

## EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN RECURSOS VEGETALES PROMISORIOS

Ana María Muñoz Jáuregui<sup>1\*</sup>, D. Fernando Ramos-Escudero<sup>1</sup>, Carlos Alvarado-Ortiz Ureta<sup>1</sup>, Benjamín Castañeda Castañeda<sup>1</sup>

### RESUMEN

El presente estudio evaluó la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en la parte comestible de aguaymanto, carambola, tomate de árbol, yacón, tumbo costeño, tumbo serrano, noni, camu-camu y guinda, siendo la capacidad antioxidante determinada por dos métodos: usando ABTS encontrando valores de 0,01 a 27,66 mg TE/100g de muestra y aplicando el método DPPH usando coeficiente de inhibición IC<sub>50</sub> obteniendo valores de 3,45 a 7057,99 mg/mL, siendo el camu-camu de mayor ARP con 289,29 mg/mL. El contenido de compuestos fenólicos totales usando el método Folin-Ciocalteu encontraron valores entre 2,16 y 2393,72 mg GAE/100g de materia fresca. La concentración de flavonoides y ácidos fenólicos libres fue determinado por HPLC-RP, siendo los más altos valores de clorogénico y ácido ferúlico 81,47 y 188,72 mg/kg de peso fresco, respectivamente. Los valores máximos de los otros compuestos fenólicos lo presentaron el noni con 42,63 mg/kg de cafeico, 60,23 mg/kg de rutina, el camu-camu con 0,55 mg/kg de morina, el tumbo serrano con 0,05 mg/kg de kaenferol. La capacidad antioxidante obtenida por los métodos de DPPH y ABTS está correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos totales.

**Palabras clave:** Capacidad antioxidante, vegetales, compuestos fenólicos, flavonoides.

## EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY AND CONTENT OF PHENOLICS COMPOUNDS OF VEGETABLE PROMISSORY RESOURCES

### ABSTRACT

The present study evaluated the antioxidant capacity and the content of phenolics compounds in the eatable part of aguaymanto, carambola, tree tomato, yacon, coast tumbo, andean tumbo, noni, camu-camu, being the antioxidant capacity determined by two methods: using ABTS obtaining values from 0,01 to 27,66 mg TE/100g of sample and applying the method DPPH using coefficient of inhibition IC<sub>50</sub> obtaining values from 3,45 to 7057,99 mg/mL, being the camu-camu of major ARP with 289,29 mg/mL-1. The content of total phenolic compounds using the method Folin-Ciocalteu they found values between 2,16 and 2393,72 mg GAE/100g of fresh weight. The concentration of flavonoids and phenolic acid free it was measured by HPLC-RP being the high values of chlorogénic and quercetine 74,21 and 10,13 mg/100 g of fresh weight, respectively, in yacon. The maximum values of other phenolics

<sup>1</sup> Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina Humana. Universidad San Martín de Porres. Av. Alameda del Corregidor N° 1531 La Molina - Lima (Perú)

