

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



“EVALUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES E HIPOGLUCEMIANTE DE LÚCUMA (*Pouteria lucuma*) EN DOS ESTADOS DE MADUREZ”

Presentado por:

CLAUDIA VANESSA MEJÍA RIOS

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Lima – Perú

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**“EVALUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y PROPIEDADES
ANTIOXIDANTES E HIPOGLUCEMIANTE DE LÚCUMA (*Pouteria lucuma*) EN
DOS ESTADOS DE MADUREZ”**

Presentado por:

CLAUDIA VANESSA MEJÍA RIOS

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Walter S. Salas Valerio

PRESIDENTE

Dr. Américo Guevara Pérez

MIEMBRO

Dr. Milber Ureña Peralta

MIEMBRO

Dra. Rosana Chirinos Gallardo

ASESORA

Mg.Sc. Marianela Inga Guevara

CO-ASESORA

Lima – Perú

2017

AGRADECIMIENTO

- A Dios, por darme fortaleza para culminar esta investigación.
- A los profesores del IBT; el Dr. Campos, Dra. Chirinos, Dra. Aguilar, Dra. Gálvez y Mg. Sc. Inga por guiarme e influir enormemente en mi vida profesional como profesores y como investigadores, así como por permitirme tener un adecuado grado de autonomía durante la realización del presente trabajo para desarrollarme como investigador.
- A mis padres José y Amalia, a mis hermanos por su amor y apoyo incondicional.
- A Angel, por su apoyo incondicional, consejos y por alentarme siempre en mi superación como profesional.
- A mis compañeros de laboratorio: Diego, Orlando, Fiorella, Katty, Carmen, Rocío, Irina, Martín y Adelaida.
- Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico, y de Innovación Tecnológica-FONDECYT, por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación como parte del proyecto “Evolución de los metabolitos primarios y secundarios (bioactivos y aromáticos–sensoriales), propiedades antioxidante e hipoglucemiante durante la maduración de lúcuma (*Pouteria lucuma*) en condiciones ambientales y controladas” (Convenio de Subvención N° 124-2015-FONDECYT).

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	LA LÚCUMA	3
2.2	ESTADOS DE MADUREZ.....	4
2.3	METABOLITOS SECUNDARIOS.....	5
2.3.1	COMPUESTOS FENÓLICOS	5
2.3.2	CAROTENOIDES	9
2.3.3	TOCOFEROLES.....	14
2.3.4	FITOESTEROLES.....	18
2.4	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA Y LIPOFÍLICA	22
2.5	ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE.....	28
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	31
3.2	MATERIA PRIMA	31
3.3	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	31
3.3.1	MATERIALES DE LABORATORIO.....	31
3.3.2	REACTIVOS.....	32
3.3.3	EQUIPOS	33
3.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS	33
3.4.1	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	33
3.4.2	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	34
3.4.3	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC-DAD.....	34
3.4.4	DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES Y PERFIL DE CAROTENOIDES POR HPLC-DAD	35
3.4.5	DETERMINACIÓN DE TOCOFEROLES.....	35
3.4.6	DETERMINACIÓN DE FITOESTEROLES POR GC-FID	36
3.4.7	DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA Y LIPOFÍLICA.....	36

3.4.8	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE	37
3.5	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	38
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1	METABOLITOS SECUNDARIOS.....	40
4.1.1	COMPUESTOS FENÓLICOS	40
4.1.2	CAROTENOIDES	44
4.1.3	TOCOFEROLES.....	48
4.1.4	FITOSTEROLES	51
4.2	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	53
4.3	CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE	57
V.	CONCLUSIONES.....	61
VI.	RECOMENDACIONES.....	62
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
VIII.	ANEXOS	77

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1:	Capacidad antioxidante hidrofílica de varias frutas en madurez comercial.....	26
Cuadro 2:	Concentración de flavanoles y flavanonas obtenidos por análisis cromatográfico (UPLC-DAD) en lúcuma del biotipo “Dos Marrón” en dos estados de madurez	43
Cuadro 3:	Identificación de los carotenoides presentes en lúcuma del biotipo “Dos Marrón” para los estados de madurez verde y pintón	47
Cuadro 4:	Contenido de tocoferoles en lúcuma del biotipo “Dos Marrón” para los estados de madurez verde y pintón	48
Cuadro 5:	Contenido de fitosteroles en lúcuma del biotipo “Dos Marrón” para los estados de madurez verde y pintón	51
Cuadro 6:	Capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica (μmol Trolox equivalente (TE/g, ms) en lúcuma del biotipo “Dos Marrón” para los estados de madurez verde y pintón.....	54
Cuadro 7:	Inhibición de α-glucosidasa (%) para tres concentraciones de lúcuma (μg, ms).....	58
Cuadro 8:	Inhibición de α-amilasa (%) para tres concentraciones de lúcuma en μg (ms)	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estructura química de flavonoides y flavonoles.....	6
Figura 2:	Esquema de la vía de síntesis de polifenoles	8
Figura 3:	Esquema simplificado de la vía isoprenoide	10
Figura 4:	Estructura química de los tocoferoles	15
Figura 5:	Ruta biosintética de tocoferoles en plantas superiores	16
Figura 6:	Estructura química de los fitoesteroles más comunes en en alimentos	19
Figura 7:	Esquema general de la síntesis de fitoesteroles y otros triterpenos ..	20
Figura 8:	Ejemplos de estructuras básicas de esteroles libres y sus conjugados	21
Figura 9:	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	24
Figura 10:	Flujo de operaciones para la obtención de harina de lúcuma liofilizada	39
Figura 11:	Contenido de compuestos fenólicos totales en dos estados fisiológicos de lúcuma (verde y pintón) provenientes de 4 árboles del biotipo “Dos marrón”	40
Figura 12:	Perfil cromatográfico del UPLC-DAD a 280 nm de los compuestos fenólicos de lúcuma del biotipo “Dos Marrón”	42
Figura 13:	Contenido de carotenoides totales en dos estados de madurez, verde y pintón, provenientes de 4 árboles de lúcuma del biotipo “Dos marrón”	44
Figura 14:	Perfiles HPLC-DAD de los carotenoides de lúcuma del biotipo “Dos Marrón” en dos diferentes estados de madurez	46
Figura 15:	Perfiles HPLC-DAD de los tocoferoles de lúcuma del biotipo “Dos Marrón” en dos diferentes estados de madurez	49
Figura 16:	Cromatografía de gases (GC-FID) del extracto lipofílico de lúcuma del biotipo “Dos Marrón” en dos diferentes estados de madurez.....	52
Figura 17:	Contenido de capacidad antioxidante lipofílica (ABTS) en dos estados fisiológicos de lúcuma (verde y pintón) provenientes de 4 árboles	54

Figura 18: Contenido de capacidad antioxidante hidrofílica (ORAC) en dos estados fisiológicos de lúcuma (verde y pintón) provenientes de 4 árboles56

Figura 19: Contenido de capacidad antioxidante hidrofílica (ABTS) en dos estados fisiológicos de lúcuma (verde y pintón) provenientes de 4 árboles.....57

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:	CONTENIDO DE MATERIA SECA (MS) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN	77
ANEXO 2:	CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN.....	78
ANEXO 3:	CONTENIDO DE FLAVANOLES Y FLAVANONAS EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN	79
ANEXO 4:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	80
ANEXO 5:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	80
ANEXO 6:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE FLAVANOLES TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	81
ANEXO 7:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE FLAVANOLES TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	81
ANEXO 8:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE FLAVANONAS TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	82
ANEXO 9:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE FLAVANONAS TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	82
ANEXO 10:	ESPECTROS ULTRAVIOLETA-VISIBLE (450 nm) DE LOS CAROTENOIDES IDENTIFICADOS EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN	83

ANEXO 11:	TIEMPOS DE RETENCIÓN (min) Y λ MÁXIMO (nm) DE LOS CAROTENOIDES IDENTIFICADOS EN TARAXACUM FORMOSANUM (HIERBA TRADICIONAL CHINA) POR COLUMNA CROMATOGRÁFICA YMC C30 (250 mm X 4,6 mm I.D, TAMAÑO DE PARTÍCULA 5 μ m).....	86
ANEXO 12:	RELACIÓN DE CAROTENOIDES EXISTENTES EN LAS FRUTAS ...	87
ANEXO 13:	CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN	88
ANEXO 14:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	89
ANEXO 15:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	89
ANEXO 16:	CONTENIDO DE TOCOFEROLES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN	90
ANEXO 17:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE α -TOCOFEROL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	91
ANEXO 18:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE α -TOCOFEROL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”.....	91
ANEXO 19:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE γ -TOCOFEROL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	92
ANEXO 20:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE γ -TOCOFEROL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	92
ANEXO 21:	CONTENIDO DE FITOSTEROLES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN	93
ANEXO 22:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE β -SITOSTEROL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	93
ANEXO 23:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE CICLOARTENOL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	93
ANEXO 24:	CONTENIDO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA Y LIPOFÍLICA EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN.....	94

ANEXO 25:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (ABTS) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	94
ANEXO 26:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (ABTS) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	95
ANEXO 27:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (ORAC) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	96
ANEXO 28:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (ORAC) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	96
ANEXO 29:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICA (ABTS) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	97
ANEXO 30:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICA (ABTS) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	97
ANEXO 31:	INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN	98
ANEXO 32:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 12 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	99
ANEXO 33:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 12 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	99
ANEXO 34:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 5 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	99
ANEXO 35:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 5 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	100

ANEXO 36:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 2 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	100
ANEXO 37:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 2 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	100
ANEXO 38:	INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN	101
ANEXO 39:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 10 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	102
ANEXO 40:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 10 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	102
ANEXO 41:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 5 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	103
ANEXO 42:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 5 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	103
ANEXO 43:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 3 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	104
ANEXO 44:	ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 3 MG DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”	105

RESUMEN

La lúcuma (*Pouteria lúcuma*) es una fruta subtropical de origen andino. Tradicionalmente apreciada por sus características sensoriales y por su versatilidad para la industria alimentaria. En la presente investigación se realizó una identificación y cuantificación de los principales metabolitos secundarios en lúcuma del biotipo “Dos Marrón” en dos estados de madurez (verde y pintón), así como un análisis de la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica. Adicionalmente, la actividad hipoglucemiante fue evaluada mediante la inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa en ambos estados. Se encontró que el estado de madurez del fruto influye en el contenido de metabolitos secundarios, observándose que las lúcumas en estado verde presentaron mayores concentraciones de compuestos fenólicos y tocoferoles, mientras que las lúcumas en estado pintón presentaron la mayor cantidad de carotenoides ($p < 0,05$). El análisis cromatográfico, reveló que los compuestos fenólicos mayoritarios pertenecen a la familia de los flavanoles y flavanonas; en cuanto a los carotenoides las xantofilas fueron predominantes y, el α -tocoferol fue el tocoferol más abundante. Los perfiles cromatográficos encontrados en todos los compuestos bioactivos evaluados fueron similares para ambos estados de madurez; difiriendo solo a nivel de concentraciones; mientras que para los fitosteroles no se encontraron diferencias estadísticas al respecto ($p > 0,05$). En cuanto a la capacidad antioxidante e hipoglucemiante se reportaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la capacidad antioxidante hidrofílica medida por los ensayos ABTS y ORAC e inhibición de la α -glucosidasa; sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante lipofílica ni en la inhibición de α -amilasa entre ambos estados de madurez. Estos resultados muestran que la lúcuma en ambos estados constituye una fuente interesante de compuestos bioactivos funcionales con potencial aplicación en la industria alimentaria.

Palabras clave: Lúcuma, Estados De Madurez, Metabolitos Secundarios, Compuestos Fenólicos, Actividad Hipoglucemiante, Capacidad Antioxidante.

ABSTRACT

The lucuma (*Pouteria lúcuma*) is a subtropical fruit of Andean origin. Traditionally appreciated for its sensory characteristics and its versatility for the food industry. In the present investigation, an identification and quantification of the main secondary metabolites in lucuma of the "Dos Marrón" biotype in two stages of maturity (green and purple) was carried out, as well as an analysis of the hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity. Additionally, the hypoglycaemic activity was evaluated by the inhibition of α -amylase and α -glucosidase in both states. It was found that the state of maturity of the fruit influences the content of secondary metabolites, observing that the lucuma in the green state had higher concentrations of phenolic compounds and tocopherols, while the lucuma in the purple state had the highest amount of carotenoids ($p < 0,05$). The chromatographic analysis revealed that the major phenolic compounds belong to the family of flavanols and flavanones; as for carotenoids, the xanthophylls were predominant and α -tocopherol was the most abundant tocopherol. The chromatographic profiles found in all the bioactive compounds evaluated were similar for both maturity stages; differing only at the level of concentrations; while for the phytosterols, no statistical differences were found ($p > 0,05$). Regarding the antioxidant and hypoglycaemic capacity, significant differences were reported ($p < 0,05$) in the hydrophilic antioxidant capacity measured by the ABTS and ORAC assays and inhibition of the α -glucosidase; however, no significant differences were found in the lipophilic antioxidant activity or in the inhibition of α -amylase between both maturity stages. These results show that lucuma in both states is an interesting source of functional bioactive compounds with potential application in the food industry.

Key Words: Lucuma, Maturity States, Secondary Metabolites, Phenolic Compounds, Hypoglycaemic Activity, Antioxidant Capacity.

I. INTRODUCCIÓN

La región andina representa un interesante nicho de biodiversidad. Muchos cultivos propios de esta región como la maca (*Lepidium meyenii* Walp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), papas nativas (*Solanum tuberosum*), yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) y la lúcuma (*Pouteria lucuma*) han sido cultivados por cientos de años por la población nativa siendo parte de su dieta tradicional y medicinal (Fuentealba *et al.* 2016). Actualmente, estos cultivos se están revalorizando gracias a la investigación científica que busca destacar sus múltiples propiedades funcionales, ya que la tendencia actual del mercado es adquirir productos que brinden algún beneficio a la salud más allá del aporte nutricional.

En el Perú se encuentra la mayor variabilidad genética de la lúcuma, estimándose en más de un centenar de biotipos peruanos. La lúcuma pertenece a la familia *Sapotaceae* y es un fruto oriundo de Sudamérica (Villanueva 2002). Asimismo, ha generado expectativas en los inversionistas, como consecuencia de la creciente demanda de empresas en el exterior; dedicadas al comercio de productos naturales y exóticos (Fuentealba *et al.* 2016, Villanueva 2002). En cuanto a los compuestos bioactivos que presenta, muy poco ha sido abordado en la literatura científica, se ha reportado la presencia de carotenoides y compuestos fenólicos, así como propiedades antioxidante e hipoglucemiante, todo ello realizado en lúcuma de origen chileno (Erazo *et al.* 1999, Fuentealba *et al.* 2016), no habiéndose encontrado estudios en lúcuma de origen peruano; más aún trabajos direccionados en el estudio de la evolución de los metabolitos secundarios y de sus propiedades antioxidante e hipoglucemiante tomando en cuenta los estados de madurez no han sido ejecutados, aspectos importantes que se considera deben ser estudiados para tener mayor conocimiento sobre las características de este fruto.

El presente trabajo tuvo como objetivos identificar y cuantificar los metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, carotenoides, tocoferoles y fitosteroles en lúcuma del biotipo “Dos Marrón” en dos estados de madurez (verde y pintón), además de analizar la capacidad antioxidante y la capacidad hipoglucemiante *in vitro* en ambos estados de madurez del fruto.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LA LÚCUMA

La lúcuma pertenece a la familia *Sapoteaceae* y es un fruto oriundo de Sudamérica, empleado por culturas pre-incas e incas del litoral, entre Ecuador, Perú y Chile, como se registra en vestigios de tejidos y cerámica de la época (Villanueva 2002).

En el Perú se encuentra la mayor variabilidad genética de la lúcuma, estimándose en más de un centenar de biotipos peruanos. Los biotipos de costa mayormente presentan un elevado contenido de agua en la pulpa, que evita la característica harinosa propia de los biotipos de sierra, como los de la zona de Ayacucho. El color de la pulpa puede ser amarillo, anaranjado y sus variantes, en tonalidades de acuerdo al material genético y fenotipo del cultivo (Villanueva 2002).

El fruto de la lúcuma tiene una forma de ovoide a elíptica con una terminación en punta o deprimida. Tiene un tamaño entre 7,5 - 10 cm con una delgada cáscara que es amarillo verdosa cuando el fruto está totalmente maduro. La pulpa es seca y harinosa, de color amarillo - anaranjado y sabor dulce. Generalmente, se encuentran dos semillas, aunque es posible encontrar de 1 a 5. Las semillas tienen forma redonda u ovalada, de color marrón oscuro y apariencia brillante (Yahia y Gutiérrez-Orozco 2011).

La lúcuma es una de las frutas que contiene los más altos niveles de proteína (1,5 g - 2,4 g) y carbohidratos (25 g). Los azúcares presentes en la pulpa son glucosa, fructosa, sucrosa e inositol. Es importante señalar que la fruta verde solamente presenta sucrosa y a medida que avanza el estado de maduración se incrementa la glucosa, fructosa e inositol (Villanueva 2002).

2.2 ESTADOS DE MADUREZ

La madurez en la cosecha es el factor más importante que determina el periodo de conservación y la calidad final de la fruta. Los frutos inmaduros son más propensos al arrugamiento y daño mecánico. Mientras que los frutos demasiado maduros se tornan suaves y harinosos con un sabor insípido poco después de la cosecha. Las frutas cosechadas demasiado pronto o demasiado tarde son más susceptibles a trastornos fisiológicos y tienen una vida de almacenamiento más corta que los recogidos en la madurez adecuada (Kader y Yahia 2011).

El fenómeno de la maduración en frutas provoca cambios importantes como el ablandamiento de la textura, el desarrollo de color y la síntesis de una amplia gama de compuestos orgánicos que constituyen el aroma y gusto característico (White 2002).

Casi todas las frutas tropicales y subtropicales alcanzan su mejor calidad de consumo cuando se les permite madurar en el árbol o planta. Sin embargo, algunas frutas son recogidas en su madurez fisiológica, pero no en la organoléptica con el fin de que puedan soportar el manejo de post-cosecha cuando se embarcan largas distancias (Kader y Yahia 2011).

Las frutas pueden dividirse en dos grupos de acuerdo a su mecanismo metabólico de maduración, las climatéricas y las no climatéricas. Las primeras, cuando la fruta madura, muestran una inmediata producción de etileno que provoca un aumento significativo de la respiración, la cual llega a un máximo y después decae. Las no climatéricas no muestran dicho fenómeno. Las frutas climatéricas generalmente se cosechan en estado verde previo a la producción de etileno. En cambio, las no climatéricas, maduran en la planta y se cosechan maduras, ya que son incapaces de continuar el proceso de maduración una vez son removidas de la planta (White 2002, Kader y Yahia 2011).

La lúcuma es un fruto climatérico de acuerdo a su patrón de producción de CO₂ (Yahia y Gutiérrez-Orozco 2011). El mamey (*Pouteria sapote*), perteneciente al mismo género que la lúcuma, también es un fruto climatérico (Mahattanatawee 2006).

2.3 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios son un grupo variado de compuestos químicos que presentan propiedades interesantes, tales como antioxidante (compuestos fenólicos, carotenoides y tocoferoles) y reductora de los niveles de colesterol (fitoesteroles). En alimentos, estos compuestos contribuyen con propiedades tales como el color y la estabilidad del mismo, además de las propiedades antes mencionadas que tienen importancia desde el punto de vista nutracéutico (Hounsome *et al.* 2008).

2.3.1 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, siendo parte importante de la dieta humana como animal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo (Martínez-Valverde *et al.* 2000, Paladino 2006). Asimismo, son esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Juegan un rol vital en las plantas e incluso regulan el metabolismo y síntesis de lignina, por lo que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, coumarinas, lignanos, etc.) (Muñoz *et al.* 2011).

Según Paladino (2006), el término compuesto fenólicos comprende aproximadamente ocho mil compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol y un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo. La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos (Tsimidou, citado por Martínez-Valverde *et al.* 2000). Los ácidos hidroxibenzoicos (derivados del ácido benzoico) e hidroxicinámicos (derivados del ácido cinámico) tienen una estructura de un único anillo mientras que los flavonoides comprenden tres estructuras de anillos y pueden clasificarse en antocianinas, flavan-3-ol (flavanoles), flavanonas (figura 1), flavones y flavonoles. Algunos flavonoides como los flavan-3-ol pueden ser encontrados en la forma

de dímeros, trímeros y polímeros (Tsao y Deng 2004). Por otro lado, estos compuestos influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor (Gimeno 2004).

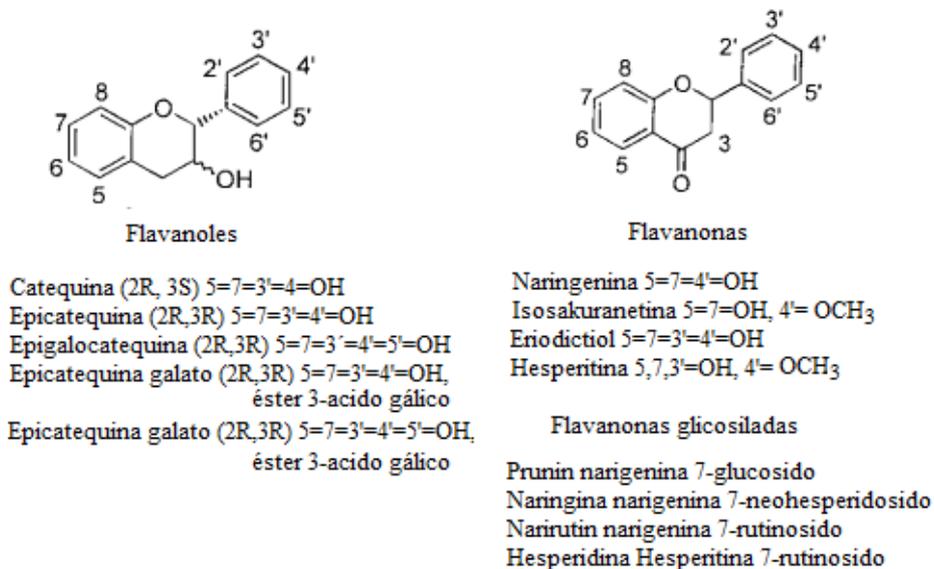


Figura 1: Estructura química de flavanoles y flavanonas.

FUENTE: Tomado de Robards *et al.* 1999

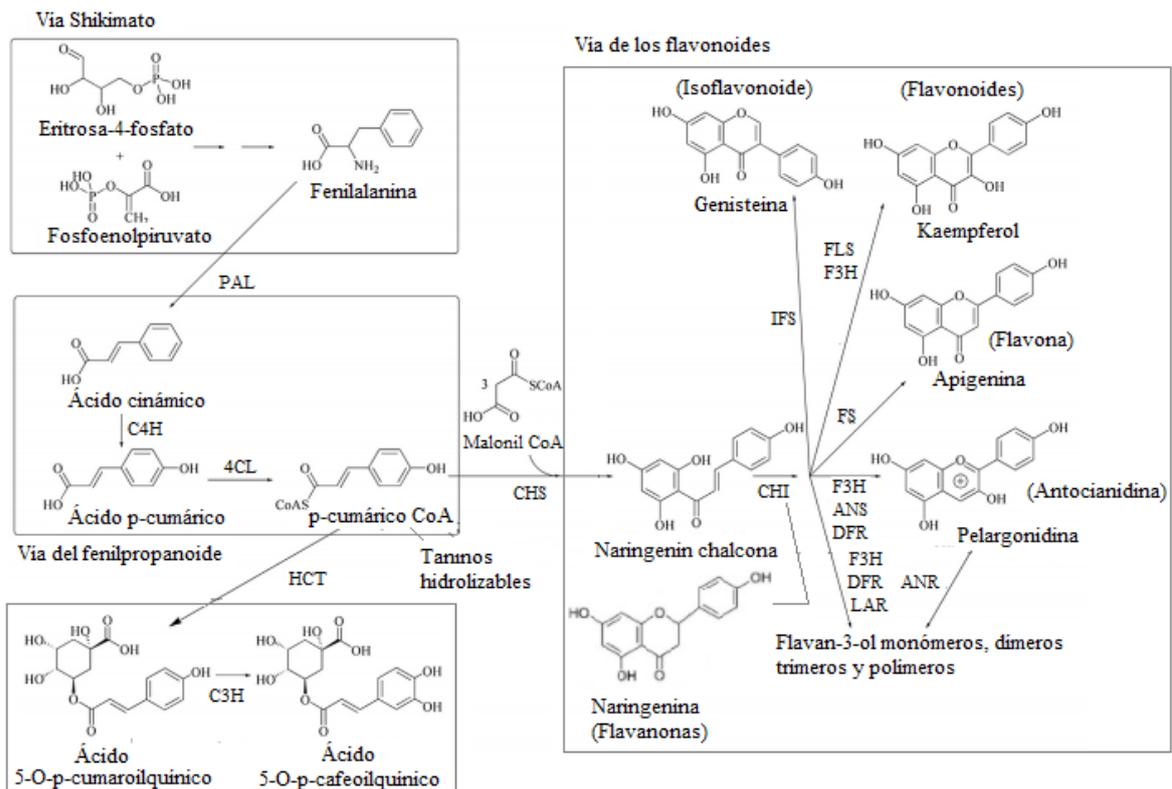
Mientras que las flavanonas y flavonas son comúnmente encontradas juntas, por ejemplo en frutas cítricas, existe una cierta exclusión mutua entre las flavonas y flavanoles en muchas familias de plantas y las antocianinas están casi ausentes en las plantas ricas en flavanonas (Rice-Evans *et al.* 1995).

En plantas, los fenólicos se encuentran en formas glicosiladas que presentan enlaces o-glicosídicos con una serie de diferentes azúcares como glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y rutinosa (Justesen *et al.* 1998). Por ejemplo, las flavanonas glicosiladas son los flavonoides más abundantes en los cítricos (Tripoli *et al.* 2007, Belitz *et al.* 2009).

Uno de los métodos de purificación de fenólicos totales consiste en emplear una extracción de fase sólida (SPE) empleando cartuchos *Sep-pack* C₁₈ con el fin de eliminar los azúcares que interfieren en el momento de la corrida cromatográfica (Rodríguez-Saona y Wroslad 2001). Además, los compuestos fenólicos también presentan acilaciones con fenólicos o ácidos alifáticos, lo que complica la tarea de identificación de los compuestos.

La cromatografía líquida (UPLC) es el método de análisis elegido para el análisis de compuestos fenólicos por su versatilidad, precisión y relativo bajo costo (Parejo *et al.* 2004). Cabe recalcar que en muchos casos los extractos de fenólicos requieren un pre-tratamiento de hidrólisis, aunque esto podría conllevar a una pérdida significativa de fenólicos a causa de la descomposición de algunos compuestos fenólicos (Robards 2003, Sakahibara *et al.* 2003).

Los compuestos fenólicos se originan a partir de la vía del shikimato y del metabolismo fenil propanoide (figura 2) (Robards *et al.* 1999). En plantas, los compuestos fenólicos son metabolizados a partir del aminoácido L-fenilalanina y en algunos casos L-tirosina. A partir de estos compuestos se sintetizan los ácidos hidroxicinámicos que son los más ampliamente distribuidos en los tejidos vegetales y se encuentran frecuentemente esterificados con los ácidos quínico, shikímico o tartárico (Craft *et al.* 2012). Las catequinas son sintetizadas a través de la vía flavonoide, donde el 4-cumaroil CoA, el sustrato requerido para su primera etapa es suministrado por la vía fenil propanoide. La chalcona sintasa es la primera enzima de la vía que cataliza la condensación de una molécula de ácido- 4-cumárico y tres moléculas de malonil-CoA para formar chalcona. La chalcona isomerasa cataliza la isomerización de chalconas a sus flavononas correspondientes. A partir de esos intermediarios, la ruta diverge en varias cadenas laterales, cada una de las cuales resulta en clases diferentes de flavonoides (Rani *et al.* 2012, Belitz *et al.* 2009).



