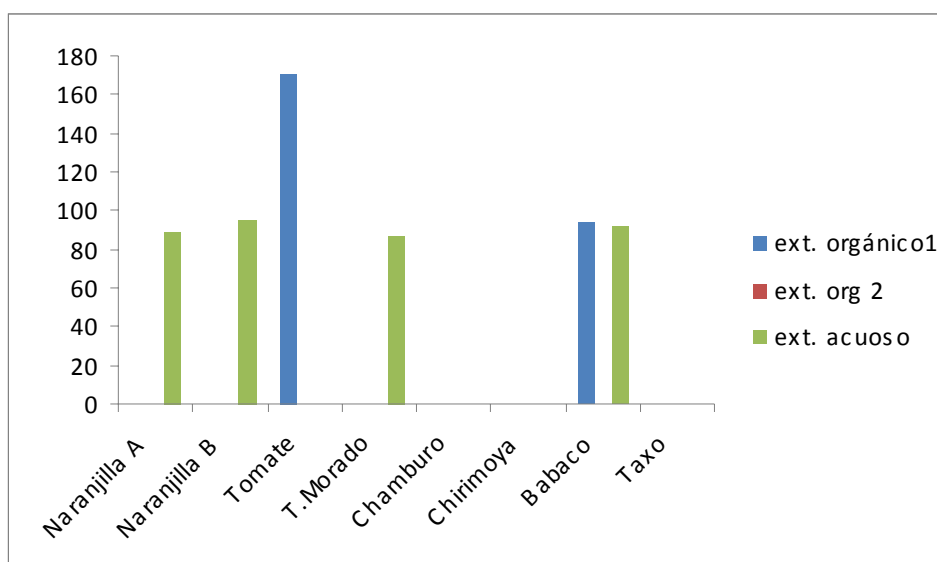


Grafico 3. Comparación de los extractos de las frutas en estudio vs. El método de DPPH.

De acuerdo al gráfico 3. Se puede demostrar que existe una actividad antioxidante tanto en los extractos orgánicos como en los extractos acuosos de las especies en estudio. Se puede observar que el extracto que presenta mejor actividad antioxidante corresponde al extracto acuoso del Tomate Morado ($IC_{50} = 87.12$), seguido del extracto orgánico del babaco ($IC_{50} = 94.02$).

5.2 Contenido de compuestos fenólicos en frutas según distintos métodos de extracción

Para comparar la posible relación entre el contenido de compuestos fenólicos para las frutas en estudio, y en dependencia de los métodos de extracción empleados, se realizaron gráficos de barras con los resultados presentados en el siguiente cuadro.

Frutas Estudiadas	Extracto Orgánico 1	Extracto Orgánico 2	Extracto Acuoso (congelado)	Extracto Acuoso
	UAG	UAG	UAG	UAG
Naranja A (común)	112.83	256.32	745.509	61.146
Naranja B (silvestre)	123.34	0	56.8	83.398
Tomate	115.19	0	99.75	108.86
T.Morado	315.75	0	245.7	316.963
Chamburo	2.218	0	173.26	173.264
Chirimoya	0	0	160.12	0
Babaco	88.277	0	87.064	13.746
Taxo	318.14	0	0	0

Cuadro 15. Comparación de los diferentes extractos de frutas vs. El contenido de compuestos fenólicos.

