

## ANTOCIANINAS, POLIFENOLES, ACTIVIDAD ANTI-OXIDANTE DE SACHAPAPA MORADA (*Dioscorea trifida* L.) Y EVALUACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN EN SUERO HUMANO

Fernando Ramos-Escudero<sup>1\*</sup>, Ana María Muñoz<sup>1</sup>, Carlos Alvarado-Ortiz Ureta<sup>1</sup>,  
Jaime A. Yáñez<sup>2</sup>

### RESUMEN

El contenido total de antocianinas y polifenoles fue determinado por espectrofotometría. La actividad anti-oxidante de los pigmentos extraídos de *Dioscorea trifida* L, fue evaluada utilizando diferentes test de anti-oxidantes, incluyendo, secuestro de radical libre (DPPH<sup>•</sup>, y ABTS<sup>•+</sup>), así como secuestro del radical anión superóxido. La actividad anti-oxidante *in vitro* de los extractos de *Dioscorea trifida* L sobre la peroxidación lipídica en suero humano fue evaluada a diferentes concentraciones. El mayor porcentaje de inhibición (66,7%) de peroxidación de lípidos se obtuvo a la concentración de extracto de *Dioscorea trifida* L de 2,06 mg/mL. El coeficiente de inhibición al 50% fue de 1,824 mg/mL. Los pigmentos extraídos de la sachapapa morada son colorantes naturales que exhiben excelente actividad anti-oxidante y que ofrecen el potencial de ser beneficiosos para la salud y que pueden ser aplicados en las áreas alimenticias y de salud.

**Palabras clave:** *Dioscorea trifida* L, antocianinas, polifenoles, actividad anti-oxidante, malondialdehído, suero humano

## ANTHOCYANINS, POLYPHENOLS, ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PURPLE SACHAPAPA (*Dioscorea trifida* L.) AND EVALUATION OF LIPID PEROXIDATION IN HUMAN SERUM

### ABSTRACT

The total content of anthocyanins, total polyphenols were determined spectrometrically. The anti-oxidant activity of the *Dioscorea trifida* L extracted pigments was evaluated using different anti-oxidant assays including: free radical scavenging (DPPH<sup>•</sup>, and ABTS<sup>•+</sup>), as well as superoxide anion radical scavenging. The *in vitro* anti-oxidant activity of *Dioscorea trifida* L extracts against the lipidic peroxidation in human serum was evaluated at different concentrations.

The largest inhibition percentage (66,37%) was achieved at the extract concentration of *Dioscorea trifida* L of 2,06 mg/mL. The inhibition coefficient to 50% (IC<sub>50</sub>) was 1,824 mg/mL. The pigments extracted from purple sachapapa are natural colorants that exhibit excellent anti-oxidant activity and offer the potential to be beneficial for health and that could be applied in the food and health science fields.

---

\* Corresponding author

E-mail address: frescudero4711@yahoo.es (Ramos-Escudero F). Tel.: 0051-1-3652300

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

<sup>2</sup> Department of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Merck & Co., Inc. Merck Research Laboratories, Kenilworth, NJ 07033, USA