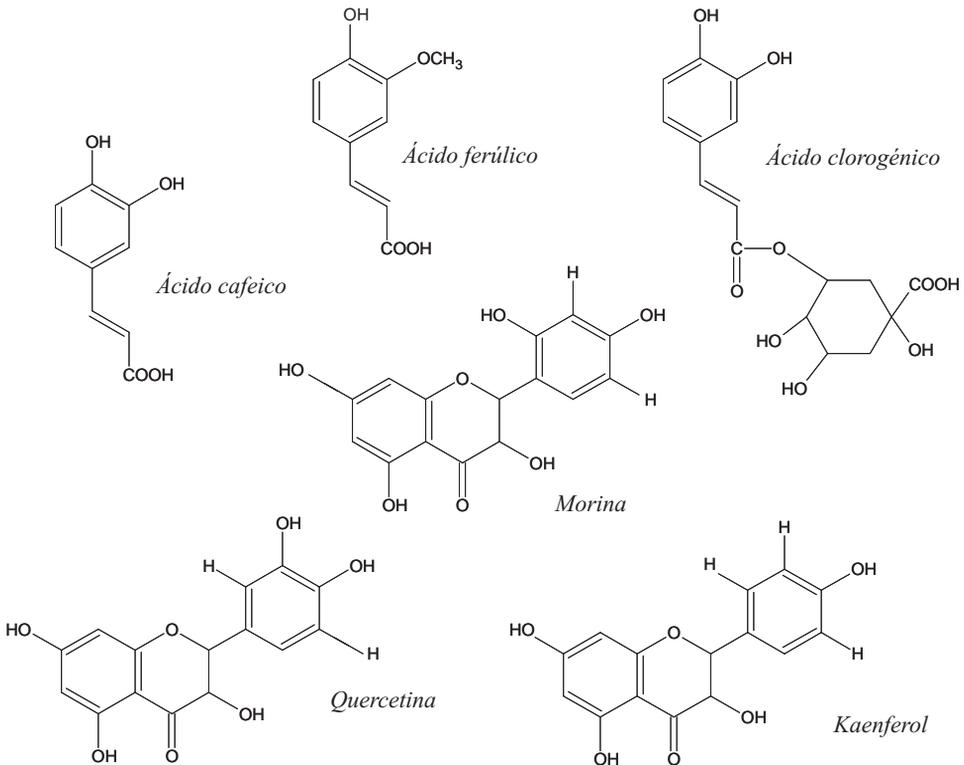
\* amariamj@yahoo.es amunoz@1969hotmail.com

compounds it presented the noni with 68,21 mg/100 g of capheic, 96,38 mg/100 g of rutine and 301,95 mg/100 g of acid pherulic, the camu-camu with 0,87 mg/100 g of morine, the andean tumbo with 0,082 mg/100 g of kaempferol. The antioxidant capacity obtained by the methods of DPPH and this ABTS correlated with the content of phenolic compounds total.

**Key words:** Antioxidant capacity, vegetables, phenolic compounds, flavonoids

## INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son metabolitos 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. Esta síntesis se da a partir de fenilalanina por la vía del shikimato. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina (Dixon y Paiva, 1995)<sup>1</sup>, por lo que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (e.g., flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, coumarinas, lignanos, etc) (Cai *et al.*, 2006)<sup>2</sup>. En la Figura 1, se muestra algunos de los antioxidantes frecuentes en alimentos correspondientes a este grupo.



**Figura 1.** Algunos compuestos fenólicos presentes en alimentos

Los compuestos fenólicos son un gran grupo de antioxidantes naturales; consumo de fuentes importantes, particularmente de frutas, vegetales y cereales presentan efectos benéficos (Naczki y Shahidi, 2006)<sup>3</sup>. La asociación entre una dieta rica en frutas y vegetales está relacionada a una disminución de riesgo de enfermedades cardiovasculares, y ciertas formas de cáncer, según evidencias epidemiológicas (García-Alonso *et al.*, 2004<sup>4</sup>; Arts y Hollman, 2005)<sup>5</sup>. Estos fitoquímicos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias que evidencian su rol protector sobre la salud humana (Carratú y Sanzini, 2005)<sup>6</sup>. Diferentes estudios han mostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y tiene que ver en la iniciación en algunas enfermedades degenerativas (García-Alonso *et al.*, 2004)<sup>4</sup>. Estos componentes antioxidantes son capaces de neutralizar radicales libres, y pueden jugar un rol importante en la modulación de detoxificación enzimática, estimulación del sistema inmune, disminución de la agregación plaquetaria y modulación del metabolismo hormonal (Carratú y Sanzini, 2005)<sup>6</sup>.

