

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA PULPA, CÁSCARA Y SEMILLA DEL FRUTO DEL CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* H.B.K.)

Víctor Sotero Solís^{1*}, Luz Silva Doza¹, Dora García de Sotero², Sixto Imán Correa³

RESUMEN

El camu camu es una especie nativa de la Amazonía y el interés por su fruto radica en su alta concentración de ácido ascórbico. En el presente estudio se realizó la determinación de la actividad antioxidante de la pulpa, cáscara y semilla del camu camu colectado en el banco de Germoplasma del INIA-Loreto. Se realizó la evaluación de la actividad antioxidante, mediante el secuestro de radicales libres del DPPH. Se determinó la concentración de compuestos fenólicos y ácido ascórbico, mediante el método espectrofotométrico y por cromatografía de HPLC. Se observa que los mejores resultados en cuanto a la actividad antioxidante la presentó la cáscara de camu camu con IC₅₀ de 146,94 µg/ml, seguido de la pulpa con 167,67 µg/ml y con menor actividad la semilla con 399,77 µg/ml. Las mejores concentraciones para compuestos fenólicos se obtienen en pulpa seca (23168,0 mg/100g) y en cáscara seca (17905,5 mg/100g). Las concentraciones de ácido ascórbico en peso seco, reportan la mayor concentración en pulpa: 14337,94 mg/100g y cáscara: 10506,37 mg/100g, siendo inferior en semilla: 87,08 mg/100g. En la pulpa y cáscara del camu camu se encontraron ácido clorogénico, catequina, epicatequina y rutina, destacando la catequina en cáscara con 47,29 mg/100g.

Palabras claves: camu camu, antioxidantes, polifenoles, HPLC

ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM PULP, PEEL AND KERUEL OF CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* H.B.K)

ABSTRACT

Camu camu is a native specie of the Amazonia and the interest for its fruit takes root in its high concentration of ascorbic acid, beside possessing excellent antioxidant qualities. In the present study there was realized the evaluation of the antioxidant activity of the pulp, peel and seed of the camu camu collected in Germoplasma's bank of the INIA-Loreto. There was realized the evaluation of the antioxidant activity, by means of the scavenging of free radical of the DPPH. Likewise they were realized the analysis of phenolics compounds and ascorbic acid, by means of the spectrophotometric method and HPLC chromatography. It is observed that the best results for the antioxidant activity was the peel of camu camu with IC₅₀ of 146,94 µg/ml, followed by the pulp with 167,67 µg/ml and with minor activity the seed with 399,77 µg/ml. The best concentrations for the compounds phenolics are obtained in dry pulp (23168,0 mg/100g) and in dry peel (17905,5 mg/100g). The concentrations of ascorbic acid reports the major concentration in dry pulp: 14337,94 mg/100g and peel: 10506,37 mg/100g, being low

¹ Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, Av Abelardo quiñones, km 2,5 – Iquitos. e-mail: vsotero@iiap.org.pe

² Facultad de Ingeniería Química.-Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Freyre 616-Iquitos.

³ Instituto Nacional de Innovación Agraria. E.E.San Roque. Av San Roque 209-Iquitos.

in seed: 87,08 mg/100g. In the pulp and peel of camu camu they were chlorogenic acid, catechin, epicatechin and rutin, emphasizing the catechin in rind with 47,29 mg/100g.

Key words: camu camu, antioxidants, phenolics, HPLC

INTRODUCCIÓN

El camu camu es una especie nativa de la cuenca amazónica y que se encuentra distribuida ampliamente en la Amazonía continental; su fruto se caracteriza principalmente por su alta concentración de ácido ascórbico, que puede llegar según su procedencia hasta 3000 mg/100g, por tal motivo es que se la considera como una de las especies de mayor potencial económico de la región amazónica^{1,2,3}.