**Key words:** *Dioscorea trifida* L, anthocyanins, polyphenols, anti-oxidant activity, malondialdehyde, human serum.

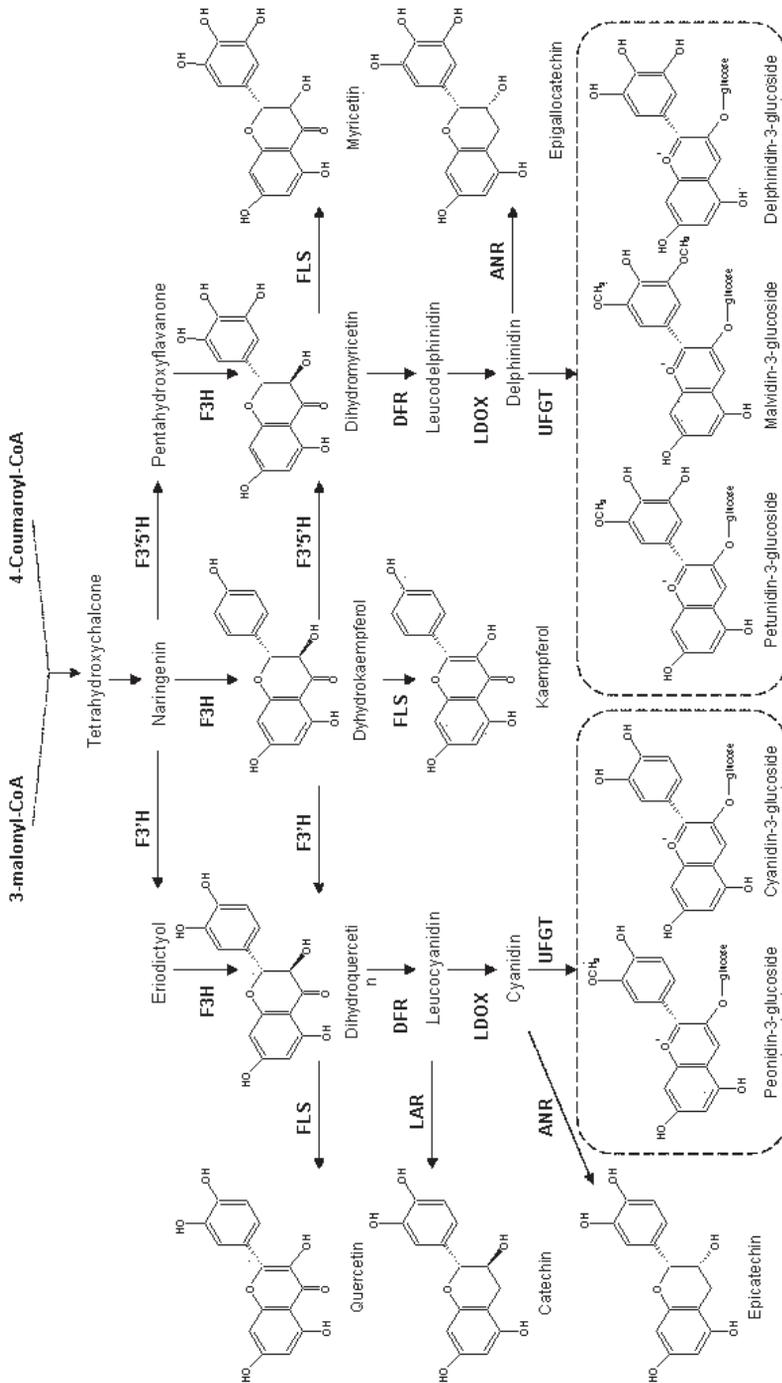
## INTRODUCCIÓN

La región amazónica posee una gran cantidad de recursos; dentro de éstos se encuentra la sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L). Tradicionalmente es usada por los pobladores de la selva, pero también es utilizada para la alimentación de cerdos por su valor nutricional. *Dioscorea trifida* L, conocida como sachapapa morada en la zona del Alto Huallaga, es un tubérculo perteneciente a la familia de las *Dioscoreaceae*. Esta planta nativa de América tropical es muy apreciada por su sabor y fina textura. Los tubérculos son de mediano tamaño y según la variedad son blancos hasta morado intenso. La familia de las *Dioscoreaceae* agrupa seis géneros diferentes: *Stenomeris*, *Avetra*, *Trichopus*, *Rajania*, *Tamus* y *Dioscorea*. Desde el punto de vista de la alimentación humana el más importante es el género *Dioscorea*, el cual comprende más de 600 especies e incluye todas las económicamente importantes. Actualmente, la especie asiática *Dioscorea alata* ocupa la mayor superficie cultivada en los trópicos, y le siguen en importancia *Dioscorea cayenensis*, *Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea trifida* y *Dioscorea esculenta*<sup>1</sup>.

