

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE ENZIMAS DE
LA VÍA DE HALLIWELL-ASADA ENTRE PLANTAS DE *Myrciaria dubia*
“CAMU-CAMU” QUE PRODUCEN FRUTOS CON ALTO Y BAJO
CONTENIDO DE VITAMINA C**

PROYECTO DE TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

**BACH. ACUÑA AMARAL CINTHYA
BACH. CERDEIRA GUTIERREZ LUIS ALEXANDER**

ASESORES

**Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ. Dr.
QF. LUÍS ALBERTO VILCHEZ ALCALÁ. Mgr.
QF. PATRICIA UTIA TORREJÓN**

IQUITOS – PERÚ

2013

**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE ENZIMAS DE
LA VÍA DE HALLIWELL-ASADA ENTRE PLANTAS DE *Myrciaria dubia*
“CAMU-CAMU” QUE PRODUCEN FRUTOS CON ALTO Y BAJO
CONTENIDO DE VITAMINA C**

Acuña A. Cinthya; Cerdeira G. Luis A.

RESUMEN

Myrciaria dubia “camu-camu” es un frutal de gran interés económico para nuestra región y el país. Porque exhibe diversas sustancias de gran interés para la salud humana con aplicación en la industria farmacéutica. Pero sobre sale por presentar un alto contenido de vitamina C a nivel mundial. Sin embargo, muy poco se sabe de los mecanismos que regulan la biosíntesis y reciclaje y por ende la acumulación de esta vitamina en plantas. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue comparar la actividad catalítica de enzimas de la vía de Halliwell-Asada entre plantas de *M. dubia* que producen frutos con alto y bajo contenido de vitamina C. Los frutos verdes de *M. dubia* fueron obtenidas de la colección de germoplasma de “camu-camu” del Instituto Nacional de Innovación Agraria-Iquitos. Las proteínas totales fueron extraídas y cuantificadas con el método de Bradford y la actividad catalítica de las enzimas de la vía de Halliwell-Asada fueron medidas con métodos estándares de dos réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. Todas las enzimas de la vía de Halliwell-Asada presentaron actividad catalítica en cáscara y pulpa de *M. dubia*. Ascorbato peroxidasa exhibió mayor actividad catalítica en frutos con bajo contenido de vitamina C, con una diferencia significativa solo en pulpa ($F = 6,4$; $gl = 3$; $P = 0,05$). Mientras que Monodehidroascorbato reductasa, Dehidroascorbato reductasa y Glutación reductasa presentaron mayor actividad catalítica en frutos con alto contenido de vitamina C. En conclusión, las diferencias en el contenido de vitamina C en *M. dubia*, se atribuyen en parte, a la actividad catalítica variable de las enzimas de la vía de Halliwell-Asada, en particular con las enzimas Monodehidroascorbato reductasa, Dehidroascorbato reductasa y Glutación reductasa.

**COMPARISON OF CATALYTIC ACTIVITY OF ENZYMES OF THE
HALLIWELL-ASADA PATHWAY BETWEEN PLANTS OF *Myrciaria
dubia* "CAMU-CAMU" PRODUCING FRUIT WITH HIGH AND LOW
CONTENTS OF VITAMIN C**

Acuña A. Cinthya; Cerdeira G. Luis A.

ABSTRACT

Myrciaria dubia "camu-camu" is a fruit of great economic interest for our region and our country, because it holds various substances of great interest to human health with application in the pharmaceutical industry. One of the highlights of this plant in the world is the high content of vitamin C it keeps. Nevertheless, very little is known about the mechanisms that regulate its biosynthesis and recycling and thus the accumulation of this vitamin in the plants. Therefore, the aim of this research was to compare the catalytic activity of enzymes of the Halliwell-Asada pathway between plants of *M. dubia* that produce fruits with high and low contents of vitamin C. Unripe fruits of *M. dubia* were obtained from the germplasm collection of "camu-camu" at the National Institute of Agrarian Innovation in Iquitos. Total proteins were extracted and quantified by the Bradford method and the catalytic activity of the enzymes of the Halliwell-Asada pathway were measured with standard methods using two biological replicates and two technical replicates. All enzymes of the Halliwell-Asada pathway showed catalytic activity in skin and pulp of *M. dubia*. Ascorbate peroxidase showed higher catalytic activity in fruits with low content of vitamin C, with a significant difference only in pulp ($F = 6,4$; $gl = 3$, $P = 0,05$). While Monodehydroascorbate reductase, Dehydroascorbate reductase and Glutathione reductase showed higher catalytic activity in fruits with high content of vitamin C. In conclusion, the differences in the content of vitamin C in *M. dubia*, are attributed in part to the variable catalytic activity of the enzyme of the Halliwell-Asada pathway, particularly with enzymes Monodehydroascorbate reductase, Dehydroascorbate reductase and Glutathione reductase.

DEDICATORIA

A Dios, porque es Quien ilumina nuestro caminar y nos guía, a nuestros padres Mirtha, Oscar, Zonia y Carly, a nuestros hermanos Lenin, Bianca y Lucero, por sus apoyo incondicional en todo momento, el cariño la comprensión y el afecto que nos brindan en cada momento de nuestro existir.

Cinthya & Luis

AGRADECIMIENTO

Aunque parezca un apartado obligatorio en cualquier Tesis, realmente queremos agradecer la colaboración de muchas personas, sin las cuales este trabajo no hubiese sido posible. Ahí va...

Al Dr. Juan Carlos Castro Gómez por brindarnos la oportunidad de trabajar con él, a veces en condiciones de estrés, pero siempre sumamente provechosas. Asimismo, le agradecemos el que nos haya permitido formar parte de este proyecto de tesis y sobre todo el estar siempre dispuesto a colaborar y comentar cualquier dato o problema.

A los Drs. Jorge Marapara Del Águila, Lastenia Ruíz Mesía y. Marianela Cobos Ruíz; por habernos brindado de alguna u otra manera su ayuda desinteresada, para lograr los objetivos de esta tesis.

A nuestros padres Mirtha, Oscar, Zonia y Carly, por la ayuda y cariño, a pesar del tiempo que dedicamos a la investigación y al laboratorio, los cuales se sienten orgullosos de nuestro trabajo y empeño que le ponemos.

A toda la gente que nos ha acompañado y mostrado su simpatía dentro y fuera del laboratorio: Alex Tapullima, Alina Egoavil, Freddy Gutiérrez, Julián Torres, Ana Córdova, Mery Siguas, Ángel Araujo, Roberson Ramírez, Aurora Romero, Janneth Viena y Jackmen Del Aguila.

Y finalmente al Ing. Sixto Alfredo Imán Correa y al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) por permitirnos acceder al banco de germoplasma para la obtención de nuestra muestra vegetal.

LOS AUTORES

ÍNDICE

CAPÍTULO I

1.- Introducción	10
2.- Problema de Investigación	12
3.- Objetivos	13
3.1.-Objetivo general	13
3.2.- Objetivos específicos	13

CAPÍTULO II

1.-Marco Teórico	15
1.1.-Antecedentes	15
1.2.-Bases Teóricas.....	17
1.2.1.- <i>Myrciaria dubia</i> “Camu-camu”	17
1.2.1.1.-Clasificación Taxonómica.....	17
1.2.1.2.-Descripción Botánica	17
1.2.1.3.-Características de la Especie	18
1.2.1.4.-Estudios Químicos	18
1.2.1.5.-Usos Tradicionales.....	19
1.2.2.- Vitamina C o Ácido-l- Ascórbico	19
1.2.2.1.-Síntesis de Vitamina C o Ácido-l- Ascórbico.....	19
1.2.2.2.- Ciclo de Halliwell-Asada o Reciclaje de Vitamina C.....	20
1.2.2.3.-Función de la Vitamina C en Plantas	21
1.2.2.4.-Función de la Vitamina C en Humanos	21
2.-Definiciones Operacionales	23
2.1.-Variables	23
2.1.1.- Variable Independiente	23
2.1.2.- Variable Dependiente.....	23
2.2.-Operacionalización de las Variables	24
3.-Hipótesis.....	25

CAPÍTULO III

1.-Metodología.	27
1.1.-Tipo de Estudio.	27
2.- Diseño de Investigación.	27
3.-Población y Muestra.....	27
3.1.-Población Vegetal.	27
3.2.-Muestra Vegetal	27
4.-Instrumentos y Materiales	28
4.1.-Equipos.....	28
4.2.-Materiales de Laboratorio.....	28
4.3.-Insumos Químicos.....	29
4.4.-Material Vegetal.....	30
5.-Procedimiento y Recolección de Datos	30
5.1.-Recolección de la Muestra Vegetal.....	30
5.2.-Extracción y Medición de la Actividad Catalítica	30
5.2.1.- Ascorbato Peroxidasa (APX).....	30
5.2.2.- Monodehidroascorbato Reductasa (MDHAR).....	31
5.2.3.- Dehidroascorbato Reductasa (DHAR).....	31
5.2.4.- Glutación Reductasa (GR).....	32
5.3.-Cuantificación de Proteínas Totales.....	32
5.4.-Recolección de Datos de los Ensayo.....	32
6.-Análisis e Interpretación de Datos	33

CAPÍTULO IV

1.-Resultados	35
2.-Discusión.....	39
3.-Conclusiones	41
4.-Recomendaciones.....	41
5.-Bibliografía	42
6.-Anexo.....	52

TITULO:

“COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE ENZIMAS DE LA VÍA DE HALLIWELL-ASADA ENTRE PLANTAS DE *Myrciaria dubia* “CAMU-CAMU” QUE PRODUCEN FRUTOS CON ALTO Y BAJO CONTENIDO DE VITAMINA C”

CAPÍTULO I

1.- INTRODUCCIÓN.