Los antioxidantes son sustancias que presentan la propiedad de inhibir las alteraciones oxidativas que puede sufrir una molécula. Todas las moléculas presentes en la naturaleza son blancos potenciales del daño oxidativo: lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc. Debido al oxígeno, en el organismo, se forman especies reactivas (ROS), como el H₂O₂, HClO o radicales libre oxigenados como el anión superóxido, los radicales hidroxilo o alquil peroxilo. Las células disponen de sistemas depuradores como las enzimas y antioxidantes endógenos; cuando existe un desequilibrio entre estos últimos y la generación de especies oxidantes, tiene lugar el estrés oxidativo, proceso donde los ROS atacan los lípidos, inactivando proteína o dañando el DNA. Entre los principales antioxidantes naturales se tiene los compuestos fenólicos, el ácido ascórbico, el tocoferol y los carotenoides, siendo encontrados con mayor frecuencia en las fuentes vegetales, destacando los frutos, semillas y aceites vegetales^{4,5}.

Los compuestos fenólicos o polifenoles, constituyen un grupo bastante amplio de sustancias químicas, que se caracterizan por presentar en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y abarcan a más de 8000 compuestos distintos y han demostrado poseer importante actividad antioxidante. El organismo humano no los produce y se les encuentra en plantas, frutas y diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana^{6,7,8}.

Según diversos autores,^{9,10} los polifenoles pueden ser divididos por lo menos en diez diferentes clases dependiendo de su estructura básica. Los flavonoides, los cuales constituyen un grupo simple pero de gran importancia, y presentan más de 5000 compuestos y tienen la estructura básica de difenilpropano (C₆-C₃-C₆), dos anillos aromáticos unidos a tres átomos de carbono. Otro grupo importante de compuestos fenólicos son las flavonas y flavononas que generalmente se encuentran juntos en frutos cítricos; del mismo modo las antocianinas, que son un grupo de pigmentos solubles en agua, responsables por el color rojo del vino, las catequinas en el té y procianidinas en la semilla de cacao¹¹. Los ácidos fenólicos, que presentan la estructura básica C₆-C₁, pertenecen a otro grupo también importante junto a los flavonoides por sus propiedades antioxidantes, se tiene los ácidos gálico, elágico y p-hidroxibenzoico encontrados en bayas y frutos de diferentes especies.^{12,13} El ácido ascórbico o vitamina C, se trata de una lactona de un azúcar – ácido y muy sensible a degradarse, aunque en el camu camu, presenta alta estabilidad al deshidratar la pulpa a temperaturas entre 60.-90°C¹⁴.

Considerando la alta concentración de ácido ascórbico y compuestos fenólicos, se reporta una interesante actividad antioxidante en pulpa y semilla de camu camu, utilizando la capacidad de secuestro por el 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), que alcanza valores de IC50 de 100 y 20, respectivamente, para extractos hidroalcohólicos.¹⁵ Del mismo modo en otro trabajo se determinó la capacidad antioxidante del camu camu con ensayo TOSC (secuestro de la capacidad antioxidativa total). Este método se basa en el rendimiento de etileno en la reacción

del KMBA (α -ácido- γ - ceto-metilbutírico) con tres especies reactivas, en los resultados se obtiene que comparado con otros frutos, el camu camu presenta destacada capacidad antioxidante en comparación con el asai, casho o marañón, naranja y manzana¹⁶.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antioxidante de los principios bioactivos del camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.) y los principales componentes causantes de esa propiedad.

PARTE EXPERIMENTAL

Material

Se colectaron muestras de camu camu de la estación experimental El Dorado del Instituto de Extensión e Investigación Agraria de Loreto (INIA), las cuales fueron: Genotipo MD-044 y MD-015 ambos de la cuenca del río Nanay, Región Loreto

Métodos

Para evaluar la actividad antioxidante se obtuvieron extractos metanólicos de las muestras secas, utilizando el método de Lebeu *et al.*,¹⁷ por reducción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), con absorbancia de 515 nm. Para calcular la capacidad de secuestro de radicales DPPH se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\%, \text{DPPH Inhibición} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra (t)}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

Donde:

A_{control} : Absorbancia del control.

$A_{\text{muestra (t)}}$: Absorbancia de compuesto experimental en tiempo n.

