

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TRABAJO FINAL DE CARRERA

TITULO

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO
Y TRATAMIENTOS CON EXTRACTOS ENZIMÁTICOS EN PULPA DE
(*Myrciaria dubia* HBK) CAMU CAMU”

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTADO POR LA BACHILLER

URSULA VANESSA MONTEIRO TEMMERMAN

Asesorado por:

Dr. Alenguer G. Alva Arévalo

Dr. Víctor E. Sotero Solís

IQUITOS-PERÚ

2014

DEDICATORIA

A mis Padres que guiados por Dios, brindan su amor, dedicación y paciencia para ser una persona de bien. A mi niño Daniel Eduardo que cada día me regala una hermosa sonrisa que alegra mi día.

AGRADECIMIENTO.

A Dios que me guía siempre por el buen camino.

A una gran amiga, mi mamá Mike Temmerman Nogueira, agradezco tu amor, dedicación, paciencia, consejos, riñas, para llegar ser una persona de bien.

A mis asesores Dr. Víctor Sotero; Dr. Alenguer Alva y a la Dra. Dora García por sus conocimientos, profesionalismo y dedicación de guiarme para la buena realización de este trabajo,

A mis colegas y compañeros Erika J.Dávila.G., Claudia Merino.Z., Elías Vela.P., Priscila Suarez, y Heinz C. Rebata., por el apoyo de manera especial que me brindaron para la realización de este trabajo, compartiendo sus conocimientos profesionales.

A los demás amigos y colegas que de una manera especial me apoyaron durante la realización de este trabajo.

INDICE

	pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	01
IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	03
HIPÓTESIS	04
JUSTIFICACIÓN	04
OBJETIVOS	06
REVISIÓN DE LITERATURA	
I.- ANTECEDENTES	07
II.- MARCO TEÓRICO	09
2.1. Myrciaria dubia H.B.K (Camu-Camu)	09
2.1.1. Aspectos Botánicos	09
2.1.2. Descripción Botánica	10
2.1.3. Origen y Distribución	12
2.1.4. La Planta y su Cultivo	13
2.1.5. Valor Nutricional y Económico	18
2.1.6. La Fruta Fresca	21
2.1.7. La Pulpa	21
2.1.8. Clasificación y requisitos del Camu-Camu para fines industriales	22
2.2. VITAMINA C O ÁCIDO ASCÓRBICO (AA)	26
2.3. ENZIMAS Y SU IMPORTANCIA EN LOS ALIMENTOS	29
2.3.1. Aspectos Generales de las Enzimas	29
2.3.2. Fuentes de Obtención de las Enzimas	29
2.3.3. Clasificación de las Enzimas	32

2.3.4. Las Enzimas en Procesos Industriales	37
2.3.5. Aplicaciones Enzimáticas para Cítricos y Frutas Tropicales	40
2.4. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	45
2.4.1. Selección de un Método Analítico	45
2.4.1.1. Características del Analito	45
2.4.1.2. Características de la Matriz.....	45
2.4.2. Requisitos o Criterios de Validación	46
A. Exactitud (Precisión y Veracidad o Justeza)	46
B. Selectividad	51
C. Linealidad.....	52
D. Sensibilidad de Calibrado	53
E. Limite de Detección y Cuantificación	54
F. Tolerancia o Fortaleza	55
III. Marco Conceptual	
3.1. Compuestos Fenólicos	56
3.1.2. Polifenoles	56
3.1.3 Antocianinas.....	57
3.1.4. Catequinas y Proantocianidinas	59
3.2. Hierro en los alimentos	60
IV. Materiales y Métodos	
4.1. Lugar de realización del trabajo	62
4.2. Materiales.....	62
4.3. Tipo y Diseño de Investigación	64
4.4. Definiciones de Variables.....	66
4.5. Descripción de cada proceso de trabajo	65

4.5.1. Colección y extracción de pulpa de camu-camu	65
4.5.2. Tratamiento enzimático en pulpa de camu-camu	66
4.5.3. Validación del método de determinación del Acido Ascórbico	67
4.5.4. Otros análisis	70
V. Resultados	75
VI. Discusiones	84
VII: Conclusiones	87
VII: Recomendaciones	89
VII: Referencias Bibliográficas	90
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1: Arbusto del fruto de Camu-Camu	10
Figura N° 2: Fruto de Camu-Camu en su rama	11
Figura N° 3: Mapa de distribución geográficas de poblaciones Naturales de Camu-Camu	12
Figura N° 4: Semilla de Camu-Camu	15
Figura N° 5: Siembra de semilla de Camu-Camu	15
Figura N° 6: Cama germinadora	15
Figura N° 7: Plántulas en cama germinadora	15
Figura N° 8: Plantaciones de Camu-Camu	17
Figura N° 9: Piojo Saltador del Camu-Camu	18
Figura N° 10: Fruta fresca de camu-camu	21
Figura N° 11: Ácido ascórbico en sus dos formas	28
Figura N° 12: Estructura química del polifenol	58
Figura N° 13: Estructura Química de la Antocianina y Catequina	60
Figura N° 14: Curva de Calibración del Fierro (Fe)	75
Figura N° 15: Curva de calibración estándar de AA.....	77
Figura N° 16: Grafico de cuantificación del AA en pulpa de Camu-Camu tratadas con Extractos Enzimáticos	81
Figura N° 17: Grafico de cuantificación de los compuestos fenólicos en pulpa de Camu-Camu tratadas con Extractos Enzimáticos	83

Lista de Cuadros

Cuadro 1: Composición Nutricional en 100 g de pulpa comestible	20
Cuadro 2: Clasificación del fruto por su estado de madurez.....	23
Cuadro 3: Clasificación del fruto por su tamaño.....	23
Cuadro 4: Clasificación del fruto por su contenido de AA	23
Cuadro 5: Clasificación por sus características organolépticas	23
Cuadro 6: Características organolépticas del Camu-Camu	25
Cuadro 7: Orígenes de algunas enzimas	31
Cuadro 8: Aplicaciones enzimáticas endógenas en diferentes tipos de frutas	42

Lista de Tablas

Tabla 1: Concentraciones de enzimas con el tiempo de tratamiento	65
Tabla 2: De diseño experimental para las enzimas	65
Tabla 3: Concentraciones de estándares de AA (mg/ml)	68
Tabla 4: Concentraciones de tratamiento enzimático en pulpa de camu-camu	70
Tabla 5: Concentraciones estándares de AA para la curva de calibración	76
Tabla 6: Sensibilidad del AA ascórbico a concentraciones de estándares mínimas a la curva de calibración.....	77
Tabla 7: Repetibilidad de un patrón de 10,0 mg/L de AA medido en cuatro días consecutivos	78
Tabla 8: Estabilidad del método de determinación del AA a diferentes temperaturas	79
Tabla 9: Cuantificación del AA en pulpa de Camu-Camu con Extractos Enzimáticos	80
Tabla 10: Compuestos Fenólicos Presentes en Pulpa de camu-camu con tratamiento enzimático	82
Tabla 11: Concentraciones de Hierro en pulpa de camu-camu con tratamiento enzimático	83

RESUMEN

Este trabajo se procedió a validar el método de análisis del ácido ascórbico (AA), utilizándose el equipo de cromatografía líquido de alta resolución (HPLC), preparando soluciones patrones de ácido ascórbico entre 1.5 y 40.0 mg/L, obteniéndose un $R \geq 0.9918$, $R_2 \geq 0.9838$ y Coeficiente de variación $CV \leq 5.00$. Con pulpa del fruto *Myrciaria dubia* H.B.K. (camu-camu), para el incremento de ácido ascórbico (AA) se utilizó dos extractos enzimáticos; el FoodPro™ Viscothim GC (Extracto de Enzima A) y Pektozyme™ MaxLiq (Extracto de Enzima B), con concentraciones de 50, 100 y 600 mg/L (ppm), a temperatura constante de 48°C, en tiempos de 35 y 120 minutos. El incremento de AA con Enzima A es de 10.37%, 15,01%, 13,59%, 51.08%, y con Enzima B es de 19.22%. Los análisis de hierro y compuestos fenólicos, se realizó mediante el equipo de absorción atómica y espectrofotometría Uv/visible.

Palabras Claves: *Myrciaria Dubia* HBK., Validación, Acido Ascórbico, FoodPro™ Viscothim GC, Pektozyme™ MaxLiq, fenólicos, Hierro,

ABSTRACT

This work proceeded to validate the method of analysis of ascorbic acid (AA) using equipment liquid chromatography (HPLC), paving patterns ascorbic acid solutions between 1.5 and 40.0 mg / L, yielding an $R \geq 0.9918$, $R_2 \geq 0.9838$ and coefficient of variation $CV \leq 5.00$. With *Myrciaria dubia* fruit pulp H.B.K. (camu-camu) to the increase of ascorbic acid (AA) two enzyme extracts were used; FoodPro™ Viscothim the GC (From Enzyme A) and Pektozyme™ MaxLiq (From Enzyme B), with concentrations of 50, 100 and 600 mg / L (ppm) at constant temperature of 48°C, in times of 35 and 120 minutes. AA increased Enzyme A is of 10.37%, 15.01%, 13.59%, 51.08%, and Enzyme B is 19.22%. Iron analysis and phenolic compounds, was performed by atomic absorption equipment and UV / Visible Spectrophotometry.

Key Words: *Myrciaria Dubia* HBK., Validation, Ascorbic Acid, FoodPro™ Viscothim GC, Pektozyme™ MaxLiq, Polyphenols, Iron.

INTRODUCCIÓN

El Camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.) es uno de los frutales nativos de la Amazonía Peruana que resalta de forma productiva y económica por su alto contenido de vitamina C (ácido ascórbico), de aproximadamente 2800 mg/100g de pulpa fresca, superando otros frutos como la naranja (92 mg/100 g de pulpa), limón (44.2 mg/100 g de pulpa). También sobresale por su contenido de polifenoles totales, aminoácidos esenciales como la valina, leucina y otros. Debido a estas características el fruto presenta un gran interés agroindustrial, farmacéutica, cosmetológica. (Villachica, 1998).

La vitamina C ha sido reconocida como un nutrimento importante en varios productos alimenticios. La importancia de esta vitamina es bien entendida, particularmente como antioxidante y en la síntesis de colágeno. Debido a su fácil degradación, la vitamina C es un compuesto muy utilizado en la tecnología de alimentos como índice de calidad nutricional de las comidas procesadas. Se dice que si esta vitamina resiste los tratamientos térmicos de los alimentos, todos los demás nutrientes se encuentran en buen estado. El ácido ascórbico (AA) es un nutrimento esencial para los humanos. Una baja ingesta causa una enfermedad, por deficiencia, conocida como escorbuto. Este ácido está presente en forma natural en muchas frutas y verduras, además, estos alimentos son ricos en vitaminas antioxidantes, compuestos fenólicos y carotenos. (Ledezma, 2005).

La enzima es una molécula de proteína con funciones muy específicas por parte de cada una de ellas. En realidad, podemos decir que la enzima tiene una estructura energética, y una estructura química. La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria son enzimas extracelulares de origen microbianos, gran parte de estas enzimas se utilizan en forma solubles libres y no se recuperan para su reutilización. Los tratamientos enzimáticos en frutas son de importancia, sobre todo en la industria de procesos de frutas tropicales donde se aplican enzimas con actividades de extracción, reducción de viscosidad, clarificación, filtración, mejorando la calidad de sus características fisicoquímicas, organolépticas, como también en la economía y aumento de flexibilidad del proceso, aprovechando más las materias primas. (Renneberg, 2008).

El objetivo principal de la validación analítica es el de asegurar que un procedimiento analítico dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto. Está directamente relacionada con la palabra calidad, es el proceso que permite establecer que características del funcionamiento del método son adecuadas para la aplicación que se pretende y obtener los mejores resultados, se deben considerarse todas las variables del método que incluyen etapa de muestreo, preparación de la muestra, detección y evaluación de los datos, es decir considerando todas las etapas del esquema. Los métodos analíticos validados permiten obtener datos fiables por lo que facilitan las transacciones comerciales basadas en la aceptación mutua de los datos. Hecho pueden ser validados los métodos analíticos, instrumentos, el personal, etc. y en este sentido aumenta cada día más las exigencias a nivel internacional. (Zumbado, 2004). Y uno de los objetivos de este estudio es validar un método para la determinación de ácido ascórbico (AA) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando como matriz pulpa de camu- camu (*Myrciari dubia* H.B.K). analizando en el equipo HPLC de marca Elite Lachrom utilizando columna LiChrocart RP18 (250 x 4.6 mm).

IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

IDENTIFICACIÓN.

- Existen métodos conocidos como el volumétrico o espectrofotométrico para la determinación del contenido de AA en frutos naturales, para la obtención de un buen resultado de análisis, es preciso seleccionar un método validado que nos dé resultados reproducibles y confiables, que sean adecuados para el propósito previsto, siendo el más viable y exacto mediante el método analítico por HPLC, aunque aún no ha sido validado para el análisis del AA en pulpa de camu-camu.
- *Myrciaria dubia* H.B.K. (camu-camu) es un fruto nativo de la amazonia, es de gran interés para su comercialización nacional e internacional, debido a su alto contenido de ácido ascórbico (AA). En la industria de alimentos se elaboran productos a partir de la pulpa como néctares, zumos, helados, mermeladas, y otros, procesos del cual experimentan disminución por diferentes parámetros de tratamiento durante la elaboración de estos productos, afectando la estabilidad del AA, también el contenido de hierro, los compuestos fenólicos interfiere en la inestabilidad de este componente. Actualmente se está elaborando productos con diferentes compuestos y/o principios activos, aplicándose extractos de enzimas, cuya tecnología interesa en mejorar las características físicas, químicas, organolépticas, y dar valor agregado al producto. Hasta el momento no hay antecedentes de la aplicación de esta tecnología en pulpa de camu-camu, del cual podría ser una alternativa de mejorar el contenido de AA.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

¿Será viable la validación del método de análisis del ácido ascórbico en pulpa de *Myrciaria dubia* H.B.K. (camu-camu) tratadas con extractos enzimáticos por HPLC?

¿Los extractos enzimáticos podrían optimizar la estabilidad del ácido ascórbico en pulpa de *Myrciaria dubia* H.B.K. (camu-camu) tratada con extractos enzimáticos?

HIPÓTESIS

1. Es viable la validación del método de análisis del ácido ascórbico en pulpa de camu-camu tratadas con extractos enzimáticos por HPLC.
2. Los extractos enzimáticos optimizan la estabilidad del ácido ascórbico en pulpa de camu-camu.

JUSTIFICACIÓN

El camu-camu es un producto bandera de nuestro país, y su uso es de gran importancia por su alto contenido de ácido ascórbico. El mercado de exportación del camu-camu es como pulpa congelada, se utiliza en la industria de alimentos, como también hoy en día en las industrias farmacéuticas y cosmeceúticas, del cual buscan obtener al AA de la forma más natural, utilizando biotecnologías, microorganismos y otros.

Por otro lado no existe un método analítico confiable que garantice la confiabilidad de la cantidad del analito presentes en la muestra, y que debido a la avance de la tecnología se utiliza equipos especializados como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La selección de un método análisis es importante, consta de conjunto de operaciones físicas y químicas que permite identificar y/o cuantificar un componente químico, al cual se denomina “analito”, y el material que lo contiene, se denomina “matriz”, es preciso validar el método seleccionado no normalizado, diseñado y desarrollado en el laboratorio con el objetivo principal de tener resultados precisos y confiables antes de realizar un ensayo.

La utilización de enzimas presenta un interés significativo en el área de tecnología de alimentos, utilizan extractos enzimáticos seleccionados de acuerdo a la actividad específica de la enzima con el fruto, mejorando la calidad fisicoquímica y organoléptica del producto. En tal sentido se empleará para la pulpa de *Myrciaria Dubia* H.B.K (Camu-Camu) extracto de enzimas en diversos ensayos, de tal modo seleccionar el mejor procesamiento que mejore el contenido de ácido ascórbico.

En este trabajo realizado servirá como parte informativa para las empresas que elaboran productos con frutos naturales, como también a laboratorios, e instituciones educativas que validan sus métodos de análisis de un componente analítico.

OBJETIVOS

1. Objetivo General:

- Validar el método de determinación del ácido ascórbico y tratar la pulpa de (*Myrciaria Dubia* HBK) camu-camu con extractos enzimáticos.

2. Objetivos Especifico:

- Validar el método de determinación del ácido ascórbico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en pulpa de camu-camu.
- Determinar parámetros de tratamientos con extractos de enzimas comerciales y así optimizar la concentración del ácido ascórbico en pulpa de camu-camu.
- Realizar análisis de hierro y fenoles totales en pulpa de camu-camu con y sin tratamiento enzimático.

REVISIÓN DE LITERATURA

I. ANTECEDENTES.

- ❖ Nur, et al (2010); Impact of Commercial Pectolytic Enzymes on Selected Properties of White Dragon Fruit Juice. Estudiaron el fruto de dragón, siendo seleccionadas de una granja local en Malaysia con considerable calidad que se reflexionó por la fruta el tamaño, color y pulpa jugosa. Una práctica general en el procesar jugos es el tratamiento de pulpa de fruta con preparaciones apropiadas de enzimas. La apariencia nublada del jugo de fruta maduro extraído fue debida por la presencia de pectinas y almidones que se quitó por la depectinización enzimática. La depectinización afectó en su composición al jugo en relación al tipo de enzima y tiempo. Utilizaron dos enzimas del pectinase como la aplicación (*Pectinex* Ultra SP-L y *Pectinex* CLEAR) demostraron los efectos en la calidad del jugo. Después del tratamiento enzimático se realizo la pasteurización y no se ha enseñado cambios significantes en la mayor parte de sus parámetros químicos principales, como humedad, ceniza, grasa, carbohidrato y caloría. Sin embargo, la enzimización usando *Pectinex* CLEAR conduce al jugo con rendimiento superior de proteína.
- ❖ Janser (2010); Aplicaciones Enzimáticas para Cítricos y Frutas Tropicales. indica en su artículo Aplicaciones enzimáticas para cítricos y frutas tropicales, que las primeras enzimas se aplicaron a las pulpas de fruta en los años 60, principalmente de grosellas negras debidos a las dificultades relacionadas con la extracción de zumo de estas frutas. En los años 70, se hizo un gran trabajo de desarrollo sobre enzimización de pulpas de manzanas y peras. Indica que la industrias del procesado de frutas tropicales debe tomar consideración las enzimas con diferentes actividades, tanto las enzimas endógenas, o sea propia de la fruta, preparado enzimáticos exógenos, se utiliza para diferentes aplicaciones, como extracción, reducción de viscosidad, clarificación y filtración.