PAL: fenilalanina amonía-liasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumaroil-CoA-ligasa; HCT: hidroxicinamoil transferasa; C3H: p-cumarato-3-hidroxilasa; CHS: chalcona sintetasa; CHI: chalcona isomerasa; ANS: antocianidina sintetasa; DFR: dihidroflavonol reductasa; FS: flavona sintetasa; FLS: flavonol sintetasa; F3H: flavanona 3-hidroxilasa; IFS: isoflavona sintetasa; ANR: antocianidina reductasa; LAR: leucoantocianidina reductasa.

Figura 2: Esquema de la vía de síntesis de polifenoles.

FUENTE: Adaptado de Cheynier *et al.* 2013

En el género *Pouteria* se han reportado compuestos fenólicos en diferentes especies. En canistel (*Pouteria macrophylla*) se ha identificado al ácido gálico y sus derivados como los principales compuestos fenólicos (Alexandre *et al.* 2012), en aguay (*Pouteria gardneriana*) se han identificado epicatequina, epigalocatequina, ácido cafeico y sus derivados, y glucósidos de kaempferol y quercetina (Gomes *et al.* 2013), en *P. sapota*, *P. viridis* y *P. campechiana* se identificaron ácido gálico, galocatequinas, dihidromircetina (Ma *et al.* 2004). En harina de lúcuma, Dini (2011) identificó glucósidos de kaempferol y ácido gálico, mientras que en pulpa de lúcuma Fuentealba *et al.* (2016) identificó un flavonoide, ácido

gálico y una antocianidina; y García (2016) identificó derivados de galocatequina, epigalocatequina galato, epicatequina, catequina, hesperetina, ácido gálico, ácido elágico en lúcuma en estado de madurez comercial.

Fuentealba *et al.* (2016) observaron una drástica reducción en el contenido de compuestos fenólicos en lúcuma entre el estado pintón (131,6 mg AGE/g materia seca, ms), el estado de madurez comercial (45,3 mg AGE/g ms) y el estado luego de almacenamiento a 20 °C por una semana (0,7 mg AGE/g ms). Se reportaron valores de 45,3; 61,6 y 0,7 mg AGE/g (ms) para lúcuma en estado de madurez comercial para los biotipos Rosalia, Leiva1 y Montero, respectivamente.

García (2016) ha reportado flavanoles (como derivados de catequina) y flavanonas (como derivados de hesperetina) en lúcuma en estado de madurez comercial, obteniendo valores para flavanoles de 0,04 mg/g (ms) en el biotipo Beltrán y 0,07 mg/g (ms) en el biotipo Seda, y con respecto a las flavanonas, valores trazas en las mismas unidades para ambos biotipos de lúcuma.

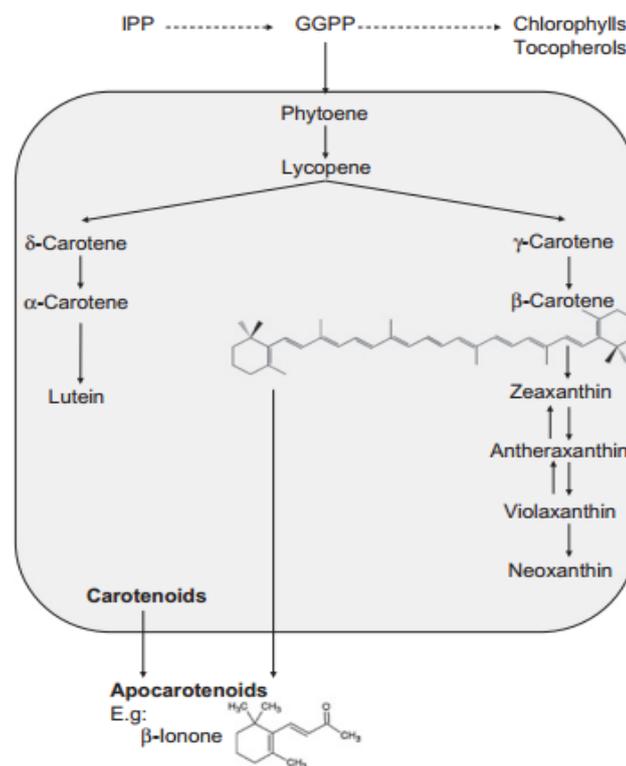
Los compuestos fenólicos son capaces de actuar como antioxidantes (Decker 1995). Según Paladino (2006), existe correlación entre el contenido de fenólicos totales y la capacidad de captura de radicales libres y es que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su reacción con los radicales libres, donándoles un átomo de hidrógeno y formando un radical más estable por resonancia (Craft *et al.* 2012). Esta capacidad depende del número y posición de los grupos hidroxilo (OH) y del pH del medio (Belitz *et al.* 2009). Además, la polaridad de los compuestos fenólicos es determinante en cuanto a la capacidad de capturar radicales libres. Los compuestos fenólicos que poseen mayor cantidad de sustituyentes hidroxilados (polihidroxilados) tienen una polaridad mayor que los otros fenoles (Paladino 2006).

2.3.2 CAROTENOIDES

Los carotenoides son pigmentos conformados por moléculas hidrofóbicas con muy baja solubilidad en agua pero solubles en lípidos y solventes apolares. Son responsables del color de una amplia variedad de alimentos con tonalidades que van desde el rojo hasta el

amarillo (Damodaran *et al.* 2008). El contenido de carotenoides en frutas, semillas y flores está determinado por la velocidad de síntesis, la tasa de degradación y por la disponibilidad de lugares de almacenamiento (Cazzonelli y Pogson 2010).

Los carotenoides son isoprenoides, originados del precursor isopentil difosfato (figura 3) y son sintetizados por plantas y otros organismos fotosintéticos. Estos compuestos cumplen funciones en la fotosíntesis, por ejemplo son importantes como pigmentos que atraen polinizadores y dispersores y también son precursores de una amplia gama de moléculas llamadas apocarotenoides que incluyen hormonas como el ácido abscísico o compuestos volátiles como las iononas y damascenona (Carvalho *et al.* 2013).



IPP: isopentil difosfato, GGPP: geranylgeranyl difosfato.

Figura 3: Esquema simplificado de la vía isoprenoide.

FUENTE: Tomado de Carvalho *et al.* 2013

Su estructura básica está conformada por unidades de isopreno enlazadas covalentemente, creándose moléculas simétricas de 40 carbonos, a partir de las cuales derivan los demás

carotenoides. Se pueden dividir en dos grupos estructurales claramente diferenciados: xantofilas y carotenos. Las primeras son moléculas que contienen oxígeno, como la luteína y zeaxantina, mientras que las segundas son moléculas no oxigenadas tales como el β -caroteno y el licopeno (Damodaran *et al.* 2008, Amorim-Carrilho *et al.* 2014).

El color amarillo-naranja de la pulpa de la lúcuma se debe a la presencia de carotenoides (Fuentealba *et al.* 2016). La lúcuma presenta en su mayoría carotenoides pertenecientes a la familia de las xantofilas, los cuales a pesar de no poseer actividad provitamina A son de mucho interés por su actividad antioxidante (Jomova y Valko 2013, Villanueva 2002).

La actividad provitamina A requiere al menos un anillo β -ionona no sustituido, el número y orientación correctos de los grupos metilo en la cadena principal de carbonos, y el número correcto de enlaces dobles conjugados preferiblemente con isomería *trans* (Burri 2013). Existen aproximadamente 60 carotenoides provitamina A de los cuales β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina son los más importantes (Cuttriss *et al.* 2011).

La vitamina A (retinol y sus derivados retinal y ácido retinoico) se producen por la escisión del carotenoide catalizada por la enzima β -caroteno 15, 15'-mono-oxigenasa, la cual produce dos moléculas de retinal en el caso del β -caroteno, otros carotenoides provitamina A producen solamente una molécula de retinal. No obstante, menos frecuentemente, algunos carotenoides no-provitamina A como el licopeno pueden escindirse y producir apocarotenales los cuales son metabolizados a ácido retinoico y retinol (Burri 2013). El proceso de escisión de carotenoides a retinal y sus derivados es limitado, por ello se requiere una ingesta aproximada de seis gramos de β -caroteno es requerida para producir un gramo de retinol (Belitz *et al.* 2009).

Respecto a la cuantificación y caracterización de carotenoides en frutos tropicales y especies de *Pouteria*, esta ha sido realizada en sapote (Moo-Huchin *et al.* 2014, Murillo *et al.* 2013), canistel (*P. campechiana*) (Da Costa *et al.* 2010) y lúcuma (Erazo *et al.* 1999, Fuentealba *et al.* 2016). Los resultados indican que en estas especies, las xantofilas, especialmente los epóxidos (violaxantina, neoxantina) constituyen el principal grupo de carotenoides y se encuentran esterificados en su mayoría. Las xantofilas contienen los

grupos funcionales hidroxilo, epóxido o carbonilo, y se encuentran con frecuencia esterificados con ácidos grasos (Eskin y Shahidi 2013).

Algunas frutas y flores, así como las hojas senescentes contienen ésteres de carotenoides, donde el grupo hidroxilo de xantófilas puede encontrarse esterificado. Los dihidroxicarotenoides como la luteína pueden ser esterificados en uno o ambos grupos hidroxilo con diferentes ácidos grasos originando así una amplia variedad de compuestos (Carvalho *et al.* 2013).

Debido a la complejidad de las muestras que contienen carotenoides esterificados y también con el fin de eliminar lípidos y clorofilas interferentes, muchos autores optan por la saponificación de las muestras y consideran solo las unidades de carotenoides libres (no esterificados) (Carvalho *et al.* 2013).

Los carotenoides juegan un rol esencial en la fotosíntesis y durante la maduración de los frutos, a medida que la actividad fotosintética disminuye los cloroplastos y clorofilas se van degradando y el nivel de carotenoides asociados con la fotosíntesis disminuye progresivamente. Se ha demostrado que la luteína es el carotenoide más lento en degradarse en aceitunas y los autores sugieren que esta xantófila es más estable y tan o más beneficioso que el β -caroteno en cuanto a propiedades antioxidantes (Roca y Mínguez-Mosquera 2001).

Los frutos no maduros presentan mayormente los carotenoides luteína y β -caroteno, y en menor proporción zeaxantina, neoxantina y otros carotenoides no identificados. Esta es la composición típica de carotenoides en tejidos verdes fotosintéticos, donde los carotenoides se encuentran en los cloroplastos, asociados en los complejos “carotenoides-proteína-clorofila” y tienen funciones esenciales de captación de luz y foto protección de la clorofila (Demmig-Adams *et al.* 1996).

Durante la maduración de las frutas se observa en general una disminución del contenido de clorofila y un incremento del contenido de carotenoides, hecho que se refleja en la transformación de los cloroplastos en cromoplastos (Eskin y Shahidi 2013). En frutas y vegetales ricos en carotenoides, usualmente la madurez viene acompañada por un

incremento en carotenogénesis e incluso después de la cosecha la biosíntesis de carotenoides puede llevarse a cabo como se ha reportado en mango (Aina 1990).

Un estudio realizado en tres biotipos de lúcuma señala que el β -caroteno fue el componente minoritario de la lista de carotenoides totales, siendo el componente mayoritario las xantófilas (Fuentealba *et al.* 2016). Carotenoides específicos como el β -caroteno son importantes debido a su actividad pro-vitamina A o como la luteína por su efecto protector contra la degeneración causada por la edad (Bowen *et al.* 2002, Li *et al.* 2012).

Se ha reportado que durante la maduración de la frambuesa que la luteína y β -caroteno disminuyen significativamente (Carvalho *et al.* 2013), mientras que los ésteres de luteína van aumentando en las etapas más maduras. El aumento de los ésteres de luteína durante la maduración se ha observado en frutas como el pimiento y el escaramujo (fruto de los arbustos del rosal silvestre) e incluso han sido sugeridos como marcadores de madurez (Anderson *et al.* 2011, Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera 2012).

Algunos estudios han propuesto que la esterificación facilita el almacenamiento de carotenoides, ayudando en la integración de estas moléculas altamente lipofílicas a los plasto-glóbulos ricos en lípidos (Howitt y Pogson 2006). De hecho, se ha propuesto que la esterificación podría servir como un medio para estabilizar los carotenoides, lo que ayudaría a proteger los triacilglicerol, lípidos insaturados y otros compuestos sensibles a la luz de la fotooxidación (Bréhélin *et al.* 2007, Cazzonelli y Pogson 2010, Soloychenko *et al.* 2010).

Estudios realizados en lúcuma chilena donde se analizaron seis biotipos sostienen que, todas las selecciones presentan trans- β -caroteno en concentraciones variables y otros dos isómeros de β -caroteno que no fueron identificados (Erazo *et al.* 1999). Otro estudio en lúcuma del biotipo Leiva1 durante tres estados de madurez: estado pintón, abscisión natural del árbol y abscisión natural del árbol más una semana a 20 °C y 60-70 por ciento de humedad relativa, reportó que el contenido de β -caroteno no presentó un cambio significativo ($p < 0,05$) fluctuando en un rango de 7,2-8,4 $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g (ms)}$ (Fuentealba *et al.* 2016). También se ha determinado que, el contenido total de

carotenoides obtenido en tres biotipos de lúcumo (Rosalia, Montero y Leiva1) en madurez comercial se encuentra en el rango de 22-50 mg de β -caroteno/100 g (ms); mientras que el contenido total de carotenoides para lúcumo del biotipo Leiva1 en estado pintón fue de 5 ± 2 mg de β -caroteno/100 g (ms). La mayoría de los carotenoides encontrados en lúcumo pertenecen a la familia de las xantófilas (Fuentealba *et al.* 2016). García (2016), obtuvo 24,9 y 30,1 mg de β -caroteno/100 g (ms) para lúcumo “Seda” y “Beltrán” respectivamente, ambas en estado de madurez comercial. De otro lado, Lanerolle *et al.* (2008), reportaron que el contenido de carotenoides totales en zapote amarillo (*Pouteria campechiana*) varía de 1,9 a 23,5 mg/100 g (ms).

La composición final de carotenoides está influenciada por la variedad o biotipo (factor genético), el estado de madurez al momento de la cosecha, factores climáticos, prácticas de cultivo, manejo post-cosecha y condiciones de procesamiento y almacenamiento (Rodríguez-Amaya 2010).

2.3.3 TOCOFEROLES

Existen cuatro formas diferentes de tocoferoles: alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ) que varían solo en la cantidad y posición de los sustituyentes metilo unidos al anillo cromanol (Munné-Bosch y Alegre 2002) (figura 4), siendo todos potentes antioxidantes lipofílicos y nutrientes esenciales para los mamíferos en la forma de vitamina E. Por lo general, α -tocoferol es la forma predominante en frutas y las otras formas (β , γ y δ) tienden a predominar en oleaginosas y sus respectivos aceites (DellaPenna 2005).

Son compuestos esenciales, puesto que el organismo no puede sintetizarlos, por lo que su aporte se realiza a través de la dieta en pequeñas cantidades (Sayago *et al.* 2007), concretamente para la vitamina E se asigna un valor de 30 unidades internacionales que equivalen a 20 mg de tocoles expresados como alfa-tocoferol (USDA, 2004).

La estructura de los tocoferoles consta de 2 partes primarias: un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral 4',8',12'-trimetiltridecil fitol y la forma molecular de esta cadena saturada es lineal (Munné-Bosch y Alegre 2002).

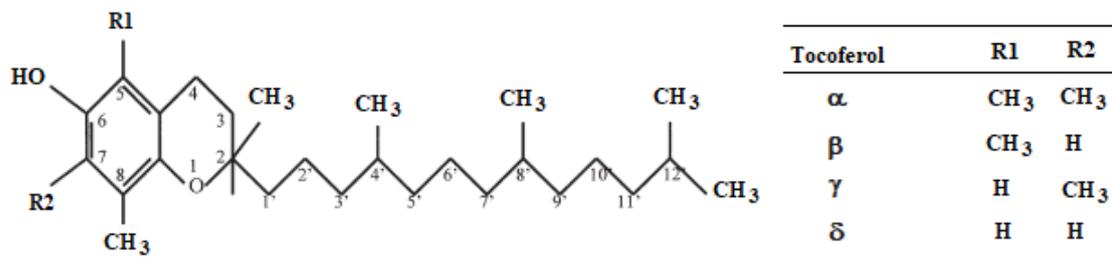


Figura 4: Estructura química de los tocoferoles.

FUENTE: Tomado de Munné-Bosch y Alegre 2002

Estudios indican que los tocoferoles en las plantas se encuentran en los plástidos, ya sea en amiloplastos de semillas y tubérculos, en los cloroplastos de tejidos fotosintéticos, leucoplastos de pétalos o cromoplastos en frutas (Kruk y Strzalka 1995). El α -tocoferol se encuentra en la membrana de los plastidios, donde es sintetizado y se almacena en el estroma del cloroplasto y en las membranas de los tilacoides (Arango y Heise 1998).

Los tocoferoles han sido detectados en hojas, semillas, raíces, tubérculos, frutos, tallos, hipocótilos y cotiledones de plantas superiores, pero el contenido de tocoferol y su composición es muy heterogéneo (DellaPenna 2005). La vitamina E, se encuentra principalmente en las hojas y partes verdes de las plantas, que contienen más α -tocoferol que las partes amarillas (Gerald y Combs, 1992). Los tejidos de las plantas varían enormemente en su contenido total y composición de tocoferoles, con concentraciones totales que van desde niveles extremadamente bajos como en el tubérculo de la papa (< 1 μ g/g, ms) a muy altos como en el caso de hojas y semillas (> 1mg/g ms) (Demo *et al.* 1998, Goffman *et al.* 1999, Grusak y DellaPenna 1999).

El α -tocoferol naturalmente sintetizado es un único estereoisómero (R, R, R), mientras que el α -tocoferol químicamente sintetizado, es la forma más común en suplementos de vitamina E, este es una mezcla racémica de ocho estereoisómeros que oscilan entre el 21 al 100 por ciento de actividad con respecto a (R, R, R)- α -tocoferol (Eintenmiller, 1997). Aunque los tocoferoles son absorbidos igualmente durante la digestión el (R, R, R)- α -tocoferol es preferentemente retenido y distribuido por todo el cuerpo (Traber 1996).

La ruta biosintética de tocoferoles en plantas parte del metabolismo citosólico de los aminoácidos aromáticos para la síntesis de la cabeza polar a partir del ácido homogentísico (HGA) y de la ruta plastídica de la deoxixilulosa 5-fosfato para la síntesis de la cola hidrofóbica a partir del fitildifosfato. La síntesis de tocoferoles es iniciada por la conversión del ácido *p*-hidroxifenilpirúvico (HPP) proveniente de la ruta del ácido shikímico en HGA por medio de una descarboxilación oxidativa. Posteriormente el HGA se condensa con la molécula de fitildifosfato para formar el 2-metil-6-fetil-benzoquinol (MPBQ) que es el intermediario de todos los tocoferoles. Esta condensación es mediada por la enzima fitiltransferasa (HPT), cuya especificidad por el sustrato es un factor que determina si se sintetizarán tocoferoles, tocotrienoles o ambos compuestos. El δ -tocoferol se forma por ciclación directa del MPBQ y una metilación adicional produce el β -tocoferol. La síntesis de α -tocoferol requiere de una metilación previa a la ciclación para formar el 2,3-dimetil-6-fetil-benzoquinol (DMPBQ), cuya ciclación forma el γ -tocoferol. Finalmente, la metilación del γ -tocoferol produce α -tocoferol (Figura 5) (Méne-Saffrané y DellaPenna 2010; DellaPenna 2005).

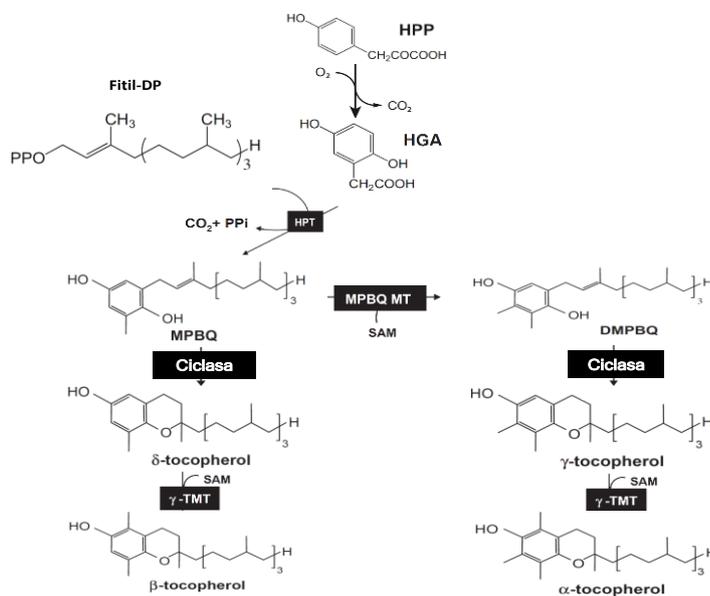


Figura 5: Ruta biosintética de tocoferoles en plantas superiores.

FUENTE: Tomado de DellaPenna 2005

Los tocoferoles son potentes antioxidantes, por lo que protegen la planta de la toxicidad del oxígeno, además eliminan los radicales que causan la peroxidación lipídica en membranas y los radicales resultantes, tocoferoxilos, son reciclados de nuevo a tocoferoles por la acción de otros antioxidantes (Munné-Bosch y Alegre 2002). La biosíntesis de tocoferoles se produce exclusivamente en organismos fotosintéticos (Méne-Saffrané y DellaPenna 2010).

El α -tocoferol tiene la más alta actividad de vitamina E (Kamal-Eldin y Appelqvist 1996) y puede regular la concentración de especies reactivas de oxígeno y las hormonas vegetales, como el ácido jasmónico, que controla el crecimiento y desarrollo de las plantas y también como respuesta de la planta al estrés (Munné-Bosch y Alegre 2002). Por otro lado, el contenido de α -tocoferol presenta una alta correlación con el contenido lipídico (Wildman 2000). El α -tocoferol aumenta la rigidez de la membrana por lo que su concentración junto con la de otros componentes de la membrana debe ser regulada para proporcionar una fluidez adecuada para el funcionamiento de la membrana (Munné-Bosch y Alegre 2002).

Los tocoferoles pueden oxidarse por cooxidación con lipoxigenasa *in vitro* (Hakansson y Jagerstad 1990). Por lo tanto, es probable que el α -tocoferol pueda degradarse enzimáticamente y no enzimáticamente en plantas. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto se pueden atribuir las pérdidas de tocoferol a la oxidación enzimática o no enzimática.

La transformación de cloroplastos en cromoplastos durante la maduración de frutos está asociada con varios eventos como la pérdida de galactolípidos y una masiva acumulación de carotenoides que se da paralelamente con un incremento en la síntesis de α -tocoferol; aunque las formas α y β aumentan considerablemente, γ -tocoferol aumenta primero y luego disminuye durante los estados posteriores (Abushita *et al.* 1997). Puntarulo (1993) sugiere que el contenido de α -tocoferol se ajusta en respuesta al estrés oxidativo. Adicionalmente, una serie de factores ambientales (por ejemplo, alta radiación UV-B, déficit hídrico, bajas temperaturas, estrés salino, ozono, contaminantes) pueden conducir a un estrés oxidativo en plantas (Smirnoff 1993). Hasta la fecha, la comprensión del papel de los tocoferoles

como respuesta al estrés oxidativo está limitado a las correlaciones entre el grado de estrés y la concentración de tocoferoles (Munné-Bosch y Alegre 2002).

El α -tocoferol disminuye cuando una alta luz es combinada con un déficit hídrico. Estos resultados indican que aunque el α -tocoferol pueda ofrecer un cierto grado de protección contra la radiación UV-B y otros factores; esta protección está limitada por el contenido de los otros antioxidantes presentes y por la cantidad de las especies reactivas de oxígeno (Munné-Bosch y Alegre 2002).

García (2016) obtuvo 4.7 y 5.9 mg α -tocoferol/100 g (ms) en lúcuma en estado de madurez comercial en los biotipos “Beltrán” y “Seda” respectivamente mientras que en: mango, plátano, manzana, pera, durazno y naranja se reportaron valores de α -tocoferol entre 1,2 – 9,4; 0,2 – 0,7; de 0,3; 0,4; 0,8 y 0,3 mg/100 g (ms) (Vilela *et al.* 2013, Vilela *et al.* 2014, Stone y Papas 2003). Las frambuesas maduras tienen un contenido de tocoferoles de 366 mg/kg (ms) (Carvalho *et al.* 2013). Con respecto al γ - tocoferol, en arándano, uva verde sin semilla, pera, durazno y palta se reportaron valores de $0,38 \pm 0,09$; $0,16 \pm 0,16$; $0,02 \pm 0,02$ y $0,13 - 0,69$ mg/100 g (ms) (Chun *et al.* 2006). Las frambuesas presentan α , δ y γ - tocoferol (Carvalho *et al.* 2013). Las frambuesas de los biotipos “Alpen Gold”, “Sugana” y “Tulameen” poseen un alto contenido de γ - tocoferol que va de 11,5 a casi 20 mg/100 g (ms), seguido de δ -tocoferol (5-15 mg/100 g, ms) y α -tocoferol (0,9-2,1 mg/100 g, ms). Aunque δ y γ - tocoferol tienen menor actividad de vitamina E tienen un alto potencial antioxidante y otras propiedades promotoras de la salud. Por ejemplo, el γ - tocoferol ha sido correlacionado negativamente con enfermedades coronarias (Ohrvall *et al.* 1996).

2.3.4 FITOSTEROLES

Los fitoesteroles, son esteroides vegetales (compuestos con 28 o 29 átomos de carbono), de estructura similar al colesterol (27 carbonos). Derivan del ciclopentanoperhidrofenantreno, diferenciándose en la cadena hidrocarbonada lateral en C-24 (Valenzuela y Ronco 2004). En el colesterol, esta cadena se forma por ocho carbonos saturados, en cambio, los fitoesteroles presentan 9 ó 10 carbonos (Muñoz *et al.* 2011). Mientras que 250 tipos de

fitosteroles son reportados en la literatura, los estudios de nutrición se centran mayormente en β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, sitostanol y campestanol (figura 6) (Han *et al.* 2008).

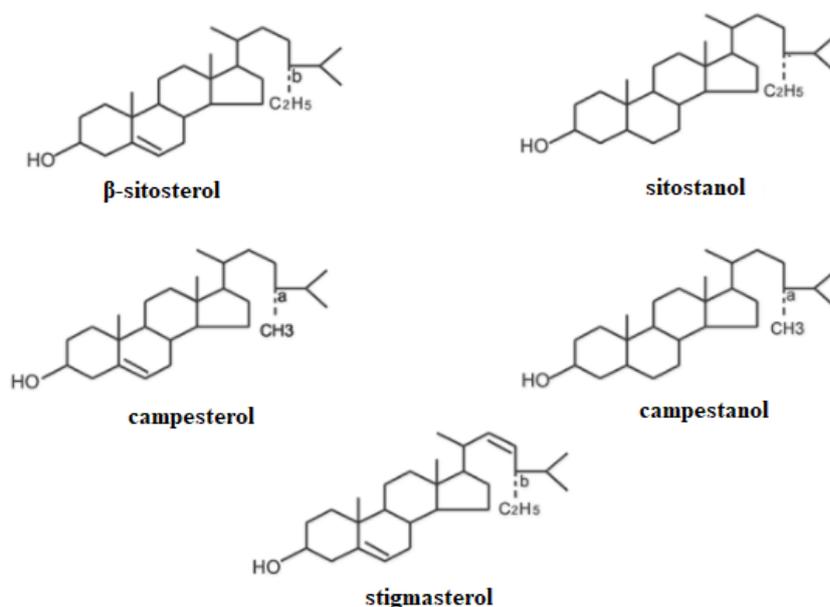


Figura 6: Estructuras químicas de los fitosteroles más comunes en alimentos.