Los objetivos del presente trabajo de investigación fue determinar la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos totales y concentración de ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ferúlico y cafeico), flavonoles (morina, quercetina, rutina, kaenferol), de los recursos promisorios como: aguaymanto, carambola, tomate de árbol, yacón, tumbo costeño, tumbo serrano, noni, camu-camu y guinda.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reactivos

Acetonitrilo grado gradiente, metanol grado HPLC, ácido *o*-fosfórico al 85 % de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu (St.Louis, MO, USA).

Agua ultrapurificada con una conductividad de 18 M $\mu$ /cm, preparado para un sistema Elix<sup>®</sup> o de ósmosis inversa (Millipore, Symplicity, USA), usado para todos los experimentos. Los estándares como quercetina, kaenferol, rutina, ácido gálico, ácido cafeico fueron obtenidos de Sigma<sup>®</sup> (Steinheim, Alemania) y ácido ferúlico, ácido clorogénico, fueron obtenidos de Aldrich<sup>®</sup> (St.Louis, MO, USA).

### Recursos promisorios

Nueve productos diferentes fueron colectados del mercado de frutas de Lima, los cuales son: *Prunus serotina*, conocida como “guinda”; *Physalis peruviana*, llamada “aguaymanto”; *Passiflora mollissima*, llamada “tumbo serrano”; *Passiflora quadrangularis* o “tumbo costeño”; *Averrhoa carambola* L., conocida como “carambola”; *Cyphomandra betacea* (cav) sendt, llamada “tomate de árbol”; *Smallanthus sonchifolius* (P. & E.) Rob o “yacón”; *Morinda citrifolia*, llamada “noni”; *Myrciaria dubia*, conocida como “camu-camu”. Los frutos inmediatamente fueron lavados y pelados para su análisis posterior.

### Preparación de la muestra

Las muestras fueron sometidas a una reducción de tamaño; la extracción fue en etanol al 60%. Posteriormente se evaporó en un rotaevaporador Heidolph Laborota 4003. Se reconstituyó con metanol grado HPLC.

## **Análisis por HPLC**

Las condiciones del análisis por HPLC fueron previamente descritas por Zavaleta *et al.* (2005)<sup>7</sup>. La cuantificación individual de los ácidos fenólicos y flavonoles fueron recogidos en función a sus respectivas áreas de los picos registrados a 370 nm.

La separación fue desarrollada a temperatura ambiente con una columna LiChroCART<sup>®</sup> 250-4 LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-Select B (5 µm) (Merck KGaA, Alemania).

La separación fue corrida a un flujo de 1000 µL min<sup>-1</sup> y la fase móvil consistió en una mezcla de gradiente del eluyente A (agua – ácido o-fosfórico, pH 2,5) y eluyente B (acetonitrilo). Seguidamente, el programa de gradiente utilizada fue el siguiente: 0 min, 100% de A; 2 min, 80% de A y 20% de B; 15 min, 70% de A y 30% de B; 16 min, 40 % de A y 60% de B; 22 min, 60% de A y 40% de B; 26 min, 100% de A; 28 min, 100 % de A. Las concentraciones de los ácidos fenólicos y flavonoles se expresaron en mg/100 g de peso fresco.

## **Análisis de compuestos fenólicos totales**

El contenido de polifenoles fue determinado acondicionando al método descrito por Ivanova *et al.* (2005)<sup>8</sup>. Se prepararon diferentes concentraciones de las muestras (2 a 4000 mg/mL); se tomó una alícuota de 150 µL (tres réplicas), las que fueron introducidas en tubos, 750 µL de Folin-Ciocalteu fue añadido; después de 5 minutos de reacción se añadió 600 µL de carbonado de sodio a 7,5 %. Los tubos fueron mezclados e incubados a 50 °C/10 min.; la absorbancia fue recogida a 760 nm usando una celda de poliestireno de (4,5 cm x 1,0 cm x 1,0 cm); las mediciones se tomaron con un espectrofotómetro (Shimadzu Uv/Vis 2550, con interfase a una PC, Shimadzu Scientific Instruments, MD, USA.). El contenido total de polifenoles fue expresado como mg ácido gálico/100 g peso fresco.