❖ Gutiérrez, *et al* (2007); Determinación del contenido de Ácido Ascórbico en Uchuva (*Physalis Peruviana L.*), por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). La uchuva (*Physalis peruviana L.*), fruto silvestre de los Andes suramericanos, registra contenidos de 20 a 32 mg de AA por cada 100 g de pulpa, siendo así, un cultivo promisorio para incluir en los registros de las fuentes comunes de esta vitamina. El objetivo principal de este estudio, fue encontrar las condiciones óptimas para la extracción, identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) del AA presente en la uchuva (*Physalis peruviana L.*); para ello se analizaron diferentes metodologías reportadas para el proceso de extracción. Por el método del ácido fosfórico se encontraron porcentajes de recuperación entre el 92,36 y 100,4 %; las condiciones de operación más adecuadas para la cuantificación del AA por CLAR, fueron, fase móvil: NaH_2PO_4 al 1 % pH = 2,7; fase estacionaria: Hypersil C18 ODS $\mu 5$ m x 4,0 mm x 250 mm; longitud de máxima absorción: 265 nm y un flujo: 0,9 mL/min. La metodología de cuantificación presentó linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad a un nivel de confianza del 95%. El contenido de AA determinado para la uchuva fue de 0,3320 mg (s—0,0262)/ g de muestra, la estandarización del método de cuantificación del AA por CLAR ofrece la oportunidad de realizar posteriores investigaciones acerca de la estabilidad de la vitamina en la uchuva.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc. Vaugh (CAMU-CAMU).

Es el nombre con lo que comúnmente se conoce a la planta y a su fruto. Está considerado como un cultivo con gran potencial para lograr valor agregado de alto nivel, especialmente por su alto contenido de ácido ascórbico (AA). Para fines industriales, es preferible contar con frutos en estado pintón maduro, ya que soportan mejor los procesos previos a la transformación, para lograr un color rosa más acentuado en la pulpa obtenida, se cosechan los frutos en estado maduro (NTP 011.030, 2007) (Velazco, 2003).

2.1.1. Aspectos botánicos.

Tipo	: Fanerógamas
Subtipo	: Angiospermas
Clase	: Dicotiledóneas
Orden	: <i>Myrtales</i>
Familia	: <i>Myrtaceae</i>
Género	: <i>Myrciaria</i>
Especie	: <i>Myrciaria Dubia</i> HBK McVaugh, <i>Myrciaria</i> sp. (camu-camu árbol) <i>Myrciaria floribunda</i> (Willd) Berg (camu-camu de altura)
Nombre común	: Camu-camu
Otros nombres	: Capan, araca dagua (Brasil).Guayabo (Colombia) Guayabito (Venezuela). Camuplus (USA)

Sinónimos aceptados:

Myrciaria divaricata (Bentham) O. Berg, *Myrciaria paraensis* O. Berg, *Myrciaria spruceana* O. Berg, *Psidium dubium* H.B.K. (Villachica, 1998).

Los taxónomos han clasificado dos géneros del camu-camu, *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, cuyo género pertenece al Perú, y *Myrciaria paraensis* Berg, perteneciente al Brasil, pero se optó por el primer género, debido a que ésta fue la primera denominación utilizada y validado. (Villachica, 1998), (Salas, 2009). Hay por lo menos tres variedades diferentes de camu-camu, solamente en los alrededores de Jenaro Herrera, el "Camu-camu de hoja menuda" crece junto con la *Myrciaria dubia*. que tiene hojas, flores y frutos más pequeños. "Camu-Camu arbustivo" es un árbol grande de hasta 20 metros de altura, sus flores parecen idénticas a la *M. dubia* pero su fruto es 2-3 veces más grande (Ruiz, 1993).

2.1.2. Descripción botánica:

Figura N° 1: Arbusto del fruto de Camu-Camu



Fuente: INIA 2010

La planta es un arbusto ó árbol pequeño de 3 m, pudiendo alcanzar de 6- 8 m de altura, con ramas que nacen desde la base en forma de caso abierto. El tallo y las ramas son glabros, cilíndricos, lisos, presentando raíces adventicias en ellos, las mismas que desarrollan preferentemente en las plantas que crecen en zonas inundables, tronco delgado que puede desarrollar hasta 15 cm de diámetro, corteza color marrón claro, lisa, con laminillas que se desprenden fácilmente en la

época de estiaje, externamente es verde plumiza, con franjas anaranjadas e internamente verde amarillenta. Las raíces son profundas y con muchos pelos absorbentes. La copa es frondosa, irregular, con las ramas superiores hispiduladas, delgadas, flexibles y pendientes. Hoja aovado-elíptica hasta lanceoladas; la longitud varía entre 4,5 a 12,0 cm de largo de 1,5 a 4,5 cm de ancho, ápice acuminado y base redondeada, margen entero y ligeramente ondulado. Inflorescencia axilar con cuatro flores subsésiles dispuestas en dos pares con brácteas redondeadas y ciliadas. Flores hermafroditas con 5 pétalos blancos; numerosos estambres blanquecinos (Ruiz, 1993) (Villachica, 1998) (NTP 011.030, 2007).

El fruto. Es una baya globosa, de 10 a 40 mm de diámetro, color rojo hasta violeta, pulpa jugosa, blanquecina, ácida, aromática; con una a tres semillas reniformes de 8 a 15 mm de largo, conspicuamente aplanadas y cubiertas por una malla de fibrillas. (Ruiz, 1993). Su peso varía entre 2 y 20 gramos, pesando en promedio 8 g. Comparativamente con otros frutales tropicales, el camu-camu es un fruto con alta concentración de ácido ascórbico (Villachica, 1998).

Las semillas son reniformes, aplanadas con 8 a 11 mm de longitud y 5,5 a 11 mm de ancho, conspicuamente aplanadas, cubierta por una vellosidad blanca rala de menos de 1 mm de longitud. El peso de 1000 semillas secas está entre 650 g y 760 g (NTP 011.030, 2007).

Figura N° 2: Fruto de Camu-Camu en su rama.



Fuente: Enerfrut Perú 2012

2.1.3. Origen y distribución.

Es notoriamente abundante en la Amazonía Peruana, formando densos agregados en cursos de agua asociados con el río Napo, Nanay, Ucayali, Marañón y Tigre. También se encuentra en el río Tapiche, quebrada Supay (cuenca del río Ucayali), ríos Yarapa, Tahuayo, Pintuyacu, Itaya, Ampiyacu, Apayacu, Manití, Orosa y el caño Boyador y cocha Nuñez en el río Napo. (Villachica, 1998). Se distribuye desde el Oeste Brasileiro hasta el Este del Perú, también se encuentra en los ríos Orinoco, Casiquiare, Oreda, Pargueni y Caura en Venezuela; así como en el río Inírida en Colombia. La concentración de poblaciones naturales de camu-camu tiende a disminuir en el curso del río Amazonas del Perú hacia el Brasil (Ruiz, 1993)

Figura N° 3: Mapa de distribución geográficas de poblaciones Naturales de Camu-Camu



Fuente: Rengifo 2009

En la región Ucayali existen 1112.27 Ha de camu-camu, distribuidas entre las provincias de Coronel Portillo y Padre Abad, de las cuales el 49 % están mantenidas; 9,71 % por recuperar y el 41,33 % no recuperables. (Velazco, 2003)

Myrciaria dubia (HBK) Mc Vaugh es exclusivamente nativo de la Amazonia peruana, esta especie es tolerante a la inundación y puede quedar completamente sumergida en el agua cuatro o cinco meses. Aparentemente hay pocas especies de plantas leñosas tolerantes a la inundación total, y por tanto camu-camu logra formar agrupaciones nono-especificas a lo largo de las cochas y quebradas.

Solo la especie *Myrciaria floribunda* (Willd) Berg (camu-camu de altura) crece en bosques de altura en la selva baja y ocurren dispersados individualmente. La densidad de *M. dubia* en medios naturales es muy elevada con 8,714 individuos por hectárea. El ciclo reproductivo cuando la planta alcanza 2 cm de diámetro. (Ruiz, 1993). Se adapta a suelos con buen drenaje y regímenes hídricos con sequias de hasta dos meses, como lo que ocurren en la zona de Pucallpa, Perú. Tolera bien los suelos ácidos de baja fertilidad, aunque sus rendimientos son mayores cuando la distribución de las lluvias y la fertilidad del suelo son mejores (Villachica, 1998).

En el Anexo A describe las diferencias entre camu-camu arbustivo (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) y camu-camu arbóreo (*Myrciaria floribunda*)

2.1.4. La planta y su cultivo.

a. Métodos de propagación:

Tradicionalmente, el Camu-Camu se ha propagado por semillas, que se encuentran en número de uno a tres en cada fruto y tienen viabilidad mayor a 90% cuando recién se separan del fruto. El número de semillas por kg es 2,300. El éxito para el establecimiento y productividad del cultivo de camu-camu, depende en gran parte de tres factores principales; la selección de la semilla, la elección del terreno y el manejo de plantación. La selección de las semillas incluye trabajos de selección de plantas con buenas características agronómicas; arquitectura tipo copa abierta o cónica, libre de enfermedades y de mejores rendimientos.

Es preferible la propagación por injerto de clones seleccionados. Los frutos que van a ser utilizados para la comercialización, deben alcanzar el estado de maduración de fruto pintón, y los destinados para la obtención de semillas porta-injertas, deben presentar el estado de maduración de fruto maduro (100% de coloración rojiza en la cáscara). La cosecha de los frutos maduros se realiza manualmente depositándolos en recipientes como bolsas plásticas o bandejas, e identificando la procedencia para evitar mezclas. Normalmente se cosechan entre los meses de diciembre y marzo. Los frutos se deben coleccionar de plantas seleccionadas por su buen aspecto sanitario y vigor vegetativo, recomendándose aquellas plantas adultas que produzcan más de 15 kg en estas condiciones se trasladan los frutos para iniciar la obtención y procesamiento de las semillas..

La semilla se separa del fruto estrujándola o partiendo el fruto con los dedos. La pulpa adherida debe ser lavada con abundante agua. Las semillas lavadas se ponen a orear en la sombra por una hora, hasta que escurra toda el agua, luego se clasifican en grandes y medianas; se eliminan las semillas pequeñas y las picadas. Para siembras inmediatas, las semillas lavadas pueden ser mantenidas en recipientes con agua limpia (cambiándola cada tres días cuando presente indicios de fermentación). Si la siembra demora varios meses, las semillas deben ser secadas a la sombra por 24 horas después de lavadas, tratadas con un fungicida en polvo (o en el proceso de lavado) y acondicionadas en sacos plásticos dobles, para ser guardadas a 20°C o temperatura ambiente. En estas condiciones mantienen gran parte de su poder germinativo hasta seis meses. También pueden ser guardadas en refrigeración a 10°C, pero con adecuado contenido de humedad (Villachica, 1998), (INIA, 2010).

Figura N° 4: Semilla de Camu-Camu



Figura N° 5: Siembra de semilla de Camu-Camu



Fuente: INIA 2010

b. Prácticas culturales y producción:

b.1 Cama germinadora.

Después de realizar el procesamiento y selección de semillas, esta se llevan a una cama germinadora en campo, diseñadas para tal fin. Se necesita una superficie de 2m², para colocar 1kg de semilla (1300 semillas aproximadamente); con esta cantidad de se obtiene el número de plantones necesarios para trasplantar 1 hectárea en campo definitivo. La longitud de la cama está sujeta a la disponibilidad del área y la cantidad de semilla a germinar, lo importante es mantener el ancho adecuado, ya que permitirá un fácil manejo de las camas.

Figura N° 6: Cama germinadora



Figura N° 7: Plántulas en cama germinadora



Fuente: INIA 2010

Para la construcción de las camas germinadoras se tiene en cuenta dos aspectos: El primero es la elección del terreno que debe encontrarse libre de hormigas cortadoras (curuhinse) y de preferencia con suelo plano y en segundo lugar estar

ubicada cerca de una fuente permanente de agua. El distanciamiento de siembra recomendado para el campo definitivo es de 4 m entre hilera y 3 m entre plantas, 833 plantas/ha. El trasplante se realiza a raíz desnuda. Las plantas injertadas deben recibir la primera poda de formación en el vivero y la segunda en campo definitivo, durante el primer año de la plantación.

La mejor época para el trasplante a campo definitivo, es al inicio de la vaciante de los ríos, con plántones de tamaño mayor de 80 cm, que corresponden aproximadamente a los 8 meses de edad. Una vez seleccionada el área de instalación, se tiene que realizar actividades comunes para la preparación del terreno, iniciando con el rozo y tumba, de preferencia evitar la quema. Todas las hojas y ramas entrarán en un proceso de descomposición que servirán de alimento a las plantas de camu-camu. Los plántones se siembran en hoyos de 20 cm de largo 20 cm de ancho x 30 cm de profundidad; teniendo en cuenta que el plánton quede con el sistema radicular en forma vertical y fijo en contacto con el suelo.

b.2 Control de malezas.

Como todas las especies cultivadas, el camu-camu necesita evitar la competencia de agua, luz y nutrientes con otras plantas; especialmente en la fase vegetativa (crecimiento) donde la planta debe crecer, engrosar tallo, y ramas e incrementar el número de ramas; antes de entrar a la fase reproductiva (producción de frutos). Las malezas deben ser eliminadas periódicamente, recomendándose el uso de coberturas (*Arachis pintoii*) en los suelos no inundables. En los suelos inundables, el agua disminuye el crecimiento de las malezas durante el período de inundación, pero éstas crecen vigorosamente durante la época de estiaje. Los deshierbos se realizan en forma natural utilizando machetes, azadones o palas y en forma oportuna. El número de deshierbos depende de la maleza y de la proliferación de la misma.

Figura N° 8: Plantaciones de Camu-Camu



Fuente: INIA 2010

Las plantas seleccionadas tienen una producción promedio mayor que de 20 kg de fruta al año, lo cual considerando 833 plantas/ha equivale a 16,6t/ha. Plantas injertadas con yemas de estos clones han manifestado un rendimiento de 8 a 10 kg al quinto año del trasplante, equivalente a 6,6 a 8,3 t fruta/ha.

Está en estudio la respuesta del camu-camu al abonamiento, sin embargo, la siembra en suelos ácidos degradados y con buen drenaje debe ir precedida de la aplicación de 300 a 500 g de dolomita y de roca fosfatada al fondo del hoyo a plantar.

b.3 Control de Plagas.

En las condiciones actuales, los insectos del camu-camu que se han identificado, tienen su control biológico o son controlados por las inundaciones, por lo que no tienen importancia económica. Sin embargo, se han identificado como plagas potenciales a los siguientes:

Piojo saltador del camu-camu (*Tuthilla cognata*), las ninfas se caracterizan por presentar el cuerpo cubierto por una sustancia pulverulenta de color blanco. Ocasiona daños a las hojas enrollándolas a nivel de la nervadura central, luego se marchitan y mueren. Cuando el ataque no es severo (menor del 10%) se recomienda eliminar las hojas. El control natural es controlado por una mosca de

la familia Syrphidae (*Ocyrtamus* sp.), que pone sus huevos en las colonias de Tuthillia, pero es insuficiente. Se necesita estudiar el control químico con productos sistémicos. Los ataques son mayores en plantaciones débiles, por lo que se recomienda tener plantaciones débiles, en buenas condiciones fisiológicas.

Figura N° 9: Piojo Saltador del Camu-Camu



Fuente: INIA 2010

Quereza de la piña (*Dismicoccus brevipes*), ataca en colonia a nivel del cuello de la planta, ocasionando desaparición de la corteza y la muerte de la planta. Estas queresas están protegidas por hormigas que se alimentan de las exudaciones que secretan los insectos; para su control se debe combatir a las hormigas. (INIA, 2010).

La queresa amarilla (*Ceroplastes Ksp.*) es una especie frecuente en las plantaciones. Las colonias se pueden ver en las ramas de los árboles, con abundante fumagina. Las larvas pasan de un árbol a otro y se produce una infestación en mancha. Los árboles fuertemente infestados se secan y mueren. Los controladores biológicos observados no son suficientes para dominar las poblaciones (INIA, 2010) (Villachica, 1998).

2.1.5. Valor nutricional y económico:

La parte alimenticia es el pericarpio que es el que contiene más vitamina. El camu-camu se consume de forma natural, pero principalmente en jugos, refrescos y helados; además mezclado con alcohol y caña de azúcar se prepara un licor

denominado “camu-camuchado”. Entre los muchos productos alimenticios del bosque amazónico, el camu-camu está considerado como un cultivo con gran potencial para lograr valor agregado de alto nivel, especialmente por su elevado contenido de ácido ascórbico (AA) ó vitamina C, presentando este fruto un aproximado de 2000-2994mg de AA en 100g de pulpa, superando a la naranja que tiene sólo 92mg por 100g de pulpa, también son importante los contenidos de aminoácidos esenciales como Valina y Leucina, lo que son muy necesarios principalmente para el desarrollo orgánico funcional en la etapa infantil. El contenido de este ácido aumenta hasta que la fruta esta pintona o semimadura, después de lo cual disminuye solamente 5 a 10% cuando la fruta madura completamente. (Ruiz, 1993). En los cuadros B1, B2, y B3 del Anexo B, indica las características fisicoquímicas del camu-camu en diferentes estado de madurez.

Sin embargo, este fruto, así como el AA que contiene, son muy sensibles tanto al manipuleo como a los procesos de extracción de pulpa y almacenamiento, incrementando por el alto contenido de agua, por lo cual se busca producir pulpa deshidrata por proceso de liofilización o atomización (Vega, 2005)

Además de su gran valor económico y alimenticio, el camu-camu es una planta de gran valor ecológico, pues protege la erosión de las zonas ribereñas, así mismo como planta riparia y de bosques inundables, es un gran alimento para muchas especies nativas de peces, tales como la gamitana (*Colossoma macropomun*). Los países importadores emplean el camu-camu en la industria nutraceúticos (que fabrican alimentos que proporcionan beneficios para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades), los pequeños productores de la Amazonía, gracias al conocimiento que tienen de las aplicaciones de esta especie hacen uso de las diversas partes de la planta de camu-camu para prevenir o curar una gran diversidad de enfermedades (Pinedo, 2007).

Cuadro 1. Composición Nutricional en 100 g de pulpa comestible.

COMPUESTO	CANTIDAD	UNIDAD
Calorías	17	cal/g
Agua	94.4	g
Carbohidratos	4.7	g
Proteínas	0.5	g
Fibra	0.6	g
Cenizas	0.2	g
Calcio	27	mg
Fósforo	17	mg
Hierro	0.5	mg
Tiamina	0.01	mg
Riboflavina	0.04	mg
Niacina	0.062	mg
Acido Ascórbico	2780	mg

Fuente: [Villachica](#) 1998

En el Perú se estimula la siembra de plantaciones comerciales de camu-camu para la producción de vitamina C, ya que es una actividad económica creciente en la Amazonia Peruana, no descartándose la recolección de plantaciones naturales, de por medio ya que esta presenta una diferencia en costos altos. La época de cosecha ocurre entre diciembre y marzo, extendiéndose en algunos casos hasta mayo (en los ríos que nacen en el Ecuador). Se pueden encontrar frutos que pasan de 10 g hasta más de 30 g. Sin embargo, este fruto, así como el AA que contiene, son muy sensibles tanto al manipuleo como a los procesos de extracción de pulpa y almacenamiento, incrementando por el alto contenido de agua, por lo cual se busca producir pulpa deshidrata por proceso de liofilización o atomización (Vega, 2005).