La vitamina C cumple funciones trascendentales al aportar múltiples beneficios para la salud humana. Es un excelente antioxidante, brindando protección a los componentes celulares, frente a la acción de los radicales libres.^(1,2) Además, actúa como cofactor de importantes enzimas relacionadas con la síntesis de hormonas y colágeno, por esta última razón se cree que es importante en la prevención de artritis y artrosis^(3,4). También, favorece a la mejora cardiovascular, permite combatir diversos tipos de cáncer, reduce el riesgo de padecer anemia y arterioesclerosis.⁽⁵⁾

Las plantas representan la principal fuente natural de vitamina C para el hombre. Debido a que éste es incapaz de sintetizar esta vitamina por falta de la enzima L-gulonolactona oxidasa.⁽⁶⁾ En contraste, las plantas presentan varias vías metabólicas para sintetizar la vitamina C.⁽⁷⁻¹¹⁾ Entre estas, la ruta biosintética de Smirnoff-Wheeler es considerada la más importante.⁽¹¹⁾ Además, las plantas emplean enzimas para regenerar la vitamina C, la cual se debe a la acción catalítica de un conjunto de enzimas como la ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), la dehidroascorbato reductasa (DHAR) y la Glutión reductasas (GR) cuyos donadores de electrones son vitamina C, NADH, GSH y NADPH respectivamente.⁽¹²⁻¹⁵⁾

En la Amazonía peruana disponemos de una buena alternativa como fuente de vitamina C natural. Nos referimos a los frutos de *M. dubia*, que se caracterizan por contener más de 2000 mg de vitamina C por 100 g de pulpa.^(1, 16,17) Adicionalmente los frutos contienen diversas sustancias con potencial uso farmacológico, tales como las antocianinas, β -carotenos y carotenoides.⁽¹⁸⁻²⁰⁾ A pesar de estas excepcionales cualidades, una de las principales dificultades que presenta es la amplia variación en la producción de vitamina C entre plantas de *M. dubia*, en parte esto se atribuye a la actividad diferencial de enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler,^(21,22) pero también las enzimas que participan en el ciclo de Halliwell-Asada podrían estar involucradas.

De acuerdo a lo mencionado se hace necesario un estudio que compare la actividad catalítica de enzimas de la vía de Halliwell-Asada entre plantas de *M. dubia* que producen frutos con alto y bajo contenido de vitamina C.

2.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existirán diferencias en la actividad catalítica de enzimas de la vía Halliwell-Asada entre plantas de *M. dubia* que producen frutos con alto y bajo contenido de vitamina C?

3.- OBJETIVOS.

3.1.- Objetivo general.

- Comparar la actividad catalítica de enzimas de la vía de Halliwell-Asada entre plantas de *M. dubia* que producen frutos con alto y bajo contenido de vitamina C.

3.2.- Objetivos específicos.

- Obtener extractos enzimáticos que contienen las enzimas Ascorbato peroxidasa, Monodehidroascorbato reductasa, Dehidroascorbato reductasa y Glutación reductasa de cáscara y pulpa verdes de *M. dubia* que producen frutos con alto y bajo contenido de vitamina C.
- Cuantificar proteínas totales del extracto enzimático obtenido de cáscara y pulpa verdes de *M. dubia* que producen frutos con alto y bajo contenido de vitamina C.
- Determinar la actividad catalítica de las enzimas Ascorbato peroxidasa, Monodehidroascorbato reductasa, Dehidroascorbato reductasa y Glutación reductasa en el extracto enzimático obtenido de cáscara y pulpa verdes de *M. dubia* que producen frutos con alto y bajo contenido de vitamina C.

CAPÍTULO II

1.- MARCO TEÓRICO.

1.1.- ANTECEDENTES.

Dalton *et al.* (1986),⁽²³⁾ mencionan que la enzima APX participa en el ciclo de Halliwell-Asada y que su única función es eliminar especies reactivas de oxígeno (ERO) en los diferentes compartimientos celulares, usando como donador de electrones a la vitamina C regenerada por las enzimas MDHAR y DHAR.

Grantz *et al.* (1995),⁽²⁴⁾ establecen que la expresión de las enzimas claves responsables de la regeneración de vitamina C son MDHAR y DHAR, las que también incrementan su actividad bajo condiciones de estrés.

Smirnoff y Wheeler (2000),⁽²⁵⁾ mencionan que el contenido de vitamina C, puede ser agotado si las formas oxidadas no son recuperadas por dos reductasas: MDHAR y DHAR.

Foyer *et al.* (2000),⁽²⁶⁾ señalan que GR si bien es importante en procesos de desintoxicación de la planta, también juega un papel transcendental en los procesos de regeneración de vitamina C.

Zhong *et al.* (2003),⁽²⁷⁾ establecieron que la vitamina C del tabaco y del maíz puede ser elevada por una mayor expresión de las enzimas responsables del reciclaje de esta vitamina C.

Zhong *et al.* (2004),⁽²⁸⁾ indican que la enzima DHAR es la responsable de regenerar la vitamina C de su forma oxidada, mantenido constante los niveles de esta vitamina en la planta.

Zhong *et al.* (2005),⁽²⁹⁾ sugieren que cambios en la expresión de la enzima DHAR afectan el estado REDOX y en consecuencia el contenido total de vitamina C en el citosol y el apoplasto de plantas.

Ishikawa *et al.* (2006),⁽³⁰⁾ establecen que la regeneración de la vitamina C es también un proceso de gran importancia para mantener concentraciones adecuadas de esta vitamina en las células y en este proceso están involucradas las enzimas MDHAR, DHAR y GR.

Cevilla *et al.* (2007),⁽³¹⁾ mencionan que la regeneración de vitamina C en *Solanum lycopersicum* es también un proceso de gran importancia en la respuesta antioxidante. Sugiere que la sobreexpresión de la enzima MDHAR podría afectar la acumulación de vitamina C.

Eltayeb *et al.* (2007),⁽³²⁾ indican que la sobreexpresión de la enzima MDHAR en tabaco aumenta los niveles de vitamina C, es decir, evita su oxidación y además le confiere tolerancia a las plantas frente al estrés.

Stevens *et al.* (2008),⁽³³⁾ señalan que existe una correlación positiva entre la actividad catalítica de la enzima MDHAR y el contenido de vitamina C en frutos de tomate, al estar sometidos a estrés por altas temperaturas.

Melino *et al.* (2009),⁽³⁴⁾ establecieron que la vitamina C reducida contribuye al total de vitamina C en bayas durante la fase de desarrollo. Esto podría ser el resultado de un incremento en la actividad de las enzimas que participan en la ciclo de Halliwell-Asada.

Li *et al.* (2010),⁽³⁵⁾ mencionan que las enzimas MDHAR y DHAR pueden desempeñar un papel importante en mantener niveles altos de vitamina C, evitando su oxidación en diferentes estadios de maduración en frutos de kiwi.

1.2.- BASES TEÓRICAS.

1.2.1.- *Myrciaria dubia* “camu-camu”.

1.2.1.1.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

La especie *M. dubia* es originaria de la Amazonía, con abundante diversidad en Loreto, Perú.

Tipo	: Fanerógamas
Subtipo	: Angiospermas
Clase	: Dicotiledóneas
Orden	: Myrtales
Familia	: <i>Myrtaceae</i>
Género	: <i>Myrciaria</i>
Especie	: <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) Mc Vaugh



Fruto de *Myrciaria dubia*

Nombres: Camu-camu (Perú), guayabito (Venezuela), caçari, arazá de agua y crista de galo (Brasil).⁽³⁶⁾

1.2.1.2.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

M. dubia es un arbusto de hasta 3 m de altura, con ramitas glabras, hojas lanceoladas o elípticas, 5 a 9 x 2,5 a 4 cm, ápice agudo, base cuneada, glabras en ambas caras; vena media plana en el haz, venas secundarias numerosas, más o menos cladrodromas, conspicuamente oblicuas a la vena media, ligeramente planas o inmersas en el envés, inflorescencias axilares, en grupos de racimos cortos, brácteas y bractéolas persistentes; flores glabras; pétalos blancos. Frutos baya 2 a 3 cm de diámetro, rojos o negros cuando están maduros. Habita en planicie inundable; sus frutos son comestibles.⁽³⁷⁾

Las hojas son simples, de borde liso, opuestas, ovaladas, elípticas, lanceoladas y algo asimétricas. La longitud varía entre 4,5 y 12,0 cm y el ancho entre 1,5 y 4,5 cm. El pecíolo es cilíndrico, de 5 a 9 mm de longitud y de 1 a 2 mm de diámetro.

La raíz principal es de forma cónica, y contiene muchos pelos absorbentes. La flor de color blanco uniforme, subsésil, con 4 pétalos; mide de 1 a 1,5 cm de diámetro. El eje contiene 4 flores, pedicelo de 1,5 mm de largo por 1 mm de diámetro. Los frutos son globosos, de superficie lisa y brillante, de color rojo oscuro hasta negro púrpura al madurar; miden de 2 a 4 cm de diámetro, con 1 a 4 semillas por fruto, siendo lo más común 2 a 3 semillas, peso promedio alrededor de 8,4 g por fruto.⁽³⁸⁾

Las semillas son reniformes, aplanadas, cubiertas por una vellosidad blanca rala de menos de 1 mm de longitud.^(1, 17,39-41) La planta es monoica, con flores hermafroditas, de fecundación alógama, ya que no existe la sincronización en la abertura de pistilo y estambre.⁽³⁸⁾

1.2.1.3.- CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE.

Arbustos de campos cerrados, ritidoma frecuentemente liso y brillante por descamación de la corteza. Hojas opuestas alternas (*Myrcia anomala*), simples, enteras, con puntuaciones translúcidas; nervio marginal. Cimastrifloras, o múltiparas (inflorescencias paniculoides), racimos, pseudo fascículos compactos. Flores heteroclamídeas, dialipétalas (raramente apétalas y con caliptra: *Calyptanthes*), actinomorfas, epíginas, 4-5(-6)-meras, hermafroditas. Botón floral con lobos calicinales libres o más raramente, totalmente cerrado rompiéndose al antesis. Estambres numerosos, ovario con 1-4(-10) lóculos 1-pluriovulados, bayas frecuentemente coronadas por los lobos calicinos persistentes. 1-n semillas con testa generalmente cartilaginosa o membranácea.⁽⁴²⁾

1.2.1.4.- ESTUDIOS QUÍMICOS.