Fenólicos

Se sigue la metodología dada por Valls *et al.*,¹⁸ para la extracción de los compuestos fenólicos. Se pesan 0,5 g de la muestra y se extraen sucesivamente con 3 volúmenes de 25 mL de etanol absoluto acidulado con un 1% de ácido clorhídrico. El extracto se evapora hasta sequedad a una temperatura de 40°C. El residuo seco se redissuelve en una solución de metanol al 50% acidulado con una solución de ácido clorhídrico, y se lleva a un volumen de 10 mL. Se guarda en alícuotas para las otras determinaciones de:

Antocianinas totales. La determinación de antocianinas totales se efectúa mediante la lectura de la absorbancia a 535 nm, previa dilución de las muestras. Para realizar los cálculos, se utiliza el coeficiente de extinción molar de la malvidina-3-glucósido: 29500 L/mol.cm

Fenólicos totales. Se realiza la medida del índice de Folin, para lo cual se tratan 40 μ l de muestra con 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de carbonato sódico al 20 (p/v), y se llevan a 10 mL. Transcurrida media hora, se efectúa la lectura de absorbancia a 765 nm. Para establecer el calibrado, se utilizan patrones de ácido gálico de concentraciones entre 0 – 100 mg/L.

Ácido ascórbico

Se pesa 100 mg de pulpa de camu camu y se diluye en 100 ml de ácido metafosfórico 4,5%. Los análisis se realizan utilizando el HPLC equipado con detector de absorbancia fase reversa 5 μ m columna LiChocart RP18 (250 x 4,6 mm). Como fase móvil se utiliza agua nanopura acidulada con ácido sulfúrico, hasta alcanzar un pH de 2,2. La razón de flujo de la fase móvil es de 0,5 ml/min. La longitud de detección es de 245 nm. Las alícuotas de las muestras pasan por un filtro de 0,45 μ m¹⁹.

Compuestos fenólicos por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se toma 5 g de la parte a analizar del fruto y se mezcla y homogeniza con 10 mL de la solución de extracción: agua/metanol 2:8, conteniendo 2 eh de NaF para inactivar las polifenol oxidasas y prevenir la degradación fenólica debido al oscurecimiento; se la mantiene en hielo hasta ser centrifugada a 11500 rpm. por 15 minutos a 2-5°C, 16000g; el sobrenadante se recupera cuidadosamente y se mide el volumen. Un ml de la porción del extracto se pasa a través de un filtro de nylon de 0,45 µm y se analiza directamente en el HPLC en un periodo que no exceda de las 24 horas.

Los compuestos fenólicos fueron identificados en un equipo de cromatografía de HPLC marca Agilent technology, por su espectro en el rango de UV, y utilizando un detector de arreglo de diodos. Las muestras se corrieron de 280 nm a 355nm, hasta establecer un protocolo definido, utilizando como fase móvil 88% agua nanopura y 12% metanol grado HPLC y razón de flujo de 1,5 ml/min, isocrático. Se utilizó una columna LiChrocart RP 18 (250 x 4,6mm). Se comparó con los estándares de ácido clorogénico, catequina, epicatequina, epigallocatequina y rutina²⁰.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se dan los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante por secuestro del radical DPPH y determinación del IC50 en camu camu. El IC50 se define como la concentración de aditivo que produce 50% de inhibición en el daño oxidativa. Se observa que los mejores resultados de IC50 se presentan en la cáscara y pulpa de camu camu con 146,94 ug/ml y 167,67 ug/ml, respectivamente. De acuerdo a los informes dados por otros autores¹⁴ reportan que el mejor IC50 del camu camu se da en la semilla con aproximadamente 20 y 250 ug/ml aproximadamente en muestras liofilizadas par extractos hidroalcohólicos y hexánicos respectivamente.

Tabla 1. Evaluación de la actividad antioxidante por secuestro del radical 2,2-difenil-1-picirilhidrazil (DPPH) y determinación del IC50 en extracto metanolico de camu camu

Parte	10 ug/ml	30, g/ml	100ug/ml	300, g/ml	1000, ug/ml	IC 50, ug/ml
Pulpa	8,45 ±0,1	15,17 ± 2,3	37,80±3,9	75,33±7,8		167,67 ± 30,0
Cáscara	13,27±2,7	21,52 ±0,5	42,61± 0,2	76,64±5,1		146,94 ± 2,1
Semilla	6,55 ±3,2	9,78±2,4	17,11±1,3	43,54±1,8	85,63±2,0	399,77 ± 15,7