FUENTE: Tomado de Illanes *et al.* 2008

Los fitosteroles se encuentran en todas las plantas, y alimentos de origen vegetal, en especial en los aceites (Katan *et al.*, citados por Romero y Vásquez 2012). Las principales fuentes son los aceites vegetales, semillas oleaginosas, cereales, legumbres y frutos secos. Sin embargo, se ha reportado que el consumo de frutas y vegetales a pesar de presentar una concentración relativamente baja de fitosteroles también contribuyen sustancialmente a la ingesta total de fitosteroles debido a la frecuencia relativa con la que son consumidos (Normen *et al.* 2001).

A los fitoesteroles se les atribuye propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas (Ling y Jones, citados por Valenzuela y Ronco 2004). Otras actividades biológicas que destacan de los fitoesteroles en humanos son antiaterosclerótica, anticancerígena, y antioxidante (Hernández *et al.* 2011). Sin embargo, el efecto mejor caracterizado y científicamente demostrado, es el efecto hipocolesterolémico, tanto a nivel

del colesterol total como del colesterol-LDL (Pollak y Kritchevsky, citados por Valenzuela y Ronco 2004). Debido a su estructura similar a la del colesterol, los fitoesteroles inhiben la absorción del colesterol tanto dietario como el producido de forma endógena (colesterol biliar). Los mecanismos posibles de este efecto son: precipitación del colesterol a una forma no absorbible en presencia de fitoesteroles y fitoestanoles y, competencia con el colesterol por las micelas de sales biliares y fosfolípidos (Moreau *et al.* 2002).

Los fitoesteroles son sintetizados de manera similar al colesterol. En general, la ruta biosintética sigue la ruta de los isoprenoides que empieza con la reducción del HMG-CoA (de seis carbonos) a mevalonato (cinco carbonos); el esquema general se presenta en la figura 10. Se necesitan seis unidades para formar dos moléculas de farnesildifosfato, las cuales se combinan para sintetizar escualeno (Moreau *et al.* 2002). Sin embargo, difiere de la ruta biosintética del colesterol en que el intermediario de la ciclación del escualeno es el cicloartenol en lugar del lanosterol, puesto que interviene la enzima oxidoescualeno-cicloartenolciclasa. Posteriormente se introduce el grupo metilo en el carbono 24 de la cadena lateral del esterol por acción de la esterol metiltransferasa 1, y la enzima ciclopropil esterol isomerasa abre el anillo ciclopropano presente en el cicloartenol (Nes 2011).

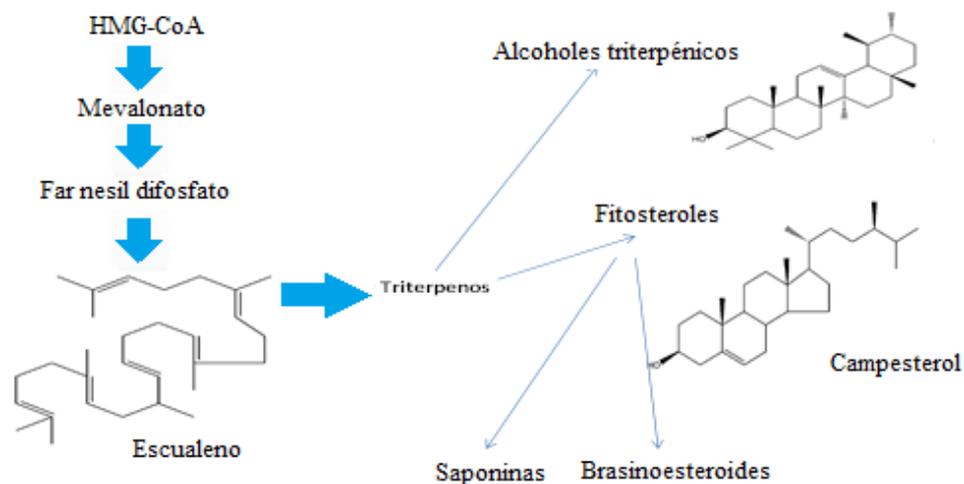


Figura 7: Esquema general de la biosíntesis de fitoesteroles y otros triterpenos.

FUENTE: Adaptado de Moreau *et al.* 2002

En los tejidos vegetales, los fitoesteroles aparecen en cinco formas comunes: forma libre, ésteres de ácidos grasos, glicosilados (por lo común con glucosa mediante un enlace 1- O - β -glicosídico), y como glucósidosacilados (con ácidos ferúlico o *p*-cumárico) (figura 7) (Moreau *et al.* 2002). En tomate, los fitoesteroles glicosilados acilados constituyen más de la mitad de los esteroides totales y junto con los fitosteroles glicosilados constituyen entre el 85 al 90 por ciento de los esteroides totales. Durante la maduración del tomate, se produce un incremento sustancial en la síntesis de esteroides, especialmente de fitoesteroles libres. En frutas y verduras, el fitoesterol predominante en la mayoría de casos es el β -sitosterol (Normén *et al.* 1999, Han *et al.* 2008).

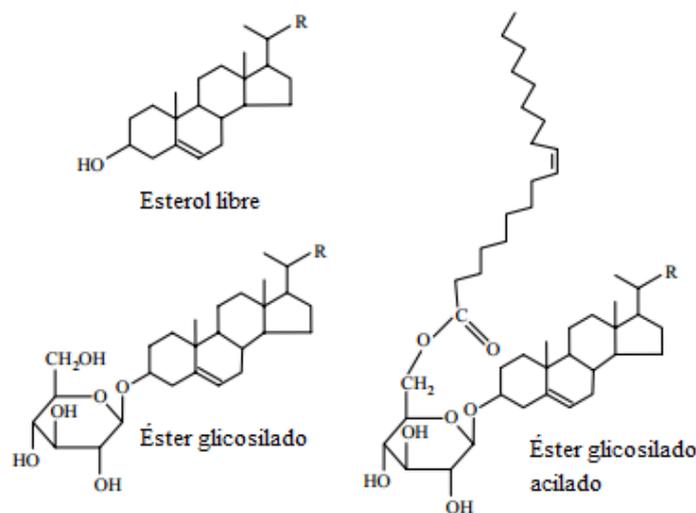


Figura 8: Ejemplos de estructuras básicas de esteroides libres y sus conjugados. R (cadena lateral) varía entre diferentes esteroides.

FUENTE: Tomado de Toivo *et al.* 2001

Jonker *et al.* (1985) reportaron un incremento del 22 a 42 por ciento de sitosterol al realizar una etapa de hidrólisis ácida previa a la hidrólisis alcalina durante la preparación de diversos alimentos, y es que el enlace acetal entre el esteroide y el resto de carbohidrato no puede hidrolizarse por condiciones alcalinas y por lo tanto, los métodos de saponificación directa fallan en cuantificar los ésteres glicosilados (Lagarda *et al.* 2006). En cuanto a la saponificación con hidróxido de potasio metanólico a temperatura ambiente en presencia de estándar interno 5α -colestanol es adecuado para la mayoría de alimentos (Lagarda *et al.* 2006).

En un estudio acerca de los componentes lipofílicos en diferentes especies de plátano, Vilela *et al.* (2014) mostraron que los fitoesteroles más importantes en estas frutas son β -sitosterol, estigmasterol y campesterol. Similares resultados se han encontrado en mango, donde el β -sitosterol representa más del 50 por ciento de los fitoesteroles totales; adicionalmente, se detectaron otros tipos de fitoesteroles como fucosterol y 24-metilencicloartenol (Vilela *et al.* 2013). En la actualidad, se dispone de poca información acerca de la composición de la fracción lipídica de las especies de *Pouteria*. Se ha identificado β -sitosterol en la corteza de aguay (*Pouteria caimito*); cicloartenol y lanosterol en hojas de *Pouteria torta* (Silva *et al.* 2009) y β -sitosterol y cicloartenol en pulpa de lúcumo en madurez comercial para los biotipos Seda y Beltrán (cuadro 1) (García 2016).

2.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA Y LIPOFÍLICA

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación. Los antioxidantes pueden clasificarse en naturales o sintéticos, estando estos últimos en desuso debido a estudios que les atribuyen efectos carcinogénicos (Velioglu *et al.* 1998). Este hecho ha despertado un creciente interés en el estudio de los antioxidantes naturales entre los que se encuentran distintos compuestos fenólicos.

Los antioxidantes de origen natural son aquellas sustancias que se presentan o pueden ser extraídas de los tejidos de las plantas (Pokorny 2001). En las frutas, las legumbres y algunos vegetales se encuentran muchas sustancias capaces de atrapar radicales libres, mejorando nuestra defensa antioxidante, reportándose que son capaces de detener o prevenir el desarrollo de tumores y los efectos bioquímicos asociados con la progresión de los mismos; este potencial se atribuye, principalmente, a sus propiedades antioxidantes (Castañeda *et al.* 2008).

Se deben cumplir dos condiciones básicas para que un compuesto sea clasificado como antioxidante: la primera es que cuando se encuentre en una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar o prevenir la oxidación mediada por un radical libre. La segunda es que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores (Pratt 1992).

Numerosos estudios han reportado una correlación fuerte entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante (Decker 1995; Alexandre *et al.* 2012; Chirinos *et al.* 2008a, 2008b, 2009; Gordon *et al.* 2011; Gomes *et al.* 2013; Ma *et al.*, 2004; Moo-Huchin *et al.* 2014), así estos compuestos son considerados como los mayores contribuyentes a la capacidad antioxidante de los alimentos (Rodríguez-Amaya 2010). Según Paladino (2006), existe correlación entre el contenido de fenólicos totales y la capacidad de captura de radicales libres y es que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su reacción con los radicales libres, donándoles un átomo de hidrógeno y formando un radical más estable por resonancia (Craft *et al.* 2012). Esta capacidad depende del número y posición de los grupos hidroxilo (OH) y del pH del medio (Belitz *et al.* 2009). Además, la polaridad de los compuestos fenólicos es determinante en cuanto a la capacidad de capturar radicales libres. Los compuestos fenólicos que poseen mayor cantidad de sustituyentes hidroxilados (polihidroxilados) tienen una polaridad mayor que los otros fenoles (Paladino 2006).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) se generan continuamente en el cuerpo como consecuencia del metabolismo oxidativo y función inmune. Las formas más frecuentes de ROS incluyen radicales como radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), mientras que las RNS incluyen óxido nítrico (NO) y peróxido nítrico ($ONOO^{\cdot}$) (figura 8).

El estrés oxidativo y nitrosativo es un importante mecanismo patológico que contribuye significativamente a varias enfermedades, tales como neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes y cáncer (Reuter *et al.* 2010, Mates *et al.* 2012).

al., 1999). Además, el ABTS•+ es soluble en solventes acuosos y orgánicos, lo cual lo hace un método apto para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de extractos y fluidos biológicos (Schlesier *et al.* 2002, Prior *et al.* 2005), por ello se indica que puede determinar la capacidad antioxidante total.

El método ORAC consiste en medir la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido (ROO). El método mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína del daño oxidativo. La proteína usada es la fluoresceína (FL). El mecanismo de la reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrogeno del antioxidante al radical libre. Por esto, se utiliza el radical iniciador, AAPH, con el fin de generar el radical peroxil ROO•. Un mol de AAPH, pierde un mol de nitrógeno, para generar dos moles de radical AAPH a una razón constante. En una solución saturada de aire, el radical AAPH reacciona rápidamente con el oxígeno para dar un radical peroxil más estable (ROO•). La pérdida de la fluorescencia de la fluoresceína es el indicador de la extensión de la oxidación con el radical peroxil. En presencia de un antioxidante, el RRO• capta, preferiblemente, un átomo de hidrógeno del antioxidante estable. Como consecuencia, la disminución de la fluorescencia de la FL por acción del radical peroxil es disminuida o inhibida (Álvarez *et al.* 2011). En el cuadro 1, se presentan la capacidad antioxidante ORAC de diferentes frutas en madurez comercial.

Entre los compuestos fenólicos con una reconocida capacidad antioxidante destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos (principalmente hidroxicinámico, hidroxibenzóico, caféico, clorogénico), taninos (elligataninos), calconas y cumarinas, los cuales constituyen la fracción polifenólica de una gran diversidad de alimentos (Pratt 1992).

Cuadro 1: Capacidad antioxidante hidrofílica de varias frutas en madurez comercial

FRUTA	ORAC ($\mu\text{mol TE/g, ms}$)
Fresa	357.4 ± 25.6
Mora	124.7 ± 9.9
Guayaba	180 ± 8.5
Lulo	100.9 ± 1.5
Granadilla	83.9 ± 7.9
Ciruela	80.9 ± 1.2
Durazno	51.1 ± 1.2
Kiwi	44.6 ± 3.7
Plátano	24.3 ± 1.3
Papaya	13.2 ± 0.1

* Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar (n=3).

*Extracto: solución acetona/ agua/ácido acético (70; 29.5; 0.5 v/v/v).

FUENTE: Tomado de Zapata *et al.* 2014

En el estudio realizado en *P.lucuma* por Fuentealba *et al.* (2016) reportaron que, solo la fracción hidrofílica inhibió los radicales libres y además se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres biotipos evaluados. Rosalia presentó la mayor capacidad antioxidante al ser evaluada por el método ABTS ($304.6 \pm 79.4 \mu\text{mol TE/g ms}$), mientras que el biotipo Montero obtuvo el valor más bajo ($5.6 \pm 0.2 \mu\text{mol TE/g ms}$). La capacidad antioxidante en las fracciones hidrofílicas indicó una buena correlación con el contenido de fenólicos totales indicando que esta propiedad está posiblemente relacionada con los compuestos fenólicos (taninos condensados o proantocianidinas) (Fuentealba *et al.* 2016).

Por otro lado, el contenido en compuestos antioxidantes de frutas y hortalizas y por tanto, su capacidad antioxidante, se puede ver afectado por factores fisiológicos, como la maduración, así como por factores tecnológicos, como las condiciones de conservación y procesado (Lindley 1998; Helyes y Lugasi 2006).

Según Fuentealba *et al.* (2016), el estado de madurez en lúcumas influye fuertemente en la capacidad antioxidante medida por el método ABTS. La capacidad antioxidante en las fracciones hidrofílicas disminuyen significativamente con el estado de madurez, presentando el mayor valor el estado pintón ($1096,9 \pm 158,6 \mu\text{mol TE/g, ms}$), luego el estado de la abscisión natural del árbol ($239,0 \pm 196,1 \mu\text{mol TE/g, ms}$) y finalmente la abscisión natural más una semana a $20\text{ }^\circ\text{C}$ y 60-70 por ciento de humedad relativa ($4,8 \pm 0,5 \mu\text{mol TE/g, ms}$).

Los antioxidantes lipofílicos incluyen principalmente carotenoides y tocoferoles, entre otros (Arnao *et al.* 2001). La acción de los carotenoides contra enfermedades ha sido ampliamente atribuida a su actividad antioxidante lipofílica. Sin embargo, no se ha reportado una correlación consistente entre la actividad antioxidante de alimentos y su contenido de carotenoides lo que puede atribuirse a que los ensayos actuales no miden la capacidad antioxidante de los carotenoides de acuerdo con su mecanismo de reacción (Rodríguez-Amaya 2010). Las fracciones lipofílicas de todos los biotipos de lúcumas evaluados por Fuentealba *et al.* (2016) no mostraron una inhibición de los radicales libres mediante el método ABTS ni DPPH. Según algunos estudios esto puede estar relacionado con las limitaciones de los ensayos de capacidad antioxidante *in vitro* para la evaluación de antioxidantes lipofílicos tales como carotenoides (Yahia y Gutiérrez-Orozco 2011).

Los carotenoides actúan como antioxidantes mediante el atrapamiento de oxígeno singlete o de las moléculas que lo forman. Aunque no son tan eficientes para el atrapamiento de radicales libres, los carotenoides tienen la habilidad de interactuar y atrapar radicales como el peróxido y otros que pueden ser generados en las células (Rodríguez-Amaya 2010; Jomova y Valko 2013). Durante mucho tiempo se creyó que el β -caroteno era el carotenoide con mejor efecto antioxidante; sin embargo, varios experimentos *in vitro* realizados en las últimas dos décadas han confirmado que la β -criptoxantina y zeaxantina exhiben una mejor protección contra los radicales peróxido en membranas liposomales.

Estas diferencias, entre el β -caroteno y zeaxantina, se atribuye a las diferentes ubicaciones y orientaciones de estos carotenoides en las membranas biológicas (Jomova y Valko 2013). De hecho, carotenoides como la luteína y zeaxantina son incorporados selectivamente en la retina y la mácula del ojo humano donde se piensa que juegan un papel importante en la prevención del daño macular mediante la absorción de los rayos de luz de alta energía. Por esta razón se ha recomendado una ingesta diaria de 4 miligramos de luteína/zeaxantina (Sajilata *et al.* 2008, Skibsted 2012).

La actividad antioxidante de los tocoferoles resulta de su reacción química directa con componentes reactivos como radicales libres de lípidos, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (DellaPenna 2005). Estudios han demostrado, que en vivo, la actividad antioxidante relativa de los tocoferoles sigue el presente orden $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ (Amaral *et al.* 2005). Los bayas o “*berries*” poseen una alta capacidad antioxidante lipofílica (Arnao *et al.* 2001).

2.5 ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

Muchos factores como el crecimiento de la población, el envejecimiento, la ausencia de actividad física, uso del tabaco, consumo de alimentos refinados con alto contenido calórico están implicados en el aumento de la población afectada por enfermedades crónicas como ataques al corazón, accidentes cerebrovasculares y diabetes (Hung *et al.* 2004, Wild *et al.* 2004). Diversos estudios han reportado que el aumento del consumo de frutas y verduras que contienen altos niveles de compuestos antioxidantes podría reducir el riesgo de estas enfermedades crónicas (Hung *et al.* 2004, Ali *et al.* 2006).

De acuerdo con Wild *et al.* (2004), el número estimado de individuos diabéticos en América Latina y el Caribe aumentará alrededor de 40 por ciento para el año 2030. La urbanización ha sido considerada como un factor importante que contribuye a la prevalencia de la diabetes tipo 2 debido a los cambios de los estilos de vida en las zonas urbanas. La diabetes tipo 2 se caracteriza por la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina (Tránsito-López 2006). No hay cura para este tipo de diabetes, pero la condición se puede controlar cambiando el estilo de vida de los pacientes, y

empleando tratamientos para mantener el nivel de glucosa en sangre dentro del rango normal para prevenir el desarrollo de efectos a largo plazo.

El enfoque terapéutico para tratar la diabetes tipo 2 consiste en retardar la absorción de glucosa a través de la reducción de la hidrólisis del almidón mediante la inhibición moderada de la amilasa pancreática y la fuerte inhibición de la absorción de glucosa en el intestino por enzimas glucosidasas. Inhibidores naturales de α -amilasa y α -glucosidasa provenientes de frutas y verduras pueden ofrecer una buena estrategia para controlar la hiperglucemia y proporcionar beneficios sin los efectos secundarios de los fármacos, tales como distensión abdominal, flatulencia y posibles diarreas (Ali *et al.* 2006, Juárez-Reyes *et al.* 2015).

Existen numerosas especies vegetales con actividad hipoglucemiante. Algunas de ellas están siendo ampliamente estudiadas y, aunque es necesario realizar un mayor número de ensayos clínicos controlados, los resultados de los trabajos realizados en los últimos años son muy positivos, por la eficacia que se desprende de ellos y por la escasa toxicidad a las dosis recomendadas, por lo que podrían utilizarse durante largos períodos. Entre las numerosas especies vegetales con actividad hipoglucemiante se encuentran la goma guar, la alholva, *Momordica charantia*, *Gymnema silvestre* y *Anemarrhena asphodeloides* Bunge (Tránsito-López 2006).

Pinto *et al.* (2009) estudiaron la posible inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa en varias frutas nativas peruanas, siendo la lúcuma la que presentó una mayor inhibición de α -glucosidasa (alrededor de 80 por ciento) respecto a frutas como el pacay, papayita arequipeña y aguamanto.

Kwon *et al.* (2006) evaluaron la inhibición de α -glucosidasa por parte del ácido protocatequico, ácido clorogénico, quercitina y ácido *p*-cumárico. De estos, el ácido protocatequico y la quercitina presentaron una actividad inhibitoria de 55.7 y 36,9 por ciento, respectivamente. Asimismo, el ácido rosmarínico y cafeico presentaron alta actividad inhibitoria. La inhibición de la α -glucosidasa abarcó un rango de 73 a 95,9 por ciento para la lúcuma del biotipo Leiva1 empleando una dosis de 40 μ g de lúcuma (ms); sin embargo, empleando la misma dosis no se reportó inhibición en lúcuma del biotipo

Montero (Fuentelba *et al.* 2016). La lúcuma del biotipo Leiva 1 en estado pintón mostró una inhibición de α -amilasa de 91,9 por ciento empleando una dosis de 2 mg de lúcuma (ms), mientras que para la inhibición de α -glucosidasa se obtuvo un valor de 97,1 por ciento empleando una dosis de 10 μ g (ms) (Fuentelba *et al.* 2016). La lúcuma el biotipo Rosalia en estado de madurez comercial mostró una inhibición de α -amilasa de 86,7 por ciento, empleando una dosis de 2 mg (ms); mientras que para la inhibición de α -glucosidasa se obtuvo un valor de 59,3 por ciento empleando una dosis de 10 μ g (ms). De ello se observa que el estado de madurez influye significativamente en la actividad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa (Fuentelba *et al.* 2016).

Tundis *et al.* (2013) reportan una actividad inhibitoria de α -amilasa superior en estado verde con respecto al estado de madurez comercial para *C.annuum* atribuida a los altos niveles de compuestos fenólicos solubles y flavonoides en el extracto analizado y Pinto *et al.* (2009), reportaron una buena correlación entre el contenido de fenólicos totales y la inhibición de α -glucosidasa ($r = 0,79$). Sin embargo, no encontraron correlación entre la capacidad antioxidante y la inhibición de α -glucosidasa.

Con respecto a α -amilasa, Pinto *et al.* (2009), no encontraron una correlación entre el contenido de fenólicos totales y la inhibición de esta enzima. Estos resultados demuestran que la capacidad antioxidante no refleja la importancia de las estructuras funcionales de estos compuestos en el contexto de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa. Asimismo, Cheplick *et al.* (2007) también reportaron que al comparar la actividad inhibitoria α -amilasa y la capacidad antioxidante en frambuesas no se encontró correlación alguna. Estos autores sugieren que probablemente la actividad de inhibición de α -amilasa se deba a algunos fenólicos específicos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología Industrial y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2 MATERIA PRIMA

Se empleó lúcuma del biotipo “Dos marrón” (híbrido de lúcuma “Seda” y “Palo”) en estados verde (coloración verde debajo de los sépalos) y pintón (coloración amarilla debajo de los sépalos), procedente del vivero Topará del Fundo Huaquina ubicado en Chincha-Ica.

3.3 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.3.1 MATERIALES DE LABORATORIO

- Filtros HPLC 0,22 μm Marca Millipore (Brasil)
- Cartuchos Sep-pack C18 (6 cc, Waters, Mildford) (EEUU)
- Columna X-Terra RP18 (5 μm ; 4,6 mm DI; 250 mm)
- Columna YMC-Pack Silica (3 μm ; 4,6 mm DI; 250 mm)
- Columna Supelco SACTM-5 (0,2 μm ; 0,25 mm DI; 30 m)
- Columna C30 (YMC, Waters) (5 μm ; 4,6 mm DI; 250 mm)
- Microplacas de 96 pocillos
- Materiales de vidrio (tubos de ensayo, matraces, probetas, etc.)
- Materiales de plástico (tubos tipo falcon, eppendorfs, etc.)
- Micropipetas (20-200 μl , 100-1000 μl y 500-5000 μl) Marca Brand® (Alemania)

3.3.2 REACTIVOS

- Ácido acético glacial (p.a. Fermont[®], México)
- Acarbosa (Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- Acetona (p.a. J.T. Baker[®], EEUU)
- ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) (Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro) (Sigma-Aldrich[®], EEUU) Alfa-amilasa (Tipo VI-B > 10 unid/mg, Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- Alfa-glucosidasa (G5003-100 UN; Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- Almidón Soluble (Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- BHT (Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- Carbonato de sodio (Merck[®], Alemania)
- Cloruro de Sodio (Merck[®], Alemania)
- DNS (Ácido Dinitrosalicílico; Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- Diclorometano (Merck[®], Alemania)
- Etanol (J.T. Baker[®], EEUU)
- Folin-Ciocalteu (Merck[®], Alemania)
- Fosfato de potasio diácido (Merck[®], Alemania)
- Fosfato de potasio monoácido (Merck[®], Alemania)
- Fosfato de sodio dibásico (Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- Fosfato de sodio monobásico (Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- Fluoresceína (Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- Hexanos (p.a. J.T. Baker[®], EEUU)
- n-Hexano (grado HPLC J.T. Baker[®], EEUU)
- n-Heptano (p.a. J.T. Baker[®], EEUU)
- Hidróxido de potasio (Mallinckrodt, Suecia)
- Metanol (J.T. Baker[®], Trinidad y Tobago)
- Metanol (grado HPLC J.T. Baker[®], Trinidad y Tobago)
- P-nitrofenil- α -D-glucopiranososa (Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- Persulfato de potasio (Merck[®], Alemania)
- 2-Propanol (p.a. Merck[®], Alemania)

- Sulfato de sodio anhidro (J.T. Baker[®])
- Trolox (Sigma-Aldrich[®], EEUU)
- Estándares de compuestos fenólicos: Flavanoles: (+)-Catequina, (-)-Epicatequina, (-)-Epicatequina galato, (-)-Epigallocatequina, galocatequina, galocatequina galato y Flavanonas: Naringenina, hesperetina y eriodictiol fueron adquiridos de Sigma Aldrich.

3.3.3 EQUIPOS

- Agitador magnético (CAT, modelo M6, Alemania)
- Baño María (GFL, modelo 1083, Alemania)
- Centrífuga (Hettich, Rotofix 32, Alemania)
- Centrífuga refrigerada (Hettich, Mikro 220R, Alemania)
- Congeladora (Electrolux, modelo H300, Brasil)
- Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (modelo 2695) con detector de fluorescencia (modelo 2475) (Waters, EEUU)
- Cromatógrafo de gases (modelo GC-2010, Shimadzu, Japón)
- Espectrofotómetro (ThermoSpectronic[®], Genesys 10 UV, EEUU)
- Estufa (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Venticell, Alemania)
- Lector de microplacas de fluorescencia (BioTek, modelo Synergy 2, EEUU)
- Microcentrífuga (Hettich, Rotina 420, Alemania)
- Potenciómetro (Thermo-Orion, modelo Star A211, EEUU)
- Refrigeradora (LG, modelo GR-482BEF, Corea)
- Rotavapor (Heidolph, modelo Laborotta 4000, Alemania)
- Selladora de bolsas (Machintek[®], modelo KF-300H)
- Ultracongelador (IlShin, modelo DF8517, Corea)
- Vórtex (CAT, modelo VM2, Alemania)

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

La humedad fue determinada de acuerdo con el Método 920.151 (AOAC 1995), por pérdida de peso en estufa a presión de vacío. En una placa fueron pesados aproximadamente 5 gramos de lúcumo fresco. La placa fue colocada en la estufa a una

temperatura de 70 °C y 20 mm Hg de vacío. Las placas fueron dejadas en la estufa hasta obtener peso constante.