M. dubia es rico en hierro, niacina, calcio, tiamina, rivo flavina y fosforo, así como otros compuestos aromáticos volátiles y fitoquímicos de interés. También tiene los aminoácidos serina, valina y leucina, además de un importante porcentaje de β -caroteno, carbohidratos, fibra y cenizas.⁽¹⁸⁻²⁰⁾

1.2.1.5.- USOS TRADICIONALES.

Existen diversas modalidades tradicionales de uso de la especie por los pobladores amazónicos: la corteza del tallo y la raíz en cocimiento para el tratamiento de la artritis reumatoide, la diabetes mellitus y la gripe, destacando el jugo fresco del fruto maduro como forma de preparación preferencial; los frutos y la corteza son empleados para teñir fibras vegetales de la chambira (*Astrocarium chambira*); la corteza raspada es aplicada localmente para aliviar dolores musculares. Asimismo, la fiebre y el dolor de cabeza son tratados con las hojas trituradas. El fruto, además, es empleado como carnada en la pesca.⁽⁴³⁾

Sin embargo, *M. dubia* como suplemente dietético, alimento funcional y en cosmetología, es un producto que tiene propiedades astringentes, antioxidantes, antiinflamatorias, emolientes y nutricionales y su gran poder antioxidante se mide por la actividad inhibidora de radicales DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).⁽¹⁹⁾

1.2.2.- VITAMINA C O ÁCIDO-L- ASCÓRBICO.

La vitamina C básicamente es una hexosa derivada y por lo tanto un carbohidrato. Es una sustancia muy soluble que posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras,⁽⁴⁴⁾ es requerida para un cierto número de reacciones metabólicas en todos los animales y plantas, además, es sintetizada por casi todos los organismos, excepto los humanos.⁽⁴⁵⁾

1.2.2.1.- SÍNTESIS DE VITAMINA C O ÁCIDO-L- ASCÓRBICO.

La vitamina C es un metabolito esencial para las plantas y los animales, aunque los seres humanos y algunos otros animales, tienen que obtenerlo de los alimentos que consumen,⁽⁴⁶⁾ debido a que carecen de la gulono-1,4-lactona oxidasa, última enzima en la biosíntesis de vitamina C a partir de glucosa.⁽⁴⁷⁾

Se han propuesto varias rutas biosintéticas para vitamina C, una de ellas es la vía a través de la L-galactosa que es la mejor establecida.⁽⁷⁾ Existen otras tres rutas

sugeridas para la biosíntesis de vitamina C, la vía del ácido galacturónico, ^(8,9) L-gulona ^(10,11) y myo-inositol, ⁽⁸⁾ pero se sugiere que la vitamina C obtenida de estas tres últimas vías contribuyen muy poco al contenido total de Vitamina C. ^(13, 48)

1.2.2.2.- CICLO DE HALLIWELL-ASADA O RECICLAJE DE VITAMINA C.

La vitamina C sintetizada en las plantas puede ser oxidada por la enzima APX, en presencia de peróxido de hidrógeno, al radical monodehidroascorbato (MDHA) el que a su vez por un proceso no enzimático es coinvertido a dehidroascorbato (DHA). La DHA puede sufrir una hidrólisis y formar irreversiblemente el ácido 2, 3-dicetoglucónico ^(29, 49) o ser catabolizado formando productos de oxalato y tartrato. ⁽⁵⁰⁾

La regeneración de vitamina C en las plantas ocurre por la conversión de MDHA utilizando a MDHAR dependiente de NADH o por la conversión de DHA por la DHAR, que usa glutatión (GSH) como agente reductor, que es regenerado de su forma oxidada (GSSG), por GR, a glutatión reducido (GSH), en una reacción dependiente de NADPH, cofactor que proviene de la fotosíntesis. ⁽¹²⁻¹⁵⁾ Así DHAR permite a la planta regenerar la vitamina C a partir de DHA. ^(11,51, 52)

La vitamina C es transportada a través de la pared celular por difusión vía un transportador de membrana plasmática a cambio de DHA, es decir, por cada molécula de la vitamina C que entra sale una molécula de DHA. ^(41,53)

Una MDHAR ligada a la membrana plasmática regenera la vitamina C en el lado citosólico. La MDHAR desempeña un importante papel en el sistema antioxidante en vegetales por ser capaz de regenerar la vitamina C y mantener el contenido total de vitamina C en la célula. Recientemente, la MDHAR demostró ser capaz también de reducir radicales fenoxil a fenol. ^(41,53) Isoformas de MDHAR se pueden encontrar en mitocondrias, cloroplastos, citosol y microcuerpos. ⁽⁵⁴⁾. (Ver Figura 1)

1.2.2.3.- FUNCIÓN DE LA VITAMINA C EN PLANTAS.

La vitamina C es el antioxidante más abundante en los tejidos vegetales. Su concentración es del orden de milimolares, aunque hay que tener en cuenta que su contenido varía en función al tipo de tejido, del estado fisiológico de la planta, así como de las condiciones medioambientales. Los mayores niveles se encuentran en tejidos fotosintéticos, frutos y órganos de almacenamiento y su contenido es mayor en tejidos jóvenes que en adultos. ^(26,50)

A nivel celular, la vitamina C se encuentra en el citosol, cloroplasto, vacuola, mitocondria y apoplasto. Sus niveles son especialmente elevados en el citosol y en los cloroplastos y su concentración oscila entre 10 y 20 mM respectivamente. ^(25,50)

En las plantas, la vitamina C actúa como un eliminador de radicales libres, como cofactor enzimático y desempeña un papel importante en la cadena de transporte de electrones, además de participar en procesos como la fotosíntesis y foto protección. ^(25, 50, 55,56)

Es esencial para el crecimiento vegetal, ^(57,58) participa en la resistencia al estrés, y parece controlar el tiempo de floración y el comienzo de la senescencia, ⁽⁵⁹⁾ juega un papel importante en la biosíntesis de hormonas vegetales, incluyendo etileno y ácido giberélico y en la de glicoproteínas de la pared celular y metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas. ⁽⁴⁾

1.2.2.4.- FUNCIÓN DE LA VITAMINA C EN HUMANOS.

Dado que los humanos no pueden sintetizar vitamina C ni tampoco almacenarlo depende únicamente de las plantas como fuente de esta importante vitamina, la cual participa en diversos mecanismos biológicos, incluyendo el combate de procesos patológicos. ⁽⁶⁰⁾

La vitamina C es un cofactor importante de enzimas que juegan un papel trascendental en la hidroxilación del colágeno, proteína indispensable para la

formación de piel, uñas y cabello, ^(3, 61,62) la biosíntesis de catecolaminas: noradrenalina, ^(55,63) amidación de hormonas peptídicas, ⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾ el metabolismo de la tirosina y la biosíntesis de carnitina. ^(45, 68) Es un gran antioxidante porque protege al ácido fólico de la oxidación, al código genético contra la mutagénesis y el inicio de la carcinogénesis y el envejecimiento, reduce el daño corporal causado por los químicos y contaminantes tóxicos como el humo del cigarrillo. ⁽⁶⁹⁾ Además, favorece la cicatrización de heridas, la reparación y mantenimiento de cartílago, huesos y dientes. ⁽⁷⁰⁾

La vitamina C también cumple funciones importantes en el sistema inmunológico ayudando en la lucha contra infecciones, estimula la producción de interferón y reduce los procesos inflamatorios, manteniendo la integridad de las mucosas, debido al hecho de que esta vitamina influencia positivamente en los niveles plasmáticos de IgA (anticuerpo presente principalmente en la boca); combate eficazmente células cancerosas, por su efecto antioxidante y por el fortalecimiento del sistema inmunológico. ⁽⁵¹⁾

Las propiedades de la vitamina C también son importantes en la prevención de la anemia, porque actúa como factor promotor de la absorción de hierro inorgánico presente en los alimentos de origen vegetal. ⁽⁷¹⁾

La vitamina C mejora la resistencia física del organismo, así como también fortalece el sistema nervioso, debido a que participa en la síntesis de numerosos neurotransmisores (dopamina, norepinefrina, serotonina), estimula los sistemas cardiovascular y respiratorio. ⁽⁷²⁾

La deficiencia de vitamina C es la causa principal del escorbuto, y se produce cuando el valor sérico es menor a 0,2 mg / 100 ml. Los síntomas son derivados de la inadecuada formación y manutención de los tejidos y compuestos intercelulares, ocurriendo hemorragias subcutáneas, en encías y otras aéreas; también ocurre

anemia, debilidad muscular, deficiencia en la cicatrización de heridas, petequias, osteoporosis, pérdida de cabello y alteraciones neuróticas.⁽⁶²⁾

2.- DEFINICIONES OPERACIONALES

2.1.-VARIABLES

2.1.1.- VARIABLE INDEPENDIENTE

Actividad catalítica de enzimas de la vía de Halliwell-Asada.

- **INDICADORES:**

Milimoles (mM) de ascorbato oxidado por minuto para APX.

Milimoles (mM) NADH oxidado por minuto para MDHAR

Milimoles (mM) ascorbato formado por minuto para DHAR.

Milimoles (mM) NADPH oxidado por minuto para GR.

2.1.2.- VARIABLE DEPENDIENTE

Contenido de vitamina C en cáscara y pulpa verdes de *M. dubia*.

- **INDICADORES**

Vitamina C (mg /100g de muestra) en cáscara y pulpa verdes de *M. dubia*.