Las plantas sintetizan y acumulan una gran cantidad de metabolitos secundarios tales como los polifenoles en respuesta al estímulo y estrés fisiológico. Ellos son sintetizados a partir de fenilalanina por la vía del shikimato. Estos compuestos fenólicos juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina<sup>2</sup>. Las antocianinas son sintetizadas por la vía de los fenilpropanoides. En la figura 1 se muestra la biosíntesis de las antocianinas a partir de 3-malonil-CoA y 4-coumaroil-CoA<sup>3</sup>.

Las antocianinas son pigmentos naturales los cuales son responsables del color azul, púrpura, violeta y rojo de las frutas, vegetales, cereales, tubérculos, granos y flores, los cuales son una de clases de flavonoides con mayor actividad anti-oxidante<sup>4</sup>. Además, en la naturaleza, hay más de 200 compuestos que pertenecen a este grupo, usualmente están unidos a residuos de sacáridos: glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa como 3-glicósidos o 3,5-diglicósidos, mientras que raras veces se encuentran como agluconas.

La peroxidación de lípidos expuestos al oxígeno es responsable del daño a los tejidos *in vivo*; los cuales pueden producir cáncer, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis y envejecimiento. Los efectos deletéreos se consideran atribuidos a los radicales libres (ROO<sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup>), producidos durante la formación de peróxidos a partir de ácidos grasos con enlaces dobles interrumpidos por metileno; es decir, los enlaces presentes en los ácidos grasos poli-insaturados naturales<sup>5</sup>. Como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres que generalmente son eliminados por los receptores endógenos pero que también pueden interactuar con lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. Dada la naturaleza inestable de los productos de la peroxidación lipídica resulta difícil determinar la magnitud de dicha peroxidación. La peroxidación lipídica juega un papel importante en la patogénesis y gravedad de diversas enfermedades<sup>6</sup>. El malondialdehído (MDA) es el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación y también el más estudiado<sup>6</sup>. Malondialdehído (MDA) es un subproducto natural de la peroxidación de lípidos y síntesis de prostaglandinas, y es muy activo al inducir daño al ADN ya que forma aductos de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) y 8-Oxo-2'-desoxiadenosina (8-oxodAd) al reaccionar con el ADN<sup>7</sup>. La peroxidación lipídica consiste en una reacción en cadena la cual proporciona un suministro continuo de radicales libres.



**Figura 1.** Ruta de la biosíntesis de flavonoides y antocianinas. El nombre de las enzimas está abreviado como sigue: ANR, antocianidina reductasa; CHI, chalcona isomerasa; CHS, chalcona sintasa; DFR, dihidroxiflavonol 4-reductasa; F3H, flavanon 3-hidroxiylasa; FLS, flavonol sintasa; LAR, leucoantocianidina reductasa; LDOX, leucoantocianina dioxygenasa; UFGT, UDP-glucosa: flavonoide 3-O-glucosiltransferasa.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Muestra

Los tubérculos de sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L) fueron obtenidos del valle del Alto Huallaga, Distrito de Rupa-Rupa (Tingo María), Perú, ubicado al margen derecho del río Huallaga sobre los 660 msnm a 9° 09' Latitud Sur y a 75° 53' Longitud Oeste.

### Químicos

Ácido gálico, Folin-Ciocalteu's, catequina, quercetina, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azo-bis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (ABAP), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), molibdato de amonio, pirogalol, fueron obtenidos de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Ácido clorhídrico, metanol grado HPLC, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido tricloroacético obtenidos de Merck KGaA, Alemania).

### Tratamiento de la muestra

La deshidratación de la sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L) se realizó según el método descrito por Rincón *et al.*<sup>8</sup>, los tubérculos fueron pelados para eliminar gran parte del mucílago. Posteriormente se cortaron en rodajas finas y se deshidrató en una estufa a 50°C por 24 horas. Las rodajas del tubérculo deshidratados fueron sometidas a una molienda y luego se hizo pasar por un tamiz para homogenizar las partículas con un tamaño máximo de 600 µm.

### Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se realizó acondicionando el método propuesto por Gülçin *et al.*<sup>9</sup>. Se utilizó ácido gálico como estándar de referencia. El extracto (50 mg/mL) se hizo reaccionar con 1,0 mL de Folin – Ciocalteu y luego se mezcló vigorosamente. Tres minutos más tarde se añadió 3 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2%. Luego se llevó a baño María a 50°C por 1 min. Las absorbancias fueron registradas a 760 nm.