3.4.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Fue realizada de acuerdo con el método propuesto por Singleton y Rossi (1965). Los compuestos fenólicos fueron extraídos según lo propuesto por Ma *et al.* (2004). Para ello 0,5 gramos de lúcumo liofilizado fueron mezclados con 25 ml de acetona al 80 por ciento en agitación durante 90 minutos. Posteriormente, se centrifugó el extracto a 3000 g y se recuperó el sobrenadante en un frasco ámbar y se almacenó bajo nitrógeno y congelación a -20 °C hasta el momento del análisis. Los compuestos fenólicos fueron determinados por reacción colorimétrica de 500 µl de extracto diluido con 250 µl el reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y 1250 µl de solución de carbonato de sodio 1,2 N. Luego de un reposo de 30 minutos en oscuridad, se midió la absorbancia a 755 nm. Se utilizó un blanco de agua destilada y el análisis se realizó por triplicado para cada muestra. El contenido de compuestos fenólicos se expresó en miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de muestra en materia seca (mg AGE/g, ms).

3.4.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC-DAD

Se realizó de acuerdo al método reportado por Chirinos *et al.* (2008a). El extracto de compuestos fenólicos (de acuerdo a lo indicado en 3.4.2) fue concentrado por evaporación al vacío hasta un volumen final de 5 ml. De los cuales se tomaron 2 ml para purificación con cartuchos Sep-pack C₁₈ y se concentró el extracto purificado hasta una concentración de 1 mg de AGE/ml de extracto aproximadamente. La separación se realizó utilizando una columna de fase reversa X-Terra RP₁₈ (5 µm, 250 x 4,6 mm). La fase móvil estuvo compuesta por agua:ácido acético (95:5, v/v, pH ≈ 2,27, solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La elución se realizó en gradiente a un flujo de 0,5 ml/min y se inyectaron 20 µl de muestra. Tanto las muestras como los solventes fueron filtrados a través de filtro de 0,22 µm. La detección se realizó con un detector de arreglo de diodos (DAD), en el espectro UV-visible (200 a 700 nm). Los compuestos fenólicos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención y espectros de absorción con estándares.

3.4.4 DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES Y PERFIL DE CAROTENOIDES POR HPLC-DAD

La extracción de carotenoides se realizó utilizando una mezcla de acetona:hexano (1:1, v/v) (Kao *et al.* 2012). El extracto fue evaporado a sequedad y re-suspendido en acetona. Este extracto fue usado para la determinación de carotenoides por espectrofotometría y una fracción fue sometida a saponificación para el análisis de β -caroteno por HPLC-DAD. La cuantificación de carotenoides totales se realizó a 450 nm, previamente se establecerá una curva estándar usando β -caroteno en acetona como estándar y acetona como blanco. El contenido de carotenoides fue expresado en mg de β -caroteno por gramo de materia seca. La saponificación fue realizada de acuerdo a lo propuesto por Andre *et al.* (2007) y el análisis por HPLC-DAD de acuerdo a lo propuesto por Kao *et al.* (2012) con ligeras modificaciones. Se utilizó una columna C30 (YMC, Waters) (5 μ m; 4,6 mm DI; 250 mm).

La fase móvil estuvo compuesta por metanol/acetonitrilo/agua (79:14:7, v/v/v) (A) y cloruro de metileno (B) a un flujo de 1 ml/min en gradiente y detección a 450 nm. Los carotenoides fueron identificados por comparación de los tiempos de retención y espectros de absorción (330-500 nm) con datos reportados en la literatura.

3.4.5 DETERMINACIÓN DE TOCOFEROLES

Se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Amaral *et al.* (2005). La identificación y cuantificación realizó por HPLC con detector de fluorescencia. Brevemente; 0,5 g de lúcumo liofilizada fueron mezclados con 100 μ l de solución de BHT (10 mg en 1 ml de n-hexano), 2 ml de etanol, 4 ml de n-hexano y 2 ml de solución saturada de NaCl. La mezcla fue homogenizada por 1 minuto en un vórtex y posteriormente centrifugada por 5 minutos a 4 000 g y 10 °C. La fase superior fue recolectada y la muestra fue re-extraída dos veces con 2 ml de n-hexano. Los extractos fueron combinados y llevados a sequedad con nitrógeno gaseoso, y el residuo fue reconstituido con 0,5 ml de n-hexano. El extracto fue secado con sulfato de sodio anhidro (0,5 gramos), centrifugado a 10 000 g por 20 segundos y transferido a un vial para el análisis HPLC. El análisis se realizó con una columna YMC-Pack Silica (3 μ m; 250 x 4,6 mm). La fase móvil estuvo compuesta por n-hexano/2-propanol/ácido acético (1000/6/5, v/v/v) a un flujo de 1,4 ml/min bajo condiciones isocráticas. El detector de fluorescencia fue programado a 290

nm para la longitud de onda de excitación y 330 nm para la longitud de onda de emisión. Los tocoferoles fueron identificados y cuantificados por comparación del tiempo de retención con estándares (alfa, beta, gamma y delta tocoferol) previamente inyectados. Los resultados se expresaron en miligramos por 100 gramos muestra (ms).

3.4.6 DETERMINACIÓN DE FITOESTEROLES POR GC-FID

Se realizó de acuerdo a lo propuesto por Duchateau *et al.* (2002) y Da Costa *et al.* (2010). Los lípidos se extrajeron a partir de 12,5 gramos de muestra liofilizada con 100 ml de hexano:acetona:etanol (50:25:25, v/v/v) durante 10 minutos con agitación luego de los cuales se añadieron 15 ml de agua y se agitó durante otros 5 minutos. La fase orgánica fue separada y evaporada a vacío a 60 °C. Se tomaron 100 mg de residuo oleoso que fueron saponificados con 1 ml de KOH metanólico a 70 °C por 50 minutos, previa adición de estándar interno (β -colestanol). La fracción insaponificable fue extraída por partición líquido-líquido con 1 ml de agua destilada y 5 ml de n-heptano. El extracto de n-heptano fue recuperado, y se repitió la extracción en la fracción acuosa dos veces. Los extractos de n-heptano fueron recuperados y deshidratados con sulfato de sodio anhidro previo a la inyección al cromatógrafo de gases. La composición de fitoesteroles se determinó por GC-FID. Se utilizó una columna Supelco SACTM-5 (0,2 μ m; 0,25 mm DI, 30 m). La temperatura del horno se programó como sigue: inicialmente a 250 °C (por 2 minutos), aumentada a 285 °C por 32 minutos. Las temperaturas del inyector y detector fueron fijadas a 300 °C. Los fitoesteroles serán identificados por comparación de los tiempos de retención con estándares (campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol y cicloartenol) previamente inyectados. El contenido de fitoesteroles se expresó en microgramos por gramo muestra de materia seca (μ g/g, ms).

3.4.7 DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA Y LIPOFÍLICA

Se empleó el ensayo ABTS o TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) recomendado por Arnao *et al.* (2001) en los extractos hidrofílico y lipofílico. El ensayo ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Capacity*) fue realizado solo en el extracto hidrofílico mediante el método propuesto por Ou *et al.* (2001) con ligeras modificaciones. Los

resultados de ambos métodos fueron expresados en μmol de trolox equivalente (TE)/g muestra (ms).

3.4.8 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE

Se evaluó midiendo el grado de inhibición de las enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa según el Manual Enzimático de Worthington (1993).

Actividad de inhibición de la enzima α -amilasa: La α -amilasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces alfa-glucosídicos, de los polisacáridos de alto peso molecular, como el almidón, liberando glucosa y maltosa. Estos azúcares reductores reaccionan con el DNS (ácido dinitrosalicílico) generando un producto coloreado que se puede medir por espectrofotometría a 540 nm. La disminución de la hidrólisis enzimática producto de la concentración de compuestos fenólicos u otros metabolitos con actividad de inhibición genera una pérdida de color de la reacción.

El procedimiento seguido fue: en tubos de ensayo de 20 ml de capacidad se agregaron 500 μl de cada extracto acuoso de muestra de lúcuma (obtenido según ítem 3.4.2) y 500 μl del buffer fosfato de sodio 0,02 M (pH 6,9 con 0,006 M NaCl) conteniendo solución de α -amilasa (0,5 mg/ml) y se pre-incubó a 25 °C por 10 minutos. Después de la pre-incubación, se agregaron 500 μl de solución de almidón al 1% en buffer fosfato de sodio 0,02 M y se incubó la mezcla a 25 °C por 10 minutos, la reacción se detuvo con 1 ml de DNS. El tubo de ensayo se incubó en baño maría a 100 °C por 10 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y la mezcla reactante se diluyó agregando 15 mL de agua destilada para medir la absorbancia a 540 nm. La absorbancia de un blanco (agua destilada en lugar de las muestras de extractos y buffer en lugar de la solución enzimática), un blanco de muestra (buffer en lugar de la solución enzimática), un control (buffer en lugar de las muestras de extractos) y un control positivo de inhibición (acarbose a 1000 ppm en lugar de las muestras de extractos) también fueron medidas. Las muestras, blanco de muestra, control y control positivo se midieron por triplicado. La absorbancia final del extracto ($A_{540 \text{ extracto}}$) se obtuvo por sustracción de la lectura de su correspondiente blanco. La actividad inhibitoria de la α -amilasa se determinó a tres concentraciones de muestra y fue calculada de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_{540}(\text{control}) - A_{540}(\text{extracto})}{A_{540}(\text{control})} \times 100$$

Actividad de inhibición de la enzima α -glucosidasa: El método consiste en la hidrólisis enzimática del sustrato de origen sintético, *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*-NFGP), que por acción de la α -glucosidasa (α -GLC), libera unidades de *p*-nitrofenolato y α -D-glucosa. El ion *p*-nitrofenolato presenta una coloración amarillo claro que evidencia que la reacción de hidrólisis enzimática se ha llevado a cabo; la disminución de la hidrólisis resulta en la pérdida de color del reactante, la cual ocurre de forma proporcional a la concentración de compuestos fenólicos con actividad de inhibición. En una microplaca de 96 pozos, se agregaron 50 μ l de cada extracto de muestra (corregido a un pH 7), se adicionó 50 μ l del buffer fosfato de potasio 0,1 M (pH 6,9) y 100 μ l de solución de α -GLC (1 U/ml) usando el mismo buffer para su dilución. Se pre-incubó la mezcla a temperatura ambiente por 10 minutos. Después de la pre-incubación, se agregaron 50 μ l de una solución *p*-NFGP 5 mM usando el mismo buffer para su dilución; la mezcla reactante se incubó a 25 °C por 5 minutos. Se midieron las absorbancias (A_{405} extracto) antes y después de la incubación con un lector de microplacas a 405 nm, se comparó con un control [50 μ l de solución buffer en lugar del extracto de muestra (A_{405} control)]; además se usó un control positivo de inhibición (50 μ l de acarbosa a 5000 ppm en lugar del extracto de muestra). La actividad inhibitoria de la α -glucosidasa se expresó como porcentaje de inhibición, se midió a tres concentraciones diferentes de muestra y se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\Delta A_{405}(\text{control}) - \Delta A_{405}(\text{extracto})}{\Delta A_{405}(\text{control})} \times 100$$

3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se seleccionaron los frutos a partir de cuatro árboles. De cada árbol se tomó una muestra de 5 kg en estado verde y en estado pintón respectivamente (ello corresponde a muestras biológicas, lo que ayudó a definir la real variación de las características de un fruto dada la distribución de los datos), obteniéndose un total de ocho muestras. Es importante indicar que los árboles considerados para la colecta de la fruta en estado verde fueron los mismos para la colecta del estado pintón. Los frutos fueron seleccionados, clasificados, lavados y desinfectados. Posteriormente, fueron pelados y cortados en rodajas de aproximadamente

3 mm de espesor con el fin de ser liofilizados, molidos y conservados a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para cada uno de los análisis se realizaron tres repeticiones, que consistieron de tres sub muestras independientes. En la figura 10 se presenta el flujo de operaciones para la obtención de harina de lúcuma liofilizada para análisis.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de los diferentes análisis se evaluaron dependiendo de la naturaleza de los factores (estado y árbol). En el caso del factor “estado” para una variable paramétrica se empleó la prueba T, mientras que para una variable no paramétrica se empleó la prueba de Mann-Whitney. Por otro lado, para el factor “árbol”, cuando la variable fue paramétrica se empleó un análisis de varianza (ANVA), seguido de la prueba de Tukey para la comparación de medias, mientras que cuando la variable fue no paramétrica se empleó la Prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de medianas. Para todas las pruebas se consideró un valor $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XVI.2.04.

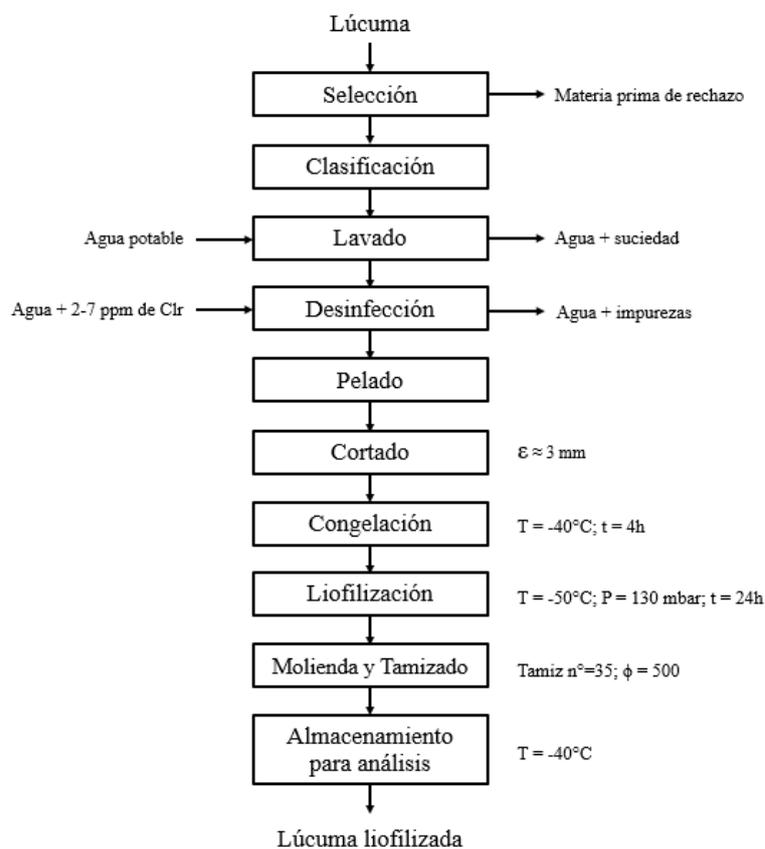


Figura 10: Flujo de operaciones para obtener harina de lúcuma liofilizada para análisis.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

4.1.1 COMPUESTOS FENÓLICOS

La figura 11 (anexo 2) muestra los resultados de compuestos fenólicos totales expresados en mg de ácido gálico equivalente (AGE)/g lúcuma (ms). Se observa que las lúcumas en estado verde en general presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos que el del estado pintón. Sin embargo, también se pudo evidenciar una gran variación en el contenido de fenólicos totales entre los árboles del estado verde (figura 11), lo que puede atribuirse a factores climáticos, prácticas de cultivo, manejo post-cosecha y condiciones de procesamiento (Rodríguez-Amaya 2010).

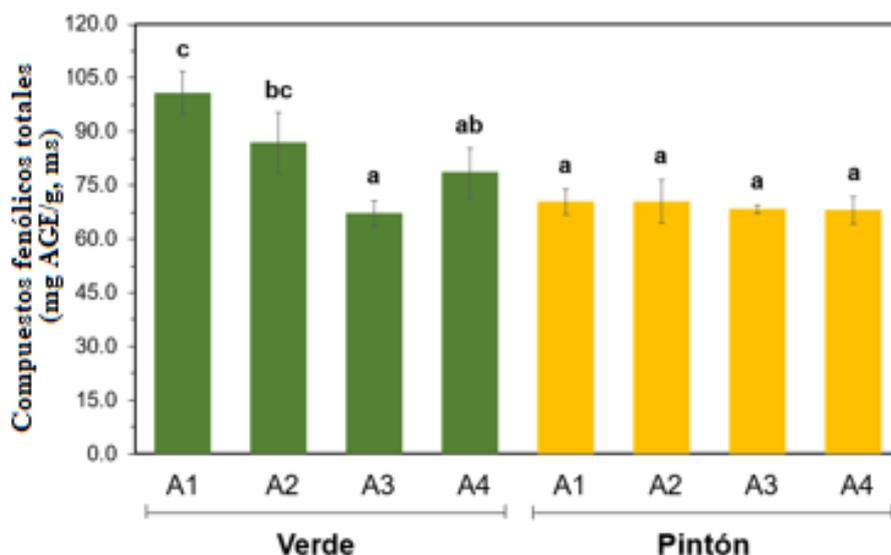


Figura 11: Contenido de compuestos fenólicos totales en dos estados fisiológicos de lúcuma, verde y pintón, provenientes de 4 árboles (A1, A2, A3 y A4), del biotipo “Dos marrón”.

Se obtuvieron valores promedio de $83,3 \pm 14,2$ y $69,3 \pm 1,3$ mg de AGE/g (ms) para los estados verde y pintón respectivamente. Estos valores tienen correlación con lo descrito por Fuentealba *et al.* (2016) quienes observaron una drástica reducción en el contenido de compuestos fenólicos en lúcuma entre el estado pintón (131,6 mg AGE/g, ms), el estado de madurez comercial (45,3 mg AGE/g, ms) y el estado luego de almacenamiento a 20 °C por una semana (0,7 mg AGE/g, ms). De estos resultados se puede afirmar que los compuestos fenólicos en la lúcuma disminuyen a medida que avanza el estado de madurez, lo cual puede explicar el que se observen valores altos cuando el fruto está aún inmaduro (verde) y que estos vayan disminuyendo a medida que el fruto alcanza la madurez fisiológica (pintón) y así subsecuentemente hasta alcanzar la madurez comercial. Así mismo, los valores obtenidos para los estados verde y pintón son mayores a los reportados en la literatura para frutos en su madurez comercial, como es el caso de lúcuma Beltrán con 2,5 mg AGE/g (ms) (García 2016), en mamey (*P. sapota*) con compuestos fenólicos entre 0,6 y 2,8 mg AGE/g (ms) (Mahattanatawee *et al.* 2006) y zapote amarillo (*P. campechiana*) con 5 mg AGE/g (ms) (Kubola *et al.* 2011). Por otro lado, el contenido de fenólicos totales puede variar entre los biotipos de un mismo fruto a pesar de encontrarse en el mismo estado de madurez, como por ejemplo los biotipos de lúcuma Rosalia y Leival mostraron valores similares con 45,3 y 61,6 mg AGE/g (ms) respectivamente en el estado de madurez comercial, mientras que el biotipo Montero, en el mismo estado de madurez, mostró un valor significativamente menor con 0,7 mg AGE/g (ms) (Fuentealba *et al.* 2016).

Rodríguez-Saona y Wrosltad (2001) sostienen que los azúcares libres, así como los ácidos entre otros compuestos presentes en los extractos fenólicos, entorpecen muchas veces la identificación de estos compuestos al momento de la corrida cromatográfica por HPLC/UPLC, por lo que es conveniente realizar una purificación de los extractos fenólicos. Es así que, se llevó a cabo una extracción de fase sólida (SPE) con el fin de remover los azúcares presentes y otros compuestos de afinidad con el agua, de los extractos fenólicos de la lúcuma.

Un total de 11 picos principales fueron detectados mediante cromatografía UPLC-DAD correspondientes a los compuestos fenólicos para ambos estados de madurez (figura 12).

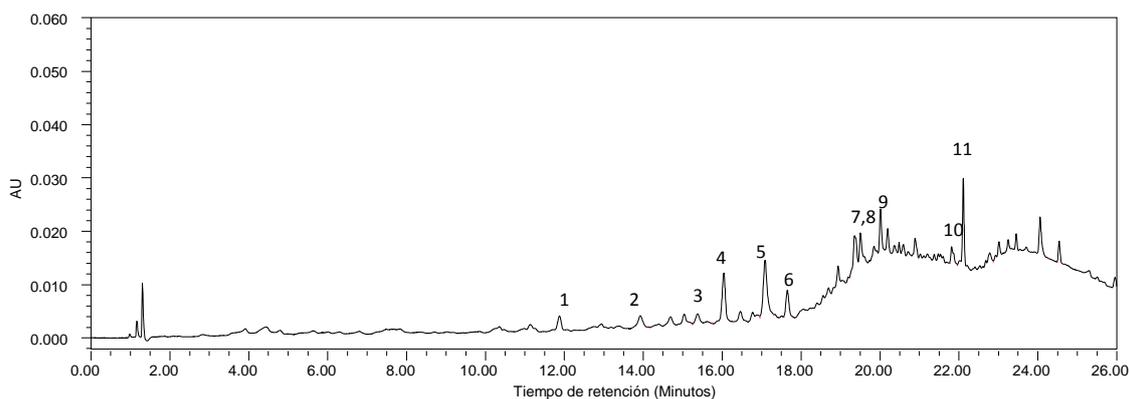


Figura 12: Perfil cromatográfico del UPLC-DAD a 280 nm de los compuestos fenólicos de lúcumas del biotipo “Dos Marrón”.

Estos compuestos fueron identificados y cuantificados como compuestos pertenecientes a la familia de los flavanoles (o flavan-3-ol) y a las flavanonas. Ningún pico fue identificado con los estándares previamente inyectados de flavanoles y flavonas, por ello en función a sus espectros de absorción (200-700 nm) los flavanoles fueron cuantificados como catequina (picos 1, 3, 6, 7, 8 y 9) y los segundos como eriodictiol (picos 2, 4, 5, 10 y 11). La naturaleza de estos compuestos fue consistente con lo reportado por Gomes *et al.* (2013), quienes identificaron flavanoles como derivados de catequina en aguay (*Pouteria gardneriana*), así como también con lo reportado en *P. sapota*, *P. viridis* y *P. campechiana* donde se identificaron derivados de catequina (Ma *et al.* 2004). También, García (2016) determinó y cuantificó a los flavanoles como derivados de catequina, galocatequina, epigalocatequina galato, epicatequina y flavanonas como derivados de hesperetina; además de derivados de ácido gálico y ácido elágico en lúcumas en estado de madurez comercial, no encontrándose, estos dos últimos en el presente estudio. Fuentealba *et al.* (2016) identificaron solo al ácido gálico, una antocianidina (derivado de los taninos condensados que contienen a los monómeros de las catequina y epicatequinas) y un derivado de flavanol, al evaluar un extracto fenólico de lúcumas previamente hidrolizado via hidrólisis ácida.

La comparación cuantitativa de las familias de los compuestos fenólicos, identificados por UPLC-DAD, en los dos estados de madurez de lúcumas se muestra en el cuadro 2 (anexo 3). Se observa que los valores totales de los compuestos fenólicos obtenidos del UPLC, difieren de los valores encontrados en las lecturas espectrofotométricas. Ello se debería a que, al utilizar el método del Folin Ciocalteu, éste detecta en su reacción de óxido-

reducción, cualquier molécula de carácter reductor (ej. azúcares reductores, aminoácidos, ácidos orgánicos, otros) que pudieran sobreestimar el valor real (Granato *et al.* 2016). Como se mencionó, los extractos de lúcuma fueron pasados por previa purificación en columna para eliminar todo tipo de interferencia durante la corrida del UPLC. El empleo de técnicas cromatográficas (HPLC o UPLC) para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, es por tanto, la técnica más específica para este tipo de análisis. De otro lado no se descarta que haya habido algunas pérdidas de compuestos fenólicos durante el proceso de purificación. Finalmente, indicar que el método del Folin Ciocalteau, es hasta la fecha una de las técnicas más utilizadas y reportadas para la cuantificación de compuestos por diferentes investigadores.

Cuadro 2: Concentración de flavanoles y flavanonas obtenidos por análisis cromatográfico (UPLC-DAD) en lúcuma del biotipo “Dos Marrón” en dos estados de madurez: verde y pintón

ESTADO	FLAVANOLES (CUANTIFICADOS COMO CATEQUINA mg/g, ms)	FLAVANONAS (CUANTIFICADOS COMO ERIODICTIOL mg/g, ms)
Verde	1,4 ± 0,25 ^a	1,0 ± 0,1 ^a
Pintón	1,0 ± 0,07 ^b	0,8 ± 0,1 ^b

* Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n=3).

*Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

A pesar de las diferencias cuantitativas encontradas se observa que la tendencia sigue siendo la misma puesto que los compuestos fenólicos en el estado verde son mayores al estado pintón existiendo diferencias significativas entre ambos estados y árboles entre sí ($p < 0,05$) (anexos 4 y 5). Asimismo, el contenido de flavanoles y flavanonas totales son superiores, como era de esperarse, a los obtenidos por García (2016) para lúcuma en madurez comercial, quien reporta valores de 0,04 mg/g (ms) para flavanoles del biotipo Beltrán y 0,07 mg/g (ms) en el biotipo Seda, y con respecto a las flavanonas el autor reportó valores trazas para ambos biotipos de lúcuma. De esta manera, es evidente que los compuestos fenólicos disminuyen con el avance de la madurez del fruto.

4.1.2 CAROTENOIDES

La Figura 13 muestra los resultados de carotenoides totales expresados en mg de β -caroteno/100 gramos (ms). Se observa que las lúcumas en estado verde presentan un menor contenido de β -caroteno que las de estado pintón, existiendo diferencias significativas entre ambos estados de madurez ($p < 0,05$). Lo observado se debe a que durante la maduración de las frutas se observa en general una disminución del contenido de clorofila y un incremento del contenido de carotenoides, hecho que se refleja en la transformación de los cloroplastos en cromoplastos (Eskin y Shahidi 2013) y es que en frutas y vegetales ricos en carotenoides, usualmente la madurez viene acompañada por un incremento en carotenogénesis e incluso después de la cosecha la biosíntesis de carotenoides puede llevarse a cabo, tal como, se ha reportado en mango (Aina 1990).

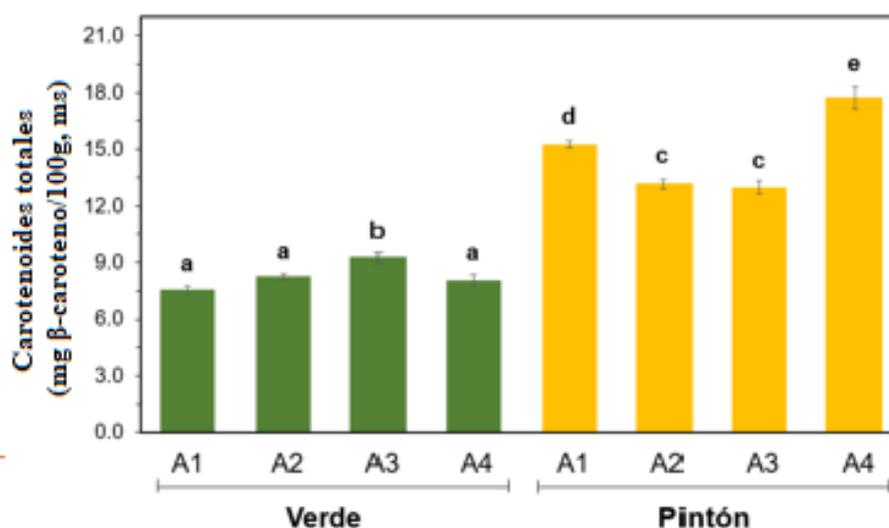


Figura 13: Contenido de carotenoides totales en dos estados de madurez, verde y pintón, provenientes de 4 árboles de lúcuma (A1, A2, A3 y A4) del biotipo “Dos marrón”.