2.1.6. La Fruta Fresca

A nivel nacional el Camu-Camu se comercializa en forma de fruta fresca, llega por vía terrestre desde la ciudad de Ucayali hasta la ciudad de Lima, para su venta en los mercados mayoristas, y para proyectos de exportación. El precio por kilo de Camu-Camu se mueve durante el año entre 4 y 8 nuevos soles. La escasez absoluta en el mercado nacional se debe a las temporadas de cosechas y exportación continua del fruto, mientras cuando las exportaciones estén bajas, se consigue Camu-Camu durante todo el año (Krause, 2009).

Figura N° 10: Fruta fresca de Camu-Camu



Fuente: NTP-NA- 0085.2011

2.1.7. La Pulpa

La pulpa de camu-camu es importante para el mercado nacional e internacional, la ventaja de tener pulpa refinada es de obtener mayor tiempo de conservación, facilidad de almacenamiento y transporte. En el año 2008 se exportaron aproximadamente 500 toneladas de Camu -Camu, el 95% en forma de pulpa congelada, el precio promedio se estableció alrededor de 4 dólares americanos por kg, se estima que 1 kg de camu-camu procesado para la exportación equivale unos 6 kg de fruta fresca, debido a la extracción de semillas y separación de cáscara, en algunos caso la deshidratación. La pulpa es un insumo pre-procesado de fácil manejo y de gran potencial, puede ser utilizado para la elaboración de helados, leche, yogurt, jugo, polvo instantáneo, dulces, etc. Los productores e

intermediarios venden desde sus plantas de proceso y oficinas, mientras la mercancía se guarda en almacenes refrigerados (Krause, 2009).

Los países importadores emplean el camu-camu en la industria nutraceúticos (que fabrican alimentos que proporcionan beneficios para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades), los pequeños productores de la Amazonía, gracias al conocimiento que tienen de las aplicaciones de esta especie hacen uso de las diversas partes de la planta de camu-camu para prevenir o curar una gran diversidad de enfermedades (Pinedo, 2007).

Para fines industriales, es preferible contar con frutos en estado pintón maduro, ya que soportan mejor los procesos previos a la transformación, pero para lograr un color rosa más acentuado en la pulpa obtenida, se cosechan los frutos en estado maduro (Vega, 2005).

La madurez del fruto es el estado fisiológico del fruto que en función al desarrollo de sus características químicas y organolépticas que presente, determinan su destino final (consumo directo ó uso industrial). En el caso del camu-camu se visualiza a través de los cambios de coloración de la cáscara, la cantidad de grados Brix y/o el contenido de ácido ascórbico (NTP 011.030, 2007).

2.1.8. Clasificación y requisitos del Camu-Camu para fines industriales.

✓ Clasificación

El fruto de camu-camu puede clasificarse en función al color de la cáscara, tamaño y peso, contenido de ácido ascórbico y características de calidad:

a).Por el color de la cáscara

El color de la cáscara es un indicativo del estado de madurez del fruto. Se considera que el fruto se encuentra en su nivel óptimo de madurez cuando la mayor parte de la superficie de la cáscara tiene una coloración rojo oscura.

Cuadro 2: Clasificación del fruto por su estado de madurez

Clasificación	% de color rojo oscuro
Maduro	100
Pintón-maduro	≥ 50
Verde-pintón	< 50
Inmaduro	0 (Ausencia)

Fuente: NTP 011.030. 2007

b) Por el tamaño (diámetro) y peso

Cuadro 3: Clasificación del fruto por su tamaño.

Clasificación	Diámetro (cm)	Peso (g)
Grande	> 2,5	> 8
Mediano	2,0 – 2,5	4 - 8
Pequeño	< 2,0	< 4

Fuente: NTP 011.030. 2007

c) Por el contenido de ácido ascórbico

Cuadro 4: Clasificación del fruto por su contenido de AA

Nivel de ácido ascórbico	Cantidad (mg/100 g)
Nivel 1	≥ 1800
Nivel 2	< 1800

Fuente: NTP 011.030. 2007

d) Por otras características de calidad

Cuadro 5: Clasificación por sus características organolépticas

Clasificación	Características
Premium	Maduros y grandes
Estándar	Maduros y pintón maduros, maduros y grandes.
Segunda	Cualquier grado de madurez y tamaño.

Fuente: NTP 011.030. 2007

✓ Requisitos.

a) Requisitos generales

Los frutos frescos deberán cumplir como mínimo con lo siguiente:

1. Sanos y exentos de materias extrañas.
2. Consistencia firme.
3. Exentos de cualquier olor y/o sabor anormal.
4. En cuanto a la presencia o contenido de metales pesados y residuos de plaguicidas que pudieran representar un peligro para la salud humana, deberán estar de acuerdo a lo establecido por la Organización Mundial de la Salud-OMS o el *Codex Alimentarius*.

b) Características organolépticas

Las características organolépticas de acuerdo al estado de madurez del fruto se muestran en el Cuadro 6:

Cuadro 6: Características organolépticas del Camu-Camu

Estado de Madurez	Color de la cáscara	Aspecto del mesocarpio	Sabor
Inmaduro	Verde	Incoloro traslúcido	Fuertemente ácido
Verde – Pintón	Predominio del verde sobre el rojo	Incoloro traslúcido	Acido
Pintón – maduro	Predominio del rojo sobre el verde	Incoloro traslúcido	Acido
Maduro	Rojo	Incoloro traslúcido	Agridulce

Fuente: NTP 011.030. 2007

c) Requisitos microbiológicos.

Con la finalidad de asegurar la ausencia o niveles de tolerancia aceptables de carga microbiana, el camu camu deberá ser manipulado de acuerdo a lo establecido en el CAC/RCP 1, Rev. 4-2003, y los criterios microbiológicos según la legislación nacional vigente.

2.2. VITAMINA C Ó ÁCIDO ASCÓRBICO (AA)

El valor del Camu-Camu se origina en el extraordinario contenido de vitamina C. Este argumento de compra es un atributo sumamente frágil y tiende a desvanecer durante el almacenamiento, transporte y procesamiento. Diferentes métodos de conservación habituales no se prestan para el Camu-Camu porque significan el tratamiento con calor.

El Camu-Camu es un fruto con un alto contenido de vitamina C, compuesto que el ser humano no lo puede sintetizar y necesariamente debe ingerirlo en su dieta. Esta vitamina es un eficiente antioxidante; pero, también puede actuar como un agente prooxidante cuando se administra en altas dosis, especialmente cuando está en presencia de elevadas cantidades de metales de transición, generando radicales hidroxilo.

Las vitaminas son sustancias orgánicas que están presentes en los alimentos y que resultan necesarias para el equilibrio de las funciones vitales. La vitamina C ó ácido ascórbico (AA) es descubierta en 1912, por los noruegos A. Hoist y T. Froelich, cierra el grupo de las vitaminas hidrosolubles junto con la B, es importante para el normal crecimiento y desarrollo de nuestro organismo. La identificación de su necesidad remonta en 1947 cuando el cirujano naval escocés James Lind detectara que los cítricos combatían el escorbuto (Krause, 2009).

El AA ha sido reconocido como un nutriente importante en varios productos alimenticios, la acción de este ácido es suministrada por el ácido l-ascórbico (AA) y su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (DHAA). En humanos ambas formas son biológicamente activas, definiéndose así la vitamina total como la suma de los dos (Ledezma, 2005).

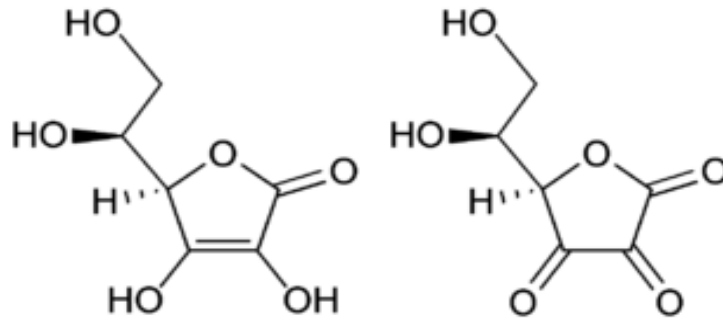
El ácido ascórbico es un compuesto que tiene excelente acción reductora; cuando pierde un electrón, se convierte en el radical ascorbato, compuesto que tiene un electrón desapareado en un sistema altamente deslocalizado, por cuyo motivo es un radical libre muy poco reactivo, que lo convierte en un buen antioxidante. Su acción antioxidante reside en la capacidad para donar un átomo de hidrógeno a

radicales lipídicos. Pero, una de sus principales propiedades consiste en regenerar el α -tocoferol a partir de radicales tocoferoxilo (Krause, 2009).

El cuerpo humano no puede producir AA por sí solo, ni tampoco la almacena. Por lo tanto es esencial en la dieta humana, interviene en el mantenimiento de huesos, dientes, vasos sanguíneos, formación y mantenimiento del colágeno. Protege de la oxidación a la vitamina A y E, así también a algunos compuestos del complejo B (Tiamina, riboflavina, ácido fólico y ácido pantoténico). Desarrolla acciones anti-infecciosas y antitóxicas, ayuda a la absorción del hierro no hérmico en el organismo. Este ácido está presente en forma natural en muchas frutas y verduras, además, como también contienen vitaminas, antioxidantes, compuestos fenólicos y carotenos.

El AA se oxida rápidamente, por tanto requiere de cuidados al momento de exponerla al aire, calor y agua. Cuando menos calor se aplique, menor será la pérdida del contenido. Los productos alimenticios que contiene este ácido, al no ser envasadas ó conservadas de forma adecuada, pierden su contenido vitamínico, lo mismo ocurre con los productos deshidratados. En jugos, la oxidación es afectada por exposición prolongada con el aire y por no conservarlos en recipientes oscuros. Su determinación por técnicas sensibles y rápidas, es importante para evaluar su estabilidad en diferentes alimentos. Actualmente la búsqueda de fuentes naturales de AA, reviste gran interés por las características antioxidante de la vitamina.

Figura N° 11: Ácido ascórbico en sus dos formas. A la izquierda: ácido ascórbico (forma reducida de la vitamina C) y a la derecha: ácido dehidroascórbico (forma oxidada de la vitamina C).



Fuente: Ledezma 2005

La vitamina C, junto con la vitamina E y A, evita el envejecimiento y la degeneración de las células al neutralizar los radicales libres por su capacidad antioxidativa, elimina sustancias tóxicas del organismo, como los nitritos y nitratos presentes en productos cárnicos preparados y embutidos. También cumple la función de fijación ó eliminación del oxígeno, siendo el caso que el oxígeno provoca rancidez, pérdida de color, en otras características, cuando reacciona con varias moléculas del alimento. Además de la fijación de radicales libres y control de pardeamiento, hacen que esta vitamina sea uno de los aditivos más empleados en la industria de los alimentos (Gutierrez, 2007).

2.3. ENZIMAS Y SU IMPORTANCIA EN LOS ALIMENTOS

2.3.1 Aspectos Generales de las Enzimas.

La enzima es una molécula de proteína con funciones muy específicas por parte de cada una de ellas, se encuentran en todos los seres vivos y son piezas esenciales en su funcionamiento. Desde el punto de vista bioquímico son proteína que actúan como aceleradores de las reacciones químicas, de síntesis y degradación de compuestos. Una de las características más sobresalientes de las enzimas es su elevada especificidad, esto quiere decir que cada tipo de enzima se une a un único tipo de sustancia, el sustrato, sobre el que actúa.

Las enzimas cambian, conducen y regulan casi todas las reacciones químicas de las células vivas. Hasta ahora se han descrito en detalle más de 3000 enzimas diferentes. Se asume que en la naturaleza hay hasta 10 000 enzimas distinta. De algunos tipos de enzimas existen solo unas pocas moléculas en una célula; de otros, en cambio, de 1000 a 100000. Todas las enzimas actúan como catalizadores biológicos: convierten sustancias a menudo en fracciones de segundo, en otros productos, sin cambiar a ellas mismas al hacerlo.

Las enzimas aceleran la consecución del equilibrio de las reacciones químicas en un factor desde algunos millones hasta un billón. Posibilitan con ello, en primer lugar, los procesos de la vida. La formación de alcohol y dióxido de carbono a partir de azúcar que realizan las enzimas en las células de levadura en unos pocos segundos duraría sin enzimas miles de años, y por lo tanto sería prácticamente imposible. Las enzimas son biocatalizadores altamente efectivos y potentes (Renneberg, 2008).

2.3.2. Fuentes de Obtención de Enzimas.

1) Animal. Aún hoy se producen preparados crudos, a partir de las enzimas de los animales, como la pepsina de la membrana mucosa gástrica del cerdo y del buey. Enzimas de laboratorio a partir de estómagos de terneros y mezclas enzimáticas de tripsina, quimotripsina, lipasas y amilasas de la glándula de la digestión (páncreas) del cerdo. Con fines analíticos y medicinales se pueden preparar

enzimas altamente purificadas de órganos con alto rendimiento metabólico (carne, muscular, hígado, bazo, riñón, corazón e intestino delgado).

2) Vegetal. Entre las enzimas de tipo vegetal, se encuentran las proteasas, carbohidrasas, las cuales descomponen residuos de azúcares de carbohidratos superiores, α -amilasas y β -amilasa, las enzimas proteolíticas (que degradan proteínas) tales como papaína y bromelina que se obtiene de la papaya y ananá respectivamente. Los cereales liberan tras la fermentación y germinación de la malta, enzima degradadora de almidón (amilasa) y las fragmentadoras de proteína (proteasas), que se utilizan desde la antigüedad en la fabricación de cerveza y destilación de licores.

3) Microbiano. La mayoría de enzimas utilizados en industrias, son enzimas extracelulares de origen microbiano, provienen de bacterias, hongos y levaduras que se desarrollan en la industria de la fermentación. Las principales aplicaciones de las enzimas extracelulares que degradan el almidón consisten en la conversión de almidón en jarabes que contienen glucosa, maltosa y oligosacáridos, en producción de azúcares fermentables, en cervecería, obtención de bebidas alcohólicas y en la modificación de harina usados en industrias de panadería. La ventaja de la obtención de enzimas microbianas es que los microorganismos se reproducen a ritmo acelerado, son fáciles de manipular genéticamente, crecen en un amplio rango de condiciones ambientales y tienen una gran variedad de vías metabólicas, haciendo que las enzimas obtenidas sean más económicas (Renneberg, 2008).

La ingeniería genética está realizando progresos importantes en la producción de enzimas recombinantes en microorganismos. Para garantizar la seguridad de su uso debe controlarse que los microorganismos de donde se extraen no sean patógenos, ni fabriquen compuestos tóxicos. Los ideales son aquellos que tienen una larga tradición de uso en los alimentos como las levaduras de la industria cervecera y los fermentos lácticos. *Bacillus*, *Aspergillus* y *Sacharomyces*, son tres

especies de microorganismos conocidas, su manipulación es segura, de crecimiento rápido y producen grandes cantidades de enzimas, generalmente mediante fermentación. (Carrera, 2003). El Cuadro 7 menciona el origen de algunas enzimas.

Cuadro 7: Origen de algunas enzimas.

	ENZIMAS	FUENTES
Origen Animal	Renina	Estomago de terneros
	Pepsina	Estomago de bovinos y porcinos
	Tripsina	Páncreas, porcinos
	Lipasa	Páncreas, Porcinos
Origen Microbiano	Alfa-amilasa	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
	Invertasa	<i>Saccharomices Cerevisiae</i>
	Pectinasa	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i>
	Glucosa	<i>Bacillus coagulans</i>
	Isomerasa	<i>Arthobacter globiformis</i>
	Lipasa	<i>Mucor Michel</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
	Origen Vegetal	Bromelina
Ficina		Higo
Papaína		Papaya

Fuente: Renneberg, 2008

Algunas enzimas recombinantes destinadas a la industria alimenticia son:

- Quimosina, que sustituye a la natural obtenida del estómago de terneros, y que se obtiene a partir de los hongos *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus Niger* transformados genéticamente con genes de vacuno.

- α -amilasa, obtenida a partir de *Bacillus subtilis* recombinante. Esta enzima licua el almidón y lo convierte en dextrina en la producción de jarabes. En la industria cervecera, favorece la retención de la humedad del producto y baja el contenido calórico del producto.
- Pectinasas producidas por *Aspergillus Oryzae* transformada con el gen de *A. aculeatus*, permiten la clarificación de jugos concentrados al degradar las pectinas proveniente de restos de semillas.
- Glucosa oxidasa y catalasa obtenidas a partir de *Aspergillus Niger* recombinantes, estas enzimas se utilizan para eliminar azúcares de huevos y evitan que aparezcan olores anormales durante la deshidratación de los mismos.
- Lipasas, obtenidas en *Aspergillus Oryzae* recombinante se utilizan en la fabricación de concentraciones de aceite de pescado.
- Glucosa Isomerasa, proveniente de *Streptomyces lividens*, al que se le ha ingerido el gen de *Actinoplanes*, permite obtener, a partir de glucosa, jarabes ricos en fructosa, con mayor poder endulzante.
- β - glucanasa, producida por levaduras cervezas recombinantes, que facilitan la filtración del producto.

2.3.3. Clasificación de la Enzimas.

Las enzimas se clasifican según el tipo y mecanismo de la reacción, se conocían sólo unas cuantas enzimas que catalizaban la hidrólisis de los enlaces covalentes, estas enzimas se identificaron mediante la adición del sufijo “asa” al nombre de la sustancia o del sustrato que la hidrolizan. Así, las lipasas hidrolizan la grasa (del griego: Lipos), las amilasas hidrolizan el almidón (del griego: amylo) y las proteasas hidrolizan las proteínas. Las deshidrogenasas catalizan la remoción del hidrógeno, en tanto que las transferasas, las reacciones de transferencia de grupos.

A) Carbohidrasas.

a.1 Amilasas. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, son las enzimas responsables de la degradación del almidón, hidrolizan los glucosídicos. Las amilasas se pueden dividir en tres grupos: 1) α -amilasas, las cuales rompen al azar los enlaces en el interior del sustrato (endoamiladas); 2) β -amilasas, las cuales hidrolizan ordenadamente unidades de maltosa a partir de los extremos no reductores del sustrato (exoamilasas) y 3) glucoamilasas que liberan unidades de glucosa a partir de los extremos no reductores del sustrato. Se han cristalizado β -amilasas a partir de trigo, malta de cebada, patata dulce y soya.

Los pHs de mayor actividad para las β amilasas están en el rango entre 4.5-7 y el límite de temperatura está alrededor de 55 °C. Los grupos sulfhidrilos son esenciales para la actividad, por lo que la enzima se inactiva por oxidación, por los metales pesados y sus sales.

a.2 Glucoamilasa (amiloglucosidasa). El principal producto final de la acción de la glucoamilasa sobre el almidón es glucosa, lo que la diferencia claramente de la α y el β -amilasas. Esta enzima también produce pequeñas cantidades de oligosacáridos, la sacarificación del almidón puede alcanzar hasta 96% de dextrosa. La acción de esta enzima causa inversión de la configuración, produciendo β -glucosa, su actividad es máxima entre pH 4 y 5.5, y temperatura alrededor de 55-65 °C.

B) Enzimas Desramificantes

Este grupo de enzimas puede dividirse en dos clases: directas e indirectas, las desramificantes directas hidrolizan los enlaces glicosídicos 1-6 del glicógeno y/o la amilopectina nativos, están representadas por el sistema amilo 1-6 glucosidasa /oligo1-4 \rightarrow 1-4 glucantransferasa. Por el contrario, la acción de las enzimas indirectas requiere la modificación previa del sustrato con otra enzima. Este último grupo puede subdividirse en pululaninas e isoamilasas.

