

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN CÁSCARA DE CAMU CAMU (*Myrciaria dubia*), GUINDA (*Prunus serotina*), TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea*) Y CARAMBOLA (*Averrhoa carambola* L.) CULTIVADAS EN PERÚ

*Ana María Muñoz Jáuregui^a, Fernando Ramos-Escudero^a, Carlos Alvarado-Ortiz Ureta^a, Benjamín Castañeda Castañeda^b, Frank Lizaraso Caparó^b

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el contenido de compuestos con actividad biológica, determinación de polifenoles totales, como la actividad antioxidante utilizando la eficiencia antirradical de los polifenoles frente a 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) radical, en las cáscaras de carambola, tomate de árbol, guinda, camu camu y su capacidad de secuestro de radicales libres producidos por el sistema ABTS/ABAP. Las muestras presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) según la prueba de Tukey estandarizada, en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante medido por su coeficiente de inhibición (IC_{50}). Estos resultados indican que la cáscara de camu camu presenta mayor contenido de polifenoles y capacidad antioxidante. Las muestras estudiadas resultan ser una buena fuente de antioxidantes sobre todo de compuestos fenólicos, cuyo uso podría ser adecuado en la formulación de alimentos funcionales.

Palabras clave: antioxidante, polifenoles, camu-camu, tomate de árbol, guinda, carambola.

EVALUATION OF COMPOUNDS WITH BIOLOGICAL ACTIVITY IN PEELS OF CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*), GUINDA (*Prunus serotina*), CARAMBOLA (*Averrhoa carambola* L.) AND TOMATE DE ARBOL (*Physalis peruviana*) CULTIVATED IN PERU

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the extracts of the peel of carambola, tomato tree, guinda, and camu camu for their content of compounds with biological activity, to determine the total polyphenols content, antioxidant activity using the 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) radical, and free radical scavenging capacity using the ABTS/ABAP system. The samples reported significant statistical difference ($p < 0,05$) for their total polyphenols content and antioxidant activity (IC_{50} values) according to the standardized Tukey's test. The studied samples appear to be a good source of antioxidants, especially phenolic compounds, whose use might be appropriate in the formulation of functional foods.

Key words: antioxidant, polyphenols, camu-camu, guinda, carambola, tomato tree.

^a Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. ^b Centro de Medicina Tradicional Andina. Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana. Universidad de San Martín de Porres. Av. Alameda del Corregidor N° 1531. La Molina, Lima12, Perú. E-mail: amariamj@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas durante su desarrollo normal y se incrementa su contenido en respuesta a las condiciones de estrés, tales como las infecciones, radiaciones UV y otros. Estos componentes están muy diversificados y, a su vez, derivan de la fenilalanina y tirosina. Las plantas pueden contener fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrosolubles y condensados, lignanos y ligninas (tabla 1).

En los alimentos, los polifenoles pueden contribuir al amargor, astringencia, color, sabor, olor y estabilidad oxidativa de los alimentos. En adición, tienen la capacidad de proteger la salud (Naczki y Shahidi, 2006)¹. Los polifenoles como antioxidantes ejercen su acción principal durante la fase de iniciación de un tumor, evitando el daño celular derivado del estrés oxidativo, lesión del DNA y favoreciendo la reparación del DNA dañado, la estabilidad de la membrana celular y la función inmunitaria. Además, estas sustancias poseen una gran variedad de aspectos biológicos que pueden incidir en cada una de las etapas de la carcinogénesis (Boticario, 2005)².

El material de desecho de las frutas está principalmente constituido por la cáscara y semillas; la cáscara de los frutos son principales fuentes de antioxidantes naturales (Rincón *et al.*, 2005)³. Los antocianos están en las vacuolas de las células de la epidermis y subepidermis de las pieles de una variedad de manzanas (Alonso-Salces *et al.*, 2001)⁴.

Las cáscaras o pieles de las frutas contienen una variedad de ácidos hidroxycinámicos (HCA), flavan-3-oles (monoméricos y oligoméricos), flavonoles y sus conjugados, dihidroxichalconas y procianidinas (Rodríguez *et al.*, 2006)⁵.