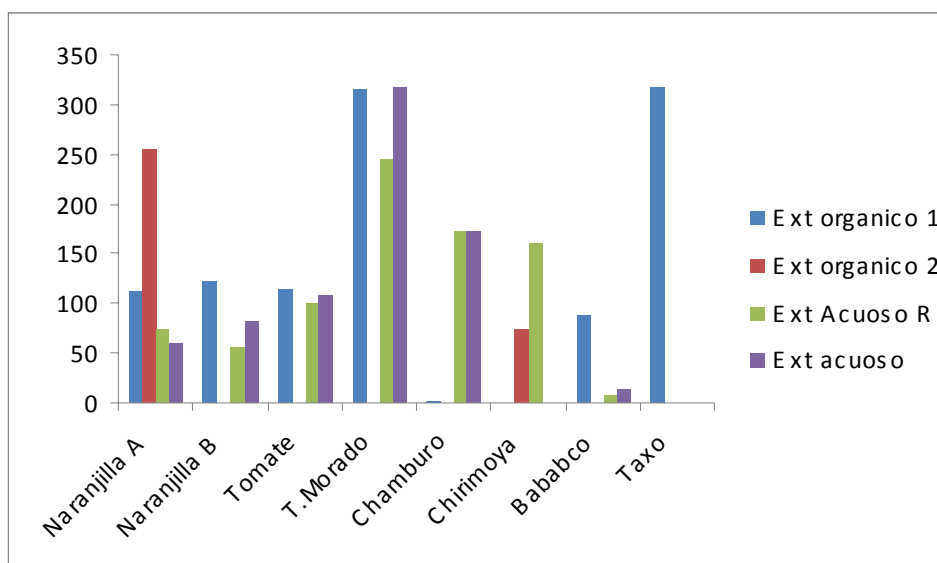


Grafico 4. Comparación de los diferentes extractos de frutas vs. El contenido de compuestos fenólicos.

La comparación de los resultados obtenidos en la cuantificación de fenoles por el método de Folin- Ciocalteu, nos permite identificar a las especies con mayor contenido (Ver 3.2.2); En los extractos acuosos evaluados en fresco y luego de un

período de congelación, el tomate morado presenta el contenido de compuestos fenólicos más elevado (316.96 y 245.70 UAG respectivamente).

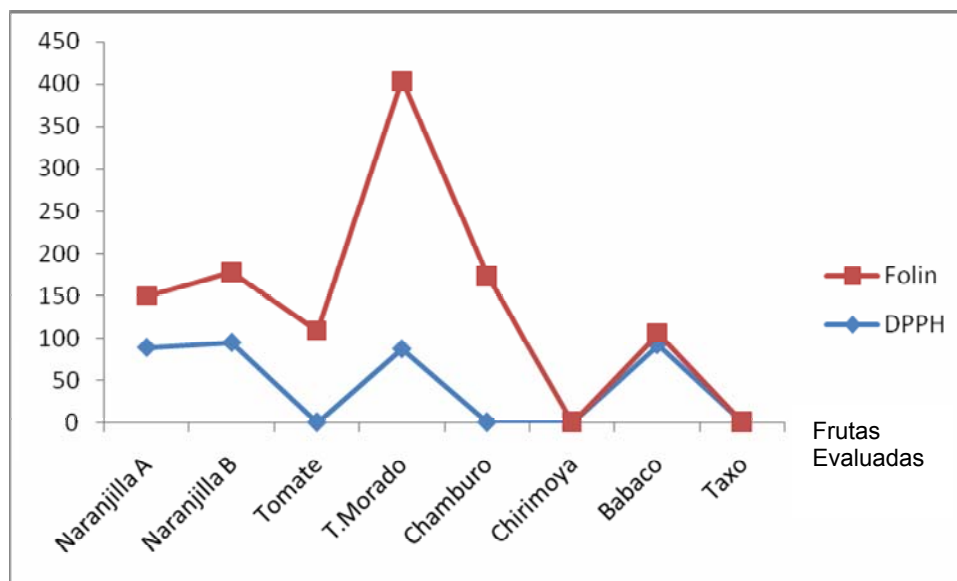
5.3 Comparación del potencial antioxidante vs. Contenido fenólico de extractos obtenidos para las frutas en estudio

5.3.1 Extractos acuosos

En el siguiente cuadro se presenta los resultados obtenidos en este trabajo lo que fue utilizado para la elaboración del grafico de barras que se presenta a continuación.

Extracto	DPPH	Folin
Naranjilla A (común)	88,833	61,146
Naranjilla B (silvestre)	94,705	83,398
Tomate		108,86
T.Morado	87,129	316,963
Chamburo	0	173,264
Chirimoya	0	0
Babaco	92,09	13,746
Taxo	0	0

Cuadro 16. Comparación del potencial antioxidante vs. Contenido Fenólicos de extractos acuosos de las frutas en estudio.