Las pululanastas de origen microbiano han sido aisladas de *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia intermedia* y *Streptococcus mitis*. Las enzimas actúan sobre pululano, amilopectina, glicógeno y dextrinas. El único producto de reacción es maltosa. La temperatura óptima está alrededor de 45 °C, con pH entre 4 y 5.

b.1 Celulasas. La celulosa es rápidamente hidrolizada en la naturaleza por organismos aeróbicos del suelo, particularmente por los hongos que degradan la madera. Los organismos anaeróbicos del rumen y del intestino son responsables de la digestibilidad de la celulosa en los animales rumiantes y en los herbívoros. Normalmente usada en el procesado de alimentos para animales, suplementos dietéticos y otras aplicaciones alimentarias. También indicada para el tratamiento de aguas residuales.

b.2 Invertasa. Hidrolizan el residuo terminal no reductor de β -D fructofuranósidos. El principal sustrato es la sacarosa, pero también pueden hidrolizar rafinosa para dar fructosa y melibiosa. La enzima también tiene actividad fructotransferasa. El pH óptimo es 4.5, pero se logra un 80% de actividad en el rango entre 3.5 – 4.5. La invertasa es de gran importancia en la industria de alimentos porque la hidrólisis de la sacarosa forma jarabes más dulces, los monosacáridos formados por la acción de la invertasa son más solubles que la sacarosa y por lo tanto no cristalizan en los jarabes concentrados.

b.3 Lactasa (β -galactosidasa). Hidroliza los residuos terminales de a D-galactosa, a partir de β -galactósidos. También ocurren reacciones de transferencia de grupos galactosil. Las mejores fuentes comerciales de lactasa son hongos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*), bacterias (*Bacillus spp.*) y levaduras (*Kluyveromyces fragilis*). Las preparaciones fúngicas pueden generalmente ser usadas a mayores temperaturas y menor pH.

b.4 Pépticas. El término se refiere a un complejo formado por varias enzimas, presentes en diversas proporciones, capaces de actuar sobre pectinas y sus derivados. El grupo incluye: Pectin esterasa, que actúa para desesterificar pectinas, removiendo los grupos metoxilo y produciendo ácido péptico. Enzimas despolimerizantes que actúan principalmente sobre pectina, ácidos pépticos y protopectina.

C) Enzimas Proteolíticas

Las proteasas son enzimas que hidrolizan las cadenas polipeptídicas de las proteínas sustrato, se caracterizan por tener gran variedad de especificidades. De acuerdo con el aminoácido o metal que posean en su sitio activo se clasifican en cuatro familias: serina proteasas, asparticoproteasas, cisteina proteasas y metaloproteasas.

c.1 Papaína.

El término papaína se aplica tanto a las preparaciones enzimáticas crudas obtenidas del latex de papaya como a las distintas fracciones proteicas del mismo. Las enzimas papaína y quimopapaína son las principales proteasas del latex (10 y 45% de la proteína soluble), el cual contiene también lisozima (20%). Una enzima capaz de una amplia especificidad de hidrolisis de proteínas sobre una extensa gama de pH. Normalmente usada como ablandador de carne y en la producción de alimentos para animales domésticos.

c.2 Bromelina.

Se obtiene del jugo, de la fruta o de los tallos de *Ananas comosus* (piña). Es una glicoproteína del grupo de las cisteín proteasas. Actúa de preferencia sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo varía con el sustrato, en el rango de 5 a 8. La enzima se utiliza principalmente como ablandador de carne (tiene buena actividad sobre los tendones y el tejido

conectivo rico en elastina) y para hidrolizar proteínas solubles de la cerveza que pudieran precipitar y causar opacidad por el enfriamiento. Una enzima capaz de una amplia especificidad de hidrólisis de proteínas dentro de una extensa gama de pH. Normalmente usada como ablandador de carne y en la producción de alimentos para animales domésticos.

c.3 Ficina.

Es una cisteín proteasa como la papaína. Se obtiene del latex de las plantas del género Ficus. Presenta hidrólisis preferencial por los aminoácidos aromáticos. El pH óptimo varía con el sustrato y se encuentra en el rango 5-8. La temperatura óptima está alrededor de 60 °C, inactivándose completamente a 80 °C.

c.4 Renina o Quimosina.

Es una proteasa ácida, aislada del estómago de los terneros jóvenes, utilizada para precipitar la caseína sin promover un nivel de proteólisis elevada. En los terneros maduros, la quimosina se reemplaza por pepsina como enzima mayoritaria a nivel estomacal. La pepsina causa un grado superior de proteólisis en la leche en comparación con la quimosina, con lo cual se forman péptidos cortos con sabor amargo que afectan la calidad final de los quesos.

c.5 Lipasas.

Las enzimas lipolíticas constituyen un importante grupo de enzimas asociado con el metabolismo y degradación de grasa. Estas enzimas hidrolizan triglicéridos dando lugar a mezclas de ácidos grasos libres, monoglicéridos y diglicéridos. Las lipasas son de interés en la industria de alimentos, y si no se controlan pueden dar lugar a rancidez indeseable en los productos lácteos, cárnicos y otros que contengan grasa. Por otra parte, las lipasas son esenciales para la producción de sabores y aromas característicos en ciertos alimentos (Carrera, 2003).

2.3.4. Las Enzimas en Procesos Industriales.

Las enzimas tienen muchas aplicaciones en diversos tipos de industrias, entre las que se destaca la alimenticia.

❖ Enzima en la Industria del Almidón y del Azúcar.

En la industria del almidón y del azúcar dependiendo de las enzimas utilizadas, a partir del almidón se pueden obtener jarabes de diferente composición y propiedades físicas. Los jarabes se utilizan en una variedad de alimentos tales como gaseosas, dulces, productos horneados, helados, salsas, alimentos para bebés, frutas enlatadas, conservas, etc. Hay tres etapas básicas en la conversión enzimática del almidón: licuefacción, sacarificación e isomerización.

❖ Enzimas en Productos Lácteos.

En productos lácteos, la aplicación de enzimas en el procesamiento de leche está bien establecida, por el uso del cuajo (quimosina) en la producción de queso, que tal vez representa el empleo más antiguo de enzimas en alimentos. Otras enzimas que participan en la producción de quesos son las lipasas presentes en la leche, las cuales hidrolizan el componente graso, proporcionando cambios característicos en el sabor.

❖ Enzimas Productoras de Jugos de Frutas

Las primeras enzimas empleadas en las industrias de jugos de frutas fueron las enzimas pécticas para la clarificación del jugo de manzana. Actualmente las enzimas pécticas se usan en el procesamiento de muchas otras frutas, junto con amilasas y celulasas.

Durante el procesamiento de los jugos cuando se desintegran los tejidos vegetales, parte de la pectina, que es un componente estructural de las frutas, pasa a la solución. Las enzimas pécticas se usan para facilitar el prensado, la extracción del jugo y la clarificación ayudando a la separación del precipitado floculante.

Las pectinasas se presentan más en frutas y verduras. Las pectinasas de moho (*Aspergillus*, *Rhizopus*) se consiguen en un cultivo superficial. Se añaden a las

frutas y a las verduras cortadas en trozos pequeños, destruyen las largas cadenas de pectina.

Así la viscosidad (resistencia a la fluidez) del zumo baja fuertemente, se facilita la filtración y el rendimiento aumenta de forma considerable. La alimentación de los bebés es otra aplicación importante de las pectinasas, al macerar (ablandar) las frutas y verduras.

También el yogur de frutas y los zumos de fruta turbios son generalmente productos de biotecnología. Para producir zumo de zanahorias en lugar de puré de zanahorias, aparte de pectinasas se añaden celulasas de moho degradadoras de la pared celular.

Las celulasas comerciales producidas por cepas de *Trichoderma reesei*, *penicillium funiculosum* y *Aspergillus niger*, tienen en la actualidad unas aplicaciones limitadas en el procesados de alimentos, en cervecería, en la producción de alcohol y en el tratamiento de desechos.

Las cepas de *A. niger* producen principalmente pectinasas y hemicelulasas. Los componentes mayoritarios de las pectinasas son la pectín esterasa, la endopolimetilgalacturonato liasa y la poligalacturonasa. En los procesos de extracción de zumos de frutas y de elaboración del vino, las pectinasas elevan el rendimiento del zumo, reduce la viscosidad, y mejora la extracción del color de las pieles, de frutas y vegetales macerados (Renneberg, 2008).

❖ **Enzimas en Molineros y Panadería**

En molineros y panadería, el uso de enzimas se debe principalmente a la deficiencia en el trigo y en la harina, de las enzimas naturalmente presentes. El contenido de α -amilasa de la harina depende de las condiciones de crecimiento y de cosecha. En climas húmedos la tendencia será a tener alta actividad de α amilasa debido a germinación de los granos, en tanto que en climas secos el nivel de α amilasa será bajo debido a escasa germinación. Esto conlleva a grandes diferencias en el contenido de amilasa de diferentes lotes de harina.

❖ **Enzimas en Procesamiento de Carne**

Las enzimas importantes para ablandar carne son proteasas de origen vegetal o de microorganismos (*Bacillus subtilis* y *Aspergillus oryzae*). Las enzimas se inyectan antes del sacrificio al animal o se trata la carne con las enzimas antes de cocerla, con lo que se logra un franco ablandamiento sin provocar una proteólisis importante.

❖ **Enzimas en Industria Cervecera**

La cebada se utiliza tradicionalmente para la fabricación de bebidas alcohólicas como la cerveza. En su producción se deben considerar dos operaciones distintas: la maltería y la cervecería.

La preparación de la malta se logra por germinación de la cebada, durante la cual se incrementa el contenido de α amilasa. Las enzimas α y β amilasas naturalmente presentes en el grano actúan sobre el almidón produciendo dextrinas y maltosa, que sirven como sustratos para la fermentación posterior. Las proteasas degradan proteínas formando aminoácidos y péptidos.

❖ **Enzimas en Industrias de Grasas y Aceites**

El uso de enzimas en las industrias de aceites y grasas es muy bajo, aunque se encuentran disponibles enzimas que pueden resolver algunos problemas, por ejemplo minimizar los subproductos indeseables. Las enzimas también se pueden usar para producir aceites y grasas novedosas.

Lipasas específicas, pueden seleccionar los ácidos grasos de algunas posiciones del triglicérido, para incorporar determinados ácidos grasos, sin cambiar los de otras posiciones. De tal manera que es posible modificar por interesterificación el contenido de ácidos grasos, o por transesterificación lograr el re-arreglo de algunos de ellos. Por ejemplo la mantequilla de cacao se requiere en la producción de chocolate y con frecuencia la disponibilidad y el costo fluctúan ampliamente. Sin embargo, aceites como el de palma son baratos y se encuentra buen abastecimiento. Lo que se plantea es modificar el aceite de palma por reacción

con ácido esteárico mediante interesterificación enzimática. La grasa resultante tiene propiedades similares a la mantequilla de cacao (Carrera, 2003).

2.3.5. Aplicaciones enzimáticas para cítricos y frutas tropicales.

La industria del procesamiento de frutas tropicales debe tomar en consideración las enzimas con diferentes actividades, es decir tanto las enzimas endógenas, o sea propias de la fruta, como los preparados enzimáticos exógenos.

Las actividades enzimáticas endógenas desempeñan un papel importante en el procesamiento de la fruta tropical. Debido a la temperatura del ambiente relativamente altas, algunas reacciones enzimáticas se realizan más rápidamente que en zonas climáticas frías. Las reacciones de fermentación (incluyendo las reacciones enzimáticas) se inician más rápidamente y es necesario procesar más rápidamente la fruta sin interrupción.

Las oxidasas (p.ej. polifenoloxidasas) pueden destruir rápidamente el color, aroma y sabor de la fruta. Por lo tanto, el procesamiento debe controlar estas actividades enzimáticas endógenas. Esto se consigue p.ej. reduciendo el tiempo de reacción (procesado rápido), disminuyendo la temperatura (procesado frío o congelado), utilizando inhibidores (antioxidantes, etc.) o bien mediante la inactivación térmica (pasteurización).

Los preparados enzimáticos exógenos (preparados enzimáticos industriales) se utilizan actualmente para una amplia serie de frutas y aplicaciones, como lo indica el Cuadro 8:

- **Pasionaria (granadilla) – *Passiflora***

Zumo turbio

La aplicación de un preparado enzimático de extracción seleccionado (Citrozym Cloudy 100 L, Citrozym G) tiene varias ventajas en la elaboración de un zumo estable en cuanto a enturbiamiento:

- Separación más fácil entre semillas y pulpa.
- Semillas limpias.
- Un aumento del 10% de los rendimientos de zumo.
- Mayor estabilidad de enturbiamiento.
- Mejor sabor natural y aroma del zumo.

El tratamiento enzimático de la pulpa con semillas se realiza durante un período de 20-30 minutos a temperatura ambiente, bajo agitación lenta. La acción combinada de agitación y tratamiento enzimático aumenta la estabilidad de enturbiamiento del producto acabado.

Cuadro 8: Aplicaciones enzimáticas endógenas en diferentes tipos de frutas.

Aplicación Fruta	Extracción	Resolución de Viscosidad	Clarificación	Filtración
Pasionaria	XXX		XX	
Mango	XX	XXX	X	
Papaya	XX	XXX	X	
Guayaba	XXX	XXX	X	
Piña	XX		XX	XXX
Tropical	XX	XXX		XX
Guanábana	XX	XXX	XXX	XX
Plátano		XXX		
Litchi	X	X		
Tamarindo	XX	X	XX	X
Acerola			XXX	X
Anacardo	X	XX	X	
Otras				

Fuente: Janser 2010

Zumo transparente

El zumo de pasionaria transparente se consigue rediluyendo el concentrado turbio a 15°Brix, añadiendo preparados enzimáticos de pectinasa y amilasa, clarificando el zumo a temperatura ambiente antes de la filtración tradicional.

El zumo clarificado puede elaborarse también directamente a partir de la extracción de la fruta. En este caso no debe practicarse agitación en la fase de maceración enzimática de la pulpa. La agitación mejora los sólidos y la estabilidad de enturbiamiento del zumo, pero dificulta la clarificación.

Después del acabado, el zumo se somete a un tratamiento con una dosificación suficiente de un preparado enzimático pectolítico/hemicelulítico para producir un resultado negativo en la prueba de pectina (1 parte de zumo, 2 partes de etanol, HCL al 1%) en 2-3 horas. Se recomienda realizar una fase de pasteurización antes de la clarificación del zumo para evitar el riesgo de fermentación.

Cuando el zumo está libre de pectina, puede centrifugarse, filtrarse y pasteurizarse. No necesitan clarificantes como gelatina, bentonita ni solución de sílice.

• Plátano (banana)-Musa

Anteriormente, los plátanos sólo podían procesarse en puré en una línea de acabado. El desarrollo de enzimas de maceración complejas (Pectinex Ultra SP-L) ha permitido reducir considerablemente la viscosidad de la pulpa de plátano de modo que resulta posible utilizar un decantador para la separación de líquido y sólidos.

Es posible elaborar un zumo de plátano transparente ligeramente coloreado, con un rendimiento superior a un 80% (p/p) después del decantador. Todo el almidón debe gelatinizarse y degradarse con enzimas.

Sólo debe utilizarse puré fresco ya que en caso contrario el almidón puede retrogradar. Los plátanos pelados dan un producto de alta calidad, ligeramente coloreado, con sabor fresco. El rendimiento después del decantador es de aproximadamente el 85% (p/p). En el caso de los plátanos enteros, es necesario realizar un acabado después del tratamiento enzimático con el fin de eliminar las

pieles. El producto acabado puede utilizarse como fuente natural de fructosa. En los tres procesos es importante y beneficioso utilizar fruta bien madura.

Zumo clarificado.

Los zumos transparentes (p.ej. de guayaba) se elaboran mediante tratamiento enzimático en el tanque de clarificación después de un breve tratamiento térmico del zumo (superior a 75 °C para la gelatinización del almidón). La tecnología y las condiciones son similares a las de la clarificación del zumo de manzana. Aparte de las pectinasas, es necesario añadir amiloglucosidasas (*Amylase* AG 300 L) para degradar completamente el almidón.

La presencia de almidón se controla mediante una prueba de yodo y la presencia de pectina mediante una prueba de pectina. Cuando ambas pruebas son negativas, se pueden añadir los clarificantes (gelatina, bentonita, solución de sílice) y la filtración tradicional puede realizarse después de la sedimentación. Además, los zumos libres de pectina y almidón pueden filtrarse directamente mediante UF/MF.

➤ **Otras frutas tropicales y aplicaciones nuevas.**

Los preparados enzimáticos de maceración pueden utilizarse con éxito para la extracción y tratamiento de tamarindo, pitanga, guaraná y otras frutas tropicales. El tratamiento enzimático de las frutas y materiales vegetales permite desarrollar nuevas tecnologías de extracción, mejorar la economía y aumentar la flexibilidad del proceso, aprovechando más las materias primas.

➤ **Eliminación de oxígeno y prevención de la oxidación durante el procesado.**

El oxígeno y la oxidación ocasiona varias reacciones negativas durante el procesado (actividades de polifenol oxidasa (PPO) en mangos y otras frutas tropicales, degradación de la vitamina C, etc.) y el almacenamiento. Los sistemas enzimáticos de glucosa oxidasa (GO) catalizan la reacción de la glucosa en

ácido glucónico, utilizando oxígeno. La aplicación de un preparado enzimático de glucosa oxidasa reduce considerablemente el oxígeno disuelto y la oxidación de fenoles producida por PPO con menos ennegrecimiento.

La aplicación de enzimas GO durante el procesado o almacenamiento de la fruta tropical (mango, anarcado, acerola, guanábana, etc.) es un método relativamente nuevo para proteger sus aromas y sabores altamente sensibles.

➤ **Clarificación del zumo (limón, lima, etc.)**

La clarificación enzimática del zumo de limón y lima es algo distinta de la clarificación de los zumos de otras frutas. La principal diferencia es el pH mucho más bajo (lima 1,8-2,7; limón 2,3-2,9) de estos zumos. El pH óptimo para los preparados enzimáticos pectolíticos estándar es de 3,5-4,5.

A continuación se indica las temperaturas óptimas de clarificación en relación con el pH del zumo:

pH del Zumo	Temperatura óptima
1,8-2,2	15-30°C
2,2-2,6	20-35°C
2,6-3,0	25-40°C

Contrariamente a los demás zumos, los zumos de limón y lima pueden clarificarse con buena estabilidad en el concentrado final simplemente utilizando un preparado enzimático seleccionado (Citrozym LS, Citropex) y solución de sílice. No es necesario realizar una clarificación con gelatina/bentonita (Janser, 2010).

2.4. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

De acuerdo a la Organización Argentino de Acreditación, nos presenta un documento que describe las actividades para la validación de métodos de ensayo no normalizados, desarrollados o diseñados por el laboratorio, métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados y para las verificaciones necesarias para confirmar que un laboratorio puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de utilizarlos para los ensayos (OAA, 2003).