PARTE EXPERIMENTAL

Las muestras de los frutos de carambola, tomate de árbol, guinda y camu-camu, fueron colectadas del mercado local (Mercado Central de Lima), en el periodo de abril-mayo 2008. Se tuvo en cuenta la apariencia general del fruto, como color, textura y ausencia de daños externos.

Preparación de la muestra

Las frutas fueron lavadas con agua destilada, separando partículas de polvo adheridas a la fruta. Inmediatamente, se procedió a quitar la piel de los recursos los cuales fueron triturados mediante licuación. Los extractos metanólicos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos.

Determinación de flavonoides por HPLC

Las condiciones del análisis por HPLC fueron previamente descritas por Zavaleta *et al.*⁶. La cuantificación individual de los ácidos fenólicos y flavonoles fue recogida en función a sus respectivas áreas de los picos registrados a 370 nm.

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

La separación fue corrida a un flujo de 1000 µL min⁻¹ 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 la gradiente utilizada fue: 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.

Determinación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles fue determinado acondicionando al método descrito por Ivanova *et al.* (2005)⁷. Se prepararon diferentes concentraciones de las muestras (10 a 250 mg/mL); se

tomó una alícuota de 150 μ L (tres réplicas), que fueron introducidas en tubos, fue añadido 750 μ L de Folin-Ciocalteu; después de 5 minutos de reacción se añadió 600 μ L de carbonato 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 (4,5cm x 1,0cm 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.

Determinación de la capacidad antioxidante

Se usó el método descrito por Brand-Williams *et al.*, (1995)⁸, El radical DPPH fue disuelto en etanol al 95%; los análisis se llevaron a cabo sobre materia fresca; las reacciones se corrieron por triplicado. El método usado está basado en la reducción de una solución alcohólica de DPPH· en presencia de un antioxidante donador de hidrógeno (AH). La cantidad de DPPH· remanente después de un tiempo determinado, es inversamente proporcional a la actividad antirradical de la muestra. Se calculó la cantidad de antioxidantes en la muestra necesarios para reducir la concentración inicial de radical DPPH en un 50%. Los valores de eficiencia de concentración (EC_{50}) se realizaron a los 10 minutos de reacción (Schwarz *et al.*, 2001)⁹; la disminución de las absorbancias fue registrada a intervalos de 1 minuto. Se usó 515 nm como la longitud de onda máxima. La concentración del radical DPPH, en el medio de la reacción, se calculó mediante regresión no lineal a partir de una curva de calibración obtenida por diferentes concentraciones del extracto vs la concentración del DPPH radical.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un diseño completamente randomizado (DCR), empleando un nivel de significancia de $p < 0,05$, seguido de una prueba de Tukey estandarizada (HSD) para la variable dependiente. Los cálculos se realizaron utilizando un programa estadístico System Analysis Statistic (SAS) para windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de flavonoides por HPLC

En la tabla 2 se muestra el contenido de flavonoides de las cáscaras estudiadas. Los cromatogramas correspondientes fueron recogidos a 370 nm; el contenido de flavonoides difiere de cada especie.

Se muestra mayor contenido de rutina, ácidos cafeico y clorogénico en la cáscara de tomate de árbol, como se aprecia en la tabla 1.

Tabla 1. Contenido de flavonoides de las cáscaras en estudio

Recurso	Flavonoides (mg/kg muestra fresca)						
	Clor	caf	rut	Fer	mor	quer	kaemp
Cáscara camu-camu	17,10	17,05	nd	0,94	80,89	7,89	nd
Cáscara guinda	8,69	nd	6,19	14,23	nd	5,34	nd
Cáscara carambola	18,28	1,43	0,42	12,90	0,19	28,59	0,24
Cáscara tomate árbol	416,04	20,26	69,11	2,51	3,69	3,82	0,47

Abreviatura: clor, ácido clorogénico; caf, ácido cafeico; rut, rutina; fer, ácido ferúlico; quer, quercetina; kaemp, kaempferol.