Cuadro 16. Comparación del potencial antioxidante vs. Contenido fenólico de extractos acuosos de las frutas en estudio.

Del gráfico anterior podemos observar que existe un contenido fenólico comparable con la actividad antioxidante, en los extractos acuosos de Naranja A y B y babaco. En el caso del tomate morado, el contenido fenólico es elevado, y corresponde a la IC_{50} observada, ya que la presencia de compuestos fenólicos incidiría en la baja IC_{50} presentada. Las especies que no tienen actividad antioxidante son chirimoya y taxo. En estas especies no se determinaron compuestos fenólicos en sus extractos acuosos.

5.3.2. Extractos orgánicos

En este cuadro se presenta los resultados obtenidos de los extractos orgánicos que fue utilizado para la elaboración del gráfico de barras que presenta a continuación.

Extracto	DPPH	Folin
Naranja A (común)	0	112,83
Naranja B (silvestre)	0	123,34
Tomate	171,05	115,19
T.Morado	0	315,73
Chamburo	0	2,218
Chirimoya	0	0
Babaco	172,52	88,277
Taxo	0	318,14

Cuadro 17. Comparación del potencial antioxidante vs. Contenido Fenólico de extracto orgánico de las frutas en estudio.

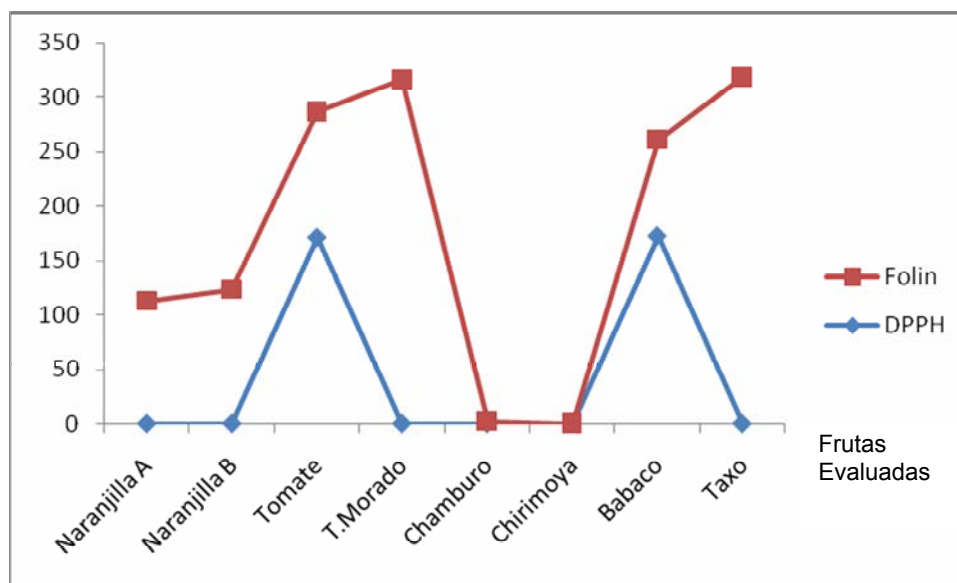


Gráfico 6. Comparación del potencial antioxidante vs. Contenido fenólico de extractos orgánicos de las frutas en estudio.

En este gráfico se observa una menor relación entre las variables en estudio. Los extractos orgánicos de Naranja A y B presentan un importante contenido de fenoles en estos extractos, sin embargo no se puede determinar actividad antioxidante. Los extractos de tomate y babaco presentan una apreciable relación entre el contenido de fenólicos y la actividad antioxidante. Los extractos orgánicos

de chamburo, tomate morado, chirimoya y taxo son inactivos en el ensayo de DPPH. No obstante, los contenidos de fenoles para el tomate morado y taxo son elevados.