2.2.-OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable Independiente	Definición conceptual	Indicador	Definición operacional	Tipo de variable	Índices
		Ascorbato(μmol) oxidado x min para APX	Cantidad de ascorbato (μmol) oxidado por minuto.		1-10 μmol de ascorbato oxidado/min
Actividad catalítica de enzimas que participan en el ciclo Halliwell-Asada en frutos de <i>M. dubia</i> .	Cantidad de enzima que convierte un mol de sustrato en un minuto	NADH (μmol) oxidado por minuto para MDHAR	Cantidad de NADH (μmol) oxidado por minuto.	Cuantitativa	1 a 10 μmol NADH oxidado/min
		Ascorbato (μmol) formado x min para DHAR	Cantidad de ascorbato (μmol) formado por minuto.		1-10 μmol de ascorbato formado/min
		NADPH (μmol) oxidado por minuto para GR	Cantidad de NADPH (μmol) oxidado por minuto.		1 a 10 μmol NADH oxidado/min
Variable Dependiente					
Contenido de vitamina C en frutos de <i>M. dubia</i>	Parámetro que nos permite medir la cantidad de vitamina C en mg/100g de muestras	Vitamina C (mg/100g de muestra) en frutos de <i>M. dubia</i> .	Calcular la cantidad de vitamina C en frutos por cromatografía líquida de alta performance	Cuantitativa	Para vitamina C: 900-3500mg/100g de muestra

3.- **HIPÓTESIS**

Existen diferencias en la actividad catalítica de enzimas de la vía de Halliwell-Asada entre plantas de *M. dubia* que producen frutos con alto y bajo contenido de vitamina C.

CAPÍTULO III

1.- METODOLOGÍA.

1.1.- TIPO DE ESTUDIO.

No experimental: porque en los ensayos realizados no se manipularon las variables.

Prospectivo porque los datos fueron recogidos con un propósito por el investigador.

Transversal porque todas las variables fueron medidas en un solo momento.

Analítico porque se plantea y pone a prueba hipótesis.

2.- DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

El estudio se realizó en el sobrenadante de cáscara y pulpa verdes de frutos de *M. dubia* con alto y bajo contenido de vitamina C, que ya fueron establecidos en el laboratorio por Castro *et al.* (2012).⁽⁸⁾ Se cuantificó las proteínas totales por el método de Bradford (1976)⁽⁷³⁾ y se determinó la actividad de enzimas que participan en el ciclo de Halliwell-Asada, por el método de Rao *et al.* (1996)⁽⁷⁴⁾ para APX, de Hossain *et al.* (1984)⁽⁷⁵⁾ para MDHAR, de Foyer *et al.* (1976)⁽⁷⁶⁾ para DHAR y de Edward *et al.* (1990)⁽⁶⁵⁾ para GR.

3.-POBLACIÓN Y MUESTRA.

3.1.- POBLACIÓN VEGETAL.

La población estuvo constituida por todas las plantas de la colección de germoplasma de *M. dubia*, constituido por un total de 43 accesiones provenientes del Campo experimental el DORADO. “El DORADO”, Km 25½ de la carretera Iquitos-Nauta

3.2.-MUESTRA VEGETAL

La muestra vegetal estuvo constituida por dos plantas, una que produce alto contenido de vitamina C (2150 mg /100 g de muestra) y otra que produce bajo contenido de vitamina C (930 mg /100 g de muestra)

- **CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

Frutos verdes de *M. dubia* en buen estado de conservación y sin presencia de plagas.

- **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

Frutos verdes de *M. dubia* en mal estado de conservación y con presencia de plagas.

4.- INSTRUMENTOS Y MATERIALES

4.1.- EQUIPOS

- Autoclave (Yamato-SM510)
- Baño María (Barnstead)
- Balanza Analítica (Sartorius CP2245)
- Destilador de Agua (Thermo Scientific)
- Estufa (ECOCELL)
- Espectrofotómetro (Genesys UV-visible v.6.0)
- Cámara Digital (Panasonic Lumix 10.0X)
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen)
- Congeladora (Friolux)
- Laptop (HP)
- Horno Microondas (LG)
- Impresora (CANON)
- Purificador de Agua (Thermo Scientific)
- pH metro (Thermo Scientific)
- Agitador Vortex. (Genie 2).

4.2.- MATERIALES DE LABORATORIO

- Frascos tapa rosca de 50, 100 y 1000 ml.
- Matraz aforado de 500 y 2000 ml
- Morteros y pilones.

- Probetas Graduadas de 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Vasos de precipitado de 50, 250 y 500 ml.
- Micropipetas de 0,1- 2,0; 0,5-10; 2,0-20; 20-200; 100-1000 μ l.
- Microtubos de 1,5
- Piceta de 500 ml.
- Gradilla para microtubos
- Puntas plásticas 1 a 10 μ l, 20 a 200 μ l, 100 a 1000 μ l
- Tubos Falcón de 15 y 50 ml

4.3.- INSUMOS QUÍMICOS

- Azul de Comassie G-250
- Albumina de suero bovino
- B- mercaptoetanol
- Polivinil pirrolidona(PVP)-Merck
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) Merck
- Cloruro de Magnesio –*APPLICHEM*
- Nicotinamida adenina dinucleotido reducido (NADH). *SIGMA-ALDRICH*
- Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducido (NADPH). *SIGMA-ALDRICH*
- Ascorbato oxidasa* *SIGMA-ALDRICH*
- L-ácido ascórbico-Standard *CALBIOCHEM*
- Dehidroascorbato-Standard *SIGMA-ALDRICH*
- Glutación reducido(GSH) *SIGMA-ALDRICH*
- Glutación oxidado (GSSG) *SIGMA-ALDRICH*
- Hidrogeno fosfato de sodio**MERCK*
- Di básico fosfato de sodio* *MERCK*
- Tritón X-100.

4.4.-MATERIAL VEGETAL

- Constituida por frutos verdes de *M. dubia*.

5.-PROCEDIMIENTO Y RECOLECCIÓN DE DATOS

5.1.- RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL

La muestra fue colectada de la colección de germoplasma de “camu-camu” del Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA, ubicado a la altura del Km 25½ de la carretera Iquitos–Nauta, donde se encuentra instalada la Colección Nacional de Germoplasma de “camu-camu”, en las condiciones geográficas 03° 57’ 17” LS y 73° 24’ 55” LO con una altitud de 112 msnm, el cual se encuentra constituido por 43 accesiones, que son muestras representativas de la variabilidad genética de esta especie; pertenecientes a 8 principales cuencas hidrográficas de la Región Loreto (Nanay, Itaya, Napo, Ucayali, Putumayo, Curaray, Tigre y Amazonas).

5.2.-EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA

En todos los ensayos se incluyó un control negativo todos los componentes de la actividad enzimática más la adición de proteinasa K 0.01 mg /ml, seguida de la incubación a 37°C por 1 hora y hervido de 10 min.

5.2.1.-ASCORBATO PEROXIDASA (APX)

La extracción se realizó según Ma *et al.* (2003)⁽⁷⁷⁾ y Vanacker *et al.* (1998),⁽⁷⁸⁾ el cual consistió en homogenizar en un mortero 0,01 g de la muestra vegetal y 1,2 ml de buffer de extracción (HEPES 100 mM pH 6,5, EDTA 5 mM, cloruro de magnesio 10 mM, ascorbato 5 mM, PMSF 1 mM y PVP 3%). El homogenizado se centrifugó a 21380 g por 15 min. El sobrenadante se colocó en microtubos de 1,5 ml y se almacenó a -20°C para posteriormente cuantificar proteínas totales y medir la actividad de la enzima.

Para la medición de la actividad catalítica se utilizó el protocolo propuesto por Rao *et al.* (1996),⁽⁷⁴⁾ que consistió de los siguientes reactivos: Fosfato de sodio 50 mM

pH 7,0, ascorbato sódico 0,4 mM y peróxido de hidrógeno 0,3 mM, al que se añadió 30 µl del extracto enzimático. El volumen final de la reacción fue de 1 ml. La disminución de la absorbancia a 290 nm se midió cada 5 seg durante 5 min a temperatura ambiente en un espectrofotómetro UV/Vis (ThermoSpectronic, Genesys 6,0). (Ver figura 2)

5.2.2.-MONODEHIDROASCORBATO REDUCTASA (MDHAR)

La extracción se realizó según Ma *et al.* (2003)⁽⁷⁷⁾, el que consistió en homogenizar en un mortero 0,01 g de la muestra vegetal y 1,2 ml de buffer de extracción (fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, EDTA 2 mM, Cloruro de magnesio 5 mM, Glicerol 2%, TritónX-100 0,25% (v/v), β-mercaptoetano 0,3% y PVP 3%), el homogenizado se centrifugó a 21380 g por 15 min. El sobrenadante se puso en microtubos de 1,5 ml y se almacenó a -20°C para posteriormente cuantificar proteínas totales y medir la actividad de las enzimas.

Para la medición de la actividad catalítica se utilizó el protocolo propuesto por Hossain *et al.* (1984),⁽⁷⁵⁾ que consistió de los siguientes reactivos: Fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, NADH 0,2 mM, ascorbato oxidasa 0,5 U /ml y L-ácido ascórbico 1 mM, al que se añadió 30 µl del extracto enzimático. El volumen final de la reacción fue de 1 ml. La disminución de la absorbancia a 340 nm se midió cada 5 seg durante 5 min a temperatura ambiente en un espectrofotómetro UV/Vis (ThermoSpectronic, Genesys 6,0). (Ver figura 2)

5.2.3.-DEHIDROASCORBATO REDUCTASA (DHAR)

La extracción se realizó según Ma *et al.* (2003).⁽⁷⁷⁾ Para la medición de la actividad catalítica se utilizó el protocolo propuesto por Foyer *et al.* (1976),⁽⁷⁶⁾ que consistió de los siguientes reactivos: Fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, DHA 0,5 mM y GSH 1mM, al que se añadió 30 µl del extracto enzimático. El volumen final fue de 1 ml, el aumento de la absorbancia a 265 nm se midió cada 5 seg durante 5

min a temperatura ambiente en un espectrofotómetro UV/Vis (ThermoSpectronic, Genesys 6,0). (Ver figura 2)

5.2.4.- GLUTATIÓN REDUCTASA (GR)

La extracción se realizó según Ma *et al.* (2003).⁽⁷⁷⁾ Para la medición de la actividad catalítica se utilizó el protocolo propuesto por Edwards *et al.* (1990),⁽⁶⁵⁾ que consistió de los siguientes reactivos: Fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, cloruro de magnesio 3 mM y glutatión oxidado 0,25 mM, al que se añadió 30 µl del extracto enzimático. El volumen final fue de 1 ml, la disminución de la absorbancia a 340 nm se midió cada 5 seg durante 5 min a temperatura ambiente en un espectrofotómetro UV/Vis (ThermoSpectronic, Genesys 6,0). (Ver figura 2)

5.3.- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

Se realizó por el método de Bradford.⁽⁷³⁾ Se prepararon soluciones estándares de albumina de suero bovino (BSA) de 0,03 mg /ml a 0,5 mg /ml y se obtuvo la ecuación de la recta (con un $R^2 > 0,99$) (Ver figura 3), la reacción consistía en mezclar 1 ml del reactivo de Bradford (azul de comassie G-250, etanol absoluto 5% y ácido orto fosfórico 10%), 50 µl de NaOH y 20 µl de cada estándar, y se procedía a realizar las lecturas a 596 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (ThermoSpectronic, Genesys 6,0). Con la ecuación de la recta y los datos de absorbancia de la muestra, se procedió a calcular la concentración de proteínas totales que contienen las muestras analizadas.