En las figuras 1, 2, 3, 4, 5, se muestran los cromatogramas correspondientes al estándar y muestras en estudio.

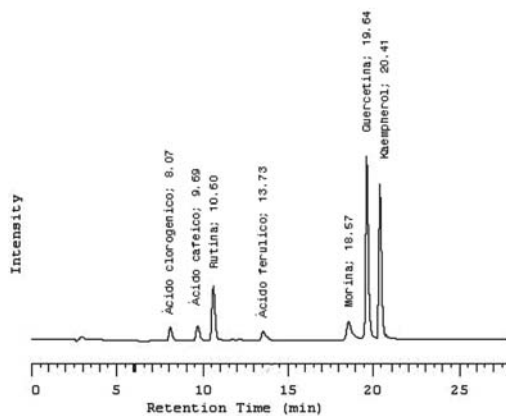


Figura 1. Cromatograma recogido a 370 nm de los estándares de flavonoides

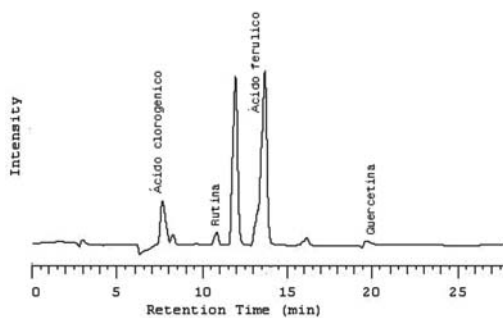


Figura 2. Cromatograma recogido a 370 nm de cáscara de guinda

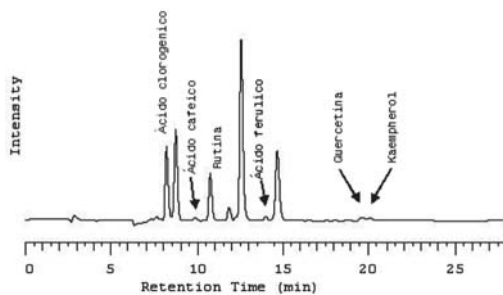


Figura 3. Cromatograma recogido a 370 nm de cáscara de tomate de árbol

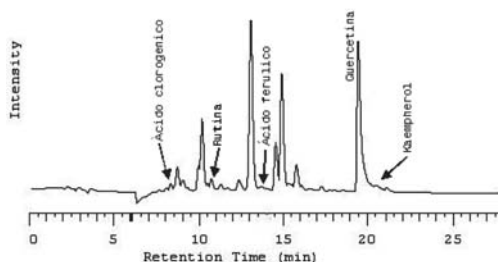


Figura 4. Cromatograma recogido a 370 nm de cáscara de carambola

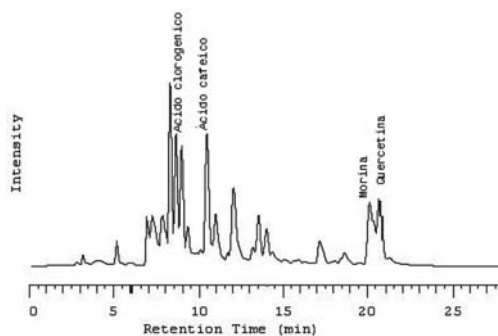


Figura 5. Cromatograma recogido a 370 nm de cáscara del camu-camu.

Determinación de la capacidad antioxidante y polifenoles totales

En la tabla 3 se muestra el valor del coeficiente de inhibición y el contenido de polifenoles totales.

Tabla 2. Contenido de flavonoides de las cáscaras en estudio

Recurso	Indicadores del recurso	
	IC ₅₀ (mg/mL)	Polifenoles totales (mg GAE/100g)
C. camu-camu	3,22±0,04 ^a	2293,57±25,70 ^a
C. guinda	8,12±0,16 ^b	735,99±15,05 ^d
C. tomate árbol	11,59±0,26 ^c	846,95±21,17 ^c
C. carambola	43,77±0,25 ^d	999,38±39,12 ^b

Valores expresados corresponden a n = 3 repeticiones. Las letras (a – d), unidas a promedios indican diferencia estadística a p<0,05 según el test de Tukey.