6. Conclusiones y Recomendaciones

Las conclusiones obtenidas al realizar este trabajo son las siguientes:

1. Mediante los ensayos enzimáticos realizados en las frutas en estudio se pudo determinar la actividad antioxidante por dos métodos de Folin y DPPH, utilizando una estrategia que incluyó obtención de extractos orgánicos y acuosos y evaluación de extractos acuosos en fresco y luego de 24 horas de congelamiento.
2. El análisis de los resultados obtenidos al cuantificar la actividad antioxidante por el método del DPPH muestran como especies promisorias al babaco en su extracto orgánico, con 94.02 $\mu\text{L/mL}$ IC_{50} . De los extractos acuosos la especie que presenta mejor actividad antioxidante es el tomate morado, con una IC_{50} de 87,129 $\mu\text{L/mL}$. Cabe destacar que este parámetro es inversamente relacionado al potencial antioxidante de las frutas, ya que presenta que una menor cantidad de fruta alcanza el 50 % de atrapamiento de radicales libres.
3. La cuantificación de fenoles por el Método de Folin Ciocalteau permitió establecer a las especies con mayor contenido de compuestos fenólicos, expresados como unidades de ácido gálico (UAG). El trabajo realizado con los extractos orgánicos identificó al taxo como la de concentración más elevada (318.14 UAG). En los extractos acuosos congelados la especie de mayor concentración fue el Tomate Morado con 245.7 UAG, su potencial se incrementa cuando su proceso es inmediato (316.963 UAG).
4. Al relacionar el contenido de compuestos fenólicos con la IC_{50} obtenida para la actividad antioxidante, buscamos identificar a la especie con mayor concentración de fenólicos y la más baja IC_{50} . De las frutas estudiadas, el tomate morado presentó estas características en su extracto acuoso fresco y congelado, por lo que señala el potencial de esta fruta por las características determinadas, y se recomiendan nuevos estudios para identificar los compuestos responsables de

su actividad antioxidante y la incidencia de su consumo en posibles efectos beneficiosos a la salud.

5. En el estudio de los extractos acuosos se determina una relación entre la actividad antioxidante y el contenido de fenólicos para las dos ecotipos de naranjilla y babaco. En los extractos orgánicos no se encuentra la relación observada para los extractos acuosos.

6. Una vez analizados los resultados en el presente estudio, determinamos al tomate morado *Solanum betacea*, como la fruta con mayor potencial antioxidante, en relación con el contenido de compuestos fenólicos.

7. El trabajo experimental desarrollado en este trabajo de graduación logró establecer una metodología de trabajo para realizar una aproximación preliminar al establecimiento de la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en frutas nativas de nuestro país. El presente estudio muestra la factibilidad de explorar el potencial antioxidante de otras fuentes alimenticias nativas. Es necesario destacar que existen otros métodos para cuantificar la actividad antioxidante que puede ser desarrollado, y así complementar la información presentada en este trabajo de graduación.

Bibliografía:

- BADUI, S. (2006). Química de los Alimentos. 4ta Edición. Editorial Pearson Addison Wesley, pp. 289.
- Buhler, D., Miranda, C. Antioxidant activities of flavonoids, en: <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html> (visitada Junio 2005).
- Buhler, D., Miranda, C. Antioxidant activities of flavonoids, en: <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html> (visitada en Octubre 2007).
- Céspedes, T., Sánchez, D. (2000). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Revista Cubana de Cardiología, **14** (1); 55 – 60.
- Ferrucci, F. (2007). Estudio de Mercado para frutas y hortalizas seleccionadas, en: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/frutas/tomate%20arbol/iica.htm> (visitada en Octubre 2007).
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **47**, 1035 – 1040.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Venkateshwara, C., Shirwaikar, A., Singh Rawat, A., Mehrotra, S., Pushpangadan, P. Antioxidant potential of *Anogeissus latifolia*. Biol. Pharm. Bull. **27** (8), pp. 1266 – 1269. (2004).
- Harborne, J. (1998). Phytochemical Methods. Editorial Chapman and Hall. Reino Unido., pp. 40 - 42 ; 66 – 68.