Se obtuvieron valores promedio de carotenoides totales de $8,3 \pm 0,7$ y $14,8 \pm 2,2$ mg de β -caroteno/100g (ms) para los estados verde y pintón, respectivamente. El resultado promedio para el estado verde es comparable al reportado en un estudio en lúcuma chilena del biotipo Leival en estado pintón, el cual fue de 5 ± 2 mg de β -caroteno/100 g (ms) (Fuentealba *et al.* 2016), lo que indicaría que la lúcuma chilena “Leival” en estado pintón presenta un menor contenido de carotenoides totales que la lúcuma peruana “Dos Marrón” en estado verde. Asimismo, dichos autores reportaron un rango de 22-50 mg β -caroteno

/100 g (ms) para lúcumas en estado de madurez comercial en tres biotipos chilenos (Rosalia, Montero y Leiva1). Mientras que, García (2016), obtuvo 24,9 y 30,1 mg de β -caroteno/100 g (ms) para lúcumas “Seda” y “Beltrán” respectivamente, ambas en estado de madurez comercial. En conjunto, estos resultados dan evidencia de la correlación directa entre el avance del estado de madurez de la fruta y el progreso de la carotenogénesis (Aina 1990).

Por otro lado, De Lanerolle *et al.* (2008) reportaron que el contenido de carotenoides totales en zapote amarillo (*Pouteria campechiana*), fruta del mismo género que la lúcumas, varía de 1,9 a 23,5 mg/100 g (ms) abarcando así el rango de carotenoides totales reportados en el presente estudio. Sin embargo, cabe mencionar que la composición final de carotenoides está influenciada por la variedad o biotipo (factor genético), el estado de madurez al momento de la cosecha, factores climáticos, prácticas de cultivo, manejo post-cosecha y condiciones de procesamiento y almacenamiento (Rodríguez-Amaya 2010).

Respecto a la caracterización de carotenoides en frutos tropicales y especies de *Pouteria*, como el sapote (Murillo *et al.* 2013, Moo-Huchin *et al.* 2014), canistel (*P. campechiana*) (Da Costa *et al.* 2010) y lúcumas (Erazo *et al.* 1999, Fuentealba *et al.* 2016) se indica que en estas especies, las xantofilas, especialmente los epóxidos (violaxantina y neoxantina) constituyen el principal grupo de carotenoides y se encuentran esterificados en su mayoría con ácidos grasos (Eskin y Shahidi 2013). Respecto a esto algunos estudios han propuesto que la esterificación facilita el almacenamiento de carotenoides (Howitt y Pogson 2006). De hecho, se ha propuesto que la esterificación podría servir como un medio para estabilizar los carotenoides, lo que ayudaría a proteger los triacilglicérols, lípidos insaturados y otros compuestos sensibles a la luz de la fotooxidación (Cazzonelli y Pogson 2010, Soloychenko *et al.* 2010). Es así que debido a la complejidad de las muestras que contienen carotenoides esterificados y también con el fin de eliminar lípidos y clorofilas interferentes muchos autores, incluyendo la presente investigación, optan por la saponificación de las muestras y considerar solo las unidades de carotenoides libres (no esterificados) (Carvalho *et al.* 2013).

En la Figura 14 se observa el perfil de carotenoides obtenido por HPLC-DAD para los estados verde (A) y pintón (B).

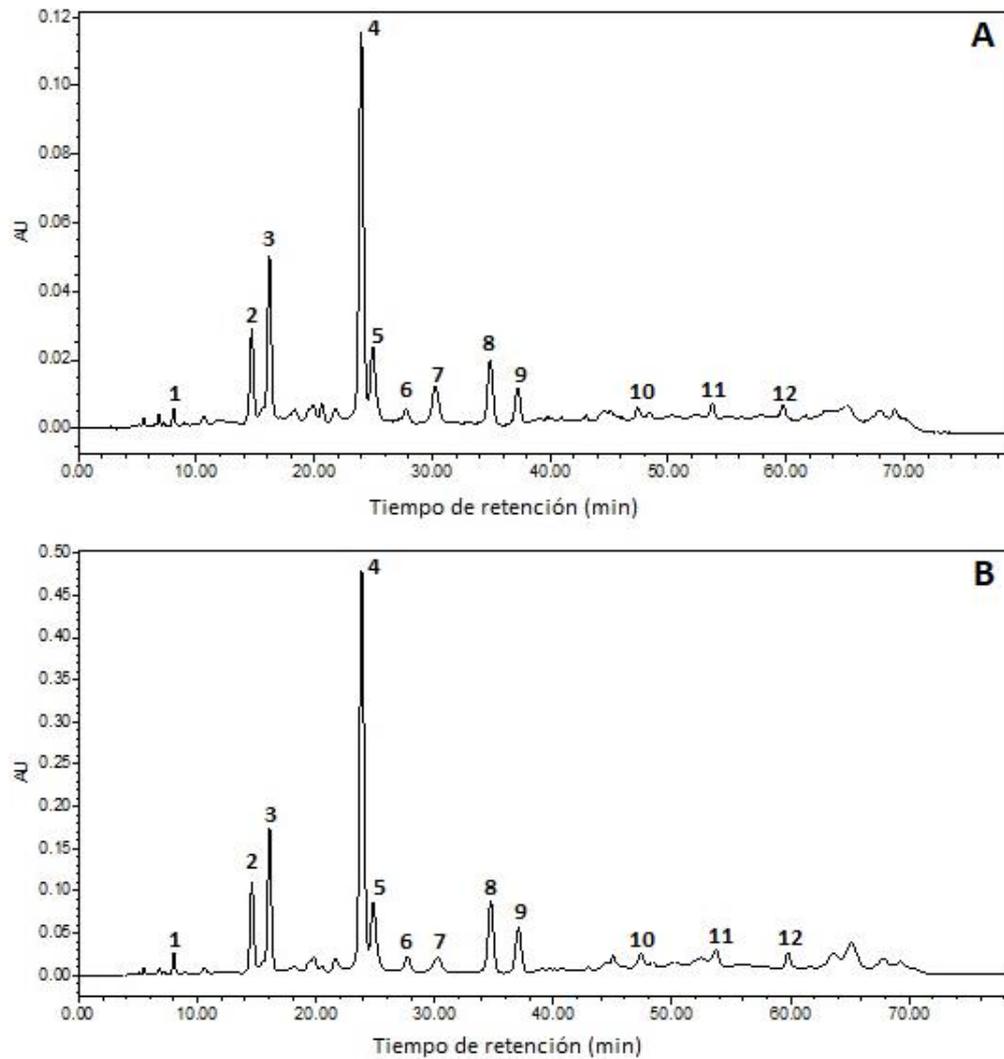


Figura 14: Perfiles HPLC-DAD de los carotenoides de lúcuma del biotipo “Dos Marrón” en dos diferentes estados de madurez: A (estado verde) y B (estado pintón).

Este análisis cromatográfico, permitió la separación de 12 carotenoides, 10 de los cuales pudieron ser identificados tentativamente mediante comparación de tiempos de retención y espectros de absorción (anexo 10) con los reportados en la literatura (anexo 11), tal como fue realizado por García (2016). Los principales carotenoides identificados se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3: Identificación de los carotenoides presentes en lúcumas del biotipo “Dos Marrón” para los estados de madurez verde y pintón

N°	TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)	λ MÁX (nm)	IDENTIFICACIÓN
1	8,6	402,3;424,1	Auroxantina
2	14,7	419,2; 443,4; 471,2	Trans-Neoxantina
3	16,2	416,8; 441,0; 471,2	Trans-Violaxantina
4	23,9	448,2; 477,3	Isómero de luteína
5	24,9	415,6; 438,5; 466,4	Cis-violaxantina
6	27,8	420,4; 447	No identificado
7	30,2	453,1; 474,9	No identificado
8	34,9	453,1; 482,1	Trans-Zeaxantina
9	37,3	444,6; 471,2	9- ó 9'-cis-luteína
10	47,2	317,6; 418,0; 443,4; 473,7	9- ó 9'-cis- β -criptoxantina
11	53,5	336,7; 450,6; 476,1	9- ó 9'-cis- β -caroteno
12	59,7	451,9; 479,7	Trans- β -caroteno

Ambos estados de madurez presentan un perfil de carotenoides similar existiendo diferencias solo en las alturas y áreas de los picos. En el estado pintón, los carotenoides se encuentran en una mayor concentración que en el estado verde, lo que concuerda con los resultados de carotenoides totales mencionados anteriormente (figura 13). Asimismo, los carotenoides obtenidos corresponden con carotenoides que se pueden encontrar en frutas (anexo 12) siendo los componentes mayoritarios las xantofilas, así también los resultados son consistentes con lo reportado por Demmig-Adams *et al.* (1996), quienes sostienen que los frutos no maduros presentan los carotenoides luteína y β -caroteno, y en menor proporción zeaxantina, neoxantina y otros carotenoides no identificados. Esta es la composición típica de carotenoides en tejidos verdes fotosintéticos, donde los carotenoides se encuentran en los cloroplastos, asociados en los complejos “carotenoides-proteína-clorofila” y tienen funciones esenciales de captación de luz y foto protección de la clorofila (Demmig-Adams *et al.* 1996).

Erazo *et al.* (1999) analizaron 6 biotipos de lúcuma chilena en estado de madurez comercial y sostienen que todas las selecciones presentan trans- β -caroteno en concentraciones variables y otros dos isómeros de β -caroteno que no fueron identificados. En ambos estados, verde y pintón, se pudo identificar tanto trans- β -caroteno como 9'-cis- β -caroteno, no obstante el bajo contenido de estos carotenoides indicaría que son rápidamente hidroxilados a medida que la maduración progresa, al punto de casi desaparecer al alcanzar la madurez organoléptica. Este proceso parece empezar incluso antes de la madurez de cosecha ya que un estudio en lúcuma (*P. lucuma*) del biotipo Leiva1 durante tres estados de madurez: estado pintón, abscisión natural del árbol y abscisión natural del árbol más una semana a 20 °C y 60-70 por ciento de humedad relativa, reportó que el contenido de β -caroteno no presentó un cambio significativo ($p < 0.05$) fluctuando en un rango de 7,2-8,4 $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g (ms)}$ (Fuentealba *et al.* 2016).

4.1.3 TOCOFEROLES

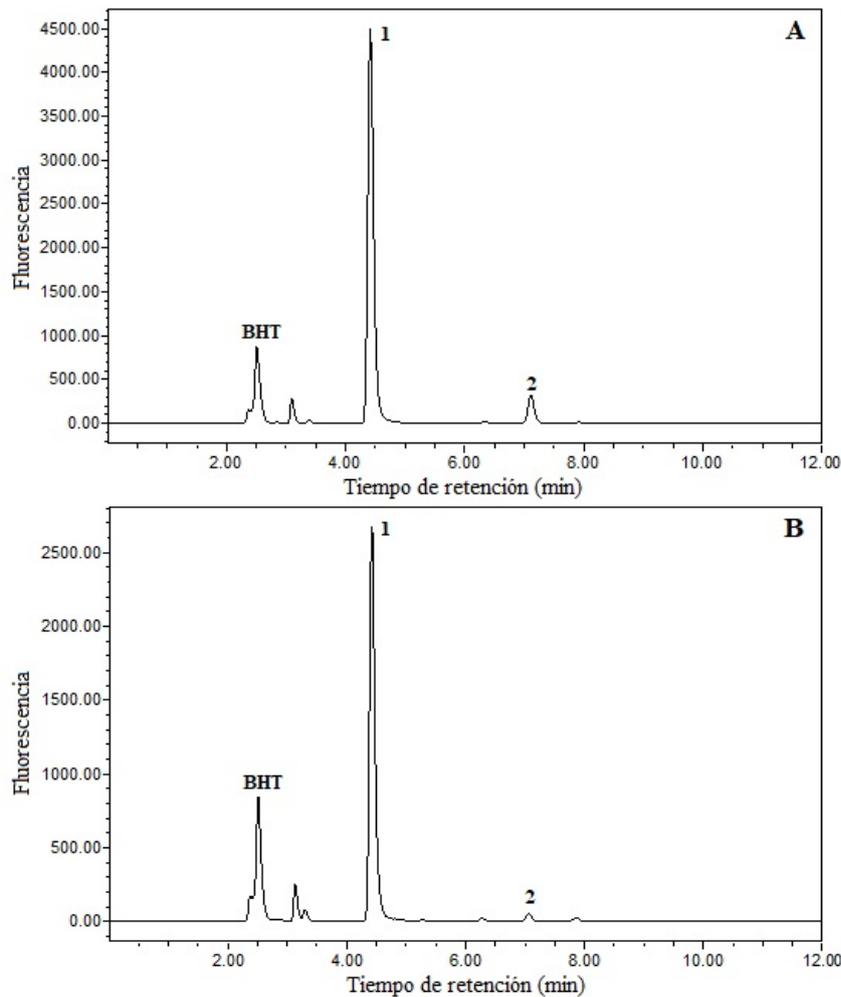
Mediante análisis cromatográfico HPLC-DAD se detectó en la lúcuma el α - y γ -tocoferol, para ambos estados de madurez (cuadro 4, figura 15, anexo 16). No se detectó δ -tocoferol, el cual es el único tocoferol reportado en mamey (*Pouteria sapota*) y cuyo contenido es de 0,36 mg/ 100 g (ms) (Yahia y Gutiérrez-Orozco 2011).

Cuadro 4: Contenido de tocoferoles* lúcuma del biotipo “Dos Marrón” para los estados de madurez verde y pintón

COMPONENTE	VERDE (mg/100 g, ms)	PINTÓN (mg/100 g, ms)
α -Tocoferol	10,5 \pm 1,6 ^a	5,1 \pm 1,1 ^b
β -Tocoferol	N.D.	N.D.
γ -Tocoferol	0,68 \pm 0,04 ^a	0,15 \pm 0,02 ^b
δ -Tocoferol	N.D.	N.D.

* Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar (n=3).

*Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$); N.D.: no detectado



Picos: 1= α -tocoferol, 2= γ -tocoferol.

Figura 15: Perfiles HPLC-DAD de los tocoferoles de lúcumá del biotipo “Dos Marrón” en dos diferentes estados de madurez: A (estado verde) y B (estado pintón).

Ambos estados de madurez presentan un perfil de tocoferoles similar existiendo diferencias solo en las alturas de los picos (figura 15). En el estado pintón, α -tocoferol se encuentra en una menor concentración que en el estado verde, lo cual discrepa con lo reportado por Abushita *et al.* (1997), quienes sostienen que mientras va aumentando la maduración del fruto existe un incremento en la síntesis de α -tocoferol. Sobre esto Puntarulo (1993) sugiere que el contenido de α -tocoferol se ajusta en respuesta al estrés oxidativo y es que diversos factores ambientales (por ejemplo, alta radiación UV-B, déficit hídrico, bajas temperaturas, estrés salino, ozono, contaminantes, otros) pueden conducir a un estrés oxidativo en plantas (Smirnoff 1993).

Hasta la fecha, la comprensión del papel de los tocoferoles como respuesta al estrés oxidativo está limitado a las correlaciones entre el grado de estrés y la concentración de tocoferoles (Munné-Bosch y Alegre 2002). Esto indicaría que posiblemente la planta sufrió un grado de estrés considerable en su paso al estado pintón puesto que la concentración de α -tocoferol disminuyó casi en un 50 por ciento, esta postura es sustentada por Munné-Bosch y Alegre (2002), quienes sostienen que el α -tocoferol disminuye cuando una alta luz es combinada con un déficit hídrico. Estos resultados indican que aunque el α -tocoferol pueda ofrecer un cierto grado de protección contra la radiación UV-B y otros factores; esta protección está limitada por el contenido de los otros antioxidantes presentes y por la cantidad de las especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, es evidente que los tocoferoles, entre otros antioxidantes, juegan un papel importante en la respuesta del estrés (Munné-Bosch y Alegre 2002).

El estado verde en promedio presentó un valor de $10,5 \pm 1,6$ mg α -tocoferol/100 g (ms), mientras que el pintón de $5,1 \pm 1,1$ mg α -tocoferol/100 g (ms). Ambos valores son comparables a los reportados por García (2016), quien obtuvo 4,7 y 5,9 mg α -tocoferol/100g (ms) en lúcuma en estado de madurez comercial de los biotipos “Beltrán” y “Seda” respectivamente y a los reportados en mango (entre 1,2 - 9,4 mg/100 g, ms), asimismo, son inferiores a los reportados en frambuesa 36,6 mg/100 g (ms) y superiores a los encontrados en plátano, manzana, pera, durazno y naranja (0,2 - 0,7; 0,3; 0,4; 0,8 y 0,3 mg/100 g ms) respectivamente (Stone y Papas 2003, Vilela *et al.* 2013, Carvalho *et al.* 2013, Vilela *et al.* 2014).

Respecto al γ -tocoferol, según Abushita *et al.* (1997) este aumenta primero y luego disminuye durante los estados de madurez posteriores, lo cual concuerda con los resultados obtenidos (cuadro 4 y figura 15), pasando de $0,68 \pm 0,04$ a $0,15 \pm 0,02$ mg/100 g (ms) del estado verde al estado pintón; estos valores son comparables a los obtenidos por García (2016) para lúcuma madura del biotipo Beltrán ($0,71 \pm 0,3$ mg/100 g, ms) y a los obtenidos por Chun *et al.* (2006), quienes obtuvieron concentraciones que van de 0,13 a 0,69 mg/100 g (ms) para palta y de $0,16 \pm 0,16$ mg/100 g (ms) para uvas verde sin semillas; sin embargo, son muy inferiores respecto a los obtenidos por Ohrvall *et al.* (1996) para frambuesas (11,5 a casi 20 mg/100 g, ms) y superiores a los reportados en peras ($0,08 \pm 0,07$ mg/100 g, ms) y durazno ($0,02 \pm 0,02$ mg/100 g, ms). Aunque en comparación con

otras fuentes de tocoferoles tales como aceites y frutos secos, el contenido de tocoferoles totales en lúcumas es bajo, esta fruta aporta una mayor cantidad de α -tocoferol que es el tocoferol con mayor actividad vitamina E (Kamal-Eldin y Budilarto 2015). Sin embargo, γ -tocoferol tiene un alto potencial antioxidante y otras propiedades promotoras de la salud. Por ejemplo, su consumo ha sido correlacionado negativamente con enfermedades coronarias (Ohrvall *et al.* 1996).

4.1.4 FITOESTEROLES

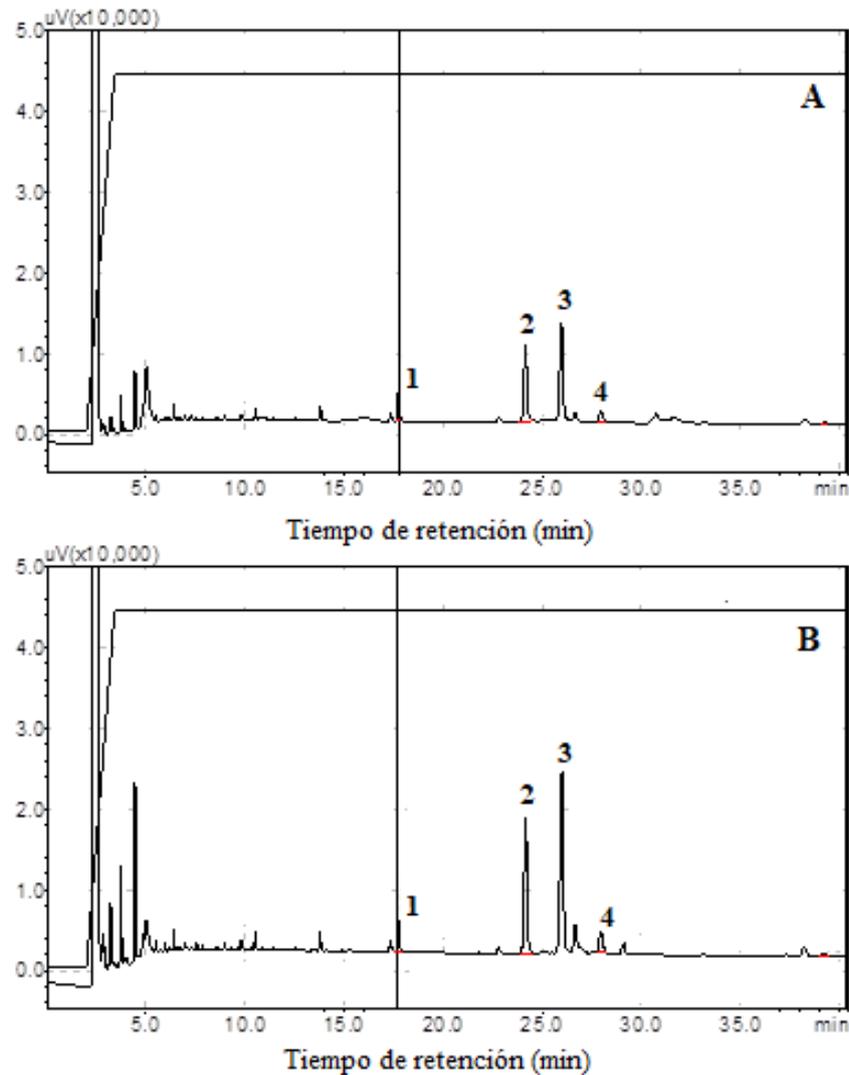
Con respecto a los fitosteroles, en la investigación se detectaron tanto β -sitosterol como cicloartenol en ambos estados de madurez y sus contenidos se muestran en el cuadro 5 (anexo 21), no pudiéndose detectar ni campesterol ni stigmaterol.

En la figura 16, se muestran los perfiles obtenidos mediante GC-FID para los dos estados de madurez, se observa que tanto el estado verde como pintón, nuevamente presentan perfiles similares variando la altura de los picos. Siendo el fitosterol mayoritario el β -sitosterol, el cual es predominante en la mayoría de frutas y verduras (Normén *et al.* 1999, Han *et al.* 2008).

Cuadro 5: Contenido de fitosteroles* en lúcumas del biotipo “Dos Marrón” para los estados de madurez verde y pintón

COMPONENTE	VERDE ($\mu\text{g/g}$, ms)	PINTÓN ($\mu\text{g/g}$, ms)
β -sitosterol	4,4 \pm 1,0 ^a	6,5 \pm 2,4 ^a
Stigmaterol	N.D.	N.D.
Cicloartenol	0,74 \pm 0,07 ^a	0,85 \pm 0,26 ^a
Campesterol	N.D.	N.D.

*Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$);
N.D.: no detectado



Picos: 1=IS (5- α -colestanol), 2= β -sitosterol, 3= no identificado, 4= cicloartenol.

Figura 16: Cromatografía de gases (GC-FID) del extracto lipofílico de lúcuma del biotipo “Dos Marrón” en dos diferentes estados de madurez: A (estado verde) y B (estado pintón).

Respecto a la maduración, este proceso en algunos frutos como el tomate producen un incremento sustancial en la síntesis de esteroides, especialmente de fitosteroides libres (Han *et al.* 2008). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de fitosteroides para ambos estados de madurez de lúcuma ($p > 0,05$).

En la actualidad, se dispone de poca información acerca de la composición de la fracción lipídica de las especies de *Pouteria*. Se ha identificado al β -sitosterol en la corteza de aguay (*Pouteria caimito*); cicloartenol y lanosterol en hojas de *Pouteria torta* (Silva *et al.*

2009) y β -sitosterol y cicloartenol en pulpa de lúcumo en madurez comercial en un estudio reciente (García 2016). Este autor reporta valores de $5,27 \pm 0,07$ y $4,44 \pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$ (ms) para β -sitosterol y $2,48 \pm 0,03$ y $3,50 \pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$ (ms) para cicloartenol para los biotipos Seda y Beltrán, respectivamente. Estos valores son comparables a los obtenidos en el cuadro 5, siendo muy similares a los obtenidos para β -sitosterol tanto en estado verde ($4,4 \pm 1,0$ $\mu\text{g/g}$, ms) como pintón ($6,5 \pm 2,4$ $\mu\text{g/g}$, ms). De otro lado, estos valores son inferiores respecto a los reportados tanto en plátano ($105 - 226$ $\mu\text{g/g}$, ms) (Vilela *et al.* 2014) como en mango ($237 - 692$ $\mu\text{g/g}$, ms) (Vilela *et al.* 2013). Además, el contenido de β -sitosterol en lúcumo en base húmeda (bh) para los estados verde y maduro ($4,3 \pm 1,0$ $\mu\text{g/g}$ y $6,4 \pm 2,4$ $\mu\text{g/g}$) es inferior al reportado en frutas (en bh) tales como manzana (130 $\mu\text{g/g}$, bh), plátano (110 $\mu\text{g/g}$, bh), kiwi (72 $\mu\text{g/g}$, bh), durazno (130 $\mu\text{g/g}$, bh), piña (110 $\mu\text{g/g}$, bh) y sandía (9 $\mu\text{g/g}$, bh) (Normén *et al.* 1999).

En cuanto al cicloartenol tanto el estado verde ($0,74 \pm 0,07$ $\mu\text{g/g}$, ms) como pintón ($0,85 \pm 0,26$ $\mu\text{g/g}$, ms) presentaron concentraciones similares encontrándose cerca del rango reportado por Vilela *et al.* (2014) para plátano ($1 - 4$ $\mu\text{g/g}$, ms). Como se observa, el contenido de β -sitosterol y cicloartenol es inferior al reportado en otras frutas por tanto, la pulpa de lúcumo contribuye en menor proporción a la ingesta de estos componentes.

4.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los resultados que se muestran en el cuadro 6 (anexos 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30) revelaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para las capacidades antioxidantes hidrofílicas de la lúcumo, medidas por ABTS y ORAC, siendo mayor esta propiedad en el estado verde; mientras que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en la capacidad antioxidante lipofílica entre los estados de madurez estudiados (figura 17).

Cuadro 6: Capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica (μmol Trolox equivalente (TE)/g, ms) en lúcumas del biotipo “Dos Marrón” para los estados de madurez verde y pintón

ESTADO	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (ABTS)	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (ORAC)	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICA (ABTS)
Verde	1245,4 \pm 161,5 ^a	166,6 \pm 13,9 ^a	3,7 \pm 0,3 ^a
Pintón	992,7 \pm 96,4 ^b	115,8 \pm 12,5 ^b	4,0 \pm 0,5 ^a

* Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar (n=3), *Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

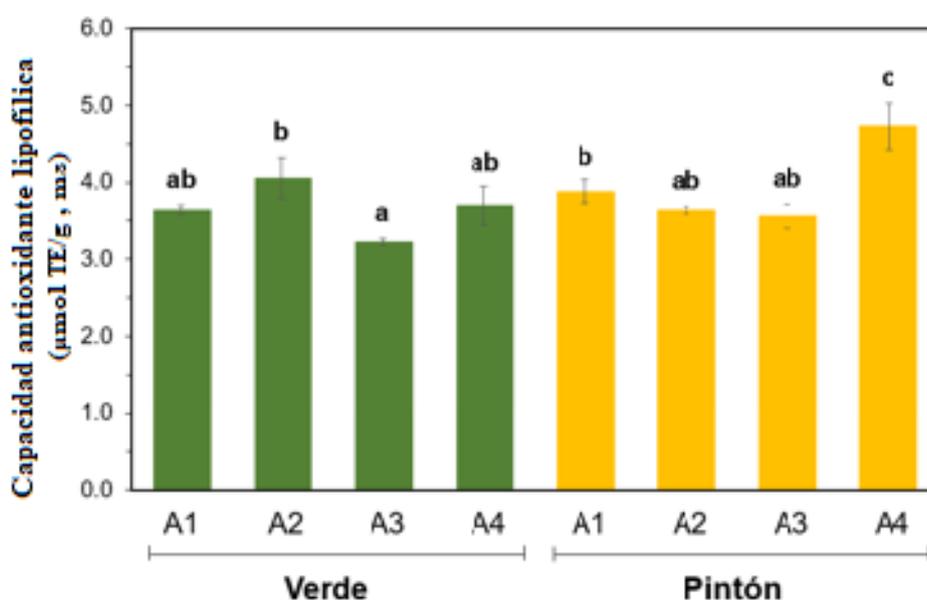


Figura 17: Contenido de capacidad antioxidante lipofílica (ABTS) en dos estados fisiológicos de lúcumas, verde y pintón, provenientes de 4 árboles (A1, A2, A3 y A4).