## **Análisis de actividad antioxidante**

Se usó el método descrito por Brand-Williams *et al.*, (1995)<sup>9</sup>. El radical DPPH fue disuelto en etanol al 95%, los análisis se llevaron a cabo sobre materia fresca; las reacciones se corrieron por triplicado. Las mayores absorbancias de cada una de las muestras se interpolaron a una curva estándar de ácido ascórbico equivalente (VCEAC) y trolox equivalente (TEAC). Los valores de eficiencia de concentración (EC<sub>50</sub>), se realizaron a los 10 minutos de reacción (Schwarz *et al.*, 2001)<sup>10</sup>; la disminución de las absorbacias fue registrada a intervalos de 1 minuto. Se usó 515 nm como la longitud de onda máxima.

## **Análisis estadístico**

Los resultados están presentados como el valor medio ± SEM. Los análisis estadísticos para el cálculo del EC<sub>50</sub>, se hizo mediante regresión. El nivel de significancia fue a p<0,05. Los datos fueron procesados mediante un software estadístico STATGRAPHICS plus 4.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Contenido de ácidos fenólicos y flavonoles

El contenido de ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ferúlico y cafeico) y flavonoles (morina, quercetina, rutina, kaenferol), se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Contenido de ácidos fenólicos y flavonoles de recursos promisorios (mg/kg g peso fresco)

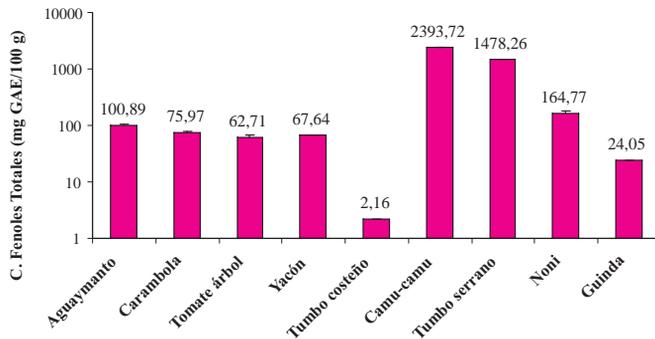
Componente	Carambola	Yacón	Tumbo costeño	Aguaymanto	Camu-camu	Guinda	Tumbo serrano	Noni	Tomate árbol
1	1,68	46,38	0,26	4,97	1,36	52,54	nd	14,87	81,47
2	0,33	7,28	0,06	1,78	18,72	0,1	0,17	42,63	2,57
3	0,24	0,003	0,08	1,67	1,87	1,37	1,65	60,23	0,81
4	3,11	21,22	0,02	4,44	1,49	98,12	0,26	188,72	2,99
5	0,01	0,01	nd	nd	0,55	nd	nd	Nd	0,18
6	0,004	6,33	0,19	0,68	0,19	3,55	0,82	0,48	3,41
7	0,04	nd	0,01	nd	0,04	nd	0,05	0,04	0,01

Ácido clorogénico<sup>1</sup>, ácido cafeico<sup>2</sup>, rutina<sup>3</sup>, ácido ferúlico<sup>4</sup>, morina<sup>5</sup>, quercetina<sup>6</sup>, kaenferol<sup>7</sup>