2.4.1. Selección del método analítico.

La selección del método analítico ha sido considerada siempre como una de las etapas de mayor importancia en el esquema de un análisis completo. Para la correcta selección del método adecuado para la realización de un análisis es necesario considerar diferentes aspectos tales como:

2.4.1.1. Características del Analito.

En este sentido debemos considerar la naturaleza química y las propiedades fisicoquímicas del componente que se desea cuantificar. No existe ningún método analítico universal, es decir que sea aplicable a la determinación de toda clase de analito. De hecho no se utilizan los mismos métodos para la determinación de sustancias orgánicas que para sustancias inorgánicas o para la determinación de sustancias de bajo peso molecular.

2.4.1.2. Características de la Matriz.

Dentro de las características importantes a considerar está el estado de agregación y la complejidad de la matriz. No es lo mismo realizar un análisis sobre un producto líquido que sobre un sólido, puesto que la matriz ha de sufrir diferentes tratamientos en función de su estado de agregación. Así mismo, estos

tratamientos serán más engorrosos en la medida que la matriz sea más compleja, es decir, posea un mayor número de componentes, puesto que entonces el método seleccionado ha de ser más específico a fin de determinar solo aquella sustancia que interesa (analito) en presencia de un gran número de otras sustancias que coexisten en la matriz. Si por el contrario, se trata de una matriz con un reducido número de sustancias, resulta más fácil muchas veces la selección del método.

2.4.2. Requisitos o Criterios de Validación.

Los requisitos o criterios de validación que debe cumplir un método analítico y que deben ser determinados en el procedimiento de validación, según lo estipulado por diferentes organizaciones internacionales tales como: NMKL, (1996); AOAC, (2000); Codex Alimentarius, (2001) y IUPAC (2002) son los siguientes:

- A. Exactitud (Precisión y Veracidad o Justeza)
- B. Selectividad
- C. Linealidad
- D. Sensibilidad de calibrado
- E. Limite de detección y limite de cuantificación
- F. Tolerancia o fortaleza.

A. Exactitud (Precisión y Veracidad o Justeza).

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible a un valor verdadero. De hecho, se define según la norma ISO 5725-1 (1994) como la proximidad de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado. Cuando sea posible, se realizan un mínimo de 10 repeticiones del ensayo tres días consecutivos. Se compara el promedio de los valores obtenidos con el valor de referencia certificado (μ), teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a ese material. De hecho, la

exactitud es un concepto cualitativo y no es posible medirlo sino a través de la Precisión y la Veracidad o Justeza.

a.1. Precisión. Es el grado de correlación o cercanía entre los resultados analíticos individuales que se obtienen al aplicar repetidamente el método a varias muestras, de una homogénea común.

Diferentes factores (excluyendo las variaciones entre especies supuestamente idénticas) pueden contribuir la variabilidad de los resultados de un método de determinación acorde: El analista, equipamiento utilizado, calibración del mismo, medio ambiente (temperatura, humedad, contaminación del aire, etc), y tiempo que se separa la realización de las mediciones. La precisión puede expresarse en dos niveles:

- **Repetibilidad:** es la precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones (un solo operador, el mismo equipo, los mismos reactivos, el mismo día, etc.). Se lleva a cabo sobre la base de un número suficiente de determinaciones de una mezcla homogénea del producto. Los ensayos en este mismo contexto, son los análisis independientes de muestras que han pasado por todo el procedimiento analítico. Desde la preparación de la muestra hasta los resultados de las pruebas finales. Para realizar un estudio de Repetibilidad, la concentración del analito en la muestra problema suele ser similar a la nominal o declarada. Puede ser necesario utilizar dos concentraciones del analito (alta y baja) o más (alta, media y baja), cada uno con sus replicas cuando la proporción de analito en la muestra puede oscilar notablemente. La repetibilidad describe la variabilidad mínima del proceso analítico.
- **Reproducibilidad:** Es la precisión entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones. Debe ser desarrollada en diferentes días, por diferentes personas, empleando reactivos diferentes, columnas, etc. y debe realizarse al menos por otro analista. La reproducibilidad describe la máxima variabilidad de un procedimiento analítico ya que incluye el estudio en diferentes condiciones.

La precisión puede calcularse matemáticamente a través del coeficiente de variación o variabilidad (CV) según la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Ec. 01}$$

Donde: S es la desviación estándar, que como se recordará es un parámetro estadístico que expresa la desviación de los valores con respecto al valor medio y puede calcularse a través de la siguiente expresión.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - X_i)^2}{n - 1}} \quad \text{Ec. 02}$$

Donde: \bar{X} = Valor medio obtenido de las diferentes repeticiones.

X_i = Valor individual obtenido para cada una de las diferentes determinaciones.

n = Número de determinaciones (repeticiones realizadas).

Un método será más preciso, en tanto menor coeficiente de variación se obtenga, es decir, cuanto más se acerca entre sí los resultados obtenidos de varios análisis realizados a una misma muestra.

Obviamente el método A es más preciso que el método B, dado que posee un menor coeficiente de variación (3.1% < 5.9%).

Los valores de coeficiente de variación reportados para que un método analítico sea considerado preciso. Se mueve en rango más o menos amplio en la literatura científica que aborda esta temática.

A continuación presentamos los criterios de la validación seguidos por el colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos, Biólogos de México.

Tipo de método	CV permisible
Cromatografías	$\leq 2\%$
Químicos y espectrofotométricos	$\leq 3\%$
Microbiológicos	$\leq 5\%$

Otros autores son más conservadores y reportan para los métodos químicos ($\leq 5\%$) y para los microbiológicos ($\leq 7\%$). De cualquier manera, y con independencia de los valores reportados como aceptables para el coeficiente de variación, estos deben ser tomados solo como una referencia aproximada. Para concluir si realmente un método es o no preciso se requiere de la aplicación de métodos estadísticos tales como el cálculo del intervalo de confianza entre otras pruebas. Debe señalarse que el coeficiente de variación puede también emplearse para determinar la precisión de un analista; siempre y cuando, el método que se aplica esté previamente validado y se considere preciso.

a.2. Veracidad o justeza.

La veracidad o justeza puede definirse como la proximidad de la concordancia entre el valor promedio obtenido en una serie de resultados de ensayo y el valor de referencia aceptado de la propiedad analítica que se está midiendo, o sea, el contenido verdadero de un analito dentro de la muestra en estudio. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinaos que deberán corregirse. La falta de veracidad puede ser por defecto o por exceso:

- Las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas del método y la selectividad no es la adecuada: los resultados finales son superiores a los verdaderos. En este caso, debería modificarse el método para hacerlo más selectivo.

- Las desviaciones por efecto suelen darse en métodos analíticos muy laboriosos en varias fases, extracciones, purificaciones, etc., que se traducen inevitablemente, en una disminución de la recuperación.

La veracidad se expresa matemáticamente en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad del analito presente en la muestra, o bien en forma de diferencia entre el valor real hallado y el valor verdadero. Lo más usual es emplear como parámetro de medida el porcentaje de recuperación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{valor obtenido } (\bar{X})}{\text{valor real}} \times 100 \quad \text{Ec. 03}$$

La determinación del porcentaje de recuperación se puede llevar a cabo a través de tres procedimientos: A) análisis repetido de una muestra de concentración única conocida, B) método de adición de patrón y C) comparación con otro método analítico ya validado.

- **Método de adición de patrón.**

En este caso se trabaja con el extracto del analito obtenido de la matriz original por un procedimiento adecuado. De esta solución se toman como mínimo dos alícuotas, a una de ellas se le añade una cantidad conocida de un patrón de referencia del analito, y ambos se analizan en paralelo.

Los resultados obtenidos de ambas determinaciones se procesan ya la diferencia (muestra + patrón) – (muestra sin patrón) indica la cantidad cuantificada del patrón añadido por el método en cuestión. Este valor se compara con la cantidad de patrón añadido (valor verdadero) y los resultados se expresan como porcentaje de recuperación.

B. Selectividad

La selectividad o especificidad se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencia de impurezas u otros componentes que puedan estar presentes en la muestra.

La selectividad es una condición esencial para conseguir una buena exactitud, por lo que constituye un criterio clave en la validación de un método analítico.

La selectividad depende de las características del propio método analítico y de las características de la muestra (matriz) que se analiza.

Mientras más específica sea la reacción o el principio empleado para la determinación, más selectivo será el método, puesto que se evita reacciones colaterales secundarias. Ahora bien, si la reacción es poco específica, otros compuestos en la muestra serán capaces de reaccionar actuando como interferencias y afectando la exactitud del método.

Por otra parte, la selectividad depende también de las características, naturales y composición de la matriz estudiada. No es lo mismo determinar la concentración de vitamina C en tabletas, una matriz relativamente simple, empleando un método reductimétrico, que determina vitamina C en un alimento vegetal donde puede existir un conjunto de compuestos reductores que experimenten la misma reacción que el analito y actúe como interferencia. De ahí que un método analítico puede ser muy específico para un tipo de muestra (tableta) y poco específico para otra matriz (alimento vegetal).

Los elementos antes expuestos, demuestran que al validar un método de análisis, debe reflejarse claramente no solo el analito que se certifica sino también la matriz para la cual es válida la determinación.

La selectividad se evalúa usualmente a través de la Exactitud (% Recuperación) empleando algunos de los siguientes procedimientos:

- Se prepara una muestra que contiene los componentes usualmente presentes en la matriz original (alimento), excepto el analito y se procede a la determinación del

analito en las condiciones del método evaluados. De forma ideal, ninguno de los componentes presentes debe producir una respuesta cuantificable.

- Se prepara una muestra con un patrón del analito y un componente de las posibles impurezas. Se realiza la cuantificación y se comparan los resultados con una muestra que solo contiene patrón del analito. En este caso hay que aplicar pruebas estadísticas para corroborarla existencia o no de diferencias entre los resultados obtenidos en ambos ensayos.

En resumen un estudio de selectividad debe asegurar que la señal medida con el método analítico procede únicamente de la sustancia a analizar sin interferencias de otros componentes que estén presentes en la matriz estudiada.

C. Linealidad.

Se entiende por linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado. Dicho de otro modo, la linealidad es la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta del método en un intervalo o rango de concentraciones.

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre soluciones de concentraciones crecientes de analito que se determina o sobre muestras problemas a las que se han adicionado cantidades crecientes de un patrón del analito. En ambos casos el procedimiento se conoce como “curva de calibración” o “curva de calibrado”.

Los pasos generales para la realización de una curva de calibración son los siguientes:

1. Se prepara una serie de soluciones de un patrón del analito a concentraciones crecientes y se procede a su determinación en cada solución aplicando el método que se evalúa y obteniéndose para cada solución una respuesta o señal (ml consumidos, absorbancia, índice de refracción, etc.). el número de

soluciones puede estar comprendido entre 6 y 10 y las concentraciones se seleccionan de acuerdo con las cantidades esperadas del analito en la muestra.

2. Se determina la proporcionalidad existente entre la concentración y la respuesta del método analítico, calculando por el método de ajuste mínimo cuadrados la ecuación de regresión lineal del tipo.

$$Y = mx + a \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

x: concentración; **m:** pendiente; **Y:** respuesta del método y **a:** intercepto

Los términos de m (pendiente) y a (intercepto) pueden ser calculados a través de las siguientes expresiones matemáticas.

$$m = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$
$$a = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

donde: n es el número de soluciones preparadas.

Se calcula además el coeficiente de determinación (r^2) el cual refleja el grado de relación o proporcionalidad entre las variables concentración (x) y la respuesta del método (y). El coeficiente de determinación toma valores entre 0 y 1, mientras más se acerque a uno, más linealidad existe entre las variables evaluadas, es decir más lineal es el método analítico.

D. Sensibilidad de calibrado.

La sensibilidad de calibrado (S) se define como el coeficiente diferencial entre la señal medida (respuesta del método) y la concentración del analito, según:

En el caso de una calibración lineal, la sensibilidad de calibrado coincide con la pendiente (m) de la recta de calibración, e indica la capacidad de respuesta del método analítico a pequeñas variaciones de la concentración del analito.

En un método analítico sensible, ligeros incrementos de la concentración del analito provocan incrementos notables de la señal o respuesta que se mide.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Respuesta del método}}{\text{Concentración del analito}} \quad \text{Ec. 5}$$

E. Limite de detección y limite de cuantificación

El límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de detección es por tanto un parámetro analítico de gran interés en ensayos de límites, análisis de trazas, contaminantes y productos de degradación.

Por su parte, el límite de cuantificación (o determinación) es la menor concentración o cantidad de analito que puede ser determinada o cuantificada con aceptable precisión y exactitud, bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación es, por lo tanto, un término cuantitativo (menor cantidad medible) mientras que el límite de detección es cualitativo (menor cantidad detectable).

La determinación práctica de los límites de detección y cuantificación es laboriosa, por lo que solo se efectúa en el caso de métodos empleados para el análisis de trazas, contaminantes e impurezas a muy bajas concentraciones.

Si las concentraciones a determinar son elevadas, se puede sustituir su estudio por la determinación de la precisión y la exactitud a la concentración más baja que presente el analito en la práctica.

F. Tolerancia o fortaleza.

La tolerancia o fortaleza de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones de operación como: temperaturas, laboratorios, columnas, lotes de reactivos, equipos, etc.

La tolerancia generalmente se expresa como la carencia de influencia en los resultados por cambios en las condiciones de operación. Es una medida de la reproducibilidad de los resultados analíticos bajo las condiciones normales de operación de laboratorio a laboratorio y de analista a analista. Para su determinación, se realizan los análisis de muestras tomadas de un mismo lote homogéneo, en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, en diferentes días, etc. las cuales pueden diferir pero se mantienen dentro de los parámetros específicos del método determinada previamente bajo condiciones normales de operación (Zumbado, 2004).

III. MARCO CONCEPTUAL

3.1. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Los compuestos fenólicos presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. Aunque existe una gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas (se conocen más de 8000), la mayor parte de ellos tienen como origen metabólico común la ruta del ácido shiquímico, es el principal camino biosintético de compuestos aromáticos. Esta secuencia metabólica convierte a los metabolitos primarios fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E4P) hasta corismato. Entre los compuestos fenólicos describimos los siguientes:

3.1.2. POLIFENOLES

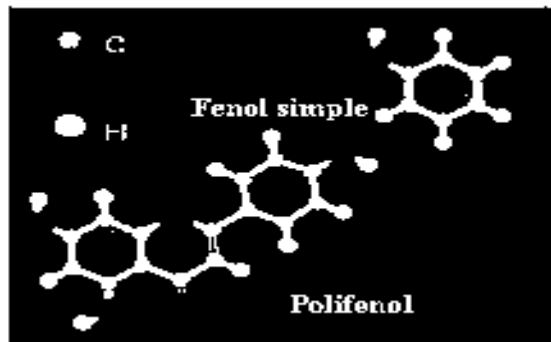
Los polifenoles son compuestos bioactivos con capacidad antioxidante que han despertado un gran interés desde el punto de vista nutricional, por sus acciones no solo en estado de salud, sino en la prevención de las alteraciones funcionales y estructurales de diversas enfermedades. En los últimos años, se les han atribuido efectos beneficiosos frente al desarrollo de diversas enfermedades (cáncer, cardiovasculares y neurodegenerativas) asociadas a un aumento de los procesos de oxidación celular, conocidos como estrés oxidativo. Nuestro cuerpo los sintetiza y pasan a formar parte de la sangre aumentando la capacidad antioxidante de nuestro cuerpo. Las células se ven beneficiadas por la acción de estas sustancias que absorben el impacto que los radicales libres van a tener en el organismo.

Existen muchos tipos de polifenoles, pero los más frecuentes son: los flavonoides, los ácidos, alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos. Los polifenoles se encuentran distribuidos ampliamente en muchas especies vegetales, como semillas de uva, manzana, cacao, corteza de pino, frutas (albaricoques, cerezas,

arándanos, granadas, etc) y en bebidas como en el vino tinto. También están presentes en los frutos secos, la canela, el té verde, el chocolate y en algunas semillas de leguminosas.

Cada tipo de polifenoles tienen una capacidad u otra de inhibir determinados tipos de radicales libres. Por ejemplo los que se encuentran en el vino absorben una encima asociada a la formación de colesterol malo que acaba dañando nuestro organismo. Los que encontramos en las frutas absorben la acción de las sustancias oxidantes de las células que son las causantes del envejecimiento prematuro de las mismas. Por este motivo es importante que ingiramos todo tipo de alimentos ricos en polifenoles. Las frutas y verduras son una gran fuente, cada una de ellas contiene una clase de polifenoles. En cuanto al vino tinto, es un tipo de bebida que contiene varios tipos de polifenoles, por lo que es uno de los mejores aliados para la protección de nuestras células.

Figura N° 12: Estructura química del polifenol.



Fuente: Revista ACE 2013

3.1.3. ANTOCIANINAS

La palabra antocianina deriva del griego anthos (flor) y Kyanos (azul oscuro). Las antocianinas son las responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de las frutas y flores. Es el pigmento más importante, después de la clorofila, que es visible al ojo humano. Se encuentra en muchos alimentos del reino vegetal que van del color rojo al azul o morado como los arándanos (frambuesa azul y negra, zarzamora, cereza, mora azul), fresas, uva azul y negra,

manzana, ciruelas, coles moradas, frijoles rojos y negros, maíz peruano morado, berenjena, cacao, etc.

Además la transformación de estas frutas en confituras o mermeladas requiere ser sometidas a procesos para evitar el pardeamiento (maduración con cambios en color, olor y sabor). Esto provoca la decoloración de las antocianinas, inclusive también pueden reaccionar con el ácido ascórbico natural o añadidos provocándose la degradación de ambos compuestos.

Las antocianinas son derivadas del catión 2-fenilbenzopirilo y debido a la poca solubilidad de éstas en agua, no se encuentran de manera libre en la naturaleza, sino en su forma glucosilada siendo una de las más abundantes la cianidina-3-glucósido. Son pigmentos que pertenecen al grupo de los bioflavonoides y estos a una amplia familia de fitoquímicos que se conocen como flavonoides, de los que se han identificado unos 4.000 diferentes hasta la fecha. Las antocianinas se mostraron como los más potentes antioxidantes de entre 150 flavonoides diferentes.