García (2016) reportó valores de $8,7 \pm 0,1$ y $7,4 \pm 0,4 \mu\text{mol TE/g}$ (ms) para lúcumas en madurez comercial del biotipo Beltrán y Seda, respectivamente. Estos valores son superiores a los obtenidos en los estados verde y pintón del presente estudio, pues como era de esperarse al avanzar el estado de madurez se fomenta la carotenogénesis y la síntesis de tocoferoles y ello debería tener incidencia en la capacidad antioxidante lipofílica. Sin embargo, autores como Fuentealba *et al.* (2016) no detectaron reactividad de la fracción lipofílica en lúcumas, en estado pintón y en madurez comercial, frente a los radicales ABTS

y DPPH, evidenciándose que diferentes resultados pueden obtenerse de frutos pertenecientes a una misma especie pero de diferentes biotipos. Es así que, de acuerdo a lo reportado en la literatura, no es posible establecer una relación concluyente entre el contenido de los compuestos lipofílicos con capacidad antioxidante y el valor mismo de la capacidad antioxidante (Arnao *et al.* 2001, Wu *et al.* 2004, Yahia y Gutiérrez-Orozco 2011, Fuentealba *et al.* 2016). En este contexto, los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con lo afirmado anteriormente, observándose valores de correlación bajos con respecto a la capacidad antioxidante lipofílica para carotenoides, α -tocoferol y γ -tocoferol ($r \leq 0,5$). Esto se debería probablemente a que los métodos empleados para la determinación de la capacidad antioxidante no contemplan el mecanismo de reacción antioxidante de los compuestos lipofílicos, especialmente de los carotenoides, los cuales han mostrado ser efectivos ante radicales libres presentes *in vivo*, tales como las especies reactivas de oxígeno, mas no ante los radicales usualmente empleados *in vitro* (Rodríguez-Amaya 2010).

Por otro lado, diversos estudios han reportado una correlación fuerte entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante hidrofílica (Decker 1995; Chirinos *et al.* 2008a, 2008b, 2009; Gordon *et al.* 2011; Alexandre *et al.* 2012; Gomes *et al.* 2013; Ma *et al.* 2004; Moo-Huchin *et al.* 2014), así estos compuestos son considerados como los mayores contribuyentes a la capacidad antioxidante hidrofílica de los alimentos (Rodríguez-Amaya 2010).

Respecto a la capacidad antioxidante hidrofílica empleando el método ORAC, la figura 18 muestra que los árboles verdes presentaron en general mayores valores de trolox equivalente/g (ms) que los árboles pintones existiendo diferencias estadísticas significativas entre ambos estados ($p < 0,05$) (anexos 27 y 28), teniéndose como valores promedios $166,7 \pm 13,9$ y $115,8 \pm 12,5$ $\mu\text{mol TE/g (ms)}$ para el estado verde y pintón, respectivamente. Estos valores son muy superiores a los reportados por García (2016), quien empleó el método ORAC en dos biotipos de lúcuma en madurez comercial obteniendo valores de $12,2 \pm 0,3$ y $12,6 \pm 0,8$ $\mu\text{mol TE/g (ms)}$ para los biotipos Beltrán y Seda, respectivamente. Esta diferencia se debe a que a medida que el fruto va madurando, la concentración de compuestos fenólicos disminuye y por ende, la capacidad antioxidante hidrofílica también disminuye. Dicha relación queda comprobada con los valores de compuestos fenólicos totales obtenidos por García (2016) para lúcuma en madurez

comercial para los biotipos Beltrán y Seda (2,5 y 2,4 mg AGE/g, ms), los cuales son muy inferiores a los reportados en el presente estudio para los estados verde (83,3 mg AGE/g, ms) y pintón (69,3 mg AGE/g, ms).

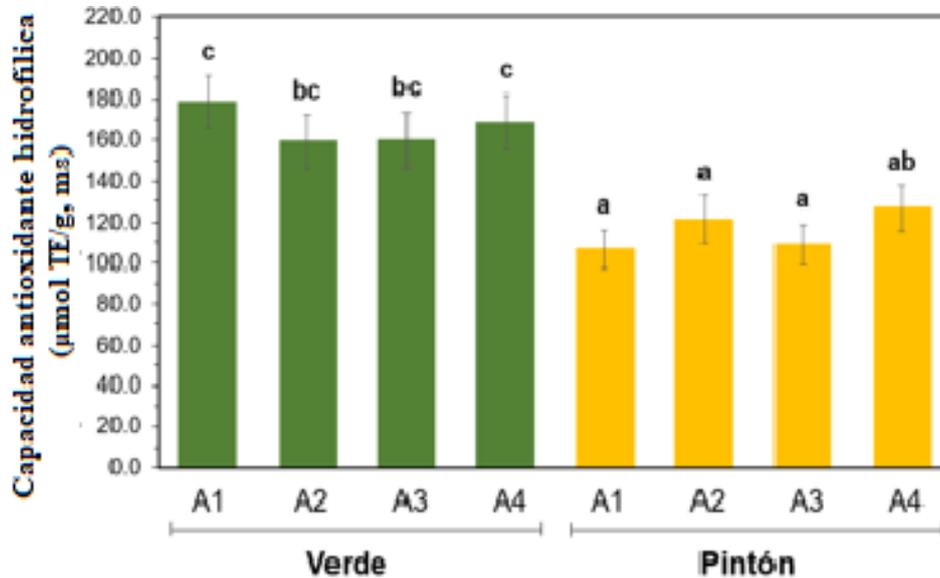


Figura 18: Contenido de capacidad antioxidante hidrofílica (ORAC) en dos estados fisiológicos de lúcumo, verde y pintón, provenientes de 4 árboles (A1, A2, A3 y A4).

Asimismo, los valores obtenidos por el método ORAC para los estados verde y pintón son comparables a los obtenidos en el lulo ($100,9 \pm 1,5 \mu\text{mol TE/g, ms}$) y mora ($124,7 \pm 9,9 \mu\text{mol TE/g, ms}$) e inferiores a los reportados en guayaba ($180 \pm 8,5 \mu\text{mol TE/g, ms}$) y fresa ($357,4 \pm 25,6 \mu\text{mol TE/g, ms}$), cabe recalcar que dichos valores de frutas fueron obtenidos por Zapata *et al.* (2014) empleando el mismo solvente de extracción: acetona/ agua/ácido acético (70; 29,5; 0,5 v/v/v) que el empleado en el presente estudio.

Respecto a la capacidad antioxidante hidrofílica medida mediante el método ABTS, en la figura 19 se observa que existen diferencias significativas entre los estados verde y pintón ($p < 0,05$) (anexos 25 y 26). Los valores promedio obtenidos fueron de $1245,4 \pm 161,5$ y $992,7 \pm 96,4 \mu\text{mol TE/g (ms)}$ para los estados verde y pintón, respectivamente. En este contexto, Fuentealba *et al.* (2016) sostienen que el estado de madurez en lúcumo influye fuertemente en la capacidad antioxidante medida por el método ABTS. Así mismo, estos autores reportaron que la capacidad antioxidante en las fracciones hidrofílicas disminuye significativamente con el estado de madurez, presentando el mayor valor el estado pintón

($1096,9 \pm 158,6 \mu\text{mol TE/g, ms}$), siguiendo el estado de la abscisión natural del árbol ($239,0 \pm 196 \mu\text{mol TE/g, ms}$) y finalmente el estado con una semana a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y 60-70 por ciento de humedad relativa después de la abscisión natural del árbol ($4,8 \pm 0,5 \mu\text{mol TE/g, ms}$). Estos resultados sugieren que la lúcuma en el estado verde contiene la mayor concentración de compuestos con alta actividad antioxidante y, que en el estado de madurez comercial, estos se encuentran en poca concentración, reportándose poca actividad antioxidante. Sin embargo, cabe señalar que este patrón no se repite en todas las frutas, pues a diferencia de la lúcuma, la guayaba (*Psidium guajava*) en su estado verde presenta baja capacidad antioxidante, mientras que en su estado maduro presenta una alta actividad antioxidante ($180 \pm 8,5 \mu\text{mol TE/g, ms}$) (Espinal, 2010). De acuerdo a esto, la capacidad antioxidante variará en el fruto de acuerdo al estado de madurez en que se encuentre, así como al biotipo al cual pertenece.

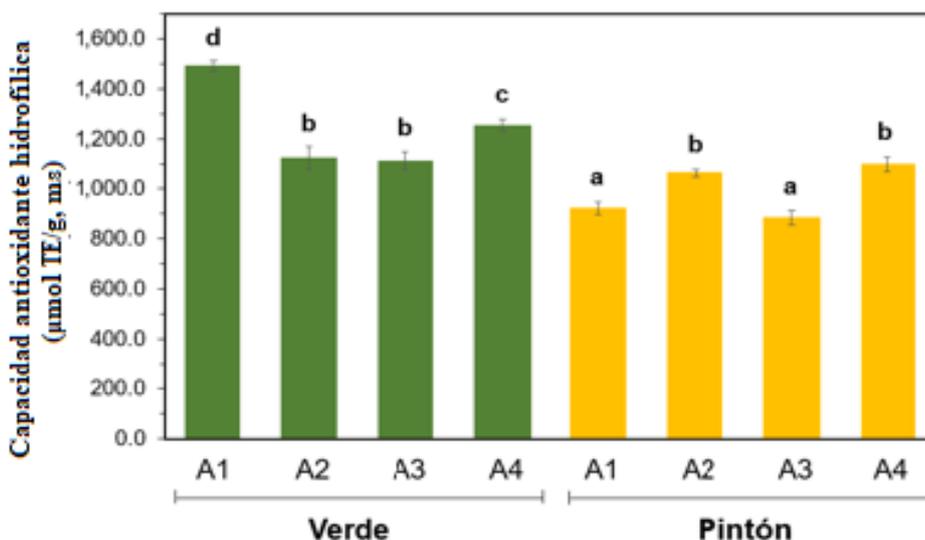


Figura 19: Contenido de capacidad antioxidante hidrofílica (ABTS) en dos estados fisiológicos de lúcuma, verde y pintón, provenientes de 4 árboles (A1, A2, A3 y A4).

Finalmente, se observó una buena correlación con respecto a los compuestos fenólicos totales para las capacidades antioxidantes hidrofílicas ABTS ($r = 0,8$) y ORAC ($r = 0,7$).

4.3 CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE

Los resultados de los ensayos de inhibición de α -glucosidasa y α -amilasa se muestran en los cuadros 7 y 8, respectivamente.

Cuadro 7: Inhibición de α -glucosidasa (%) para tres concentraciones de lúcumas (μg , ms)

LÚCUMA (μg , ms)	ESTADO VERDE				ESTADO PINTÓN			
	ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%)				ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%)			
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
10	98,8 \pm 0,1 ^a	98,0 \pm 0,4 ^a	95,7 \pm 2,2 ^b	98,1 \pm 0,2 ^a	70,1 \pm 0,7 ^f	83,1 \pm 0,1 ^c	80,8 \pm 0,7 ^d	77,8 \pm 0,2 ^e
5	90,9 \pm 1,8 ^a	75,5 \pm 1,0 ^c	55,2 \pm 3,6 ^d	82,7 \pm 1,7 ^b	32,6 \pm 0,9 ^e	33,8 \pm 0,3 ^e	31,6 \pm 1,2 ^e	32,8 \pm 0,5 ^e
3	53,0 \pm 0,8 ^a	40,5 \pm 0,2 ^c	34,3 \pm 0,7 ^d	47,2 \pm 1,4 ^b	16,9 \pm 0,7 ^e	17,6 \pm 0,1 ^e	18,3 \pm 0,6 ^e	17,2 \pm 0,4 ^e

* Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar (n=3), *Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Cuadro 8: Inhibición de α -amilasa (%) para tres concentraciones de lúcumas en μg (ms)

LÚCUMA (μg , ms)	ESTADO VERDE				ESTADO PINTÓN			
	ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%)				ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%)			
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
10	91,6 \pm 1,4 ^a	91,9 \pm 1,0 ^a	91,0 \pm 1,7 ^a	92,7 \pm 4,5 ^a	92,3 \pm 4,7 ^a	91,1 \pm 1,5 ^a	88,5 \pm 2,3 ^a	87,4 \pm 1,6 ^a
5	88,2 \pm 0,5 ^a	87,8 \pm 1,0 ^a	87,6 \pm 0,5 ^a	89,1 \pm 4,2 ^a	88,3 \pm 0,8 ^a	88,5 \pm 1,9 ^a	87,9 \pm 5,2 ^a	86,8 \pm 3,1 ^a
3	87,0 \pm 2,0 ^a	85,7 \pm 1,9 ^a	86,0 \pm 1,9 ^a	87,6 \pm 1,7 ^a	85,8 \pm 1,7 ^a	86,5 \pm 1,3 ^a	86,2 \pm 2,4 ^a	85,7 \pm 0,1 ^a

* Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar (n=3), *Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

De los cuadros, se aprecia que la lúcuma presenta una alta capacidad de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa a bajas concentraciones, lo cual es confirmado por Pinto *et al.* (2009) quienes al estudiar la posible inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa en varias frutas nativas peruanas, concluyeron que la lúcuma presentó una mayor inhibición de α -glucosidasa a bajas concentraciones (alrededor de 80 por ciento) con respecto a frutas como pacay, papayita arequipeña y aguamanto. Asimismo, Fuentealba *et al.* (2016) sostienen que la inhibición de α -glucosidasa para lúcuma del biotipo Leiva1 abarca un rango de 73 a 95,9 por ciento empleando una dosis de 40 μ g (ms). Mientras que en el cuadro 7, se observa que se alcanza un rango similar de 70,1 a 98,8 por ciento empleando solo una dosis de 10 μ g (ms). Por otro lado, con respecto a la inhibición de α -amilasa, se reportó un valor de $91,9 \pm 5,6$ por ciento empleando una dosis de 2 mg (ms) para lúcuma del biotipo Leiva1 en estado pintón (Fuentealba *et al.* 2016), mientras que al emplear una dosis menor de la lúcuma en estudio (10 μ g, ms) se obtuvo un valor de inhibición de 87,4 a 92,3 por ciento para el mismo estado de madurez (cuadro 8). Estos resultados indicarían una mejor inhibición de α -glucosidasa y α -amilasa por parte de la lúcuma del biotipo “Dos Marrón” estudiada en el presente estudio.

Fuentealba *et al.* (2016) y Tundis *et al.* (2013), sostienen que la actividad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa es significativamente influenciada por el estado de madurez del fruto. Es así que en el cuadro 7, se observa una menor capacidad inhibitoria de α -glucosidasa en el estado pintón como resultado de las diferencias significativas entre ambos estados de madurez ($p < 0,05$) (anexos 39, 41 y 43), lo cual no ocurre en el cuadro 7, donde no se evidenciaron diferencias significativas (en α -amilasa) entre los dos estados de madurez (anexos 32, 34 y 36).

Se encontró una buena correlación entre el contenido de fenólicos totales y la inhibición de α -glucosidasa ($r = 0,78$), la cual es similar a la reportada por Pinto *et al.* (2009) ($r = 0,79$). Esto nos llevaría a pensar que entonces debería existir una buena correlación entre la capacidad antioxidante y la inhibición de α -glucosidasa, sin embargo no se encontró correlación entre ambas características, suceso que también reportan Pinto *et al.* (2009).

Con respecto a α -amilasa, no se encontró una buena correlación entre el contenido de fenólicos totales y la inhibición de esta enzima ($r = 0,19$) debido a que como Pinto *et al.* (2009) mencionan la capacidad antioxidante no refleja la importancia de las estructuras

funcionales de los compuestos fenólicos en el contexto de inhibición de α -amilasa. Asimismo, Cheplick *et al.* (2007) también reportaron que al comparar la actividad inhibitoria de α -amilasa y la capacidad antioxidante en frambuesas no se encontró correlación alguna. Estos autores sugieren que probablemente la actividad de inhibición de α -amilasa se deba a determinados fenólicos específicos.

V. CONCLUSIONES

- El estado de madurez influye en el contenido de metabolitos secundarios, observándose que las lúcumas en el estado verde presentaron la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales y tocoferoles. Mientras que las lúcumas en estado pintón presentaron la mayor cantidad de carotenoides. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de fitosteroles entre los estados de madurez estudiados.
- Ambos estados de madurez presentaron un perfil de compuestos fenólicos, carotenoides, tocoferoles y fitosteroles similar diferenciándose a nivel de las concentraciones.
- Los compuestos fenólicos más importantes encontrados mediante UPLC-DAD en lúcumas en estado verde y pintón pertenecieron a las familias de los flavanoles y flavanonas.
- La capacidad antioxidante ABTS hidrofílica fue superior a la capacidad antioxidante lipofílica para los dos estados de madurez. No se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante lipofílica ABTS entre los estados de madurez estudiados.
- Existe una correlación positiva entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante hidrofílica medida mediante ABTS ($r = 0,8$) y ORAC ($r = 0,7$).
- Una correlación positiva se estableció entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la inhibición de α -glucosidasa ($r = 0,78$), pero no a nivel de compuestos fenólicos totales y la inhibición de α -amilasa.
- La actividad inhibitoria de α -glucosidasa estuvo significativamente influenciada por el estado de madurez.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio sobre los efectos del manejo post-cosecha sobre los metabolitos secundarios en diferentes biotipos de lúcuma.
- Caracterizar los metabolitos compuestos fenólicos y carotenoides de lúcuma empleando técnicas tales como la espectrometría de masas, para una identificación precisa de la naturaleza de estos compuestos y establecer relaciones estructura-función de los mismos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abushita, A; Hebshi, E; Daood, H; Biacs, P. 1997. Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chemistry* 60(2):207-212.
- Aina, JO. 1990. Physico-chemical changes in african mango (*Irvingiagabonensis*) during normal storage ripening. *Food Chemistry* 36(3):205-212.
- Alexandre, B; Gordon, A; Jungfer, E; Marx, F; Guilherme, J. 2012. Antioxidant capacity and phenolics of *Pouteria macrophylla* , an under-utilized fruit from Brazilian Amazon. *European Food Research and Technology* 234:761-768.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists, Estados Unidos). 2005. Official Methods of Analysis. 16th Ed. Maryland, Estados Unidos.
- Ali, H; Houghton, P; Soumyanath, A. 2006. Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes: with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107(3):449-455.
- Álvarez, R; Carvalho, C; Sierra, J; Lara, O; Cardona, D; Londoño, J. 2011. Citrus juice extraction systems: effect on chemical composition and antioxidant activity of clementine juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(3):774-781.
- Amaral, J; Alves, M; Seabra, R; Oliveira, B. 2005. Vitamin E composition of walnuts: a 3 years comparative study of different cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(13):5467-5472.
- Amorim-Carrilho, K; Cepeda, A; Fente, C; Regal, P. 2014. Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry* 56:49-73.

- Andre, C; Oufir, M; Guignard, C; Hoffmann, L; Hausman, J; Evers, D; Larondelle, Y. 2007. Antioxidant profiling of native Andean potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) reveals cultivars with high levels of β -carotene, α -tocopherol, chlorogenic acid, and petanin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(26):10839-10849.
- Arango, Y; Heise, K. 1998. Localisation of α -tocopherol synthesis in chromoplast envelope membranes of *Capsicum annuum* L. fruits *Journal of Experimental Botany* 49(324):1259-1262.
- Arnao, M; Cano, A; Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73(2):239-244.
- Belitz, H; Grosch, W. 1988. *Química de los alimentos: frutas, frutos secos y productos derivados*. 2 ed. Zaragoza, España, Acribia S.A. 843 p.
- Belitz, H; Grosch, W; Schieberle, P. 2009. *Food chemistry*. 4 ed. Nueva York, Estados Unidos, Springer. 1070 p.
- Bowen, P; Herbst-Espinosa, S; Hussain, E; Stacewicz-Sapuntzakis, M. 2002. Esterification does not impair lutein bioavailability in humans. *Journal of Nutrition* 132(12):3668-3673.
- Burri, B. 2013. Carotenoids: chemistry, sources and physiology. *In* Allen, LH; Prentice, A; Caballero, B(ed.). *Encyclopedia of human nutrition*. 3 ed. Nueva York, Estados Unidos, Academic Press. p. 283-291.
- Bréhélin, C; Kessler, F; van Wijk, K. 2007. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in Plant Science* 12(6):260–266.
- Carvalho, E; Fraser, P; Martens, S. 2013. Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food Chemistry* 139:744-752.
- Castañeda, B; Ramos, E; Ibáñez, L. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico* 8(1):56-72.

- Cazzonelli, C; Pogson, B. 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 15(5):266-274.
- Cheplick, S; Kwon, Y; Bhowmik, P; Shetty, K. 2007. Clonal variation in raspberry fruit phenolics and relevance for diabetes and hypertension management. *Journal of Food Biochemistry* 31(5):656-679.
- Cheynier, V; Comte, G; Davies, K; Lattanzio, V; Martens, S. 2013. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 72:1-20.
- Chirinos, R; Campos, D; Costa, N; Arbizu, C; Pedreschi, R; Larondelle, Y. 2008a. Phenolic profiles of Andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers : identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry* 106(3):1285-1298.
- Chirinos, R; Campos, D; Warnier, M; Pedreschi, R; Larondelle, Y. 2008b. Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological *in vitro* assays. *Food Chemistry* 111(1):98-105.
- Chirinos, R; Betalleluz-Pallardel, I; Huamán, A; Arbizu, C; Pedreschi, R; Campos, D. 2009. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry* 113(4):1243-1251.
- Chun, J; Lee, J; Ye, L; Exler, J; Eitenmiller, R. 2006. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:196-204.
- Craft, B; Kerrihard, AL; Amarowicz, R; Pegg, R. 2012. Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11(2):148-173.

- Cuttriss, A; Cazzonelli, C; Wurtzel, E; Pogson, B. 2011. Carotenoids. *In* Rébeillé, F; Douce, R (ed.). *Advances in botanical research*. Londres, Reino Unido, Academic Press. p. 1-36.
- Da Costa, P; Ballus, C; Teixeira-Filho, J; Teixeira-Godoy, H. 2010. Phytoesterol and tocopherol content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Research International* 43(6):1603-1606.
- Damodaran, S; Parkin, K; Fennema, O. 2008. *Química de los alimentos*. 3 ed. Zaragoza, España, Acribia S.A. 1166 p.
- Decker, E. 1995. The role of phenolic, conjugated linoleic acid, carnosine and pyrroloquinoline as nonessential dietary antioxidants. *Nutrition Reviews* 53(3):49-58.
- De Lanerolle, M; Pryadarshani, B; Sumithraarachchi, D; Janz, E. 2008. The carotenoids of *Pouteria campechiana*. *Journal of the National Science Foundation Sri Lanka* 36(1):95-98.
- Dini, I. 2011. Flavonoid glycosides from *Pouteria obovata* (R. Br.) fruit flour. *Food Chemistry* 124(3):884-888.
- DellaPenna, D. 2005. A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *Journal of Plant Physiology* 162(7):729-737.
- Demmig-Adams, B; Gilmore, A; Adams, W. 1996. Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB Journal* 10(4):403-412.
- Duchateau, G; Bauer-Plank, C; Louter, A; van der Ham, M; Boerna, J; van Rooijen, J. 2002. Fast and accurate method for total 4-desmethyl sterol (s) content in spreads, fat-blends, and raw materials. *Journal of the American Oil Chemists Society* 79(3):273-278.

- Erazo, S; Escobar, A; Olaeta, J; Undurraga, P. 1999. Determinación proximal y carotenoides totales de frutos de seis selecciones de lúcuma (*Pouterialucuma*). Revista Alimentos 24(1):67-75.
- Eskin, N; Shahidi, F. 2013. Fruits and vegetables. *In* Biochemistry of foods. 3 ed. Londres, Reino Unido, Academic Press. p. 49-126.
- Fuentealba, C; Gálvez, L; Cobos, A; Olaeta, J; Defilippi, B; Chirinos, R; Campos, D; Pedreschi, R. 2016. Characterization of main primary and secondary metabolites and *in vitro* antioxidant and antihyperglycemic properties in the mesocarp of three biotypes of *Pouteria lucuma*. Food Chemistry 190:403-411.
- García, D. 2016. Caracterización de algunos metabolitos primarios y secundarios en dos variedades comerciales de lúcuma (*Pouteria lucuma*). Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM. 134 p.
- Gimeno, E. 2004. Compuestos fenólicos: un análisis de sus beneficios para la salud. Revista de la Oficina de Farmacia Ámbito Farmacéutico 23(6):80-84.
- Goffman, F; Thies, W; Velasco, L. 1999. Chemotaxonomic value of tocopherols in *Brassicaceae*. Phytochemistry 50(5):793-798.
- Gomes, L; Paulo, E; Eberlin, M; Pastore, G; Hai, R. 2013. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. Food Research International 53(1):417-425.
- Gordon, A; Jungfer, E; Alexandre, B; Guilherme, J; Marx, F. 2011. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(14):7688-7699.
- Granato, D; Santos, J; Maciel, L; Nunes, D. 2016. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. Trends in Analytical Chemistry 80:266-279.

- Grusak, M; DellaPenna, D. 1999. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:133-161.
- Hakansson, R; Jagerstad, M. 1990. The effect of thermal inactivation of lipoxygenase on the stability of vitamin E in wheat. *Journal of Cereal Science* 12(2):177-186.
- Han, J; Yang, Y; Feng, M. 2008. Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. *Biomedical and Environmental Sciences* 21(16):449-453.
- Helyes, L; Lugasi, A. 2006. Formation of certain compounds having technological and nutritinal importance in tomato fruits during maturation. *Acta Alimentaria* 35(2):183-93.
- Hernández, R; Sandoval, G; Estarrón, M; Cardador, A. 2011. Cuantificación de fitoesteroles en residuos industriales derivados de la molienda húmeda de maíz. *CyTA Journal of Food* 9(2):102-108.
- Hornero-Méndez, D; Mínguez-Mosquera, M. 2012. Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplast of *Capsicum annuum* ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(5):1617-1622.
- Hounsome, N; Hounsome, B; Tomos, D; Edward-Jones, G. 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science* 73(4):48-65.
- Howitt, C; Pogson, B. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell & Environment* 29(3):435-445.
- Hung, H; Joshipura, K; Jiang, R; Hu, F; Hunter, D; Smith-Warner, S; Colditz, G; Rosner, B; Spiegelman, D; Willett, W. 2004. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute* 96(21):1577-1584.

- Illanes, A; Álvarez, L; Álvaro, G. 2008. Esterificación quimioselectiva de fitosteroles de madera mediante lipasas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(1):17-35.
- Inbaraj, S; Chien, J; Chen, B. 2006. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Chromatography A* 1102:193-199.
- Jomova, K; Valko, M. 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry* 70:102-110.
- Jonker, D; Van der Hoek, G; Glatz, J. 1985. Combined determination of free, esterified and glycosylated plant sterols in foods. *Nutrition Reports International* 32:943-951.
- Júarez-Reyes, K; Brindis, F; Medina-Campos, O; Pedraza-Chaverri, J; Bye, R; Linares, E; Mata, R. 2015. Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of Ethnopharmacology* 161:36-45.
- Justesen, U; Knuthsen, P; Leth, T. 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 799:101-110.
- Kader, A; Yahia, E. 2011. Postharvest biology of tropical and subtropical fruits. *In* Yahia, E; Gutiérrez-Orozco, F (eds.). *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: cocona to mango*. 1 ed. Oxford, Inglaterra, Woodhead Publishing. p. 79-111.
- Kamal-Eldin, A; Appelqvist, L. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31(7):671-701.
- Kamal-Eldin, A; Budilarto, E. 2015. Tocopherols and tocotrienols as antioxidants for food preservation. *In* Shahidi, F (ed.). *Handbook of antioxidants for food preservation*. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. p. 141-159.