En la tabla 2, se reportan los resultados de la concentración total de polifenoles, antocianinas, flavonoides y ácido ascórbico en camu camu. Según lo observado la mayor concentración se encuentra en el la pulpa y cáscara del fruto de camu camu, con 23468,00 y 17905,5 mg/100g (peso seco). Del mismo modo la mayor concentración de antocianinas y flavonoides, se encuentra en cáscara de camu camu con 109,50 y 2012,32 mg/100g (peso seco), siendo los primeros los causantes de la coloración característica de este fruto. La concentración de ácido ascórbico, sigue siendo alta en pulpa seca de camu camu y muy superior a otras partes del fruto. La pulpa presenta 14337,94 mg/100g (peso seco) y la cáscara 10506,37 mg/100g (peso seco). Los valores en pulpa son similares a los presentados por diversos autores quienes informan que este valor puede llegar a valores superiores a 2000,0 mg/100g en peso fresco,^{1,2,3} y algo inferiores a los reportados para la pulpa liofilizada, la cual presenta valores entre 15849,73 a 20 383,80 mg/100g²¹.

Tabla 2. Cuantificación de polifenoles, antocianinas, flavonoides y ácido ascórbico en el fruto de camu camu (peso seco)

Parte	Polifenoles, mg/100g	Antocianinas, mg/100g	Flavonoides, mg/100g	Ácido ascórbico, mg/100g
Pulpa	23168,00 ± 932,7	74,04 ± 4,7	994,97 ± 194,0	14337,94 ± 2506,1
Cáscara	17905,50 ± 1302,5	109,50 ± 33,8	2012,32 ± 102,1	10506,37 ± 5039,2
Semillas	2969,20 ± 113,1	35,33 ± 19,3	218,78 ± 0,1	87,08 ± 20,5

En la tabla 3, se presentan los resultados de las concentraciones de los compuestos fenólicos en el fruto de camu camu analizados por cromatografía de HPLC y con los estándares conocidos de ácido clorogénico, catequina, epicatequina y rutina.

Se observa que los principales compuestos fenólicos obtenidos en la pulpa y cáscara de camu camu, fueron el ácido clorogénico, catequina, epicatequina y rutina, se evaluaron otros estándares, como indicados en 2.2.4, lo mismo no aparecieron en la semilla, entendiéndose que su mayor actividad antioxidante de ésta lo da el ácido ascórbico presente. Cabe destacar la alta concentración de ácido clorogénico (32,85 mg/100g) y epicatequina (30.52 mg/100g), en la pulpa, y de catequina en la cáscara (12,29 mg/100g); se observa que la mayoría de compuestos fenólicos no han sido identificados cuando se utiliza una longitud de onda 280 nm.; la presencia de ácido clorogénico y catequina, indica que están presentes los compuestos de los grupos de hidroxycinamatos y flavan 3-ols. Los compuestos aquí señalados son escasos, pero en los cromatogramas indican la presencia de otros compuestos fenólicos por analizar. Este trabajo es parecido al realizado por otros investigadores,²⁰ con melocotones y ciruelas; que debe de ser continuado ya que estos compuestos (polifenoles) suman alrededor de 5000⁹. Con muestras de camu camu procedentes de las regiones de Mirnadapoles e Iguapé, se reportan la presencia de las antocianinas: delfidina -3-glucósido y cianidina-3-glucósido.^{10, 22} Los compuestos catequínicos son los monómeros para la formación de los taninos catequinos y son causantes de la astringencia en los vinos.²³ El representante más importante del grupo flavan-3-ols es la catequina. Estos compuestos exhiben innumerables efectos biológicos incluyendo acción antiviral, antioxidante y antitrombótica²⁴.

Tabla 3. Concentraciones de compuestos fenólicos en fruto de camu camu.

Camu camu	Ácido clorogénico, mg/100g	Catequina, mg/100g	Epicatequina, mg/100g	Rutina, mg/100g
Pulpa	32,85 ± 1,2	28,03 ± 0,1	30,52 ± 0,1	9,015 ± 0,1
Cáscara	12,29 ± 2,6	47,29 ± 2,1	29,96 ± 0,1	4,85 ± 0,1

CONCLUSIONES

- Las pulpas y cáscaras de camu camu presentan una apreciable actividad antioxidante “*in vitro*”.
- La actividad antioxidante del camu camu, sea como pulpa, o cáscara es apreciable.
- La concentración de compuestos fenólicos en la cáscara del fruto de camu camu es muy superior en cuanto a flavonoides y antocianinas.
- Se identificó los compuestos fenólicos como catequina, epicatequina, ácido clorogénico y rutina en la pulpa de camu camu.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a CONCYTEC, por haber financiado este proyecto y del mismo modo a las personas que colaboraron con los análisis químicos como la Q.F. Martha Maco Luján y Q.F. Pedro Vásquez