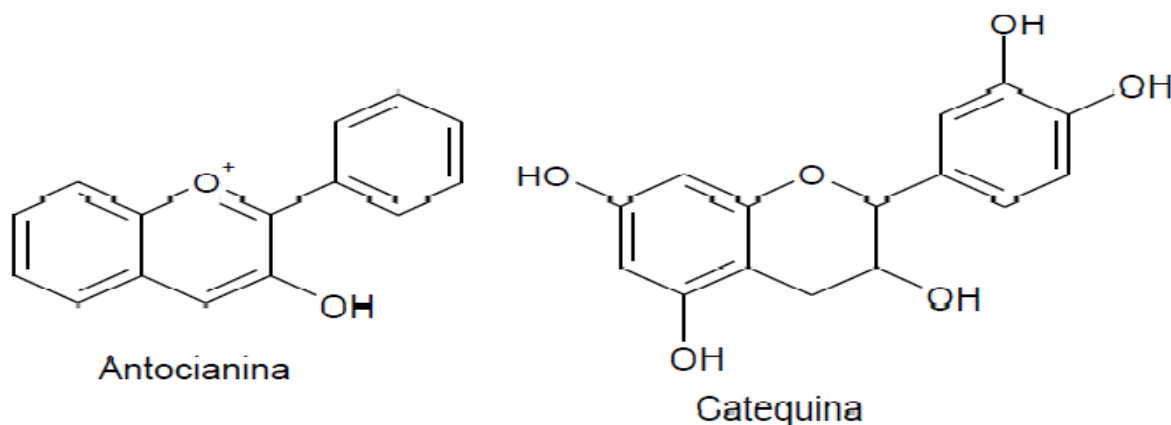
El color de las antocianinas varía en función del pH y de su estructura. Algunas de ellas a pH ácido se muestran de color rojo, a pH básico de color azul y a pH neutro incoloras. En un reciente estudio comparativo entre el maíz azul y el arándano azul, se descubrió que el maíz tenía un contenido cuatro veces superior en antocianinas que el arándano azul, siendo la cianidina la más abundante en el maíz azul y la que posee más actividad antioxidante.

La estabilidad es un problema ya que las antocianinas son degradadas en la presencia de metales, ácido ascórbico, azúcar, oxígeno, temperatura y enzimas.

La inestabilidad al pH es un factor limitante en varias situaciones, afectando el color y la estabilidad química, decolorando en valores de pH por encima de 4,0. En soluciones ácidas la antocianina es roja, pero con el aumento del pH la intensidad del color disminuye. En solución alcalina, el color azul es obtenido, siendo sin embargo, inestable. Para aplicaciones generales, el pH entre 1,0 y 3,5 confiere una mayor estabilidad. Las antocianinas son utilizadas en bebidas ácidas, jaleas, dulces y cosméticos. La adición de ácido ascórbico para el efecto de estabilización

no es recomendada y la presencia de azúcares, especialmente la fructuosa, acelera el proceso de oscurecimiento. Además del pH (principal responsable por la estabilidad de las antocianinas), otros factores contribuyen para su degradación.

Figura N° 13: Estructura Química de la Antocianina y Catequina.



Fuente: Valls 2012

3.1.4. CATEQUINAS y PROANTOCIANIDINAS.

Las catequinas son flavonoides que parecen tener una actividad anti cancerígena reconocida, aunque sus propiedades son mucho más amplias. Entre estas podríamos mencionar sus propiedades antiátricas, antiinflamatorias, antiulcéricas, antiagregantes, immunoestimulantes y hepatoprotectivas, tiene como estructura básica un núcleo de flavón unido mediante un enlace β -glucosídico a un azúcar. Son moléculas que poseen un alto poder antioxidante, logrando proteger a nuestras células de los radicales libres y el estrés oxidativo.

Fueron generadas por las plantas en el curso de la evolución, como protección contra factores ambientales dañinos, como por ejemplo los insectos, hongos, radiación, luz ultravioleta e incluso predadores herbívoros. Algunos de estos factores de protección están constituidos por auténticas fitotoxinas, mientras que otros son antioxidantes o alcaloides naturales.

El té verde, manzanas, uvas y el cacao son ejemplos de alimentos donde podemos encontrar estos compuestos. Las catequinas más interesantes son: la epicatequinas (EC), la epicatequina galata (ECG), la epigalocatequina (EGC) y la epigalocatequina galata (EGCG). De todas ellas, la epigalocatequina galata es la que posee el poder antioxidante más alto. Todas pueden ser encontradas en las hojas del té verde (*Camellia sinensis*) de manera que hasta un 30% del té verde seco corresponde a estos componentes.

Las catequinas están en estudio para la prevención y el tratamiento de cáncer. Una catequina es un tipo de antioxidante.

Los flavonoles polímeros reciben el nombre de taninos condensados o proantocianidinas y corresponden a cadenas formados por diferentes números de unidades de los diversos flavonoles unidad mediante enlaces C4-C8 o C4-C6.

3.2. Hierro en los alimentos.

El hierro es un elemento necesario en el cuerpo para que se forme la sangre. El cuerpo humano contiene normalmente de 3 a 4 g. de hierro, del que más de la mitad se encuentra en forma de hemoglobina, el pigmento rojo de la sangre.

Las mejores fuentes de hierro son las frutas desecadas, los cereales integrales (incluido el pan integral), los frutos secos, las hortalizas de hojas verdes, las semillas y las legumbres. Otros alimentos ricos en hierro, pero que se toman normalmente en cantidades más pequeñas son la harina de soja, el perejil, el berro, las melazas y las algas comestibles.

Ejemplos de cantidades de alimentos que aportan 2 mg de hierro

Tipo de comida

- ✓ Pistachos (14 g)
- ✓ Anacardos tostados (32 g)
- ✓ Lentejas (57 g)
- ✓ Garbanzos hervidos (95 g)

- ✓ Pan integral (74 g)
- ✓ Semillas de sésamo o tahín (19 g)
- ✓ Melazas (22 g)
- ✓ Albaricoques secos (59 g)

Absorción del Hierro

Hasta el 22 % del hierro que se encuentra en la carne se absorbe, mientras sólo de un 1 a un 8% se absorbe de los huevos y alimentos vegetarianos. La absorción del hierro de origen vegetal mejora gracias a la presencia en la comida de la vitamina C (ácido ascórbico), a otros ácidos orgánicos tales como el ácido málico (en calabazas, ciruelas y manzanas) y al ácido cítrico (en frutas cítricas).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar de realización del trabajo.

El trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio Sustancias Naturales y Bioactivos (LSNB), ubicada en el Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP), Kilometro 4.5 carretera Iquitos-Nauta, durante el año 2012.

4.2. Materiales:

Material Biológico.

- Muestra fresca y madura de pulpa de *Myrciaria dubia* H.B.K (camu-camu), procedente de los rodales naturales del Río Tigre.
- Extractos de enzimas comerciales: FoodPro™ Viscothim GC (Extracto de enzima A) y Pektozyme™ MaxLiq (Extracto de enzima B).

Materiales: Los materiales son limpios y esterilizados.

- Botellas de vidrio de 1 Lt,
- Micro tubos de 1,5 a 2,0 ml.
- Tips para micropipetas de 20-200 μ l y de 100-1000 μ l.
- Micropipetas (ependorf) de 20-200 μ l y de 100-1000 μ l.
- Vasos de precipitado.
- Filtro de membrana de nylon de 0.45 μ m x 47 mm.
- Filtro de jeringa puradisc de 0.45 μ m.
- Gradillas de microtubos.
- Viales de 1,5 ml.
- Jeringas descartables de 1 ml.
- Fiolas de 10 ml, 50 ml, y 100 ml
- Cubetas de cuarzo de 1 ml
- Hot plate

Reactivos: Los reactivos empleados para el desarrollo experimental son de grado analítico.

- Isopropanol
- Estándar de ácido ascórbico grado HPLC (Sigma 99 % pureza).
- Agua destilada
- Agua millipore
- Etanol 96° Q.P
- Ácido sulfúrico
- Ácido metafosfórico al 4,5 % Q.P
- Reactivo de Folin
- Vainillina
- Ácido sulfúrico concentrado
- Líquido para el lavado ácido del material de vidrio. Diluir 1 a 100 ácido nítrico concentrado en agua.
- Comprobar el contenido en metales de los ácidos. Utilizar reactivos que no contengan más de 1 mg de metal objeto de determinación por litro.

Equipos: Los equipos utilizados son calibrados y se detallan a continuación.

- HPLC con columna cromatográfica (LiChrosper RP-18)
- Espectrofotómetro UV visible.
- Absorción Atómica (VARIAN Modelo AA2240)
- Balanza analítica ($p = 0.0001$ gr)
- Minivortex
- Ultrasonificador
- Bomba al vacío
- Purificador de agua
- Agitador magnético
- Campana de seguridad

4.3. Tipo y Diseño de la Investigación:

Diseño experimental: Se aplica factorial $3 \times 3 = 9$; El diseño es el 3^2 que consta de dos factores con tres niveles cada uno, y esto es igual a nueve combinaciones de tratamientos. El grado de libertad es de ocho, los efectos principales A y B tienen dos grados de libertad cada uno, y la interacción AB tiene cuatro grados de libertad. Si hay n réplicas habrá un total de $n3^2 - 1$ grado de libertad, correspondiendo para el error $3^2 (n-1)$ grados de libertad.

Tabla 1: Concentraciones de enzimas con el tiempo de tratamiento.

Nivel	-1	0	+1
Concentración de enzima (ppm)	50	100	600
Tiempo (min)	35		120

Fuente: Elaboración propia

Diseño Muestral.

Tabla 2: Diseño experimental para las enzimas

Ensayo	Concentración (ppm)	Tiempo (minutos)
1	-1	-1
2	0	-1
3	+1	-1
4	-1	+1
5	0	+1
6	+1	+1

Fuente: Planeamiento y optimización de experimentos 1995

4.4. Definición de Variables.

1. Variable Independiente:

▪ Enzimas:

FoodPro ViscoThin GC (Extracto de enzima A): Es un extracto enzimático líquido que la preparación derivó de *Trichoderma reesei*, está diseñado para el tratamiento de materiales fibrosos consistente en polisacáridos de poco almidón.

Pektozyme™ MaxLiq (Extracto de enzima B): Es un extracto enzimático líquido complejo de la enzima del pectolytica, producido por fermentación con una tensión seleccionada de fungosidad.

2. Variable dependiente:

Concentración de ácido ascórbico (AA): Es la proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto (AA) en la pulpa de camu-camu, donde el soluto es la sustancia que se disuelve.

4.5. Descripción de cada proceso de trabajo.

4.5.1. Colección y extracción de pulpa de camu-camu.

a) Colecta de las muestras.

Los frutos frescos y maduros serán colectadas en los sembríos de los productores de Requena, la muestra es transportada en bolsas plásticas bien selladas y rotuladas, indicando la fecha, hora de colecta y cantidad colectada (g).

b) Procesamiento de la muestra.

Los frutos maduros serán seleccionados, utilizando como muestra aquellos que no presentan golpes y hongos. Se separa manualmente la cáscara y semillas, de esa forma evitar la mezcla de pulpa y cáscara. Las muestras serán conservadas en envases de 1L a una temperatura de -20 °C, hasta su posterior evaluación.

4.5.2. Tratamiento enzimático en pulpa de camu-camu.

En un vaso precipitado de 500 ml se pesa 300 ml de pulpa de camu-camu, las reacciones enzimáticas se lleva a cabo utilizando extractos enzimáticos comerciales: FoodPro™ Viscothim GC (Extracto de enzima A), y Pektozyme™ MaxLiq (Extracto de enzima B), la dosis empleadas es de 50,100 y 600 ppm (0.005, 0.01 y 0.06 %) respecto al peso total de la materia prima. El proceso es controlado en un agitador magnético a 1600 rpm a la temperatura de 48 °C, en los tiempos de 30 y 120 minutos. El tratamiento es acondicionado de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4: Concentraciones de tratamiento enzimático en pulpa de camu-camu.

Tratamientos	Extractos de enzimas	Concentración (ppm)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
T1	EA	50	48	35
T2	EA	100	48	35
T3	EA	600	48	35
T4	EA	50	48	120
T5	EA	100	48	120
T6	EA	600	48	120
T7	EB	50	48	35
T8	EB	100	48	35
T9	EB	600	48	35
T10	EB	50	48	120
T11	EB	100	48	120
T12	EB	600	48	120

Fuente: Elaboración propia

Los parámetros de tratamiento enzimáticos son trabajados de acuerdo a los datos de concentración, tiempo, y temperatura presentados en el certificado de calidad de los productos de extractos de enzimas comerciales.

4.5.3. Validación del método de determinación del ácido ascórbico.

1) Preparación de las soluciones de trabajo.

❖ Fase móvil.

Se diluye 0.5 µl de ácido sulfúrico en 1 L de agua ultra pura (millipore), ajustando a un pH de 2,2. Posteriormente la fase móvil es filtrada con una membrana de nylon de 0.45 µm, y desgasificada en la bomba al vacío. Se realiza 10 corridas cromatográficas de la fase móvil por HPLC, para asegurar que no haya interferencias, así corroborar la especificidad del método.

❖ Ácido metafosfórico al 4,5 % (Solución extractora de ácido ascórbico)

En una fiola de 100 ml se diluye 4,5 g de ácido metafosfórico con agua millipore, se lleva a homogenizar por 15 minutos a 30 °C en el equipo ultrasonificador.

❖ Preparación de Estándares.

Se prepara un estándar patrón de 0.04 mg/ml; en una fiola de 50 ml se pesa 2 mg de estándar de ácido ascórbico de 99.9 %, aforando con ácido metafosfórico al 4,5 %. Del estándar patrón, se realiza diluciones a concentraciones descritas en la Tabla 3 en micro tubos de 1.5 ml. El grupo de estándares será homogenizados con el minivortex y protegidos contra la luz con un forro de papel aluminio.

Tabla 3: Concentraciones de estándares de AA (mg/ml)

Estándares	Concentración mg/ml	Concentración en ppm
S1	0.0400	40.0
S2	0.0350	35.0
S3	0.0250	25.0
S4	0.0200	20.0
S5	0.0100	10.0
S6	0.0050	5.0
S7	0.0035	3.5
S8	0.0025	2.5
S9	0.0020	2.0
S10	0.0015	1.5

Fuente: Elaboración propia

Todos los estándares son filtrados a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm de porosidad, y colocados en un vial de 1,5 ml, posteriormente es inyectado por 3 veces, para ver su repetibilidad y linealidad.

2) Validación del método.

El criterio de validación del método de determinación del ácido ascórbico se realizara de la siguiente forma.

a) Exactitud. Se mide a través de lo siguiente:

- **Precisión.** se evalúa mediante el coeficiente de variación (CV) que presenta los resultados de repetibilidad y reproducibilidad de una muestra patrón analizada. Durante cuatro días se realizara corridas repetidas con una muestra patrón de 10 ppm de AA. Cada día se prepara muestra patrón fresco, ya que el AA es inestable.

Las muestras preparadas son homogenizadas con el minivortex y protegidos contra la luz con forro de papel aluminio, se lleva al equipo ultrasonificador a 30 °C por un espacio de 10 minutos.

b) Linealidad.

Con soluciones patrón de AA de 1.5 a 40.0 ppm, se evalúa la linealidad ó curva de calibración, con criterio de:

- Rango de linealidad: $R \geq 0,994$, $R^2 \geq 0,990$ y
- Coeficiente de variación: $CV \leq 5,00 \%$, cada patrón se inyectará por triplicado, se determina la curva entre la concentración y la respuesta del analito, calculándose por el método de ajuste de mínimos cuadrados a la ecuación de regresión lineal.

c) Sensibilidad de calibrado.

Se determina la sensibilidad de calibrado con concentraciones mínimas de AA de 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; y 1.0 ppm, referente a las concentraciones de curva de calibración.

d) Estabilidad.

Con muestras patrones de 40.0 ppm, conservando a las temperaturas de -20; 20 y 32 °C, se procede a determinar la estabilidad del AA a los 10 minutos, 2 y 5 horas después de preparado la muestra patrón.

e) Cuantificación del Ácido Ascórbico.

En base a la curva de calibración estándar, se procede a cuantificar las concentraciones de AA presentes en pulpa de camu-camu. Las corridas cromatográfica se realiza en el equipo HPLC a una longitud de onda de 200 a 300 nm, con flujo de 1.0 ml/min. Las muestras son inyectadas por triplicado.

4.5.4. Otros Análisis.

a) Compuestos fenólicos.

- **Metodología de extracción de los compuestos fenólicos:** Se pesan 0,5 gramos de la muestra de pulpa de camu-camu con y sin tratamiento enzimático, se extraen sucesivamente con 3 volúmenes de 25 ml de etanol absoluto acidulado con un 1% de ácido fórmico. El extracto se evapora hasta sequedad en la estufa controlando que la temperatura no supere los 40 °C. El residuo seco se redissuelve en una solución de metanol al 50% acidulado con un 1% de ácido fórmico, y se lleva a un volumen de 10 ml. Se guarda en alícuotas a -20 °C hasta el análisis.
- **Determinación de antocianos totales:** Se efectúa mediante la lectura de absorbancia a 535 nm, previa dilución de las muestras.
- **Determinación de compuestos fenólicos totales:** Se realiza la medida del índice de Folin, para lo cual se tratan 40 µl de muestra con 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 ml de carbonato sódico al 20% (p/v), y se llevan a 10 ml. Transcurrida media hora, se efectúa la lectura de absorbancia a 700 nm.
- **Análisis de catequinas y proantocianidoles:** Se aplica el ensayo de la vainillina, se mezclan 0,5 ml del extracto con 1,25 ml de vainillina en metanol (1%,p/v) y con 1,25 ml de ácido sulfúrico 25% (v/v) en metanol. El blanco se prepara simultáneamente del mismo modo, pero sustituyendo la solución de vainillina por metanol. Se efectúa la lectura de absorbancia a 500 nm pasados 15 minutos.

b) Concentración de Hierro.

Primera Etapa: Determinación de Ceniza.

1. Colocar el crisol limpio en estufa a 100°C durante una hora.
2. Colocar el crisol en el desecador para que se enfríe y pesarlo, siempre manipulando con pinzas de metal o guantes para evitar ensuciarlo con la grasa de los dedos.
3. Pesarse 1,5 a 2,0 g de muestra y colocarlo en el crisol de porcelana
4. Colocar en la mufla a temperatura de 550 °C por 3-5 horas
5. Cumplido el tiempo de incineración, retirar el crisol de la mufla cuando la temperatura haya descendido a 100°C; colocarlo en un desecador para que se enfríe.
6. Pesarse el crisol con las cenizas.
7. Calcular el peso de la ceniza.

Cálculo

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{(W2 - W1)}{W3} \times 100$$

Donde:

W1 = Peso (g) crisol; **W2** = Peso (g) crisol + ceniza y **W3** = Peso (g) muestra

Segunda Etapa: Identificación del Elemento

REACTIVOS

- Ácido clorhídrico 6N, 3N y 0,3 N.
- Cloruro de lantano al 10% p/v
- Agua destilada de buena calidad o desionizada

- Papel de filtro Whatman 541 ó Schleicher and Schül N° 589-1. Lavar los papeles de filtro antes del uso con ácido clorhídrico 3 N para eliminar las trazas de metales.
- Soluciones madre patrones conteniendo 1mg/L. Pesar las cantidades de reactivos para análisis que se indican en la tabla 5 y disolver las sales en 25 mL de ácido clorhídrico 3 N y diluir a 250 mL de agua.
- Soluciones Patrones. Diluir la solución madre patrón con agua (si se aplica la digestión húmeda) ó ácido clorhídrico 0,3 N (si se aplica la incineración en seco) a las concentraciones que caigan dentro del margen de trabajo. Añadir otras sales si es necesario tal como indica la primera columna de la tabla 2.

Equipo de Detección.

Se utiliza el Equipo de Absorción Atómica (Marca VARIAN, Modelo AA2240) el cual requiere calibración con patrones conocidos para cada serie de determinaciones de cada elemento.