- Kao, T; Loh, C; Inbaraj, S; Chen, B. 2012. Determination of carotenoids in *Taraxacum formosanum* by HPLC-DAD-APCI-MS and preparation by column chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 66:144-153.
- Kruk, J; Strzalka, K. 1995. Occurrence and function of α -tocopherol quinone in plants. *Journal of Plants Physiology* 145(4):405-409.
- Kwon, Y; Vатtem, D; Shetty, K. 2006. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 15(1):107–118.
- Lagarda, M; García-Llatas, G; Farré, R. 2006. Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(5):1486-1496.
- Lindley, M. 1998. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology* 9(8):336-40.
- Mahattanatawee, K. 2006. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(19):7355-7363.
- Martínez-Valverde, I; Periago, M; Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50(1):5-18.
- Méne-Saffrané, L; DellaPenna, D. 2010. Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(5):301-309.
- Moo-Huchin, V; Estrada-Mota, I; Estrada-León, R; Cuevas-Glory, L; Ortiz-Vázquez, E; Vargas-Vargas, M; Betancur-Ancona, D; Sauri-Duch, E. 2014. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry* 152(1):508-515.
- Moreau, R; Whitaker, B; Hicks, K. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research* 41(6):457-500.

- Munné-Bosch, S; Alegre, L. 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Review in Plant Sciences* 21(1):31-57.
- Muñoz, A; Alvarado, U; Encina, Z. 2011. Fitoesteroles y fitoestanoles: propiedades saludables. *Revista Horizonte Médico* 11(2):93-100.
- Murillo, E; Giuffrida, D; Menchaca, D; Dugo, P; Torre, G; Meléndez-Martínez, AJ; Mondello, L. 2013. Native carotenoids composition of some tropical fruits. *Food Chemistry* 140(4):825-36.
- Nes, W. 2011. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chemical Reviews* 111(10):6423-6451.
- Normén, L; Johnsson, M; Andersson, H; van Gameren, Y; Dutta, P. 1999. Plant sterols in vegetables and fruits commonly consumed in Sweden. *European Journal of Nutrition* 88(2):84-89.
- Normén, A; Brants, H; Voorrips, L. 2001. Plant sterol intake and colorectal cancer risk in the Netherlands cohort study on diet and cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74(1):141-148.
- Ohrvall, M; Sundlöf, G; Vessby, B. 1996. Gamma, but not alpha, tocopherol levels in serum are reduced in coronary heart disease patients. *Journal of Internal Medicine* 239(2):111-117.
- Ou, B; Hampsch-Woodill, M; Prior, R. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal Agriculture Food Chemistry* 49(10):4619-4626.
- Paladino, S. 2006. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*vitis vinífera* L.). Tesis Mg.Sc. Mendoza, Argentina, Universidad Nacional de Cuyo. 100 p.

- Parejo, I; Viladomat, F; Bastida, J; Codina, C. 2004. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. *Analytica Chimica Acta* 512(2):271-280.
- Pinto, M; Galvez, L; Apostolidis, E; Lajolo, F; Genovese, M; Shetty, K. 2009. Evaluation of antihyperglycemia and antihypertension potencial of native peruvian fruits using *in vitro* models. *Journal of Medical Food* 12(2):278-291.
- Pokorny, J. 2001. *Antioxidantes de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza, España, Editorial Acribia S.A. 364 p.
- Pratt, D. 1992. Natural antioxidant from plantmaterial. *In* Huang, MT; Ho, CT; Li, CY (eds.). *Phenolic compounds in food and their effects on health*. Washington, Estados Unidos, ACS Symposium Series. v. 2, p. 8-34.
- Prior, R; Wu, X; Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10):4290-4302.
- Puntarulo, S. 1993. Effect of oxidative stress during inhibition of soybean embryonic axes. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences* 102:279-286.
- Rani, A; Singh, K; Ahuja, PS; Kumar, S. 2012. Molecular regulation of catechins biosynthesis in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Gene* 495(2):205-210.
- Re, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A; Yang, M; Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237.
- Rice-Evans, C; Miller, N; Paganga, G. 1995. Structure-antioxidant activity relationships flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20(7):933-956.

- Robards, K; Prenzler, P; Tucker, G; Swatsitang, P; Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66(4): 401-436.
- Robards, K. 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1000(1):657-691.
- Roca, M; Mínguez-Mosquera, M. 2001. Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(2):832-839.
- Rodríguez-Amaya, D. 2010. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids. *Journal of Food Composition and Analysis* 23(7):726-740.
- Rodríguez-Saona, L; Wrolstad, R. 2001. Extraction, isolation and purification of anthocyanins. *In* Wrolstad, RE (ed.). *Current protocols in food analytical chemistry*. Nueva York, Estados Unidos. p. 1-11.
- Roleira, F; Tavares-da-Silva, E; Varela, C; Costa, S; Silva, T; Garrida, J; Borges, F. 2015. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chemistry* 183:235-258.
- Romero, J; Vásquez, E. 2012. Fitoesteroles y Fitoestanoles: eficaces para disminución de lípidos plasmáticos. *Revista CES Salud Pública* 3(2):165-173.
- Sajilata, M; Singhal, R; Kamat, M. 2008. Pigment zeaxanthin: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7(1):29-49.
- Sayago, A; Marín, M; Aparicio, R; Morales, M. 2007. Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceites* 58(1):74-86.
- Schlesier, K; Harwat, M; Bohm, V; Bitsch, R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research* 36(2):177-187.

- Silva, C; Simeoni, L; Silveira, D. 2009. Genus *Pouteria*: chemistry and biological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19(2):501-509.
- Singleton, L; Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdeic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158.
- Skibsted, L. 2012. Carotenoids in antioxidant networks: colorants or radical scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(10):2409-2417.
- Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist Journal* 125(1):27-58.
- Stone, W; Papas, A. 2003. Tocopherols, tocotrienols and vitamin E. *In* Gunstone, F(ed.). *Lipids for functional foods and nutraceuticals*. 3 ed. Londres, Reino Unido, The Oily Press. p. 53-72.
- Thaipong, U; Boonprakob, K; Crosby, L; Cisneros-Zevallos, D; Byrne, E. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (6):669-675.
- Toivo, J; Phillips, K; Maija-Lampi, A; Piironen, V. 2001. Determination of sterols in food: recovery of free, esterified, and glycosidic sterols. *Journal of Food Composition and Analysis* 14(6):631-643.
- Traber, M. 1996. Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annual Revision of Nutrition* 16:321-47.
- Tránsito-López, M. 2006. Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante: características, administración y efectos adversos. *Revista de la Oficina de Farmacia Ámbito Farmacéutico* 25(5):82-88.

- Tripoli, E; La Guardia, M; Giammanco, S; Di Majo, D; Giammanco, M. 2007. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry* 104(2):466-479.
- Tsao, R; Deng, Z. 2004. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of chromatography B* 812(1):85-99.
- Tundis, R; Menichini, F; Bonesi, M; Conforti, F; Statti, G. 2013. Antioxidant and hypoglycemic activities and their relationship to phytochemicals in *Capsicum annuum* cultivars during fruit development. *Food Science and Technology* 53(1):370-377.
- Valenzuela, A; Ronco, A. 2004. Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Revista Chilena de Nutrición* 21(1):161-169.
- Velioglu, Y; Mazza, G; Gao, L; Oomah, B. 1998. Antioxidant activity and total phenolic in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10):4113-4117.
- Vilela, C; Santos, S; Oliveira, L; Camacho, J; Cordeiro, N; Freire, C; Silvestre, A. 2013. The ripe pulp of *Mangifera indica* L.: a rich source of phytosterols and other lipophilic phytochemicals. *Food Research International* 54(2):1535-1540.
- Vilela, C; Santos, S; Villaverde, J; Oliveira, L; Nunes, A; Cordeiro, N; Freire, C; Silvestre, A. 2014. Lipophilic phytochemicals from banana fruits of several *Musa* species. *Food Chemistry* 162:247-252.
- Villanueva, C. 2002. Cultivo comercial de la lúcuma en Perú y el Mercado internacional. Lima, Perú, Editorial Schmidt.
- White, P. 2002. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany* 53(377):1995-2000.
- Wild, S; Roglic, G; Green, A; Sicree, R; King, H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27(5):1047-1053.

- Wildman, R. 2000. Handbook of nutraceutical and functional food. 3 ed. Londres, Reino Unido, CRC Press. 568 p.
- Worthington, V. 1993. Enzyme manual: enzymes and related. New Jersey, Estados Unidos, Worthington Biochemical Corporation.
- Yahia, E; Gutiérrez-Orozco, F. 2011. Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: cocona to mango. 1 ed. Oxford, Inglaterra, Woodhead Publishing. v. 3, 584 p.
- Zapata, S; Piedrahita, A; Rojano, B. 2014. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic content of fruits and vegetables from Colombia. *Perspectivas de Nutrición Humana* 16(1):25-36.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: CONTENIDO DE MATERIA SECA (MS) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN

	MUESTRA		% MS	
1	Verde	A1	R1	96,78
2		A1	R2	96,74
3		A1	R3	96,95
4		A2	R1	97,35
5		A2	R2	96,70
6		A2	R3	97,65
7		A3	R1	96,55
8		A3	R2	96,69
9		A3	R3	96,42
10		A4	R1	96,92
11		A4	R2	97,55
12		A4	R3	97,11
13	Pintón	A1	R1	96,74
14		A1	R2	96,37
15		A1	R3	96,65
16		A2	R1	98,78
17		A2	R2	98,81
18		A2	R3	98,89
19		A3	R1	97,78
20		A3	R2	97,60
21		A3	R3	97,97
22		A4	R1	98,87
23		A4	R2	99,09
24		A4	R3	99,04

A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, R1= repetición 1, R2= repetición 2, R3= repetición 3

ANEXO 2: CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN

	MUESTRA		mg AGE/g MS	
1	Verde	A1	R1	93,8
2		A1	R2	103,6
3		A1	R3	104,9
4		A2	R1	79,0
5		A2	R2	85,8
6		A2	R3	95,9
7		A3	R1	70,4
8		A3	R2	67,2
9		A3	R3	63,5
10		A4	R1	70,5
11		A4	R2	82,8
12		A4	R3	82,2
13	Pintón	A1	R1	66,8
14		A1	R2	73,8
15		A1	R3	70,4
16		A2	R1	67,0
17		A2	R2	77,3
18		A2	R3	67,0
19		A3	R1	67,9
20		A3	R2	67,4
21		A3	R3	69,7
22		A4	R1	64,4
23		A4	R2	72,0
24		A4	R3	67,6

A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, R1= repetición 1, R2= repetición 2, R3= repetición 3

ANEXO 3: CONTENIDO DE FLAVANOLES Y FLAVANONAS EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN

	MUESTRA		FLAVANOLES (CUANTIFICADO COMO CATEQUINA mg/g MS)	FLAVANONA (CUANTIFICADO COMO ERIODICTIOL mg/g MS)	
1	Verde	A1	R1	1,8	0,9
2		A1	R2	1,2	0,9
3		A1	R3	1,5	0,9
4		A2	R1	1,3	1,0
5		A2	R2	1,2	1,0
6		A2	R3	1,2	1,0
7		A3	R1	1,3	1,0
8		A3	R2	1,1	1,0
9		A3	R3	1,2	1,0
10		A4	R1	1,8	1,1
11		A4	R2	1,7	1,1
12		A4	R3	1,7	1,1
13	Pintón	A1	R1	1,2	0,7
14		A1	R2	1,0	0,9
15		A1	R3	1,1	0,8
16		A2	R1	1,01	0,9
17		A2	R2	0,9	1,0
18		A2	R3	1,0	0,9
19		A3	R1	1,1	0,8
20		A3	R2	1,1	0,8
21		A3	R3	1,1	0,8
22		A4	R1	1,0	0,7
23		A4	R2	1,1	0,7
24		A4	R3	1,0	0,7

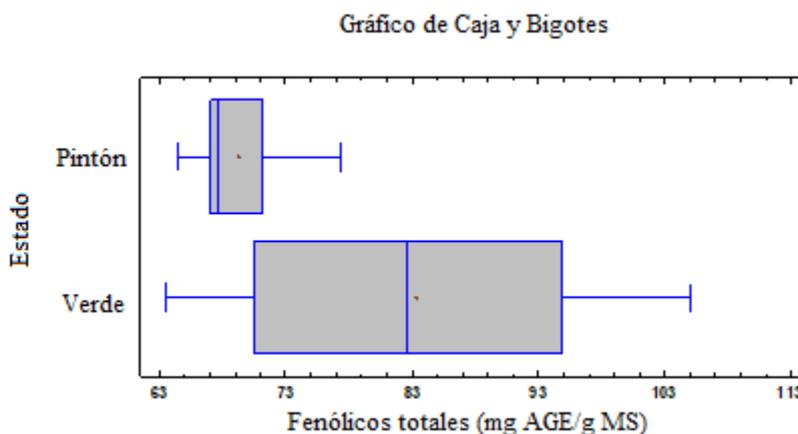
A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, R1= repetición 1, R2= repetición 2, R3= repetición 3

ANEXO 4: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba W de Mann-Whitney (comparación de medianas)

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,009344	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)



ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

TABLA ANOVA

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
Entre grupos	3014,32	7	430,617	14,74	0,0000
Intra grupos	467,38	16	29,2113		
Total (Corr.)	3481,7	23			

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

Prueba de Múltiples Rangos (Tukey)

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ÁRBOL	CASOS	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
A3V	3	67,0363	A
A4P	3	68,0257	A
A3P	3	68,3253	A
A1P	3	70,3277	A
A2P	3	70,4517	A
A4V	3	78,5257	AB
A2V	3	86,9243	BC
A1V	3	100,775	C

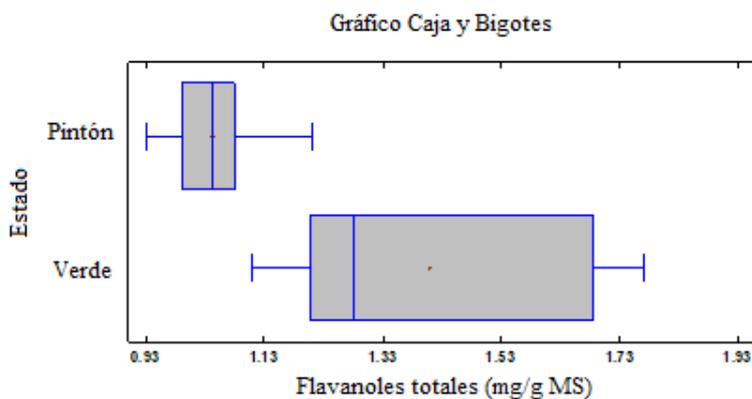
A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, P= pintón, V= verde

ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE FLAVANOLES TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba W de Mann-Whitney (comparación de medianas)

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,0000749769	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)



ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE FLAVANOLES TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba de Kruskal-Wallis

ÁRBOL	TAMAÑO MUESTRA	RANGO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGÉNEOS
AP2	3	2,16667	D
AP4	3	6,16667	DC
AP3	3	8,83333	DC
AP1	3	9,83333	DC
AV3	3	15,33333	C
AV2	3	16,0	C
AV1	3	19,66667	B
AV4	3	22,0	A

Estadístico = 19,8117; Valor-P = 0,00599115; * Diferencia significativa ($p < 0,05$)

ANEXO 8: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE FLAVANONAS TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba T

Comparación de medias

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,000152299	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

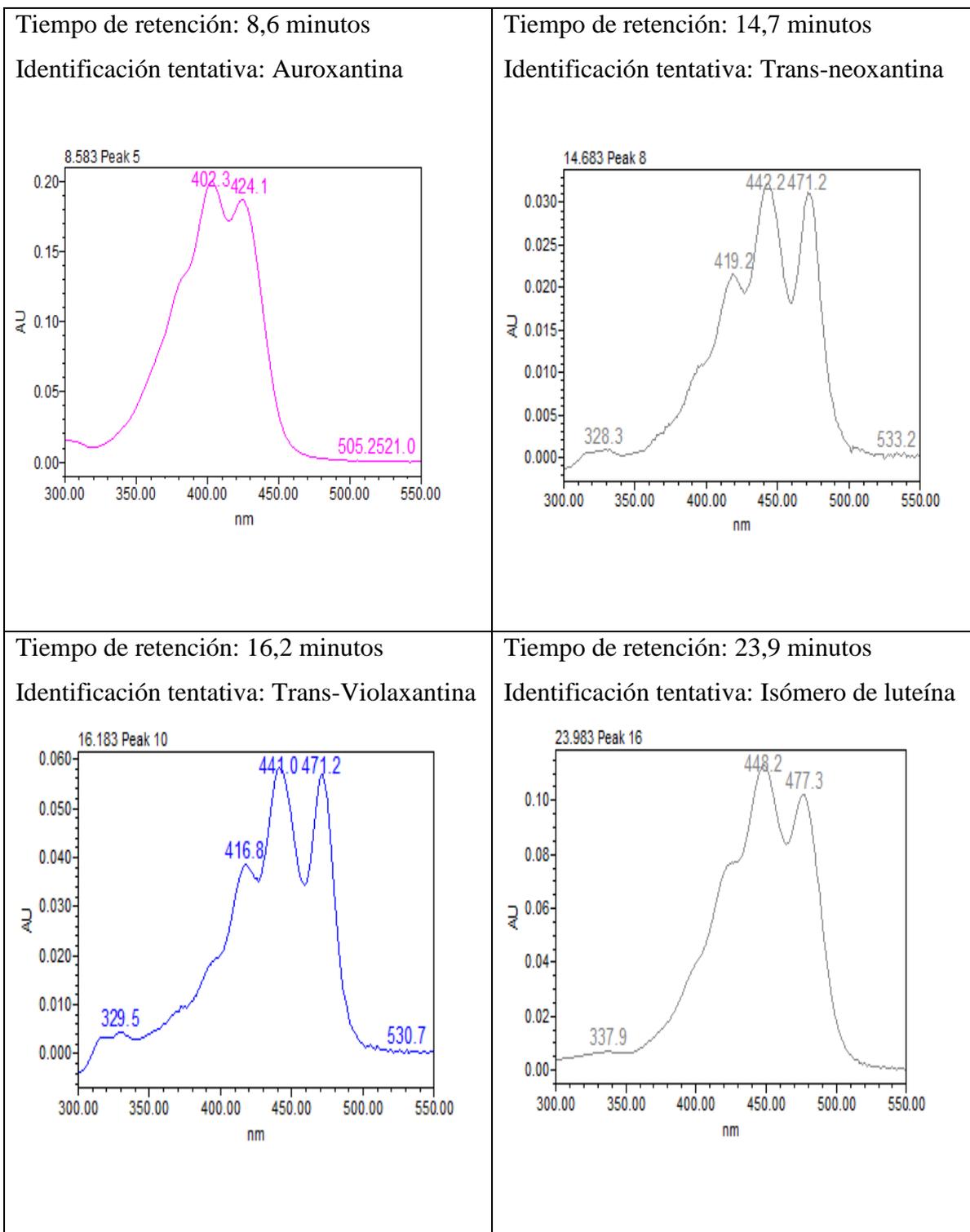
ANEXO 9: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE FLAVANONAS TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba de Kruskal-Wallis

ÁRBOL	TAMAÑO MUESTRA	RANGO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGÉNEOS
AP4	3	3,0	E
AP3	3	6,66667	ED
AP1	3	7,0	ED
AV1	3	11,0	DC
AP2	3	13,3333	C
AV3	3	16,0	CB
AV2	3	20,0	BA
AV4	3	23,0	A

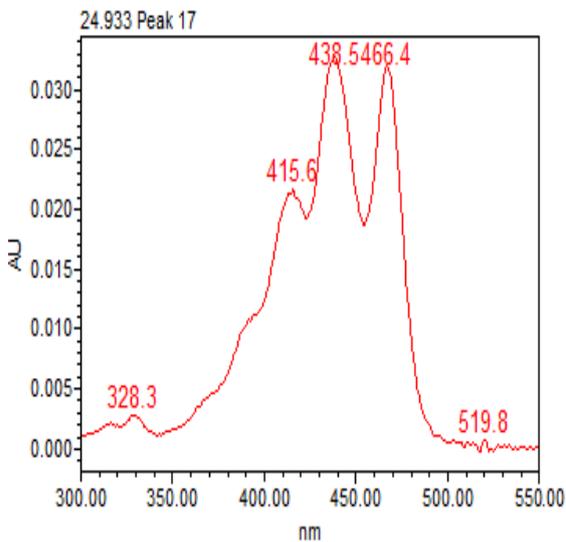
Estadístico = 20,2085; Valor-P = 0,00513656; * Diferencia significativa ($p < 0,05$)

ANEXO 10: ESPECTROS ULTRAVIOLETA-VISIBLE (450 nm) DE LOS CAROTENOIDES IDENTIFICADOS EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN

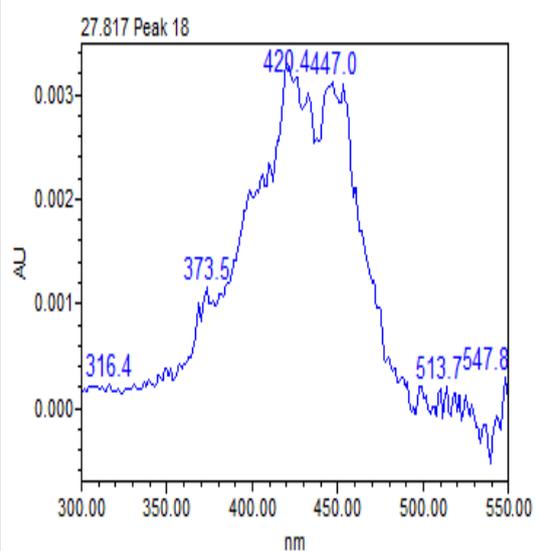


«continuación»

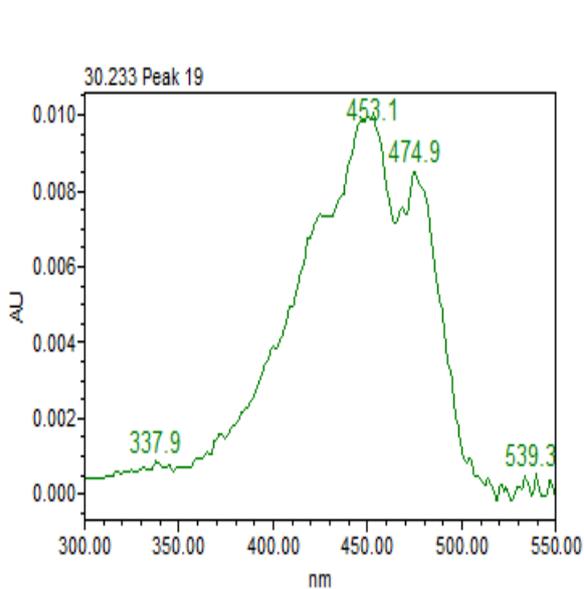
Tiempo de retención: 24,9 minutos
Identificación tentativa: Cis-violaxantina



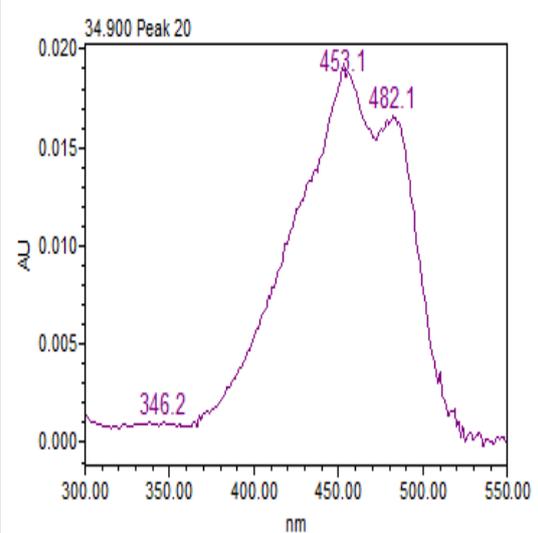
Tiempo de retención: 27,8 minutos
Identificación tentativa: No identificado



Tiempo de retención: 30,2 minutos
Identificación tentativa: No identificado

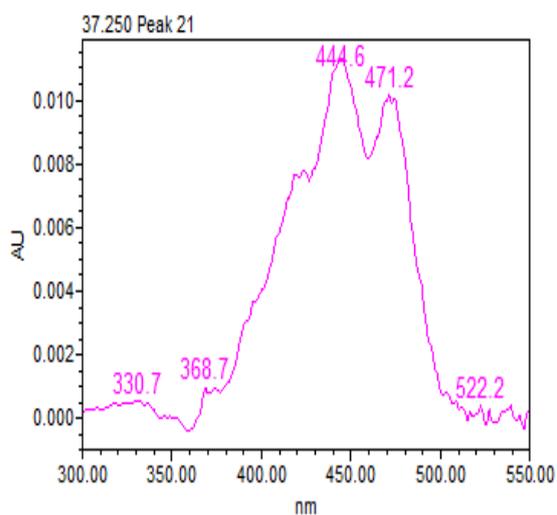


Tiempo de retención: 34,9 minutos
Identificación tentativa: Trans- Zeaxantina

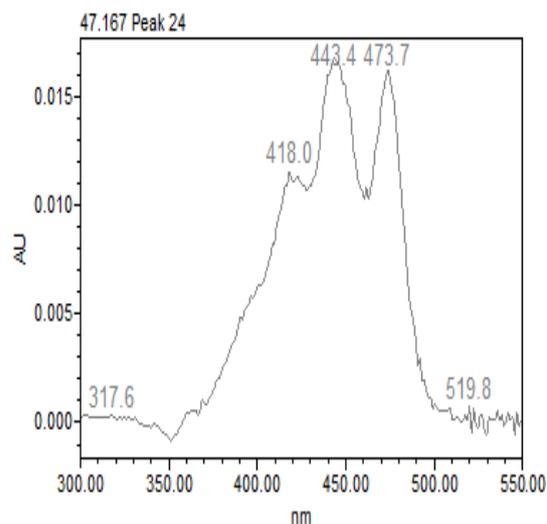


«continuación»

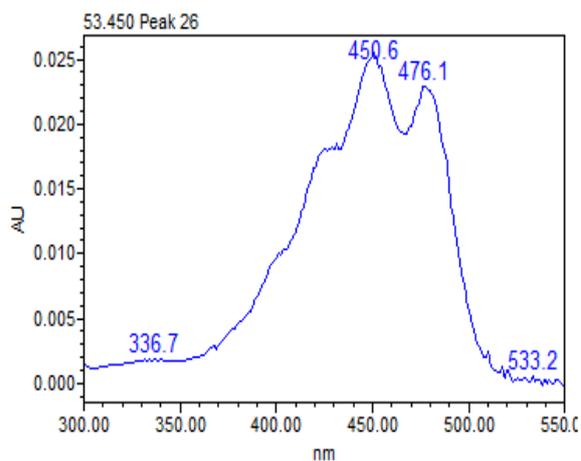
Tiempo de retención: 37,3 minutos
Identificación tentativa: 9- ó 9'-*cis*-luteína