El contenido de ácido clorogénico en las muestras estudiadas se encontró alrededor de 0,26 a 81,47 mg/kg, siendo el yacón, guinda y tomate de árbol los de mayor concentración; estos valores superan los reportados por Martínez *et al.*<sup>11</sup>, para las manzanas que oscilan entre 25-61,47 mg/L. Por otro lado, el contenido de ácido cafeico fue 0,06 a 42,63 mg/kg, siendo el noni, camu-camu, yacón los que presentaron mayores contenidos; la rutina se encontró entre 0,003 a 60,23 mg/kg y de ácido ferúlico estuvo entre 0,02 a 188,72 mg/kg siendo el noni en donde se encontró mayor concentración de estos metabolitos, la concentración de morina estuvo alrededor de 0,01 a 0,18 mg/100g; sólo el camu-camu, tomate de árbol, carambola y yacón reportaron su presencia en bajas concentraciones de este componente, y finalmente, la concentración de quercetina y kaenferol se encontró alrededor de 0,004 a 6,33 mg/kg y 0,01 a 0,05 mg/kg, respectivamente; el yacón presentó mayor contenido de quercetina, y el tumbo serrano mejor concentración de kaenferol. El tumbo costeño presentó la menor cantidad en todos los componentes analizados.

### Contenido de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son muy importantes como constituyentes de las plantas debido a su habilidad para secuestrar radicales libres, la que está relacionada a la presencia de su grupo hidroxilo (Gulcin *et al.*, 2003)<sup>12</sup>. En la Figura 2, se muestra la concentración de compuestos fenólicos totales de los recursos promisorios en mg ácido gálico equivalente/100 g peso fresco.

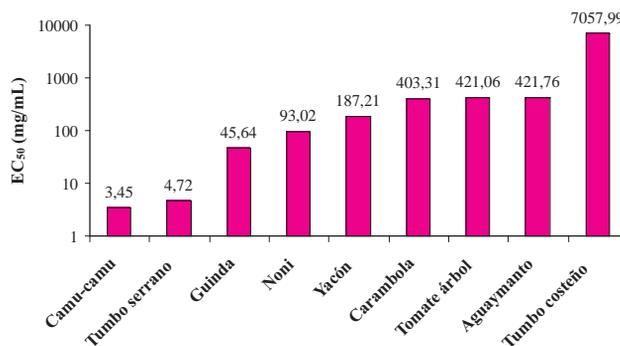


**Figura 2.** Contenido de compuestos fenólicos totales en alimentos promisorios

El contenido de compuestos fenólicos totales es variable, de acuerdo al tipo de recurso; algunos presentan mayor contenido respecto de otros, siendo el camu-camu > tumbo serrano > noni > aguaymanto > carambola > yacón > tomate árbol > guinda > tumbo costeño, en ese orden, respectivamente. Otros frutos estudiados mencionan el contenido de compuestos fenólicos en uva blanca 95 mg/100 g, uva rosada 93 mg/100 g, ciruelo “wegierka” 200 mg/100 g, toronja rosada 425 mg/100g, naranja 217 mg/100 g, kiwi 273 mg/100 g, manzana “gala” 132 mg/100 g (Cieslik *et al.*, 2006)<sup>13</sup>, siendo superados por el tumbo serrano y camu-camu. Otros estudios realizados en pulpas de frutas del Brasil mencionan la mora con 118 mg/100g, guayaba 83 mg/100g, graviola 84,3 mg/100g, copoazu 20,5 mg/100 g, maracuyá 20 mg/100g, acerola 580,1 mg/100g, mango 544 mg/100g (Kuskoski *et al.*,) cuyos valores son inferiores a varios de los frutos estudiados. Cabe indicar que los compuestos fenólicos juegan un rol importante en la salud; es evidente que un consumo alto de frutas y vegetales puede disminuir el riesgo de enfermedades crónicas, tales como la enfermedad cardiovascular y cáncer (Boyer y Liu, 2004)<sup>14</sup>.

### Actividad antioxidante

Los resultados obtenidos para la actividad antioxidante mediante el método DPPH se muestra en la Figura 3; la eficiencia de concentración 50% indica que el camu-camu y el tumbo serrano presentan mayor capacidad antioxidante, seguidos por la guinda y el noni.