5.4.- RECOLECCIÓN DE DATOS DE LOS ENSAYOS

Se utilizó la observación directa, medición y registro de la absorbancia, se interpoló en las fórmulas correspondientes y se obtuvo la actividad catalítica de cada enzima de la vía de Halliwell-Asada.

6.-ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Los datos de la investigación, de cuantificación de proteínas totales y medición de las actividades catalíticas de las enzimas de la vía Halliwell-Asada fueron almacenados en una base de datos del programa Microsoft Excel 2010. Los análisis estadísticos (promedios, error estándar de la media, ANOVA y HSD de Tukey) se realizaron empleando el programa IBM SPSS Statistics v.21.

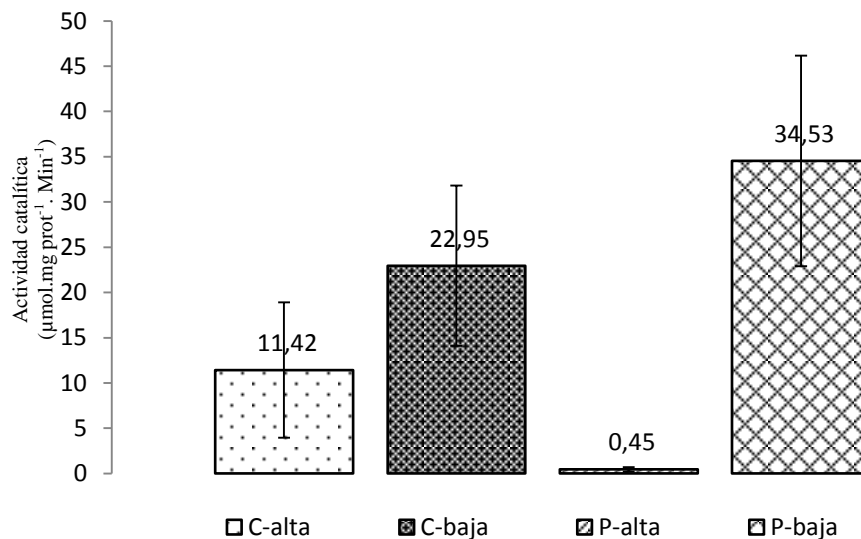
CAPÍTULO IV

1.- RESULTADOS

Todas las enzimas de la vía de Halliwell-Asada, mostraron actividad catalítica en cáscara y pulpa de frutos de *M. dubia*, pero solo las enzimas implicadas en el reciclaje presentaron mayor actividad catalítica en frutos con alto contenido de vitamina C.

APX presentó mayor actividad catalítica en frutos con bajo contenido de vitamina C y menor en frutos con alto contenido de vitamina C, mostrando diferencias estadísticas significativas en la pulpa ($F = 6,4$; $gl = 3$; $P = 0,05$) y dos veces más actividad catalítica en cáscara de frutos con bajo contenido de esta vitamina.

Gráfico 1: Actividad catalítica específica de APX ($\mu\text{mol.mg prot}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1}$) en cáscara y pulpa de frutos con alto y bajo contenido de vitamina C de *M. dubia*

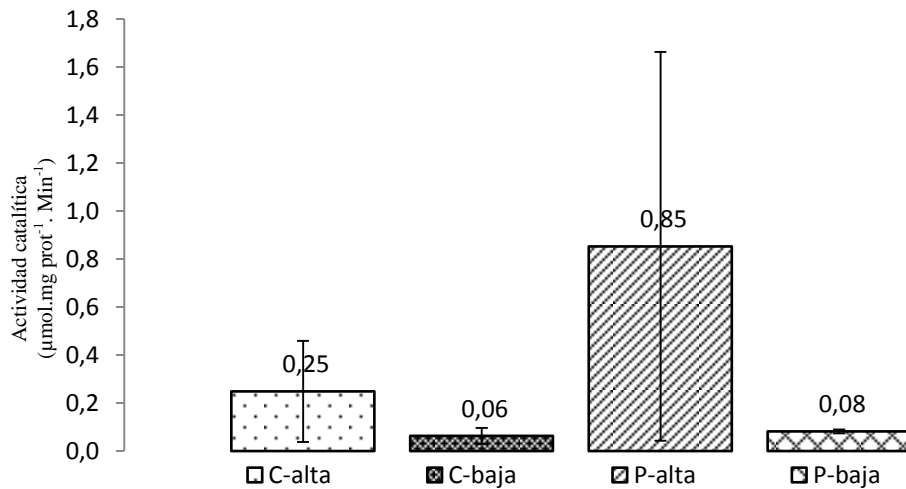


C-alta: Cáscara de frutos con alto contenido de vitamina C. C-baja: Cáscara de frutos con bajo contenido de vitamina C. P-alta: Pulpa de frutos con alto contenido de vitamina C, P-baja: Pulpa de frutos con bajo contenido de vitamina C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En el caso de la enzima MDHAR mostró mayor actividad catalítica en frutos con alto contenido de vitamina C, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, se observó cuatro veces más actividad catalítica en cáscara de frutos con alto contenido de vitamina C que en cáscara de frutos con

bajo contenido de esta vitamina, mientras que en pulpa la actividad catalítica fue once veces más.

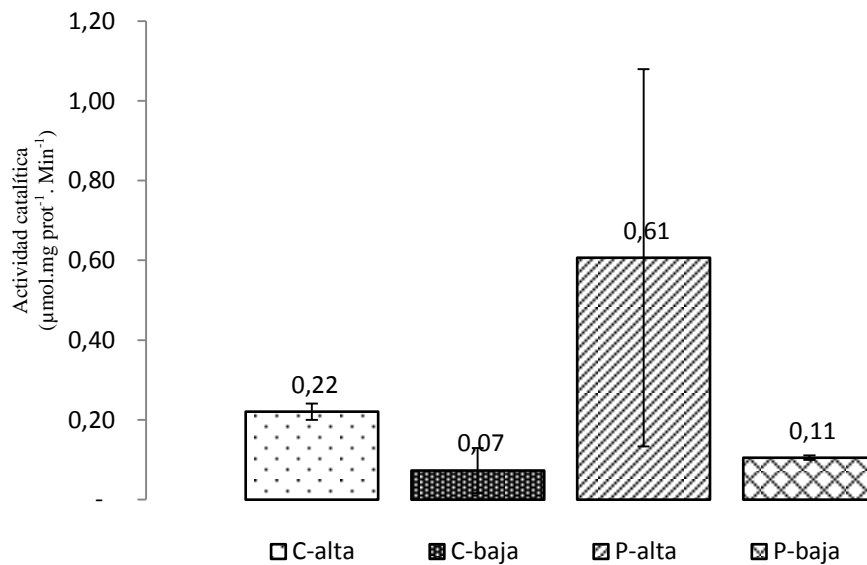
Gráfico 2: Actividad catalítica específica de MDHAR ($\mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{Min}^{-1}$) en cáscara y pulpa de frutos con alto y bajo contenido de vitamina C de *M. dubia*.



C-alta: Cáscara de frutos con alto contenido de vitamina C. C-baja: Cáscara de frutos con bajo contenido de vitamina C. P-alta: Pulpa de frutos con alto contenido de vitamina C, P-baja: Pulpa de frutos con bajo contenido de vitamina C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

La enzima DHAR también exhibió mayor actividad catalítica en frutos con alto contenido de vitamina C, pero no mostro una diferencia estadísticamente significativa ($F = 2,11$; $gl = 0,12$; $P = 0,24$), no obstante, la actividad catalítica aumento tres veces más en cáscara y seis veces más en pulpa de frutos con alto contenido de vitamina C.

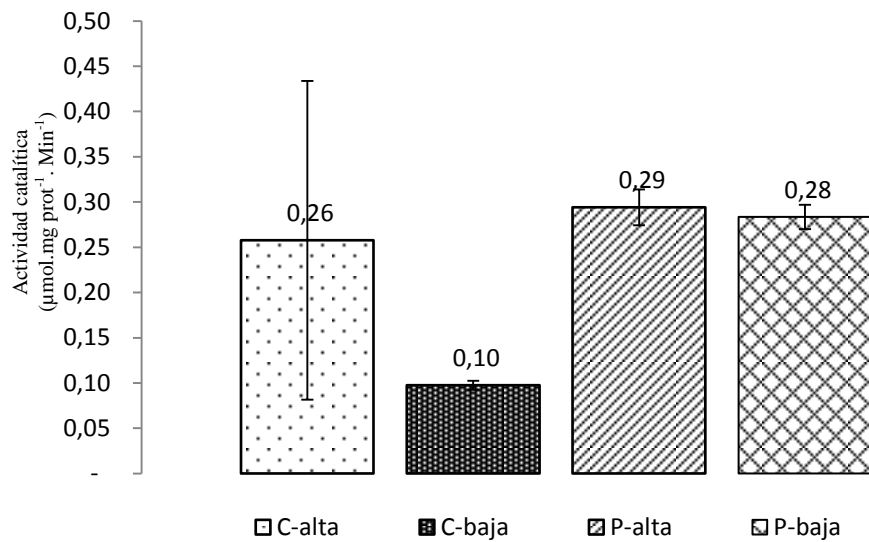
Gráfico 3: Actividad catalítica específica de DHAR ($\mu\text{mol.mg prot}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1}$) en cáscara y pulpa de frutos con alto y bajo contenido de vitamina C de *M. dubia*



C-alta: Cáscara de frutos con alto contenido de vitamina C. C-baja: Cáscara de frutos con bajo contenido de vitamina C. P-alta: Pulpa de frutos con alto contenido de vitamina C, P-baja: Pulpa de frutos con bajo contenido de vitamina C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

La actividad catalítica de GR aumento tres veces más en cáscara de frutos con alto contenido de vitamina C, mientras en pulpa no se observa una gran diferencia ya que GR presentó una actividad catalítica de $0,29 \pm 0,02$ y $0,28 \pm 0,01$ $\mu\text{mol.mg prot}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1}$ para frutos con alto y bajo contenido de vitamina C, respectivamente.