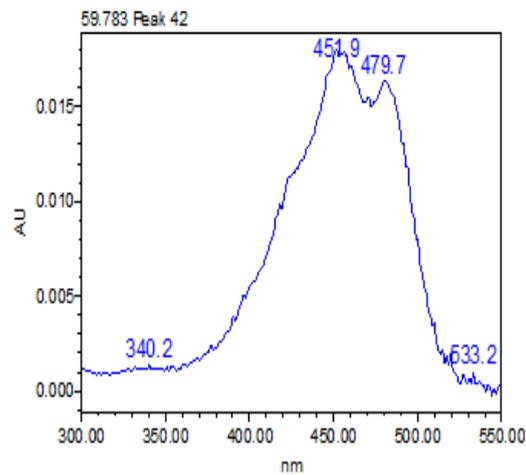
Tiempo de retención: 47,2 minutos
Identificación tentativa: 9-ó 9'-*cis*- β -criptoxantina



Tiempo de retención: 53,5 minutos
Identificación tentativa: 9- ó 9'-*cis*- β -caroteno



Tiempo de retención: 59,7 minutos
Identificación tentativa: *trans*- β -caroteno



ANEXO 11. TIEMPOS DE RETENCIÓN (min) Y λ Máximo (nm) DE LOS CAROTENOIDES IDENTIFICADOS EN *TARAXACUM FORMOSANUM* (HIERBA TRADICIONAL CHINA) POR COLUMNA CROMATOGRÁFICA YMC C30 (250 mm x 4,6 mm I.D, TAMAÑO DE PARTÍCULA 5 μ m)

Compound	t_R (min)	λ (nm, inline) ^a	λ (nm, reported)
Auroxanthin	6.99	328, 382, 398, 422	338, 374, 398, 422 ^c
Auroxanthin	7.44	338, 380, 398, 422	338, 374, 398, 422 ^c
Auroxanthin	8.87	328, 382, 400, 422	338, 374, 398, 422 ^c
9-or 9'-cis-Violaxanthin	11.27	336, 412, 438, 460	326, 412, 436, 464 ^b
13-or 13'-cis-neoxanthin	13.43	328, 414, 434, 460	328, 412, 434, 460 ^d
Neochrome	14.98	328, 404, 428, 456	332, 398, 422, 446 ^c
All-trans-neoxanthin	16.80	328, 416, 440, 468	418, 440, 468 ^d
All-trans-violaxanthin	18.72	328, 416, 440, 468	416, 440, 468 ^b
9-or 9'-cis-neoxanthin	20.74	328, 414, 436, 464	326, 414, 436, 464 ^d
Luteoxanthin	22.67	330, 402, 422, 448	399, 423, 447 ^e
cis-Violaxanthin	23.44	328, 418, 440, 468	328, 414, 438, 466 ^f
Violaxanthin	24.48	330, 422, 440, 470	-
Antheraxanthin	26.40	328, 418, 444, 472	422, 442, 470 ⁱ
9-or 9'-cis-Violaxanthin	27.56	330, 414, 438, 464	326, 412, 436, 464 ^b
Luteoxanthin	27.75	330, 414, 438, 464	399, 423, 447 ^e
13-or 13'-cis-Lutein	29.56	330, 412, 440, 466	332, 415, 440, 464 ^c
13-or 13'-cis-Lutein	30.47	334, 414, 440, 464	332, 415, 440, 464 ^c
All-trans-lutein	32.12	334, 420, 446, 474	332, 423, 446, 470 ^c
All-trans-zeaxanthin	36.21	342, 428, 454, 480	344, 427, 452, 476 ^c
9-or 9'-cis-Lutein	38.10	330, 420, 440, 470	332, 416, 440, 470 ^c
9-or 9'-cis-Lutein	39.64	330, 420, 440, 470	332, 416, 440, 470 ^c
All-trans-canthaxanthin	40.38	480	-
All-trans- β -cryptoxanthin	45.52	342, 428, 450, 482	450, 476 ^j
9-or 9'-cis- β -Cryptoxanthin	46.99	320, 420, 446, 478	342, 446, 470 ⁱ
9-or 9'-cis- β -Cryptoxanthin	48.11	320, 418, 438, 468	342, 446, 470 ⁱ
15-or 15'-cis- β -Carotene	52.60	342, 424, 442, 472	421, 445, 474 ^k
9-or 9'-cis- β -Carotene	53.44	336, 424, 454, 476	344, 422, 452, 476 ^c
15-or 15'-cis- β -Carotene	54.60	340, 422, 446, 472	421, 445, 474 ^k
13-or 13'-cis- β -Carotene	55.49	342, 424, 446, 474	422, 446, 476 ^k
9-or 9'-cis- β -Carotene	59.79	332, 422, 446, 470	342, 424, 446, 472 ^f
All-trans- β -carotene	62.25	454, 478	426, 456, 480 ^h
9-or 9'-cis- β -Carotene	64.36	348, 450, 474	344, 428, 452, 476 ^c

c:Fase móvil de metanol-acetonitrilo-agua (84:14:2, v/v/v), Diclorometano (100:0, v/v a 45:55, v/v) fue usado por Inbaraj *et al.* (2006).

FUENTE: Tomado de Kao *et al.* 2012

ANEXO 12: RELACIÓN DE CAROTENOIDES EXISTENTES EN LAS FRUTAS

Nº	Carotenoide
1	Fitoeno
2	Fitoflueno
3	ζ-caroteno
4	Licopeno
5	α-caroteno
6	β-caroteno
7	β-zeacaroteno
8	licoxantina
9	α-criptoxantina
10	B-criptoxantina
11	B-caroteno-5,6-epoxido
12	Mutacromo
13	Luteina
14	Zeaxantina
15	Criptoflavina
16	B-caroteno-5,6,5,6-diepoxido
17	Anteraxantina
18	Luteina-5,6-epoxido
19	Mutatoxantina
20	Luteina-5-8-epoxido
21	Criptoxantina-5-8,5,8-diepoxido
22	Violaxantina
23	Luteoxantina
24	Auroxantina
25	Neoxantina
26	Capsantina

FUENTE: Tomado de Belitz y Grosch 1988

**ANEXO 13: CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO
“DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN**

	MUESTRA		mg DE β - CAROTENO /100g MS	
1	Verde	A1	R1	7,79
2		A1	R2	7,49
3		A1	R3	7,39
4		A2	R1	8,04
5		A2	R2	8,28
6		A2	R3	8,35
7		A3	R1	8,98
8		A3	R2	9,57
9		A3	R3	9,24
10		A4	R1	7,79
11		A4	R2	8,35
12		A4	R3	8,00
13	Pintón	A1	R1	15,33
14		A1	R2	15,02
15		A1	R3	15,40
16		A2	R1	13,34
17		A2	R2	12,87
18		A2	R3	13,27
19		A3	R1	12,92
20		A3	R2	13,36
21		A3	R3	12,64
22		A4	R1	17,02
23		A4	R2	18,15
24		A4	R3	17,96

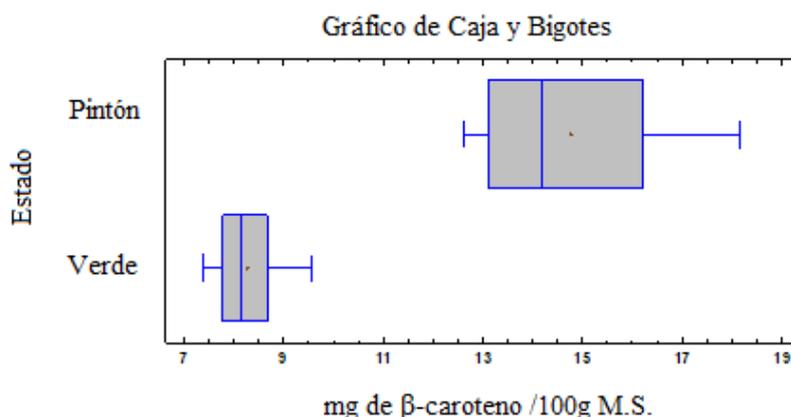
A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, R1= repetición 1, R2= repetición 2, R3= repetición 3

ANEXO 14: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba W de Mann-Whitney (comparación de medianas)

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,0000358966	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)



ANEXO 15: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Tabla ANOVA

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
Entre grupos	301,896	7	43,128	364,46	0,0000
Intra grupos	1,89333	16	0,118333		
Total (Corr.)	303,79	23			

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

Pruebas de Múltiple Rangos (Tukey)

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ÁRBOL	CASOS	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
AV1	3	7,56667	A
AV4	3	8,06667	A
AV2	3	8,23333	A
AV3	3	9,26667	B
AP3	3	12,9667	C
AP2	3	13,1667	C
AP1	3	15,2333	D
AP4	3	17,7333	E

A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, P= pintón, V= verde

**ANEXO 16: CONTENIDO DE TOCOFEROLES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO
“DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN**

	MUESTRA		mg α - TOCOFEROL/100g MS	mg γ - TOCOFEROL/100g MS	
1	Verde	A1	R1	12,1	1,35
2		A1	R2	12,4	1,33
3		A1	R3	12,8	1,34
4		A2	R1	9,5	0,37
5		A2	R2	9,3	0,35
6		A2	R3	9,1	0,36
7		A3	R1	9,3	0,29
8		A3	R2	9,3	0,28
9		A3	R3	9,2	0,29
10		A4	R1	11,6	0,78
11		A4	R2	11,2	0,70
12		A4	R3	10,8	0,74
13	Pintón	A1	R1	4,1	0,10
14		A1	R2	4,5	0,14
15		A1	R3	4,3	0,12
16		A2	R1	6,2	0,18
17		A2	R2	6,2	0,18
18		A2	R3	6,3	0,18
19		A3	R1	5,8	0,16
20		A3	R2	6,0	0,15
21		A3	R3	5,6	0,16
22		A4	R1	4,1	0,14
23		A4	R2	4,1	0,13
24		A4	R3	4,2	0,14

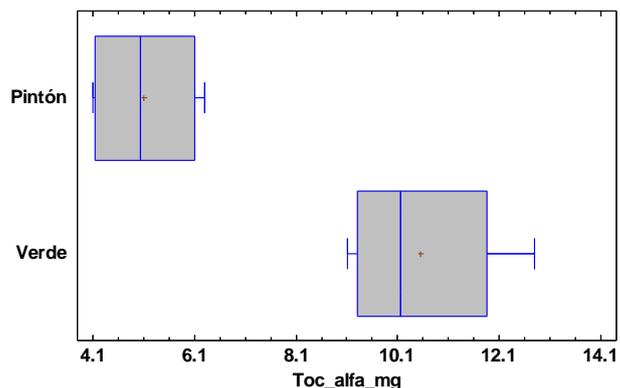
A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, R1= repetición 1, R2= repetición 2, R3= repetición 3

ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE α -TOCOFEROL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba W de Mann-Whitney (comparación de medianas)

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,0000353375	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)



ANEXO 18: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE α -TOCOFEROL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Tabla ANOVA

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
Entre grupos	208,707	7	29,8152	577,07	0,0000
Intra grupos	0,826667	16	0,0516667		
Total (Corr.)	209,533	23			

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

Pruebas de Múltiple Rangos (Tukey)

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ÁRBOL	CASOS	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
AP4	3	4,13333	E
AP1	3	4,3	E
AP3	3	5,8	D
AP2	3	6,23333	D
AV3	3	9,26667	C
AV2	3	9,3	C
AV4	3	11,2	B
AV1	3	12,4333	A

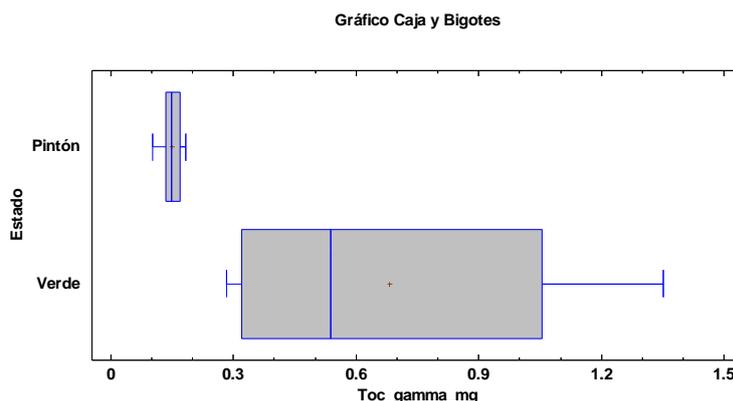
A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, P= pintón, V= verde

ANEXO 19: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE γ -TOCOFEROL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba W de Mann-Whitney (comparación de medianas)

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,0000351988	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)



ANEXO 20: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA EL CONTENIDO DE γ -TOCOFEROL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba de Kruskal-Wallis

ÁRBOL	TAMAÑO MUESTRA	RANGO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGÉNEOS
AP1	3	2,66667	G
AP4	3	4,33333	GF
AP3	3	8,0	FE
AP2	3	11,0	E
AV3	3	14,0	D
AV2	3	17,0	C
AV4	3	20,0	B
AV1	3	23,0	A

Estadístico = 22,5916; Valor-P = 0,0020073

ANEXO 21: CONTENIDO DE FITOSTEROLES EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN

	MUESTRA		$\mu\text{g } \beta\text{-SITOSTEROL/g MS}$	$\mu\text{g CICLOARTENOL/g MS}$	
1	Verde	A1	R1	3,35	0,71
2		A2	R1	5,51	0,85
3		A3	R1	5,12	0,70
4		A4	R1	3,74	0,70
5	Pintón	A1	R1	7,65	1,03
6		A2	R1	8,26	1,01
7		A3	R1	2,90	0,48
8		A4	R1	7,07	0,90

A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, R1= repetición 1, R2= repetición 2, R3= repetición 3

ANEXO 22: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE β -SITOSTEROL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba T
Comparación de medias

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,173871	NS

NS: No hay diferencia significativa ($p > 0,05$)

ANEXO 23: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA EL CONTENIDO DE CICLOARTENOL EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba T
Comparación de medias

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,421714	NS

NS: No hay diferencia significativa ($p > 0,05$)

ANEXO 24: CONTENIDO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA Y LIPOFÍLICA EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN

	MUESTRA		ABTS HIDROFÍLICO ($\mu\text{mol TE/g}$ MS)	ORAC HIDROFÍLICO ($\mu\text{mol TE/g}$ MS)	ABTS LIPOFÍLICO ($\mu\text{mol TE/g}$ MS)	
1	Verde	A1	R1	1483,9	190,9	3,7
2		A1	R2	1514,9	179,5	3,7
3		A1	R3	1473,4	165,7	3,6
4		A2	R1	1075,2	174,1	3,9
5		A2	R2	1168,2	154,7	3,9
6		A2	R3	1127,7	149,3	4,4
7		A3	R1	1101,3	147,4	3,2
8		A3	R2	1152,7	174,3	3,2
9		A3	R3	1084,0	158,1	3,3
10		A4	R1	1243,6	153,3	3,9
11		A4	R2	1280,1	173,4	3,8
12		A4	R3	1239,6	179,0	3,4
13	Pintón	A1	R1	951,1	100,1	3,7
14		A1	R2	903,3	102,4	4,1
15		A1	R3	914,1	117,5	3,9
16		A2	R1	1046,1	110,5	3,6
17		A2	R2	1071,4	120,1	3,7
18		A2	R3	1071,9	133,3	3,6
19		A3	R1	852,7	115,0	3,4
20		A3	R2	908,7	114,0	3,6
21		A3	R3	897,5	97,3	3,7
22		A4	R1	1072,7	115,7	4,4
23		A4	R2	1091,0	126,6	5,0
24		A4	R3	1131,3	137,6	4,8

A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, R1= repetición 1, R2= repetición 2, R3= repetición 3

ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (ABTS) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba T
Comparación de medias

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,000121924	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

ANEXO 26: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (ABTS) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Tabla ANOVA

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
Entre grupos	758307,	7	108330,	123,14	0,0000
Intra grupos	14075,4	16	879,715		
Total (Corr.)	772382,	23			

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

Pruebas de Múltiple Rangos (Tukey)

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ÁRBOL	CASOS	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
A3P	3	886,292	A
A1P	3	922,842	A
A2P	3	1063,16	B
A4P	3	1098,34	B
A3V	3	1112,66	B
A2V	3	1123,68	B
A4V	3	1254,44	C
A1V	3	1490,71	D

ANEXO 27: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (ORAC) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba T
Comparación de medias

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,00000	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

ANEXO 28: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (ORAC) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Tabla ANOVA

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
Entre grupos	17066,4	7	2438,06	17,19	0,0000
Intra grupos	2269,1	16	141,819		
Total (Corr.)	19335,5	23			

Pruebas de Múltiple Rangos (Tukey)

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ÁRBOL	CASOS	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
A1P	3	106,658	A
A3P	3	108,756	A
A2P	3	121,284	A
A4P	3	126,629	AB
A2V	3	159,392	BC
A3V	3	159,933	BC
A4V	3	168,571	C
A1V	3	178,7	C

ANEXO 29: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICA (ABTS) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba T
Comparación de medias

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,108788	NS

NS: No hay diferencia significativa ($p > 0,05$)

ANEXO 30: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICA (ABTS) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Tabla ANOVA

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
Entre grupos	4,15696	7	0,593852	17,10	0,0000
Intra grupos	0,5556	16	0,034725		
Total (Corr.)	4,71256	23			

Pruebas de Múltiple Rangos (Tukey)

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ÁRBOL	CASOS	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
A3V	3	3,223	A
A3P	3	3,56	AB
A2P	3	3,64	AB
A1V	3	3,643	AB
A4V	3	3,7	AB
A1P	3	3,88	B
A2V	3	4,053	B
A4P	3	4,73	C

ANEXO 31: INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN

	MUESTRA		INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 12 mg DE LÚCUMA MS	INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 5 mg DE LÚCUMA MS	INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 2 mg DE LÚCUMA MS	
1	Verde	A1	R1	90,8	87,7	88,3
2		A1	R2	93,2	88,6	84,7
3		A1	R3	90,8	88,2	88,1
4		A2	R1	93,1	88,4	85,6
5		A2	R2	91,4	88,2	83,8
6		A2	R3	91,4	86,6	87,6
7		A3	R1	91,7	87,3	88,2
8		A3	R2	92,2	87,9	84,4
9		A3	R3	89,1	88,3	85,4
10		A4	R1	94,4	85,2	88,9
11		A4	R2	96,0	88,6	85,6
12		A4	R3	87,6	93,5	88,4
13	Pintón	A1	R1	96,5	88,0	84,8
14		A1	R2	93,3	87,7	84,7
15		A1	R3	87,2	89,2	87,7
16		A2	R1	91,9	87,9	87,6
17		A2	R2	89,5	86,1	86,9
18		A2	R3	92,1	91,5	85,2
19		A3	R1	85,9	93,7	85,5
20		A3	R2	89,2	86,1	84,3
21		A3	R3	90,3	83,8	88,9
22		A4	R1	89,2	88,2	85,6
23		A4	R2	86,5	83,2	85,7
24		A4	R3	86,5	88,9	85,7

A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, R1= repetición 1, R2= repetición 2, R3= repetición 3

ANEXO 32: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 12 mg DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba T
Comparación de medias

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,094415	NS

NS: No hay diferencia significativa ($p > 0,05$)

ANEXO 33: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 12 mg DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Tabla ANOVA

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
Entre grupos	75,0317	7	10,7188	1,49	0,2406
Intra grupos	115,273	16	7,20458		
Total (Corr.)	190,305	23			

NS: No hay diferencia significativa ($p > 0,05$)

ANEXO 34: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 5 mg DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba W de Mann-Whitney
Comparación de medianas

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,750408	NS

NS: No hay diferencia significativa ($p > 0,05$)

ANEXO 35: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 5 mg DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba de Kruskal-Wallis

ÁRBOL	TAMAÑO MUESTRA	RANGO PROMEDIO
AP3	3	10,1667
AV3	3	11,1667
AP4	3	11,6667
AP2	3	12,3333
AV2	3	12,3333
AV1	3	13,6667
AP1	3	13,8333
AV4	3	14,8333

Estadístico = 0,9968; Valor-P = 0,99488, NS: No hay diferencia significativa ($p > 0,05$)

ANEXO 36: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 2 mg DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba T

Comparación de medias

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,43296	NS

NS: No hay diferencia significativa ($p > 0,05$)

ANEXO 37: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -AMILASA (%) PARA 2 mg DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Tabla ANOVA

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
Entre grupos	10,8067	7	1,54381	0,50	0,8236
Intra grupos	49,7467	16	3,10917		
Total (Corr.)	60,5533	23			

NS: No hay diferencia significativa ($p > 0,05$)

ANEXO 38: INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) EN LÚCUMA DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN” EN ESTADOS DE MADUREZ VERDE Y PINTÓN

	MUESTRA		INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 10 μ g DE LÚCUMA MS	INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 5 μ g DE LÚCUMA MS	INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 3 μ g DE LÚCUMA MS	
1	Verde	A1	R1	98,8	90,8	54,0
2		A1	R2	98,7	89,1	52,4
3		A1	R3	98,7	92,6	52,6
4		A2	R1	98,3	74,4	40,5
5		A2	R2	97,6	75,8	40,4
6		A2	R3	98,1	76,3	40,2
7		A3	R1	97,6	53,1	33,8
8		A3	R2	93,3	59,4	34,0
9		A3	R3	96,1	53,1	35,0
10		A4	R1	98,0	80,8	47,3
11		A4	R2	98,3	83,7	48,5
12		A4	R3	98,0	83,7	45,7
13	Pintón	A1	R1	70,8	33,0	16,9
14		A1	R2	69,4	31,6	16,3
15		A1	R3	70,1	33,3	17,6
16		A2	R1	83,1	33,9	17,6
17		A2	R2	83,2	33,4	17,5
18		A2	R3	83,0	33,9	17,5
19		A3	R1	80,2	31,6	18,5
20		A3	R2	80,7	32,7	18,7
21		A3	R3	81,5	30,4	17,6
22		A4	R1	77,9	33,4	17,5
23		A4	R2	77,9	32,7	17,2
24		A4	R3	77,5	32,4	16,8

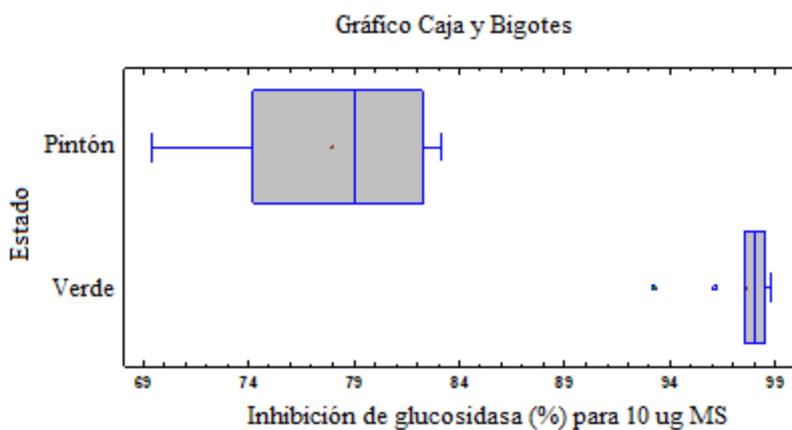
A1= árbol 1, A2= árbol 2, A3= árbol 3, A4= árbol 4, R1= repetición 1, R2= repetición 2, R3= repetición 3

ANEXO 39: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 10 μ g DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba W de Mann-Whitney
Comparación de medianas

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,0000358966	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)



ANEXO 40: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 10 μ g DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba de Kruskal-Wallis

ÁRBOL	TAMAÑO MUESTRA	RANGO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGÉNEOS
AP1	3	2,0	F
AP4	3	5,0	E
AP3	3	8,0	D
AP2	3	11,0	C
AV3	3	14,1667	B
AV2	3	18,3333	A
AV4	3	18,5	A
AV1	3	23,0	A

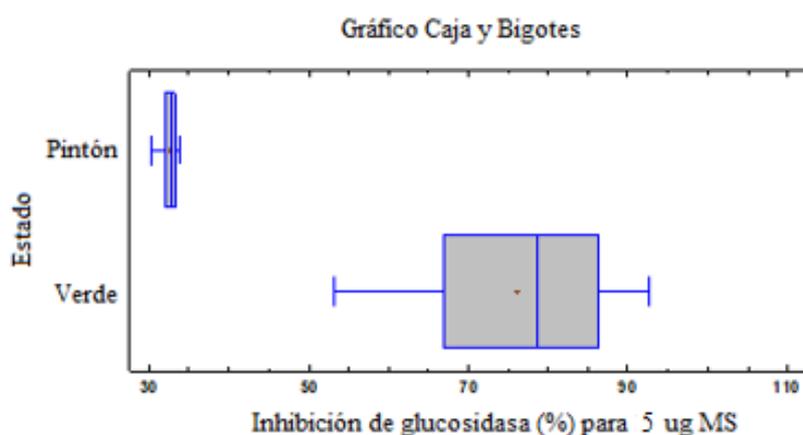
Estadístico = 22,372; Valor-P = 0,00219107

ANEXO 41: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 5 μ g DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba W de Mann-Whitney
Comparación de medianas

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,0000357562	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)



ANEXO 42: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 5 μ g DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Tabla ANOVA

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
Entre grupos	13390,2	7	1912,88	678,33	0,0000
Intra grupos	45,12	16	2,82		
Total (Corr.)	13435,3	23			

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

Prueba Tukey

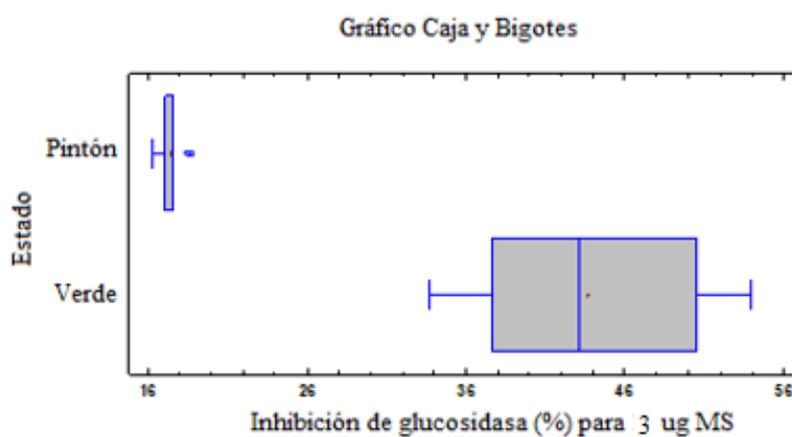
ÁRBOL	CASOS	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
AP3	3	31,5667	E
AP1	3	32,6333	E
AP4	3	32,8333	E
AP2	3	33,7333	E
AV3	3	55,2	D
AV2	3	75,5	C
AV4	3	82,7333	B
AV1	3	90,8333	A

ANEXO 43: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ESTADO PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 3 μ g DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba W de Mann-Whitney Comparación de medianas

CONTRASTE	VALOR-P	SIGNIFICACIÓN
Verde - Pintón	0,0000354766	*

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)



ANEXO 44: ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ÁRBOL PARA LA INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA (%) PARA 3 μ g DE LÚCUMA (MS) DEL BIOTIPO “DOS MARRÓN”

Prueba de Kruskal-Wallis

ÁRBOL	TAMAÑO MUESTRA	RANGO PROMEDIO	GRUPOS HOMOGÉNEOS
AP4	3	4,0	E
AP1	3	4,33333	E
AP2	3	7,0	E
AP3	3	10,6667	E
AV3	3	14,0	D
AV2	3	17,0	C
AV4	3	20,0	B
AV1	3	23,0	A

Estadístico = 21,7691; Valor-P = 0,00278401