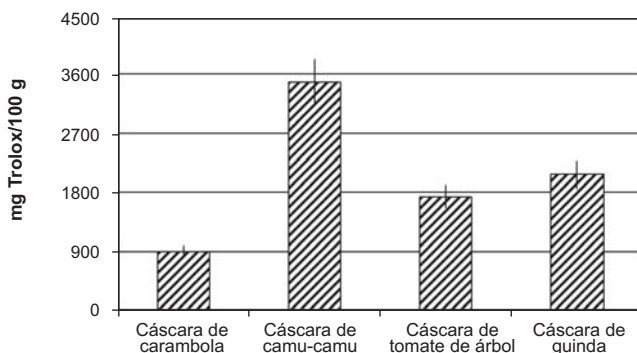


Figura 6. Capacidad antioxidante de algunas cáscaras en un sistema ABTS/ABAP, los resultados expresados como mg trolox equivalente/100 g.

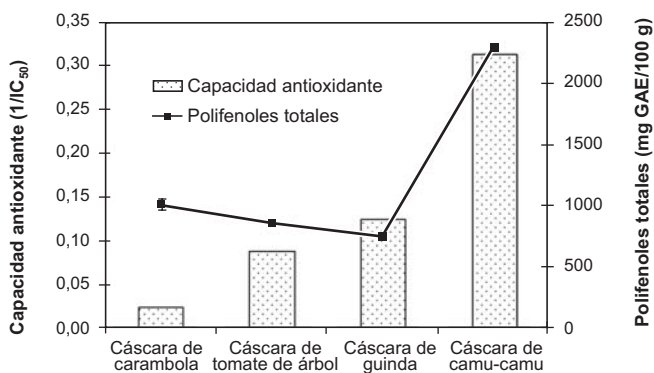


Figura 7. Capacidad antioxidante de algunas cáscaras en un sistema DPPH y contenido de polifenoles totales en mg GAE/100 g de muestra.

En la figura 6 se muestra la capacidad antioxidante de las cáscaras frente a un sistema TRAP (ABTS/ABAP); la cáscara de camu-camu presenta un mayor secuestro de los radicales ABTS que la cáscara de guinda, tomate de árbol y carambola. Esta misma relación se observa frente al sistema DPPH. Posiblemente esta potencia antioxidante que ofrece la cáscara de camu-camu proceda del contenido de ácido ascórbico.

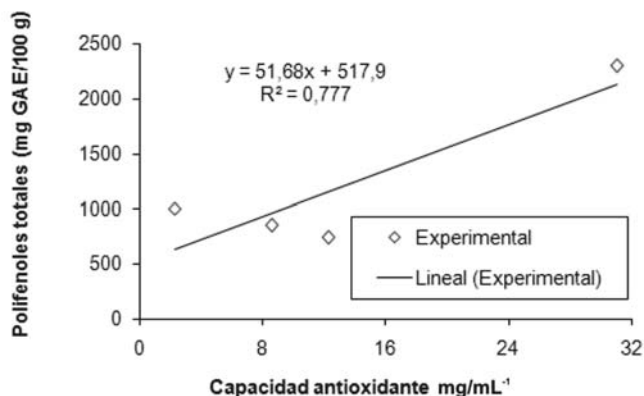


Figura 8. Correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales.

Estudios realizados por Rincón *et al.*, (2005)³ en harinas de cáscaras de naranja, mandarina y toronja, tuvieron una actividad antioxidante significativa, especialmente el extracto de cáscara de mandarina, que presentó valores menores de $EC_{50}=1,92$ g en b. s. /g DPPH, un mayor contenido de polifenoles totales (76,4) g GAE/kg y una mayor eficiencia antirradical.