Material de vidrio especial para análisis de metales traza. Todo el material de vidrio debe lavarse perfectamente con ácido nítrico diluido antes del uso. Mantener el material de vidrio utilizado para análisis de metales traza separado de otro material de vidrio de uso general.

PROCEDIMIENTO

Cenizas obtenidas por incineración seca.

1. Tratar las cenizas con 5 – 10 mL de ácido clorhídrico 6 N hasta mojarlas totalmente y a continuación desecar cuidadosamente sobre placa caliente a temperatura moderada.
2. Añadir 15 mL de ácido clorhídrico 3 N y calentar el crisol sobre la placa caliente hasta que la solución comience justamente a hervir.
3. Enfriar y filtrar a través de papel de filtro hacia un matraz volumétrico reteniendo en el crisol la mayor cantidad posible de sólidos.
4. Añadir 10 mL de ácido clorhídrico 3 N al crisol y calentar hasta que la solución comience justamente a hervir.

5. Enfriar y filtrar hacia el matraz volumétrico.
6. Lavar el crisol al menos tres veces con agua y filtrar los lavados hacia el matraz.
7. Lavar perfectamente el papel de filtro y recoger los lavados en el matraz.
8. Si se va a determinar calcio añadir 5 mL de solución de cloruro de lantano por 100 mL de solución.
9. Enfriar y diluir el contenido del matraz hasta la señal de enrase con agua.
10. Preparar un blanco tomando las mismas cantidades de los reactivos indicados en las instrucciones 1 – 9.

Calibración del aparato y medida de las muestras

1. Poner en marcha el aparato de acuerdo con las instrucciones.
2. Medir las soluciones de calibración y la solución en blanco de los reactivos.
3. Mientras se están midiendo las muestras comprobar periódicamente que los valores de calibración permanezcan constantes.
4. Para los metales objeto de análisis preparar una curva de calibración representando gráficamente los valores de absorción o emisión frente a la concentración del metal $\mu\text{g/mL}$.

CÁLCULO

Para los cálculos del hierro se utiliza la curva de calibración estándar (Figura 14) y leer la concentración del metal ($\mu\text{g/mL}$) que corresponda a los valores de absorción o emisión de las muestras y blanco.

Si: W = Peso (g) de las muestras

V = Volumen (mL) del extracto

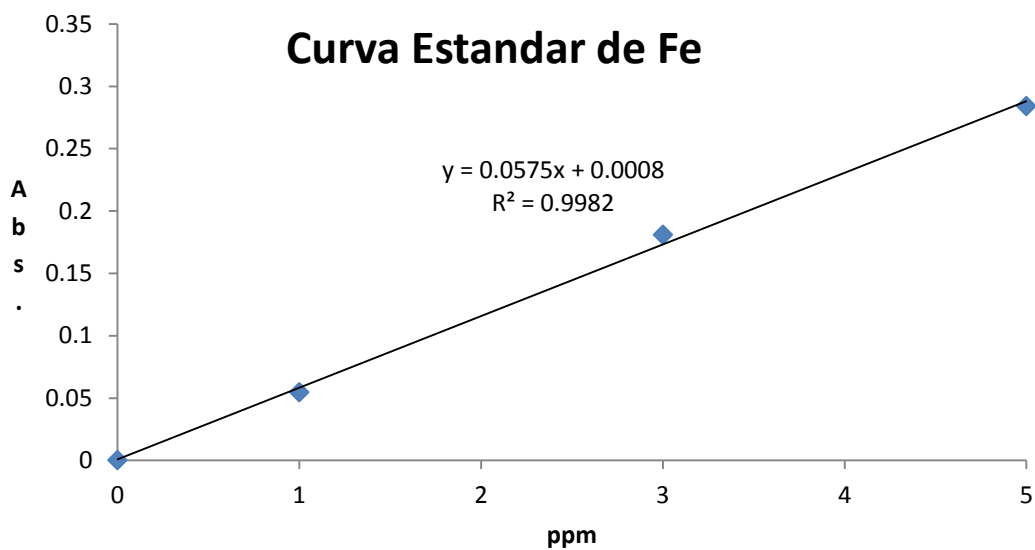
a = Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de la solución de la muestra problema.

b = Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de la solución en blanco.

Entonces:

$$\text{Contenido de metal} = \frac{(a - b) \times V}{10 W}$$

Figura N° 14: Curva de Calibración del Hierro (Fe).



Fuente: IIAP 2012

V. RESULTADOS

5.1. Proceso de validación.

A. Exactitud. Se midió a través de lo siguiente:

- **Precisión.** Se mide a través de los resultados mostrados en la Tabla 7, el método presenta una buena exactitud y precisión.

B. Rango de Linealidad.

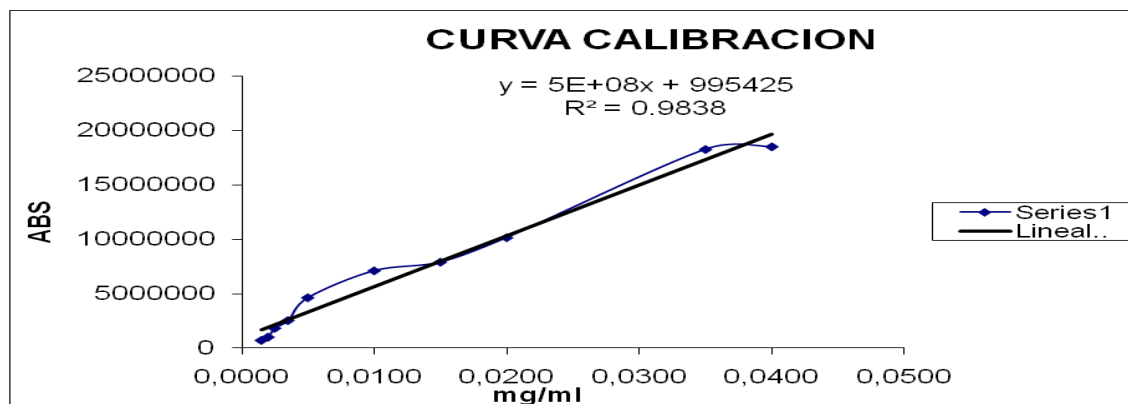
Con soluciones patrones de AA a concentraciones crecientes de 0.0015 a 0.0400 mg/ml se procedió a determinar la linealidad del analito, en la Tabla 5 se muestra los resultados, presentándose una proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta del método, con coeficiente de variación de $CV \leq 5.00\%$, regresión lineal de $R^2 \geq 0.9838$ y $R \geq 0.9918$, obteniéndose la curva de calibración como se muestra en la Figura 15.

Tabla 5: Concentraciones estándares de AA para la curva de calibración.

N°	Estándares, mg/ml	Área, mUA	DS	CV %
1	0.0015	711396	20547	2.9
2	0.0020	1012449	12502	1.2
3	0.0025	1826726	97931	5.4
4	0.0035	2533953	72490	2.9
5	0.0050	4634095	274631	5.9
6	0.0100	7110334	321764	4.5
7	0.0150	7906207	98609	1.2
8	0.0200	10161744	406311	4.0
9	0.0350	18271880	178043	1.0
10	0.0400	18394643	1276850	6.9

Fuente: Elaboración propia

Figura N° 15: Curva de calibración estándar de AA.



Fuente: Elaboración propia

C. Sensibilidad.

En la Tabla 6, se muestra resultados de sensibilidad del método con soluciones patrones de 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; y 1.0 mg/L de AA con respecto a la de curva de calibración. Presenta un CV \leq 5.00 %.

Tabla 6: Sensibilidad del AA ascórbico a concentraciones de estándares mínimas a la curva de calibración.

Concentraciones (mg/L)	0.1	0.2	0.3	0.5	1.0
Replicas	área	área	área	área	área
1	65324.0	165786.0	150644.0	284010.0	401109.0
2	65118.0	165036.0	150810.0	281336.0	395021.0
3	65522.0	164348.0	151458.0	282970.0	395330.0
Promedio	21773.8	55018.9	50323.6	94257.3	132384.4
DS	202.0	719.2	430.1	1348.0	3429.2
CV (%)	0.9	1.3	0.9	1.4	2.6

Fuente: Elaboración propia

D. Repetibilidad.

Se preparó cada día una muestra patrón fresco de 10,0 mg/L de AA, sometiéndose al análisis en las mismas condiciones de operación (mismo operador, equipo, laboratorio y en pequeños intervalos de tiempo). En la tabla 7 presenta los resultados del analito, indicando la precisión y exactitud del método, viéndose a través del $CV \leq 5.00 \%$. En este análisis de repetibilidad muestra la variabilidad mínima del proceso analítico.

Tabla 7: Repetibilidad de un patrón de 10.0 mg/L de AA medido en cuatro días consecutivos.

Días	1	2	3	4
Replicas	mg/100g	mg/100g	mg/100g	mg/100g
1	1237.39	1094.36	1645.80	1018.85
2	1270.73	1101.25	1603.09	1031.93
3	1238.12	1086.79	1627.08	1030.08
Promedio	416.25	364.71	541.78	342.3
DS	19.04	7.23	21.41	7.08
CV %	4.6	2.0	4.0	2.1

Fuente: Elaboración propia

E. Estabilidad.

Para medir la estabilidad del método de determinación del AA, se preparó tres patrones de 40 mg/l, conservándose a las temperaturas dadas, realizándose lecturas a los 10 minutos, 2 y 5 horas después de preparado la muestra patrón. A 20 °C es 22509105.7 y 21774330.7; 32 °C es 22179424.0, 22052653.7 y 21735069.7; -20 °C es 22378412.0 y 18423500.3 en mAU (unidades de área de absorbancia).

Tabla 8: Estabilidad del método de determinación del AA a diferentes temperaturas.

Tiempo y Temperatura	AA, 10 min 32°C	AA, 2 Horas 32°C	AA, 5 Horas 32°C	AA, 2 Horas 20°C	AA, 5 Horas 20°C	AA, 2 Horas -20°C	AA, 5 Horas -20°C
Replicas	mAU	mAU	mAU	mAU	mAU	mAU	mAU
1	22216642.0	22471557.0	22191728.0	22545420.0	22226710.0	21632748.0	18204202.0
2	22384873.0	22485749.0	20957287.0	22533361.0	22115674.0	22447805.0	18990729.0
3	21936757.0	21200655.0	22056194.0	22448536.0	20980608.0	23054683.0	18075570.0
Promedio	22179424.0	22052653.7	21735069.7	22509105.7	21774330.7	22378412.0	18423500.3
DS	226364.5	737886.6	676979.9	52800.3	689622.4	713502.9	495426.9
CV (%)	1.0	3.3	3.1	0.2	3.2	3.2	2.7

Fuente: Elaboración propia

F. Cuantificación del Ácido Ascórbico.

En base a la curva de calibración estándar, se procedió a cuantificar las concentraciones de AA presentes en pulpa de Camu-Camu. Las corridas cromatografía se realizó en el equipo HPLC a una longitud de onda de 245 nm, con flujo de 1.0 ml/min, los resultados se presentan en la Tabla 5.

5.2. Tratamiento enzimático de pulpa de camu-camu.

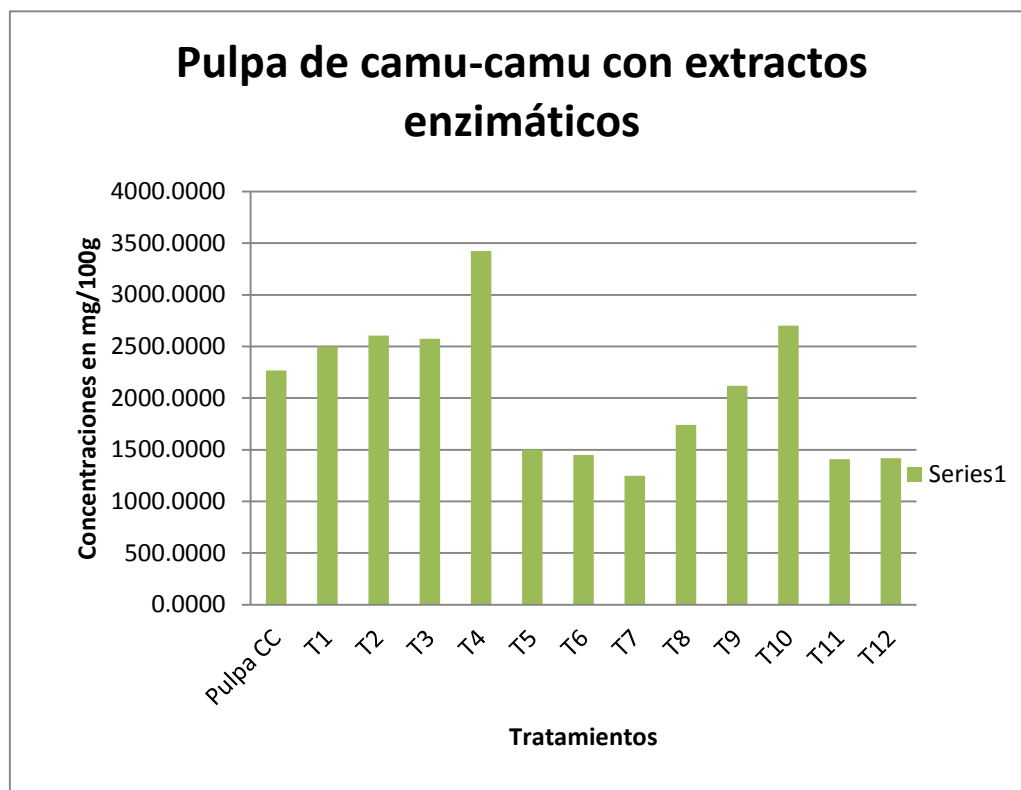
La concentración de ácido ascórbico (AA) en la pulpa de camu-camu es de 2265.80 mg/100 g de pulpa; la Tabla 9 muestra incremento del AA en los tratamientos 1, 2, 3 y 4 con valores de 2500.91, 2605.98, 2573.72, y 3423.21 mg/100 g de pulpa de camu-camu tratada con el extracto de enzima A. Con respecto al extracto de enzima B, el incremento del AA se da en el tratamiento 10 con 2701.4419 mg/100 g.

Tabla 9: Cuantificación del AA en pulpa de camu-Camu con Extractos Enzimáticos.

Tratamientos	Muestra	AA (mg/ml)	AA (mg/100g)	% Incremento/Decremento
	Pulpa de Camu-Camu	22.6580	2265.80	10.37
T1		25.0091	2500.91	10.37
T2		26.0598	2605.98	15.01
T3	Enzima A	25.7372	2573.72	13.59
T4	Enzima A	34.2322	3423.22	51.08
T5	Enzima A	15.0058	1500.58	-33.77
T6	Enzima A	14.4925	1449.25	-36.03
T7	Enzima A	12.4790	1247.90	-44.92
T8	Enzima A	17.3995	1739.95	-23.20
T9	Enzima B	21.1909	2119.09	-6.47
T10	Enzima B	27.0144	2701.44	19.22
T11	Enzima B	14.0770	1407.70	-37.87
T12	Enzima B	14.1735	1417.35	-37.44

Fuente: Elaboración propia
Enzima B
Enzima B

Figura N° 16: Grafico de ccuantificación del AA en pulpa de Camu-Camu tratadas con Extractos Enzimáticos.



Fuente: Elaboración propia.

Del tratamiento 1 al 6 son resultados con el extracto A y del 7 a 12 con extracto B.

5.2 Determinación de compuestos fenólicos.

Los resultados se muestran en la Tabla 10, el contenido de **polifenoles** en camu-camu es de 1995.72 mg/100 g de pulpa, y concentraciones de 2139.79; 2011.34; 2012.00; 2041.13; 2005.13 mg/ 100 g de pulpa con los extractos enzimáticos.

Los compuestos de **antocianinas** es 0.240 mg/ 100 g de pulpa, y concentraciones de 0.431; 0.324; 0.412; 0.339 mg/100 g de pulpa con extractos enzimáticos.

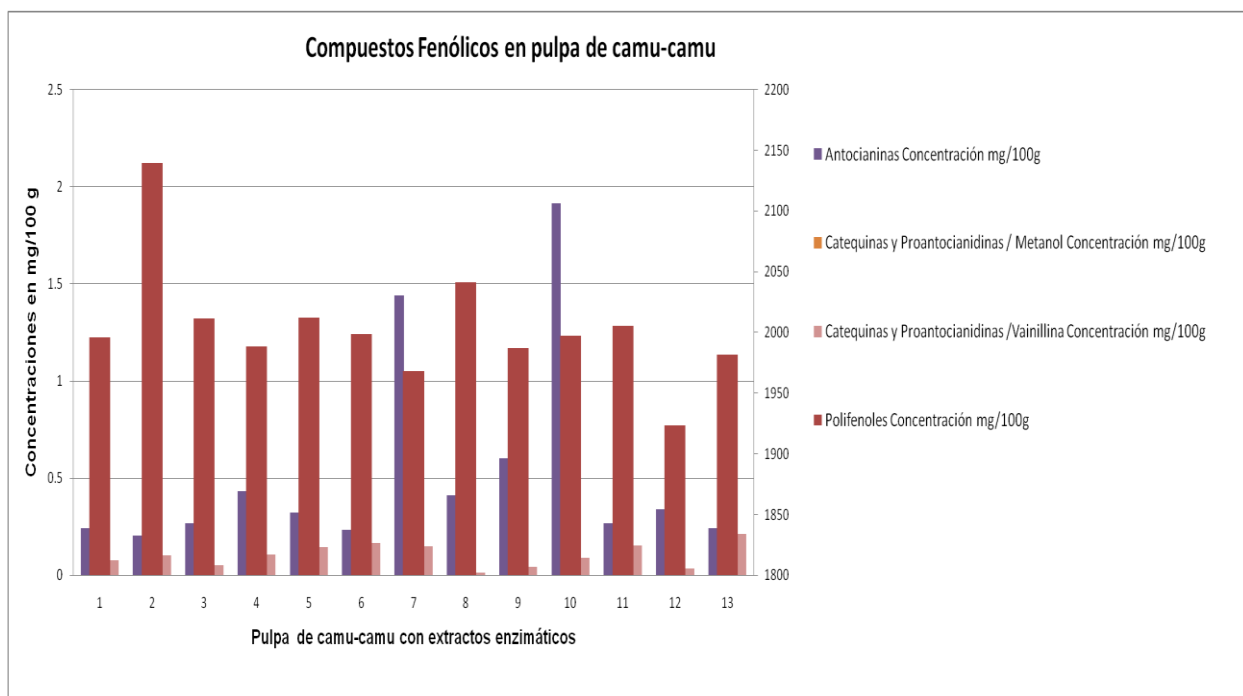
Las concentraciones de catequina y proantocianidinas realizados con el uso metanol y vainillina; los resultados con metanol en camu-camu es de 0.007 mg/100 g en pulpa, y de 0.359; 0.68; 0.063 mg/100 g de pulpa con extractos enzimáticos. Con vainillina en camu-camu es de 0.078 mg/100 g de pulpa, y de 0.165; 0.151; y 0.212 mg/ 100 g de pulpa con extractos enzimáticos.

Tabla 10: Compuestos Fenólicos Presentes en Pulpa de Camu-Camu con tratamiento enzimático.