### Antocianinas

El contenido total de antocianinas en la sachapapa se determinó usando el método de pH-diferencial descrito por Kirca y Cemeroglu<sup>10</sup>. Los espectros del extracto (100 mg/mL) fueron registrados entre 510 y 550 nm, en buffers a pH=1 y pH=4,5. Los cálculos fueron en base a cianidina-3-glucósido con un peso molecular de 445,2; la absorbancia molar fue 29600 mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>. Se tomaron las máximas absorbancias a 520 nm.

### Flavonoides totales

El ensayo se realizó acondicionando el método propuesto por Viswanathan *et al.*<sup>11</sup>, que consistió en preparar una solución de molibdato de amonio al 0,02 % en metanol al 50% conteniendo 0,1 N de ácido sulfúrico. Se usó quercetina como estándar de referencia. El extracto a una concentración de 1 mg/mL se hizo reaccionar con la solución de molibdato de amonio. La reacción fue 1:1, para llegar a un volumen final de 3 mL. Las absorbancias se registraron a 430 nm.

### Taninos

La medición de taninos se realizó por el método propuesto por Price y Butler<sup>12</sup>, que consistió en preparar una concentración de 200 mg/mL de sachapapa pulverizada al que se le añadió 3,0 mL de 0,1 M FeCl<sub>3</sub> en 0,1 N HCl. Inmediatamente después se añadió 3,0 mL de 0,008 M K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Luego de 10 minutos de reacción se tomó la lectura a 720 nm, teniendo como estándar de referencia ácido gálico.

### Actividad anti-oxidante

#### Ensayo de DPPH

La actividad de secuestro del radical DPPH<sup>•</sup> (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), fue determinado espectrofotométricamente; el cambio de color de púrpura a amarillo fue monitoreado a 515 nm. El orden de la reacción fue (extracto – DPPH<sup>•</sup>) y se realizó con el extracto a las siguientes concentraciones: 1, 3, 5, 7, 10 mg/mL. Se utilizó el método propuesto por Brand-Williams *et*

*al.*<sup>13</sup> y Yokozawa *et al.*<sup>14</sup> que consistió en hacer reaccionar 50  $\mu$ L del extracto con 950  $\mu$ L de DPPH<sup>\*</sup> a 100  $\mu$ M.

#### **Ensayo de ABTS/ABAP**

Las mediciones del potencial anti-oxidante por radical-trapping (TRAP) fue desarrollado por el ensayo ABAP/ABTS, usando el método descrito por Overveld *et al.*<sup>15</sup>. Los radicales ABTS<sup>\*\*</sup> fueron generados por descomposición termal del compuesto soluble en agua, 2,2'-azobis(2-amidopropano) hidrocloreto (ABAP), generando un compuesto de color verde debido a la formación estable del radical catiónico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) ABTS<sup>\*\*</sup>. La prueba se realizó con el extracto a las siguientes concentraciones: 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/mL. El producto de oxidación es medido a 414 nm.

#### **Ensayo de anión superóxido**

La capacidad del extracto de sachapapa para secuestrar el anión superóxido se evaluó a través del método de inhibición de la auto-oxidación del pirogalol. Se acondicionó los métodos descritos por Bermúdez-Camps *et al.*<sup>16</sup> y Jiao *et al.*<sup>17</sup>. El medio de reacción contenía un volumen final de 3 mL de las siguientes concentraciones finales: 1000  $\mu$ L Tris-HCl de 50 mM a pH=8,2; 1000  $\mu$ L EDTA a 1 mM, 500  $\mu$ L de muestra y 500  $\mu$ L de pirogalol a 1 mM. La prueba se realizó con el extracto a las siguientes concentraciones: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 25, 50 mg/mL. Los valores de absorbancia se registraron a 420 nm a intervalos de 60 segundos durante 30 minutos.