Gráfico 4: Actividad catalítica específica de GR ($\mu\text{mol.mg prot}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1}$) en cáscara y pulpa de frutos con alto y bajo contenido de vitamina C de *M. dubia*



C-alta: Cáscara de frutos con alto contenido de vitamina C. C-baja: Cáscara de frutos con bajo contenido de vitamina C. P-alta: Pulpa de frutos con alto contenido de vitamina C, P-baja: Pulpa de frutos con bajo contenido de vitamina C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

2.- DISCUSIÓN

M. dubia, es un fruto de gran importancia por su elevado contenido de vitamina C, además de contener otras sustancias de mucho interés para la salud humana. ⁽³⁻⁵⁾ Sin embargo, la más grande dificultad que presenta, es la amplia variación en la producción de vitamina C entre plantas, ⁽²¹⁾ lo que se debe principalmente a la influencia genética ^(21,22) y ambiental. ⁽⁷⁹⁾ La influencia genética se evidencia por la actividad catalítica diferencial de enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler. ^(21,22) Además como se demuestra en este estudio las enzimas de la vía de Halliwell-Asada particularmente MDHAR, DHAR y GR también están involucrados, ya que una regeneración eficaz de esta vitamina, es vital para mantener constante su contenido total en plantas. ^(24, 27,28, 39.)

La importancia de la enzima MDHAR y DHAR en el reciclaje y por ende en la acumulación de esta vitamina en tejidos vegetales han sido demostradas en plantas transgénicas por Zong *et al.* (2003)⁽²⁷⁾ que mencionan que el contenido de la vitamina C en tabaco y maíz aumento de dos a cuatro veces, por la sobreexpresión de DHAR y que MDHAR también puede estar involucrada en reciclaje de vitamina C. Además Li *et al.* (2010), ⁽³⁵⁾ señala que MDHAR y DHAR puede desempeñar un papel importante en mantener niveles altos de vitamina C en diferentes estadios de maduración en frutos de kiwi.

Por sus parte Eltayeb *et al.* (2007)⁽³²⁾ y Zong *et al* (2004) ⁽²⁸⁾ indican que la sobreexpresión de MDHAR en tabaco aumenta los niveles de vitamina C, confiriendo tolerancia a las plantas frente al estrés y que DHAR es la enzima responsable de regenerar la vitamina C de su forma oxidada, mantenido constante los niveles de esta vitamina en plantas y evitando así su pérdida irreversible en cuestión de minutos. ^(25,80.) Probablemente es por eso que MDHAR y DHAR presentan una mayor actividad catalítica en plantas con mayor contenido de esta vitamina, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa, sin embargo, se han identificado como enzimas claves en el reciclaje de vitamina C en tejidos

vegetales, ^(24,35, 81) y por ende puede contribuir a mantener concentraciones adecuadas de esta vitamina. ⁽³⁰⁾

En el caso de GR, cuya participación en la vía de Halliwell- Asada como enzima recicladora fue demostrado por Foyer *et al.* (2000), ⁽²⁶⁾ también presenta una mayor actividad catalítica en plantas con mayor contenido de vitamina C, pero no presenta una diferencia estadísticamente significativa, quizás esto se deba a que estas enzimas participa en el reciclaje de manera indirecta, ya que solo aumenta en pequeñas proporciones el contenido total de vitamina C ⁽⁸²⁾.

Cabe recalcar que esta vía también tiene como función, eliminar especies reactivas de oxígeno (ERO). ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾ Esto es posible por la acción de la enzima APX, que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a agua por posterior oxidación de vitamina C a MDHA, es decir, que esta enzima utiliza esta vitamina como donador de electrones. ⁽⁶⁴⁾ Probablemente es por eso que presenta una mayor actividad catalítica en plantas con menor contenido de vitamina C. Barata *et al.* (2004), ⁽⁸⁶⁾ sugieren que una disminución en el contenido total de vitamina C se puede deber a una mayor actividad catalítica de APX. Posiblemente a un aumento en la actividad de esta enzima se deba a que estas plantas con menor contenido de vitamina C hayan estado sometidas a algún tipo de estrés biótico o abiótico, ya que esta enzima se expresa en estas condiciones. ⁽⁸³⁾

Si bien es cierto que las enzimas del reciclaje no presentaron una diferencia estadísticamente significativa, pero a pesar de esto mostraron mayor actividad catalítica en frutos con mayor contenido de vitamina C, es importante mencionar que en los sistemas biológicos aún los pequeños cambios en la actividad catalítica de las enzimas pueden hacer grandes diferencias en la producción de las sustancias como vitamina C.

3.- CONCLUSIONES

1. Con los protocolos empleados se extrajeron todas las enzimas de la vía de Halliwell-Asada a partir de cáscara y pulpa de *M. dubia*.
2. Las diferencias en el contenido de vitamina C en *M. dubia*, se atribuyen en parte, a la actividad catalítica variable de las enzimas de la vía de Halliwell-Asada. Particularmente APX presentó una mayor actividad catalítica en frutos con menor contenido de vitamina C. Mientras que MDHAR, DHAR y GR, presentaron mayor actividad catalítica en plantas con alto contenido de vitamina C.

4.- RECOMENDACIONES

- Corroborar los resultados obtenidos con estudios a nivel genético para tener bases más sólidas de la expresión de las enzimas de la vía de Halliwell-Asada en *M. dubia*.
- Purificar y Caracterizar las enzimas de la vía de Halliwell-Asada en *M. dubia*, con la finalidad de poder determinar diferentes parámetros cinéticos importantes como afinidad a sustrato, K_m , velocidad de reacción, y comparar dichas características con otras enzimas de otras especies.
- Realizar estudios moleculares y bioquímicos a nivel del metabolismo de la vitamina C en *M. dubia* en diferentes estadios de maduración para comprender mejor la variabilidad en la producción de esta vitamina para así poder controlarla y obtener frutos con contenido estandarizado de vitamina C, con mayor calidad y valor agregado.
- Determinar la actividad catalítica de las enzimas de la vía de Halliwell-Asada en plántulas con diferentes condiciones estresantes en fracciones celulares. Para evaluar si es que habrá un aumento o disminución en la expresión de los genes involucrados en esta vía, según los reportados en otras especies.

- Desarrollar estudios en *M. dubia*, para saber que otros metabolismos beneficiosos para la salud humana contiene.

5.- BIBLIOGRAFÍA

1. Blokhina, O., E. Virolainen, K.V. Fagerstedt. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91: 179-194.
2. Pinedo, M.P, Riva, R.R *et al.* (2001). Sistema de producción de camu camu en restinga. *iiap / pet, iquitos-perú*, 141 p.
3. Xammar, J.R; Donnamaria, M.C; (2006). Acción Farmacológica, Biofísicoquímica y Estructura Dinámica de la Vitamina C. *Acta Farm. Bonaerense* 25 (1): 145-54
4. Kivirikko, K.I; Myllyla, R (1985) Post-translational processing of procollagens. *Ann NY Acad Sci*460: 187-201
5. Peterofsky B (1991) Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of pro-collagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 54(supp): S1135-S1140
6. Peterofsky B (1991) Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of pro-collagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 54(supp): S1135-S1140
7. Charterjee, I .B (1978), Ascorbic acid metabolism. *World Rev. Nutr Diet*; 30:60-87
8. Wheeler GL, Jones M.A *et al.* (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365–369
9. Agius, F; Gonzalez, L.R *et al.* (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by over-expression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* 21, 177–181. Agricultura, Peru.

10. Loewus, F.A, (1999). Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry* 52, 193–210.
11. Wolucka B.A, Van Montagu M. (2003). GDP-mannose 3, 5-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47483–47490.
12. Wolucka BA, Van Montagu M. (2007). The VTC2 cycle and the de novo biosynthesis pathways for vitamin C in plants: an opinion. *Phytochemistry* 68, 2602–2613
13. Chew, O; Whelam, J *et al.* (2003). Molecular definition of the Ascorbate – glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plant. *J. Biol. Chem.* 278: 46869 – 46877
14. Ishiwara, T; Takeda *et al.* (1996). Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuma (*Brassica rapa*). *Plant Science* 120_ 11-18.
15. Jimenéz, A; Hernández, J.A *et al.* (1997). Evidence for the present of the ascorbate – glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant physiology.* 114: 275 – 284
16. Kieselbach, T; Bystedt, M. *et al.* (2000). A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to be Arabidopsis thylakoid lumen. *FEBS Letters* 480: 271 – 276
17. Flores, S. (1997). Cultivo de frutales nativos amazónicos: manual para el extensionista, Ed. Tratado de Cooperación Amazónica - Secretaría Pro Tempore. Pág.105-107.

18. Villachica, H. (1996). El cultivo del Camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) en la Amazonía Peruana. TCA / SPT, Limo N° 46, Pág. 95.
19. Potencial de Camu – camu y Sachainchi en el mercado estadounidense. Disponible en URL: www.iiap.org.pe/promamazonia/SBiocomercio/Upload/.../420.pdf
20. Lima Da Silva, M., (2006). Estudio de genes expresos em frutos de camu-camu: seqüenciamento de ESTS. Capitulo 4.
21. Castro, J.C; Gutiérrez, F; Araujo, A *et al.* (2012). Actividad de las enzimas de Smirnoff-Wheeler, Determina la variación de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia*”Camu-camu”, Centro de Investigación de recursos naturales. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Encuentro Científico Internacional- ECI - 2012
22. Castro, J.C; Gutiérrez, F; Imán, S *et al.* (2012). L- Galactosa deshidrogenasa y L- Gulono- 1,4 lactona deshidrogenasa influyen en la biosíntesis de vitamina C en *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh “camu-camu” Encuentro Científico Internacional -ECI - 2012
23. Dalton D,A, Hanus F,J, Russell S,A, Evans H,J (1987) Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant Physiol* 83: 789-794
24. Grantz, A.A; Brummell, D.A *et al.* (1995). Ascorbate free radical reductasa levels are induced by wounding. *Plant Physiology* 108: 411–418.
25. Smirnoff, N; Wheeler, G.L, (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 35:291-314
26. Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: a molecular approach. *New Phytol.* 146, 359–388.