**Figura 3.** Capacidad antioxidante obtenida por DPPH (mg/mL)

Sin embargo, la carambola, el tomate de árbol y el aguaymanto presentan una moderada actividad antioxidante; por el contrario, el tumbo costeño presenta una baja actividad antioxidante. Estudios realizados en otros frutos presentan equivalente a vitamina C (VCEAC) en uva 105,9 mg/100g, mango 174mg/100g, copoazu 43 mg/100g, graviola 57,15 mg/100g; algunos inferiores a las muestras estudiadas. Por otro lado, la capacidad antioxidante en un alimento vegetal no viene dada sólo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada componente, también depende del microambiente en el que se encuentre el compuesto, pudiendo interactuar entre sí, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otro lado, es importante indicar que la actividad antioxidante (ARP) frente al contenido de compuestos fenólicos presenta una alta correlación ( $R^2 = 0,9836$ ), que fue observada a un nivel de significancia ( $p < 0,001$ ). En la Tabla 2 se muestra la capacidad antioxidante de vitamina C equivalente (VCEAC).

**Tabla 2.** Capacidad antioxidante (VCEAC) y (TEAC) en alimentos promisorios

Recursos	ARP	VCEAC (mg AAE/100 g)	TEAC ( $\mu\text{mol/g}$ )
Camu-camu	289,29	805,63	110,52
Tumbo serrano	212,09	285,33	41,18
Guinda	21,91	36,78	5,18
Noni	10,75	23,89	3,48
Yacón	5,34	15,66	2,22
Carambola	2,48	5,59	0,80
Tomate de árbol	2,37	6,85	0,89
Aguaymanto	2,37	6,29	0,89
Tumbo costeño	0,14	0,35	0,05

Valores de ARP (poder antirradical) expresados como  $1000/EC_{50}$  de  $n = 3$ .

## CONCLUSIONES

Entre los frutos promisorios estudiados poseen actividad antioxidante **muy elevada** el camu-camu y el tumbo serrano; **elevada** la guinda, el noni y el yacón; **moderada** la carambola, el aguaymanto y el tomate de árbol y **baja** el tumbo costeño. Existe una correlación directa entre los valores TEAC y VCEAC y los valores de compuestos fenólicos totales, lo que explica que las frutas de mayor poder antioxidante, como es el camu-camu y el tumbo serrano, contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos, recomendándose el consumo de estos frutos promisorios en una alimentación saludable para una mejor calidad de vida.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo brindado por la Mg. María Luisa Guevara de Fujita.

## REFERENCIAS

1. Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 1995, 7: 1085–1097.
2. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Science*. 2006, 78(25): 2872–2888.
3. Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 41: 1523–1542.
4. García-Alonso M, De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Evaluation of the antioxidant properties of fruit. *Food Chemistry*. 2004, 84: 13–18.
5. Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005, 81(suppl): 317S–325S.
6. Carratù B, Sanzini E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Ann. Ist. Super Sanita*. 2005, 41: 7–16.
7. Zavaleta J, Muñoz AM, Blanco T, Alvarado C, Loja B. Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Revista Horizonte Médico*. 2005, 2(5): 29–38.
8. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology* 2005, 96: 145–150.
9. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 1995, 28: 25–30.
10. Schwarz K, Bertelsen G, Nissen LR, Gardner PT, Heinonen MI, Hopia A, Huynh-Ba T, Lambelet P, McPhail D, Skibsted LH, Tijburg L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur. Food Res. Technol.* 2001, 212: 319–328.
11. Martínez I, Periago M, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *ALAN*. 2000, 50 (1): 5-18
12. Gülçin Ý Oktay M, Kireççi E, Küfreviođlu ÖÝ Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. *Food Chemistry*. 2003, 83: 371–382.
13. Cieslik E, Greda A, Adamus W. Contents of phenolics in fruit and vegetables. *Food Chemistry*. 2006, 94: 135–142.
14. Boyer J, Liu RH. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*. 2004, 3: 1–15.