#### **Acción de los antocianos sobre la peroxidación de lípidos**

La peroxidación de lípidos es la oxidación directa en una reacción entre radicales oxigenados y lípidos para formar radicales lipídicos intermediarios. El ensayo de TBARS fue acondicionado basado en los métodos descritos por Sandoval *et al.*<sup>18</sup> y Estepa *et al.*<sup>6</sup>. Las muestras de sangre se extrajeron de voluntarios con buen estado de salud, en general, con edad entre 20 a 40 años (hombres, con una edad promedio de 27 años y una desviación típica de 3,36) y con un rango de peso entre 70 y 86 kg (peso promedio de 80 kg y una desviación típica de 4,49). La sangre de cada voluntario fue extraída en ayunas, se les indicó a los voluntarios que la última comida que realizaran fuera entre la 6 y 9 de la noche del día anterior, y las muestras se tomaron entre las 9 y 10 de la mañana del día siguiente. Paralelamente se distribuyeron alícuotas de sangre en tubos sin anticoagulante. Se trabajó con el suero, induciendo la oxidación y se observó el efecto inhibidor de las diferentes concentraciones de sachapapa. Se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos, a temperatura ambiente y en el suero resultante se realizó el método TBARS. El método consistió en añadir en tubos de borosilicato (resistente al calor) los siguientes volúmenes para llegar a concentraciones finales y volumen final de 3,4 mL en el siguiente orden: suero humano 600  $\mu$ L, 700  $\mu$ L de 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 700  $\mu$ L  $\text{FeCl}_3$  100  $\mu$ M, 700  $\mu$ L ácido ascórbico 100  $\mu$ M y 700  $\mu$ L de extracto de sachapapa. Agregar a cada tubo de reacción un volumen de muestra de una concentración 4,85X (concentración final). Para el control usar  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Para el blanco agregar 700  $\mu$ L de suero humano y 1300  $\mu$ L de  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Las muestras fueron incubadas a 37C en baño María por 20 minutos. Posteriormente al tiempo de incubación, la reacción de peroxidación fue neutralizada por la adición de 1000  $\mu$ L de 5,5% de ácido tricloroacético (TCA), a 4C y 1000  $\mu$ L de 2% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Las soluciones fueron luego calentadas a 100C por 20 min. Luego las muestras fueron enfriadas durante 10 minutos en agua fría y centrifugada a 2000 rpm durante 10 min para remover proteínas precipitadas. La prueba se realizó con el extracto a las siguientes concentraciones: 0,2; 0,8; 1,5; 2,0 mg/mL. El color generado por la reacción del aducto MDA - TBA fue monitoreado a un ancho de banda de 540 nm.

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA), seguido de prueba de Tukey HSD con  $\alpha = 0,01$ . Este tratamiento se llevó a cabo utilizando el software SAS (Statistical Analysis System).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Contenido de antocianinas, polifenoles y flavonoides totales

Las estimaciones fueron basadas sobre reacciones con sustratos específicos o ensayos dedicados para mediciones de actividad anti-oxidante de un tipo particular de componentes. Estos resultados incluyen polifenoles totales, antocianinas, flavonoides, y taninos, como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Polifenoles totales, flavonoides, taninos y antocianinas en sachapapa morada.

Características	Estándar	% CV	Contenido (mg equivalente/100g dw) <sup>a</sup>
Polifenoles totales <sup>(1)</sup>	Ácido gálico	1,59	166,10 ± 1,52
Flavonoides <sup>(2)</sup>	Quercetina	16,88	27,63 ± 2,69
Taninos <sup>(3)</sup>	Ácido gálico	1,52	9,62 ± 0,084
Antocianinas	Cianidina 3-glucósido	11,77	21,59 ± 1,47

<sup>a</sup> Datos expresados en media ± SEM de n = 3, CV = coeficiente de variabilidad entre repeticiones.

<sup>(1)</sup>  $Y = 0,007X + 0,0263$ ,  $R^2 = 0,9995$ ; <sup>(2)</sup>  $Y = 0,0151X$ ,  $R^2 = 0,9974$ ; <sup>(3)</sup>  $Y = 0,0753X - 0,0117$ ,  $R^2 = 0,9992$ .