- Le, K., Chiu, F., Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. Food Chemistry, **105**, 353 – 363.
- Maria,Montero.,Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.Universidad Santiago de Compostela .España.Radicales Libres y defensas antioxidantes.
- Morales, J. (2006). Los Recursos Genéticos. Aplicaciones. Seminario – Taller “La Biotecnología en Ecuador, estado actual y perspectivas futuras”. REDBIO-Ecuador. Quito, 2006.
- Muñoz, I.,Soto ,V.,(2005). Determinación de la capacidad protectora de antocianinas de un extracto de vitis vinifera en aortas de rata sometidas a estrés oxidativo.Tesis para optar al grado de Licenciado en Kinesiología de la Universidad de Chile, Facultad de medicina.
- Nakazawa, H., Genka, C., Fujishima, M. (1996). Pathological aspects of active oxygen/free radicals. Japanese Journal of Physiology, **46**, pp. 15 – 32.
- Olmedilla, B. (2002). Beneficios derivados del consumo de frutas y verduras y perspectiva de futuro. Alimentaria. Revista de Tecnología e Higiene de los alimentos. **337**, pgs. 11-20.
- P,Piergiorgio.,P,Simonetti.,M,Pierluigi. (1998). Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants.American Chemical Society,46, 4487-4490 .
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M., Jiménez, A., Codina, C. (2003). Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. Life Sciences, **73**, 1667 – 1681.
- Pineda, D,. Salucci,M., Lazaro, R., Maiani,G.,Ferro-Luzzi ,A.,Instituto de Nutricion e higiene de Alimentos.Capacidad antioxidante y potencial de

sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos.

- Robinson, E., Maxwell, S., Thorpe, G. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research* **26**, pp. 291 – 302, (1997).
- Sanchez, I., Tapia, M. (2008). Frutales andinos. Tomate de árbol, en: Cultivos Andinos FAO – Introducción, http://www.fao.org/regional/Lamerica/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro10/cap03_4.htm (visitada en Abril de 2008).
- Terranova.(1995).Producción Agrícola. Enciclopedia Agropecuaria Terranova. Editorial Terranova, Ltda., pp. 168-170,183-185,248-250.
- Wang, S., Lin, H. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 140 – 146.
- Yildirim, A., Oktay, M., Bilaloglu, V. The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turk. J. Med. Sci*, **31**, pp. 23 – 28, (2000).

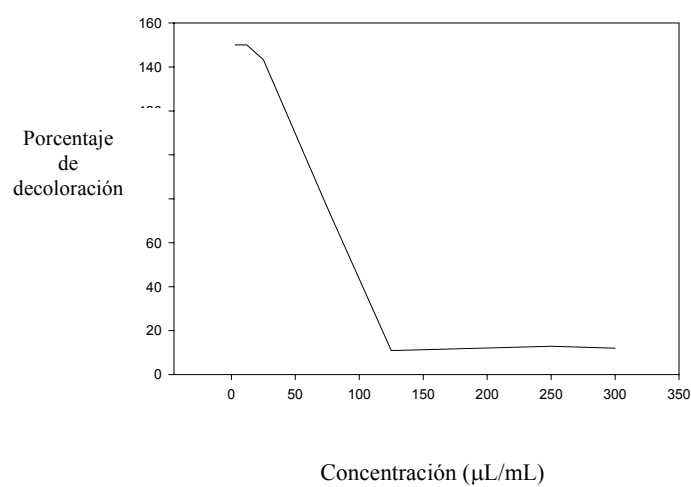
ANEXOS

ANEXO 1

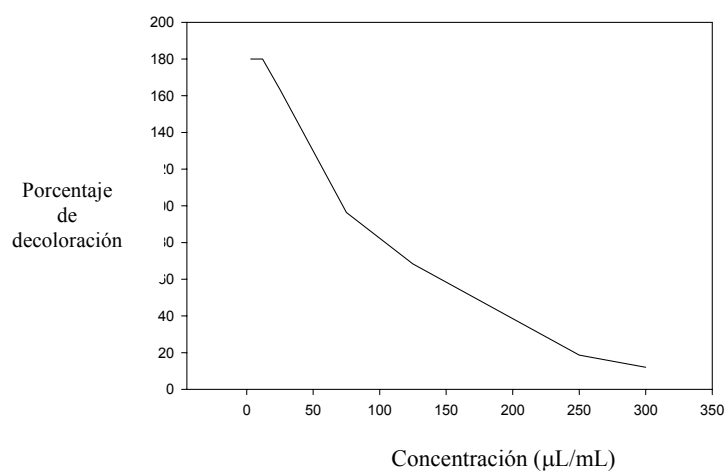
Gráficos de Evaluación de actividad antioxidante para extractos activos por el método de DPPH