27. Zhong, C; Todd, E *et al.* (2003). Increasing vitamin c content of plants through enhanced ascorbate recycling. 1p.
28. Chen. Z, Gallie, D, (2004). Dehydroascorbate Reductase Affects Leaf Growth, Development, and Function. *Plant Physiol Biochem*; 142(2):775-787.
29. Chen Z, Gallie DR (2005) Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. *Plant Physiol* 138: 1673–1689
30. Ishikawa T; Dowdle J *et al.* (2006) Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiol Plantarum*, 126(3):343-355.
31. Cervilla, L.M; Begoña, J.,J *et al.* (2007). Oxidative stress and antioxidants in tomato (*solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity.
32. Eltayeb A.E., Kawano N., Badawi G.H., Kaminaka H., Sanekata T., Shibahara T, Inanaga S., Tanaka K. (2007) Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* 225, 1255–1264.
33. Stevens R, Page D, Gouble B, Garchery C, Zamir D, *et al.* (2008) Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant Cell Environ* 31: 1086–1096.
34. Melino, J. V; Soole, L. K *et al.* (2009). Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC Plant Biology*, 9: 145. Pág. 8
35. Li M, Ma F, Liang D, Li J, Wang Y (2010) Ascorbate Biosynthesis during Early Fruit Development Is the Main Reason for Its Accumulation in Kiwi. *PLoS ONE* 5(12): e14281. doi:10.1371/journal.pone.0014281

36. Pinedo, M; Linares, C *et al.* (2004). Plan de mejoramiento genético de Camu-camu, Iquitos-Perú. Pag. 6
37. Vásquez, M.R (1997). Florula de las reservas biológicas de Iquitos, Perú. allpahuayo - mishana. missouri botanical garden. 1046 p.
38. Vásquez, A; Peters, C.M (1988) - Estudios eco lógicos de camu camu (*Myrciaria dubia*) producción de frutos en poblaciones naturales. *Folia Amazonica*, 1: 83 98.
39. Alvarado, V.M (1969). Posibilidades del cultivo del Camu-camu en el Perú, *Myrciaria dubia*. Monografía, Pontifica Universidad Católica del Perú. *Anal. Biochem.* 204, 1–14.
40. Picon, B. C; Acosta, V.A (1999) Manual de los sistemas de producción de camu camu en selva baja. Iquitos (Perú), Centro de Estudio y Promoción de Tecnologías de Especies Nativas de la Amazonía, Iquitos, 20 p.
41. Sakihama, Y; Mano, JI *et al.*(2000). Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *bioch. bioph. res. comm.*, v. 279, pp. 949–954.
42. Conservatorio de jardines botánicos “Myrtaceae”, (2011). Disponible en URL: www.ville-ge.ch/cjb/fdp/claves/pdf/myrt.pdf
43. Revista de Agroecología. Disponible en URL: <http://www.alphanatura.com/exportproduct/ESP/np3-04-1.html>
44. Vivas, D; Hoyos, S *et al* (2003). Relevamiento de técnicas analíticas para la investigación de Vitamina C en mieles. Departamento de química. Facultad de agroindustrias. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
45. Vitamina C. Disponible en URL: http://www.acidoascorbico.com/vitamina_c

46. Arrigoni, O; De Tullio, M (2000). The role of ascorbic acid in cell metabolism between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology* 157, 481–488.
47. Basadre, T.B (2000). Funciones de la vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Revista Cubana: Aliment nutrition: 14(1): 46 – 54.*
48. Linster, CL; Gomez, TA. *et.al.* (2007). Arabidopsis VTC2 encodes a GDP-Lgalactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff– Wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *Journal of Biological Chemistry* 282, 18879–18885.
49. Washko, PW. Welch, R. W. *et al.* (1992) Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393, 365–369.
50. Noctor, G; Foyer, CH. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annul. Rev. Plant physiol. plant mol. biol.*, v. 49, pp. 249–79.
51. Glaser, R; Rabin, B *et al.* (1999). Stress induced immunomodulation: implications for infectious. *JAMA Pp: 281: 2268 – 2270*
52. Martins, L. L; Mourato, M. P. (2008). Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. *Revista Agros* 8.
53. Leterrier, M; Corpas, F.J.*et al.* (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant physiology*, V. 138, pp. 2111–2123.

54. Obara, K.S; Kazuyoshi, FH, (2002) the use of multiple transcription starts causes the adual targeting of arabidopsis putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplast. *plant cell physiol*, v. 43, n. 7, pp. 697-705.
55. Levine, M; Dhariwal; K.R. *et al.* (1991). Ascorbic acid and in situ kinetics: a new approach to vitamin requirements. *Am J Clin Nutr* 54(supp): S1157-S1162
56. Pastori, G.M; Kiddle, G. *et al.*(2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell* 15: 939-951
57. Alhag Dow, M; Mounet, F *et al.* (2007). Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiology* 145, 1408–1422.
58. Dowdle, J; Ishikawa, T. *et al.* (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal* 52, 673–689.
59. Davey, M.D; Van Montagu, M. *et al.* (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 825–860.
60. Vandamme, E.J. (1992). Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *J Chem Tech Biotechnol* 53. Pp: 313 – 327.
61. Palma Martin, F.J. (2009). Respuestas inducidas por acido abscisico y acido salicílico en las simbiosis de judía y alfalfa en estrés salinos. Departamento de fisiología vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada – España

62. Pórtela, M. L. (1994) Vitaminas y minerales en nutrición. Ed. López.P. 23-45
63. Kaufman, S (1974) Dopamine-beta-hydroxylase. J Psychiatr Res 11: 303-316
64. Dunn, W.A; Rettura, G *et al.* (1984) Carnitine Biosynthesis from γ -Butyrobetaine and from Exogenous Protein-bound 6-N-Trimethyl-L-lysine by the Perfused Guinea Pig Liver. J Biol Chem 259: 10764-10770.
65. Edwards, E.A; Rawsthorne,S. *et al.*(1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum*). Planta: 180: 278-284
66. Eipper, B.A; Milgram, S.L. *et al.* (1993). Peptidylglycine alpha amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains. Prot Sci 2: 489-497.
67. Eipper, B; Stoffers, D.A. *et al.* (1992). The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha amidation. Annu Rev Neurosci 15:57-85.
68. Rebouche, C.J (1991) Ascorbic acid and cartinine biosynthesis. Am J Clin Nutr 54(supp): S1147-S1152
69. Szent-Gyorgyi, A (1928). Observation on the function of the peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. Description of a new carbohydrate derivative. Biochem J 22: 1387-1409.
70. Murray, R; Granner, D *et al.* (1993) Bioquímica Harper. Ed. Manual Moderno
71. Lynch, S.R; Cook, J.D. (1980) Interaction of vitamin C and Iron. Annals of the New York. Academy ofsciences . V 355 Pp: 32 – 43.

72. Vitamin C, Its chemistry and Biochemistry (1991).The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park 0-85 186-333-7. Cambridge - England
73. Bradford, M. M (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding Anal. Biochem. 72, 248–254.
74. Rao M.V, Paliyath G, Ormrod D.P. (1996). Ultraviolet-B radiation and ozone-induced biochemical changes in the antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 110: 125-136
75. Hossain, M.A; Nakano, Y. *et al.* (1984). Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. Plant and cell physiology 25: 385 – 395.
76. Foyer,C; Halliwell, B.(1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133, 21-25
77. Ma, F.W; Cheng, L.L (2003). The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shade peel. Plant Sci 165: 819–827.
78. Vanacker H., Carver T.L.W., Foyer C.H. (1998) Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. Plant Physiology 117, 1103–1114.
79. Teixeira. A. S; Chaves. L, Yuyama, K. (2004). Esterases for examining the population structure of camu camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh-Myrtaceae). Acta Amazonica. 34 (1): 89-96.

80. András Szarka,¹ Bálint Tomasskovics,¹ and Gábor Bánhegyi(año). The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response.
81. Asada K (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* . 50:601-639.
82. Foyer,C.H; Souriau, N *et al.*(1995). Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol* 109: 1047–1057.
83. Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9):405-410.
84. Smirnoff, N. (1996). Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, 78: 661-669.
85. Blokhina, OE,. Virolainen, KV. Fagerstedt. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91: 179-194.
86. Barata. A, Gomez. M, Mesquita. C, Lajolo. F (2004). Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Plant Physiol*, 16(3): 147-154)