Compuestos Fenólicos								
Muestra	Polifenoles (ABS 700 nm) promedio	Concentración mg/100g	Antocianinas (ABS 535 nm) promedio	Concentración mg/100g	Catequinas y Proantocianidi- nas / Metanol (ABS 500 nm) promedio	Concentración mg/100g	Catequinas y Proantocianidi- nas /Vainillina (ABS 500 nm) promedio	Concentración mg/100g
PCC	2.842	1995.72	0.110	0.240	0.003	0.007	0.029	0.078
T1	3.046	2139.79	0.093	0.202	0.135	0.359	0.038	0.100
T2	2.864	2011.34	0.187	0.268	0.001	0.002	0.019	0.051
T3	2.832	1988.28	0.123	0.431	0.015	0.041	0.040	0.107
T4	2.865	2012.00	0.198	0.324	0.026	0.068	0.054	0.142
T5	2.846	1998.47	0.149	0.235	0.008	0.021	0.062	0.165
T6	2.803	1968.09	0.108	1.440	0.010	0.027	0.057	0.150
T7	2.906	2041.13	0.662	0.413	0.024	0.063	0.005	0.014
T8	2.830	1986.94	0.190	0.603	0.008	0.021	0.016	0.043
T9	2.844	1997.41	0.277	1.914	0.005	0.012	0.033	0.087
T10	2.855	2005.13	0.880	0.266	0.058	0.155	0.057	0.151
T11	2.740	1923.62	0.122	0.339	0.007	0.018	0.013	0.034
T12	2.822	1981.60	0.156	0.240	0.003	0.008	0.080	0.212

Fuente: Elaboración propia

Figura N° 17: Gráfico de cuantificación compuestos fenólicos en pulpa de Camu-Camu tratadas con Extractos Enzimáticos.



Fuente: Elaboración propia

5.3. Determinación de Hierro (Fe).

Los resultados de concentración de hierro se muestra en la Tabla 11, en camu-camu presenta 12.08 ppm de pulpa, en los tratamientos con extracto enzimático A es de 13.17; 16.53 ppm, y en el extracto enzimático B es de 18.42 ppm.

Tabla 11: Concentraciones de Hierro en pulpa de Camu-Camu con tratamiento enzimático

N°	Código	ppm	Promedio	Desviación	CV %		
1	PCC	13.8	11.5	10.95	12.08	1.51	12.512
2	T1	7.65	6.75	6.25	6.88	0.71	10.307
3	T2	13.15	12.35	14	13.17	0.83	6.267
4	T3	15.8	17.05	16.75	16.53	0.65	3.947
5	T10	19	18.55	17.7	18.42	0.66	3.585

Fuente: Elaboración propia

VI. DISCUSIÓN

6.1. Validación del método de determinación del ácido ascórbico por HPLC.

Con soluciones patrones de ácido ascórbico a concentraciones crecientes de 0.0015 a 0.0400 ppm se determinó la linealidad del analito, del cual presentó buena proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta del método, con coeficiente de variación de $CV \leq 5.00 \%$, regresión lineal de $R^2 \geq 0.9838$ y $R \geq 0.9918$, obteniéndose A) Una buena curva de calibración; B) Repetibilidad para verificar la exactitud, precisión; B) Estabilidad del AA es importante, y se mantuvo estable en diferentes condiciones de conservación. En otra investigación; Ledezma (2005) en la validación de AA por HPLC, preparo 5 disoluciones madre, independientes de 1000 ppm de AA y construyó la curva de calibración con 6 patrones de 10-200 ppm, siendo diluidos después para bajar la concentración, obtuvo un rango de linealidad de $R^2 \geq 0.9996$. Gutiérrez (2007), en su trabajo realizado indica los valores entre las pendientes de la curva de calibración y adición estándar no presentaron diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 %, por lo tanto se cuantificó por curva de calibración empleando el método de mínimos cuadrados con los datos sin promediar.

6.2. Tratamiento enzimático de pulpa de camu-camu.

El tratamiento con los extractos de enzimas comerciales FoodPro™ Viscothim GC (Extracto de enzima A) y Pektozyme™ MaxLiq (Extracto de enzima B), para mejorar la concentración del ácido ascórbico (AA) en pulpa de *Myrciaria Dubia* H.B.K (camu-camu), se obtuvo excelentes resultados con el extracto A, presentando incrementos de 2500.91; 2605.98; 2573.72; y 3423.22 mg/100 g de pulpa superando a la pulpa sin tratamiento, en el extracto B presento incremento de 2701.44 mg/100 g de pulpa. Similar a lo reportado por Nur (2010) que realizó ensayos de tratamientos en *Hylocereus undatus* (Fruto de Dragón) con extractos de enzimas comerciales Pectinex Ultra SP-L and Pectinex CLEAR, obtuvieron como resultado que la pulpa no tratada tenía ligeramente más alto contenido de vitamina C que las muestras tratadas con enzimas y de control, debido a los efectos de aplicación de calor durante el tratamiento.

De acuerdo a lo que define Janser (2006), la actividad de las enzimas desempeña un papel importante en el procesado de fruta tropical y que debido a las temperaturas del ambiente relativamente altas, algunas reacciones enzimáticas se realizan más rápidamente que a temperaturas frías, menciona también que algunas actividades de las enzimas pueden destruir rápidamente el color, aroma, y sabor de la fruta, actividades que se puede manejar con disminución del tiempo de reacción, temperatura y otros parámetros de control.

6.3 Determinación de compuestos fenólicos.

De acuerdo a la Tabla 10, las concentraciones altas de compuestos fenólicos, es 2139.79; 2011.34; 2012.00; 2041.13; 2005.13 mg/ 100 g, mostrándose en los mismos tratamientos con concentraciones altas de ácido ascórbico presentado en las Tablas 5A y 5B. Comparado con Sotero et al., (2009) y Salgado et al (2012), quienes reportan 23168.00 mg/100 g y 1476.4055 mg/100g de pulpa, respectivamente, el contenido de estas muestras es superior. También es factible esto debido a que en el despulpado, se mezcló con la cascara la cual contiene también alta concentración de estos compuestos, y que alcanza a 17905.50 mg/100g y 1439.335 mg/100g en pulpa de camu-camu. Miller y Rice-Evans (1996) en Nur A. (2010) sugiere que los antioxidantes fenólicos del zumo de frutas protegen el contenido de vitamina C de la degradación oxidativa. Los fenólicos son importantes debido a su contribución a la calidad sensorial de los frutos (color, astringencia, amargor y aroma), que puede ser afectado durante los procesos tecnológicos utilizados para la obtención de los jugos y otros productos de transformación. Se encontraron cantidades razonables de polifenoles en los zumos de fruta dragón blanco que eran 0,73-1,12 mg jugo / 100g como equivalentes de ácido gálico (GAE).

Los compuestos de antocianinas en camu-camu es 0.240 mg/ 100 g de pulpa, y concentraciones altas de 0.431; 0.324; 0.412; 0.339 mg/100 g de pulpa con extractos

enzimáticos. Estos valores difieren notablemente de los obtenidos por Sotero (2009), quien presenta 74.04 mg/100 g y Villanueva – Tiburcio (2010), quienes reportan 48.42 mg/100g en fruto maduro y 3.83 mg/100 g en fruto pintón y que el mayor contenido de antocianinas se presentan en la cáscara de camu-camu fresco.

VII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados del presente estudio se concluye que:

1. El método para analizar ácido ascórbico en pulpa de Camu-Camu, utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es adecuada de acuerdo a la validación realizada, presentando coeficientes de variación de 5.00%, que incorpora los criterios de linealidad, sensibilidad, exactitud, estabilidad.
 - ✓ Con 10 valores de concentraciones estándares proporcionales de 0.0015 a 0.0400 se determinó el rango de linealidad, obteniéndose la regresión lineal de 0.9918, indicando una correlación positiva perfecta (entre X e Y) con pendiente positiva. Con valores menores de 0.1 a 1.0, se observó la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito.
 - ✓ Con los resultados de repetibilidad se verificó la exactitud del método, del cual se refiere a la combinación de veracidad y precisión, durante 4 días se midió la misma concentración de 10 mg/L de estándar, obteniéndose un CV menor de 5.00 %, valor que indica una buena exactitud.
 - ✓ La estabilidad del analito presento resultados positivos, esto indica que el método es estable a diferentes condiciones de conservación que se le dé.
2. La actividad enzimática del extracto comercial FoodPro™ Viscothim GC logró mejorar la concentración de ácido ascórbico en pulpa de camu-camu. De las concentraciones y tiempo de tratamiento, la actividad del extracto es buena en concentraciones de 50; 100 y 600 ppm a 35 minutos. Se puede ver que en concentración 50 ppm a 120 minutos la actividad de los extractos enzimáticos es excelente, podemos decir que a menor concentración y mayor tiempo de tratamiento es factible el mejoramiento de la concentración del AA.

3. Con los extractos enzimáticos comerciales los compuestos fenólicos se mantienen estables, habiendo pequeños incrementos y decrementos de lo que presenta la pulpa de camu-camu antes del tratamiento, los compuestos fenólicos protegen el contenido de vitamina C o ácido ascórbico (AA) de la degradación oxidativa y la actividad de los extractos enzimáticos actúa también para el mejoramiento de estos compuestos en forma conjunta con el mejoramiento de la concentración del AA.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Es recomendable en general que el laboratorio valide Métodos no normalizados que corresponde a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados, y Método normalizados con una modificación significativa. El método validado en el presente estudio, es factible de replicar con otros frutos o alimentos para cuantificar el contenido de ácido ascórbico.
2. Aplicar el uso del extracto enzimático comercial FoodPro™ Viscothim GC a otros frutos de la Amazonía que contenga buenas concentraciones de ácido ascórbico y compuestos fenólicos del cual mejore o mantenga estable las propiedades del fruto.
3. En el laboratorio, para el caso de muestras que contenga ácido ascórbico trabajar en ambientes limpios, oscuro (que entre poca luz), a una temperatura de 22°C.

VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AOAC 2000. Official Methods Validation Program. "AOAC International Official Methods of Analysis." 17th Edition. Page XXIII.
2. CARRERA J. 2003. Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Vol. 1
3. CODEX ALIMENTARIUS 2001. CXMAS-09-1. "Directrices armonizadas para la validación interna de métodos de análisis de la IUPAC".
4. Enerfrut Perú (2012). Jugos de fruta para el mundo; en la página web de enerfrutperu.blogspot.com.
5. GUTIERREZ, T., et al 2007. Determinación de Ácido Ascórbico en Uchuva (*physalis peruviana L.*), Por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Ciencias Agropecuarias. Página de 70 al 78. Vol. 5.
6. ISO 5725-1 1994. International Standard Organization. "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results." First Edition. Printed in Switzerland. Part 1: General Principles and Definitions.
7. IUPAC 2002. "Harmonized Guidelines for the in-house validation of methods of analysis (Technical report)". Budapest.
8. JANSER E. 2010. Aplicaciones enzimáticas para Cítricos y Frutas Tropicales. Artículo Novo: B 996b-E, Nordisk Ferment Ltd; Suiza.
9. KRAUSE A. 2009. Camu-Camu en el Mercado de Lima Metropolitana Perú Biodiverso. Lima-Perú.
10. LEDEZMA G. 2005. Validación del método: determinación de vitamina C total por cromatografía líquida de alta resolución "HPLC" Tecnología en marcha. Vol. 17-4.
11. Ministerio de Agricultura - Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA 2010. Dirección de Investigación Agraria; Dirección de Extensión Agraria; Estación Experimental Agraria San Roque- Iquitos.
12. NMKL 1996. Comité Nórdico de Análisis de Alimentos. "Validation of Chemical Analytical Methods". Procedimiento N° 4. Versión 1. Finlandia.

13. NTP-NA 0085-2011. Norma Técnica Peruana. Comisión de Normalización y de Fiscalización de Barreras Comerciales No Arancerales-INDECOPI. Calle de la Prosa 104, San Borja (Lima 41) Apartado 145, Lima-Perú.
14. NTP-Norma Técnica Peruana 011.030- 2007. Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales-INDECOPI. Calle de la Prosa 138, San Borja (Lima 41) Apartado 145, Lima-Perú.
15. NUR A., SITI M. and TAIP F. 2010. Impact of Commercial Pectolytic Enzymeson Selected Properties of White Dragon Fruit Juice. Department of Process and Food Engineering, Faculty of Engineering; Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM, Serdang, Selangor.
16. OAA-Organismo Argentino de Acreditación 2003. Guías para la validación de métodos de ensayo. Páginas del 1 al 16 Código: DC-LE-05 Versión: 1.
17. RENGIFO E. 2009; Monografía: Camu-amu - *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mac Vaugh. Perú Biodiverso; Lima, Perú.
18. PINEDO M; ARMAS M. 2007. El Camu-Camu y sus Usos Populares como Planta Medicinal. Revista LEISA de agro ecología.
19. RENNEBERG R. 2008. Biotecnología Para Principiantes. Editorial Reverte-ER, Barcelona. Bogotá. Buenos Aires. Caracas. México.
20. Revista ACE de Enología (2012) en la página web www.acenología.com//figs55_ciencia2.htm.
21. RUIZ M. 1993, Alimentos del Bosque Amazónico, Una Alternativa para la Protección de los Bosques Tropicales. Montevideo Uruguay. Editorial MAB UNESCO ORCYT.
22. SALAS N.; BECERRE E eta al. 2009. Proceso para obtener bebida nutraceutica a partir de *Myrciaria Dubia* (Camu-Camu), Orientada a reducir efecto genotoxicos en niños de edad escolar. Rev. Peruana. Química. Ing. Química. Vol. 12 N° 2. Pag 34-41.

23. SALGADO N., RAMIREZ M. ROJAS S; BELTRAN Y, ORREGO C 2012. POLIFENOLES EN TRES ACCESIONES DE CAMU- CAMU (*Myrciaria dubia*). Red de Revista Científica de América Latina, el Caribe, España y Portugal, Sistema de Información Científica. Vitae, vol 19, N° 1, pp. S360-S362, Universidad de Antioquia Medellín, Colombia.
24. SOTERO, S. V., SILVA D.L., GARCÍA, DS. D., IMÁN C.S., 2009. Evaluación de la actividad antioxidante de pulpa, cáscara y semilla del fruto de Camu-Camu. Revista de la Sociedad Química del Perú.
25. UREÑA M; ENCINA C. 2010. Determinación de la Máxima Retención de Ácido Ascórbico de la Conserva de Aguaymanto (*Physalis peruviana*) en Almíbar Aplicando el Método Taguchi. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Industrias Alimentarias, Lima-Perú.
26. VALLS J; LAMPREAYE M; NADAL M. y AROLA L. 2012. Importancia de los Compuestos Fenólicos en Vinos Tintos de Crianza. Unidad de Enología. Dpto. de Bioquímica y Biotecnología Universidad Rovira i Virgili (Tarragona).
27. VEGA R. 2005. Liofilización de Pulpa de Camu-Camu *Myrciaria Dubia* HBK .MC Vaugh, Camu-Camu. Folia Amazónica 14 (2)-IIAP.
28. VELAZCCO E, VEGA R. 2003. Estabilidad del Ácido Ascórbico en Productos Elaborados de Cam-Camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) de la ciudad de Ucayali.
29. VILLACHICA H., (1998). Frutales y hortalizas promisoros de la Amazonia. Tratado de cooperación Amazónica. primera edición, lima –Perú.
30. VILLANUEVA J; CONDEZO L. y RAMÍREZ E. 2008. Antocianinas, Ácido Ascórbico, Polifenoles totales y Actividad Antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh).
31. ZUMBADO, H., (2004). Análisis Químicos de los Alimentos. Métodos Clásicos. Instituto de Farmacia y Alimentos., Universidad de Habana. Paginas del 35 al 64. Primera edición.

ANEXOS

ANEXO A
(INFORMATIVO)
DIFERENCIAS ENTRE CAMU CAMU
ARBUSTIVO (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) Y
CAMU CAMU ARBOREO (*Myrciaria floribunda*)

Características	<i>Myrciaria dubia</i>	<i>Myrciaria floribunda</i>
Porte	Arbustivo	Arbóreo
Hábitat	Orillas de cuerpo de agua negra (cocharas o ríos)	Orillas de cuerpos de agua negra o dentro del bosque inundable (tahuampas)
Hojas	Generalmente más anchas	Generalmente mas angostas
Fruto	Rojo púrpura al madurar normalmente de forma redonda	Marrón rojo al madurar de forma redonda o periforme
Aroma de los frutos maduros	Sui generis diferencial	Sui generis diferencial
Sabor de la fruta madura	Acida	Muy ácida
Tenor de ácido ascórbico	Apro1000 mg/g a 3000 mg/100 g	Aprox 500 mg/100 g
Tenor de ácidos	Tiene aprox. 5 veces mas ácido ascórbico que <i>M. floribunda</i>	Tiene aproximadamente 2 veces más ácido cítrico que <i>M. dubia</i> .
Aptitud agroforestal	Por su alto requerimiento de luz no tolera el sombreadamiento; por su copa rala deja pasar mucho la luz en los primeros años y puede asociarse con cultivos temporales	Tolerante al sombreadamiento; su copa es densa y más vistosa que <i>M. dubia</i> . Se adapta al sistema de fajas en áreas inundables

Fuente: NTP 011.030 2007

ANEXO B
(INFORMATIVO)

CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS

B1) Composición proximal de la cáscara y pulpa de la fruta fresca.

Parámetro	VERDE		PINTON		MADURO	
	Cáscara	Pulpa	Cáscara	Pulpa	Cáscara	Pulpa
Humedad %	92,38	95,17	91,52	94,89	93,64	94,51
Cenizas %	0,16	0,04	0,11	0,07	0,01	0,06
Proteínas %	0,77	0,11	0,77	0,77	0,55	0,55
Carbohidratos %	6,64	4,6	7,55	4,39	5,67	4,28
Grasas	0,05	0,08	0,05	0,08	0,04	0,06
Flavonoides mg/100 g	14,4	2,77	10,53	2,49	8,5	6,7
Antocianinas mg/100 g	1,04	0,1	1,3	0,86	2,6	1,3
Acido ascórbico mg/100 g	472,58	1387,8	432,13	1307	287,2	1138

Fuente: NTP 011.030 2007

B2) Contenido de aminoácidos (mg/Kg en base húmeda)

Aminoácido	Estado de Madurez		
	Inmaduro	Pintón	Maduro
Serina	299	371	637
Valina	99	168	316
Leucina	90	132	289
Glutamato	88	100	119
4-aminobutanoato	71	93	108
Prolinina	43	53	82
Fenilalanina	17	22	43
Treonina	20	28	36
Alanita	17	28	34

Fuente: NTP 011.030 2007

B3) Contenido de minerales (mg/Kg en base húmeda)

Nutrientes	Estado de Madurez		
	Inmaduro	Pintón	Maduro
K	532	600	711
Ca	66	62	65
Mg	47	47	51
Na	49	44	27
PO4	245	256	295
SO4	219	136	132
Al	3,1	3,0	2,1
B	0,4	0,5	0,5
Cu	0,5	0,7	0,8
Fe	1,3	1,8	1,8
Mn	1,4	1,4	2,1
Zn	1,3	1,2	1,3
Cl	77	66	116

Fuente: NTP 011.030 2007