1.1 Extractos Orgánicos activos en ensayo DPPH

1.1.1 Babaco

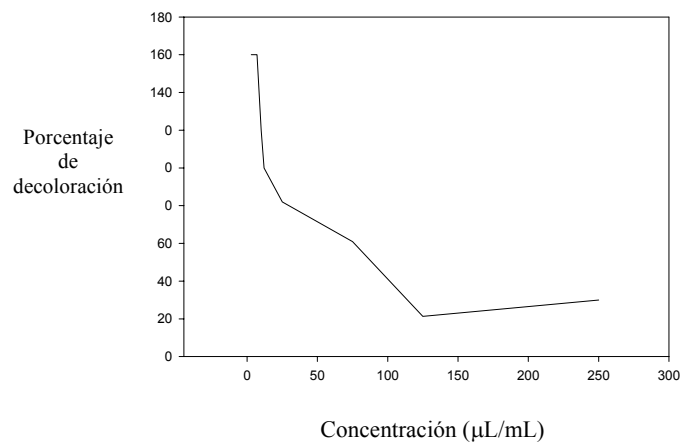


1.1.2 Tomate

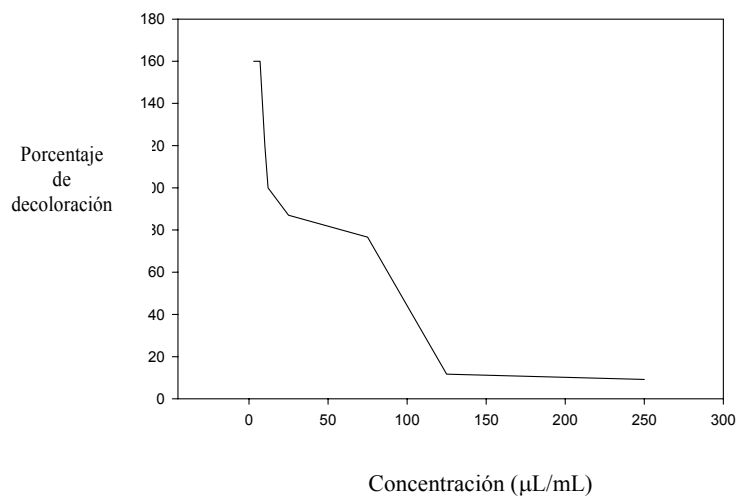


1.2 Extractos acuosos activos en ensayo de DPPH

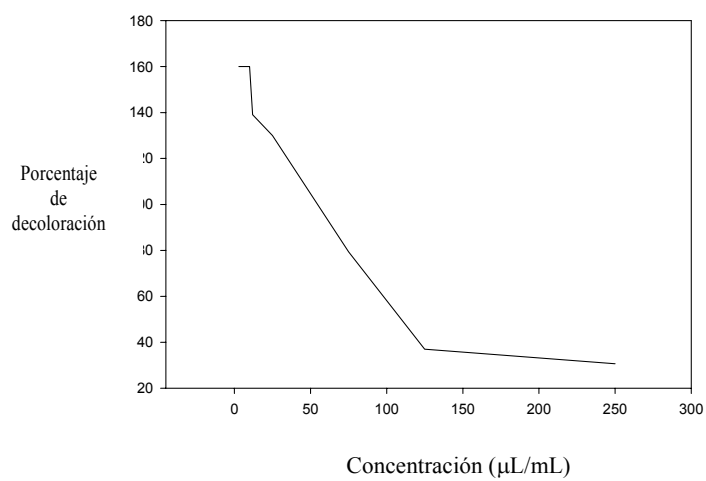
1.2.1 Naranja A (variedad silvestre)