REFERENCIAS

1. Flores, S. Cultivo de frutales nativos amazónicos: manual para el extensionista, Ed. Tratado de Cooperación Amazónica - Secretaría Pro Tempore, Lima, 1997 p.105-107.
2. Maeda, R.N.; Andrade, J.S.. Aproveitamento do camu camu (*Myrciaria dúbia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. *Acta Amazônica*. 2003; 33(3): 489-498.
3. Villachica, H. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonía. Ed. Tratado de Cooperación Amazónica -Secretaria Pro-Tempore, Lima. 1996.144p.
4. Aruoma, O.I. Free radicals and foods. *Chem. Br.*, 1993; 29:210–214
5. Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. Antioxidants in nutrition, health, and disease. : Oxford University, Oxford, 1994. 143p.
6. Lock, O. Investigación fitoquímico. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, 1988, 213p.
7. Martínez-Valverde, I; Periago, M. J. Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *ALAN*, 2000; 50:5-18.
8. Martínez-Flores, S.; Gonzales-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, M..J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 2002; 6: 271-278.
9. Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 1998; 56: 317-333,
10. Wollgast, J.; Anklam, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.*, 2000; 33: 423-427..
11. Dreosti, J.E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, New York, 2000;16: 692-694.
12. Häkkinen, S.; Heinonen, M.; Kärenlampi, H.; Ruuskanen, J., Törrönen, R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries: *Food Res. Int.*, 1999; 32: 345-353.
13. Ju, Z.; Bramlage, W.J. Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. *Postharvest Biol. Technol.*, 1999; 16:107-118.
14. Sotero, V; García de Sotero, D.E.; Velazco, E. Estabilidad del ácido ascórbico en pulpa deshidratada de camu camu (*Myrciaria dubia* HBK Mc Vaugh) a diferentes temperaturas. *Folia amazonica*. 2007; 16: 75-79..
15. Nunomura, S. Campos Fernández, A. Avaliação da atividade antioxidante dos frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (Myrtaceae). 29 Reunião anual da Sociedade Química Brasileira. 2003.
16. Rodrigues, R.B.; Papagiannopoulos, M.; Maia, J. G. S., Yuyama, Marx, F.:Antioxidant capacity of camu camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh] pulp. *Ernährung/Nutrition* 2006; 30: 357-362
17. Lebeau, J.; Furman, C.; Berner, J.L.; Dunez, P.; Teisser, E.; Cotelle, N. Antioxidant Properties of Di-Tert-Butylhydroxylated Flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 29:990-912,

18. Valls, J.; Lampreave, M.; Nadal, M.; Arola, L.; Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alimentación, equipos y tecnología*. 2000; 2: 119-124.
19. Asami, D.K; Hong, Y-J; Barret, D.; Mitchell, A. Comparison of the total Phenolic and ascorbic acid content of freeze – dried and air dried marjonberry,, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable. Agricultural Practices. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51:1237-1241.
20. Tomás – Barberán, F.; Gil, M.; Cremin, P.; Waterhouse, A.; Hess-Pierce, B.; Kader, A. HPLC -DAD.-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums. *J. Agric. Food. Chem.* 2001; 49.4748-4769
21. Vega, R. liofilización de pulpa de *Myrciaria dubia* HBK Mc Vaugjh, camu camu. *Folia Amazonica*. 2005;14: 51-56.
22. Zanatta, C.F.; Cuevas, E.; bobbio, P.W.; Mercadante, A. Determination of antochyanins from camu camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC_PDA, HPLC_MS and NMR. *J.Agric. food*, 2005; 53: 9531-9535
23. Ojeda, H. Los compuestos fenólicos de la uva. *Revista Enología*. 2007;4: 1-11.
24. Neiva, T.; Machado, M.; Hoehn, M.; Hermes; M.; Vituri; C.; Ferreria, J.; D'Amico, E. Evaluation of platelet aggregation in platelet concentrates: storage implications. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2003; 25: 207-212.