Asimismo, Jiménez *et al.* (2001)¹⁰ obtuvieron valores comparables al obtenido para residuos de cáscara de guayaba (IC_{50} 1,92 y un contenido de polifenoles de 58,7g GAE/kg).

El análisis de regresión lineal P-valor en la tabla de Anova es mayor o igual a 0,10; no hay una relación estadísticamente significativa entre Col_2 y Col_1 en el 90% o superior nivel de confianza.

La tabla 2 nos muestra los valores obtenidos de polifenoles totales y CI_{50} de las cáscaras en estudio donde el camu-camu presenta mayor contenido de polifenoles totales y mayor capacidad de inhibición del DPPH. En la gráfica 7 establecemos una relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles, donde R-cuadrado estadístico indica que la relación entre capacidad antioxidante y polifenoles totales presenta un valor de 77,7718% (gráfica 8). Asimismo, el coeficiente de correlación es igual a 0,881883, lo que expresa una moderada relación entre las variables.

Mientras Rincón *et al.* (2005)³ mostraron, en el análisis de regresión lineal del secuestro o barrido del radical DPPH· por los extractos de las harinas de cáscaras de naranja, mandarina y toronja, una correlación estadísticamente significativa entre IC_{50} y el contenido de polifenoles totales ($r=-0,9780$ $p<0,05$).

El camu-camu, la carambola, tomate de árbol y la guinda contienen otros componentes tales como el ácido ascórbico y carotenoides que puede influir en su potencial antioxidante.

CONCLUSIONES

- La cáscara de tomate de árbol presenta mayor contenido de ác. clorogénico, rutina y ác. cafeico en relación a las muestras analizadas.
- La cáscara de camu-camu presenta mayor contenido de polifenoles totales que las cáscaras de guinda, tomate de árbol y carambola.

- Los métodos de DPPH y ABTS/ABAP coinciden que mayor capacidad antioxidante presenta la cáscara de camu-camu seguida por las cáscaras de guinda, tomate de árbol y finalmente carambola.
- La cáscara de camu-camu presenta una mayor eficiencia como antioxidante que se relaciona con el mayor contenido de polifenoles presentado.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Universidad de San Martín de Porres por la ayuda financiera recibida en la ejecución de la investigación y al *Ph.D.* Jaime A. Yáñez por el apoyo brindado en la publicación de este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Naczki, M.; Shahidi, F. Phenolics in cereal, fruit and vegetables: Occurrence extraction and analysis. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 1523-1542, 2006.
2. Boticario, B.C. ¿Una alimentación sana puede prevenir el cáncer? *Anales de la Real Academia de Farmacia*, v. 71, p. 609-633, 2005.
3. Rincón, A.; Vásquez, M.; Padilla, F. Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 55, p. 305-310, 2005.
4. Alonso-Salces, R.M.; Korta, E.; Barranco, A.; Berrueta, L.A.; Gallo, B.; Vicente, F. Determination of polyphenolic profiles of basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 3761-3767, 2001.
5. Rodríguez, M.R.; Picinelli, L.A.; Suárez, V.B. Phenolic profile of Asturias (Spain) natural cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 120-124, 2006.
6. Zavaleta, J; Muñoz, A.M.; Blanco, T.; Alvarado, C.; Loja, B. Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Revista Horizonte Médico*, v. 2, p.29-38, 2005.
7. Ivanova, D.; Gerova, D.; Chervenkov, T.; Yankova, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology*, v. 96, p. 145-150, 2005.
8. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v. 28, p. 25-30, 1995.
9. Schwarz, K.; Bertelsen, G.; Nissen, L.R.; Gardner, P.T.; Heinonen, M.I.; Hopia, A.; Huynh-BA, T.; Lambelet, P.; McPhail, D.; Skibsted, L.H.; 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. *European Food Research Technology*, v. 212, p. 319-328, 2001.
10. Jiménez-Escrig, A.; Rincón, M.; Pulido, R.; Saura-Calixto, F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 5489-5493, 2001.