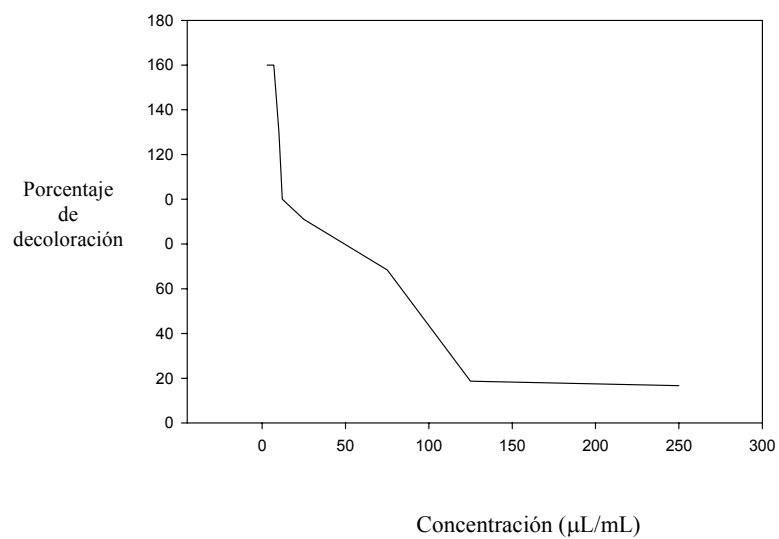
1.2.2 Naranja B (variedad común)



1.2.3 Tomate Morado



1.2.4 Babaco



Anexo 2

2.1 Extractos orgánicos

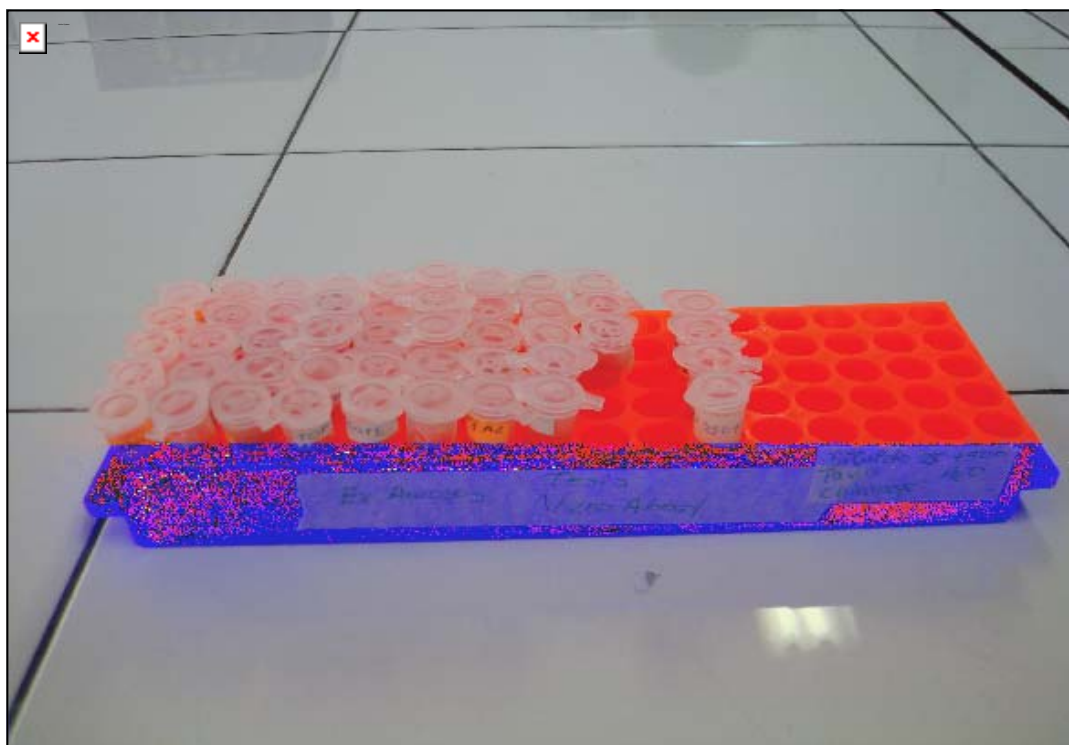


2.2 Extractos Acuosos



ANEXO 3

3.1 Método de DPPH



Método de Folin Ciocalteu.