ANEXOS

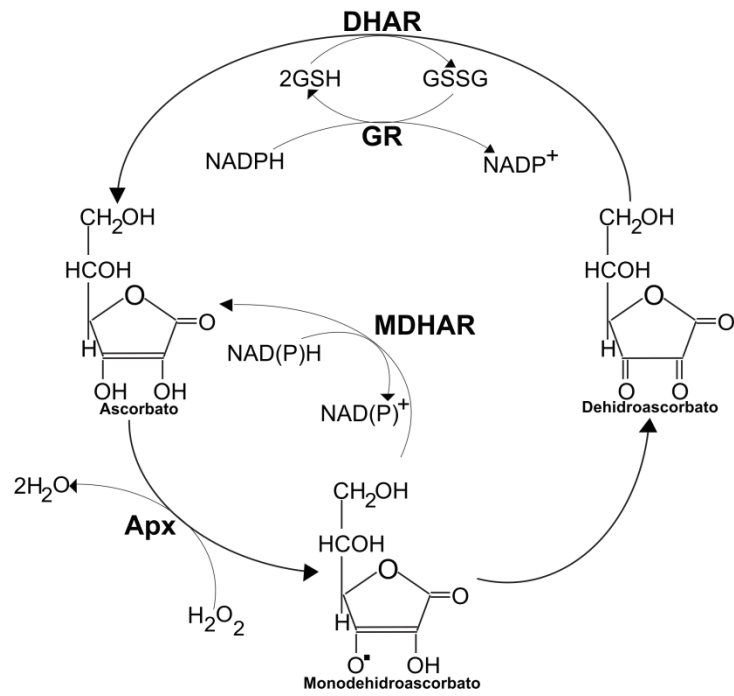


FIGURA 1. Ciclo de Halliwell-Asada en plantas

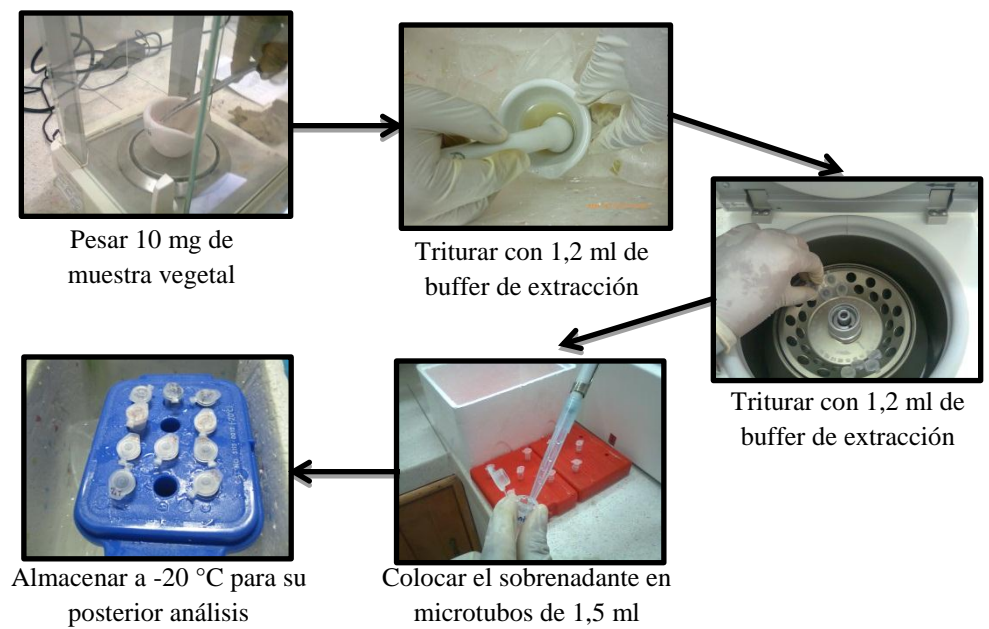


FIGURA 2. Flujograma de extracción de enzimas del ciclo de Halliwell-asada en *M. dubia*.

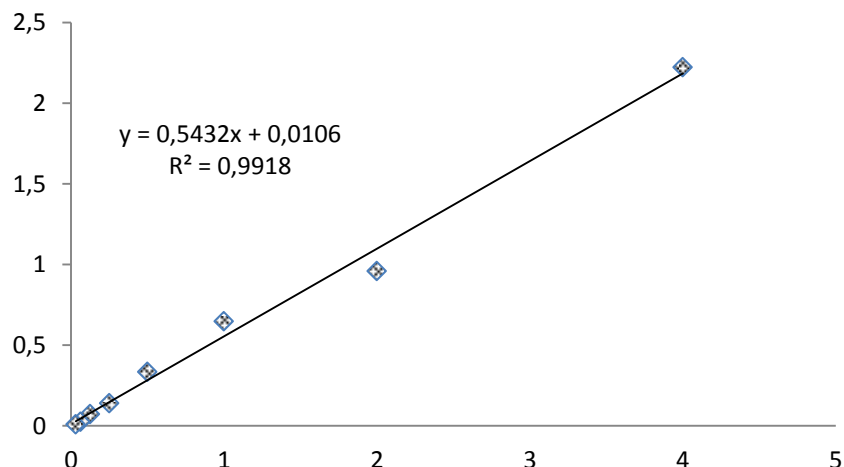


FIGURA 3. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales (mg /ml).

Tabla 1. Condición cada la actividad catalítica de APX (Método de Rao *et al.* 1996)

Condiciones para 30 μ l de muestra			
Ítem	Volumen (μ l)	Concentración final (mM)	Stock (mM)
Fosfato de sodio pH 7,0	50	50	1000
Ascorbato de sodio	10	0,4	40
Peróxido de hidrógeno	17	0,3 U/ml	16
Muestra	30	Temperatura 25°C a una absorbancia de 290nm.	
Agua	893		

Tabla 2. Condiciones para la actividad catalítica de MDHAR (Método de Hossain *et al.* 1984).

Condiciones para 30 μ l de muestra			
Ítem	Volumen (μ l)	Concentración (mM)	Stock (mM)
Fosfato de sodio pH 7,0	50	50	1000
Ascorbato sódico	25	1	40
Ascorbato oxidasa	5	0,5 U/ml	100 U/ml
NADH	16	0,2	16
Muestra	25	Temperatura 25°C a una absorbancia de 340nm.	
Agua	879		

Tabla 3. Condiciones para la actividad catalítica de DHAR (Método de Foyer *et al.* 1976).

Condiciones de muestra para 30 µl de muestra			
Ítem	Volumen (µl)	Concentración (mM)	Stock (mM)
Fosfato de potasio pH 7,0	50	50	1000
DHA	9	0.5	56,6
GSH	34	1	29,28
Muestra	30	Temperatura 25°C a una absorbancia de 265nm.	
Agua	880		

Tabla 4. Condiciones para la actividad catalítica de GR (Método de Edwards *et al.* 1990)

Condiciones de muestra para 30 µl de muestra			
Ítem	Volumen (µl)	Concentración (mM)	Stock (mM)
Fosfato de sodio pH 7,0	50	50	1000
EDTA	500	1	10
Cloruro de magnesio	3	3	20
Glutación oxidado	5	0,25	5
NADPH	2	0,2	4
Muestra	30	Temperatura 25°C a una absorbancia de 340nm.	
Agua	860		

Tabla 5. Estadística descriptiva del análisis de varianza. APX Ca: cáscara de fruto con alto contenido de vitamina C, Pa: Pulpa de fruto con alto contenido de vitamina C, Cb: cáscara de fruto con bajo contenido de vitamina C, Pb: pulpa de fruto con bajo contenido de vitamina C. APX: Ascorbato peroxidasa, MDHAR: Monodehidroascorbato reductasa, DHAR: Dehidroascorbato reductasa, GR: Glutación reductasa.

		Estadística Descriptiva							
		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
APX	Ca	2	11,42	7,47	5,29	-55,73	78,57	6,14	16,71
	Pa	2	0,45	0,24	0,17	-1,72	2,62	0,28	0,62
	Cb	2	22,95	8,85	6,26	-56,57	102,46	16,69	29,20
	Pb	2	34,53	11,63	8,22	-69,93	138,98	26,31	42,75
	Total	8	17,34	14,95	5,28	4,84	29,83	0,28	42,75
MDHAR	Ca	2	0,25	0,21	0,15	-1,64	2,14	0,10	0,40
	Pa	2	0,85	0,81	0,57	-6,43	8,13	0,28	1,43
	Cb	2	0,06	0,03	0,02	-0,24	0,36	0,04	0,09
	Pb	2	0,08	0,01	0,01	0,01	0,16	0,08	0,09
	Total	8	0,31	0,47	0,17	-0,08	0,70	0,04	1,43
DHAR	Ca	2	0,22	0,02	0,01	0,04	0,40	0,21	0,24
	Pa	2	0,61	0,47	0,33	-3,64	4,86	0,27	0,94
	Cb	2	0,07	0,06	0,04	-0,44	0,58	0,03	0,11
	Pb	2	0,11	0,01	0,00	0,05	0,16	0,10	0,11
	Total	8	0,25	0,29	0,10	0,01	0,49	0,03	0,94
GR	Ca	2	0,26	0,18	0,12	-1,32	1,84	0,13	0,38
	Pa	2	0,29	0,02	0,01	0,12	0,47	0,28	0,31
	Cb	2	0,10	0,00	0,00	0,05	0,14	0,09	0,10
	Pb	2	0,28	0,01	0,01	0,16	0,40	0,27	0,29
	Total	8	0,23	0,11	0,04	0,14	0,32	0,09	0,38

Tabla 6. Análisis de varianza de un factor para las Enzimas de la vía de Halliwell-Asada

		ANOVA de un factor				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
APX	Inter-grupos	1294,16	3,00	431,39	6,41	0,05
	Intra-grupos	269,40	4,00	67,35		
	Total	1563,56	7,00			
MDHAR	Inter-grupos	0,82	3,00	0,27	1,56	0,33
	Intra-grupos	0,70	4,00	0,18		
	Total	1,52	7,00			
DHAR	Inter-grupos	0,36	3,00	0,12	2,11	0,24
	Intra-grupos	0,23	4,00	0,06		
	Total	0,59	7,00			
GR	Inter-grupos	0,05	3,00	0,02	2,13	0,24
	Intra-grupos	0,03	4,00	0,01		
	Total	0,08	7,00			

Tabla 7. Comparaciones múltiples para Ascorbato peroxidasa

		Comparaciones múltiples					
Variable dependiente		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
APX	Ca	Pa	10,97	8,21	0,59	22,44	44,38
		Pb	23,10	8,21	0,15	56,51	10,30
	Pb	Ca	10,97	8,21	0,59	44,38	22,44
		Pb	-34,076000*	8,21	0,05	67,48	0,67
	Ca	Pa	11,52	8,21	0,56	21,88	44,93
		Pb	22,50	8,21	0,16	10,91	55,90
	Pb	Ca	11,58	8,21	0,55	44,99	21,83
		Pb	23,10	8,21	0,15	10,30	56,51
	Ca	Pa	34,076000*	8,21	0,05	0,67	67,48
		Pb	11,58	8,21	0,55	21,83	44,99