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 1, se observa que el contenido de polifenoles totales (analizado por el método de Folin-Ciocalteu) en el extracto metanólico al 50% de sachapapa morada, fue de 166,10±1,52 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de muestra seca, con un %CV de 1,59; lo que indica que no existe mucha variabilidad entre repeticiones. El contenido de polifenoles en otros alimentos, como cebolla roja, es de 300 mg/100g, zanahoria 60 mg/ 100g, avena 30 mg/ 100g, centeno 130 mg/ 100g, cebada 40 mg/ 100g, tomate 200 mg/ 100g<sup>19</sup>.

El contenido de flavonoides fue de 27,63 ± 2,69 mg equivalentes de quercetina (QE)/ 100 g de muestra seca. Cabe indicar que los flavonoides reaccionan con metales para formar complejos con molibdeno, antimonio y bismuto; esto permite la substitución del grupo hidroxilo del C-3 en el anillo C del flavonoide (componentes que presentan 15 – carbonos en su estructura con grupos hidroxilo en diferentes posiciones de los 3 anillos), el complejo flavonoide – metal muestra la especificidad que presentan estas moléculas para realizar saltos bacteriocromicos<sup>11</sup>.

Los taninos están comúnmente divididos en taninos condensados y principalmente son oligómeros (e.g., monómeros, dímeros y trímeros) y polímeros de flavan-3-ols (derivados de catequinas), también conocidos como proantocianidinas, y los taninos hidrolizables son galotaninos y elagitaninos que poseen un núcleo central de alcohol polihídrico, tal como la glucosa y los grupos hidroxilo, los cuales están esterificados cualquiera de los dos particularmente<sup>20</sup>. El contenido de taninos encontrados en la sachapapa morada fue de 9,62 ± 0,084 mg GAE/100 g.

Por otro lado, el contenido de antocianinas en la sachapapa morada está en el orden de 21,59 ± 1,47 mg de cianidina 3-glucósido /100 g de muestra seca. Cabe indicar que las antocianinas, químicamente son glucósidos de núcleo flavilium polihidrohilados y/o metoxilados. El

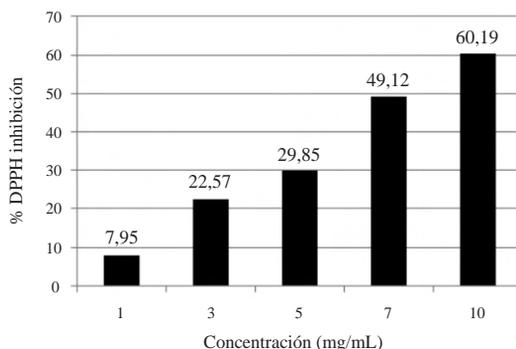
núcleo flavilium comprende un anillo A que es derivado del floroglucinol encadenado a un anillo pirilo, el cual está unido a un anillo fenólico B<sup>21</sup>. Otras fuentes de antocianinas, como el arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) presenta alrededor de 720 mg/100 g<sup>4</sup>, la zarzamora (*Rubus fruticosus*) 4974 mg/100 g<sup>17</sup>, la frambuesa negra (*Rubus occidentalis* L) 952,4 mg/100 g, frambuesa roja (*Rubus idaeus* L) 391,8 mg/100 g y fresa (*Fragaria ananassa* D) 315,2 mg/100 g<sup>22</sup>.

### Actividad anti-oxidante

La evaluación de la actividad anti-oxidante se realizó de acuerdo a los siguientes ensayos: Ensayo de secuestro del radical DPPH<sup>•</sup>, ensayo de secuestro del radical ABTS<sup>•+</sup> y ensayo de secuestro del radical superóxido.

#### Ensayo DPPH

En la figura 2, se muestra los resultados de la capacidad de secuestro de las diferentes concentraciones de sachapapa morada sobre el radical DPPH, durante 30 minutos de reacción, monitoreado a 515 nm de longitud de onda. Se monitorearon cinco concentraciones (1, 3, 5, 7, 10 mg/mL); estadísticamente los valores de DPPH<sup>•</sup> remanente son diferentes a un nivel de significancia de  $p < 0,01$  mediante la prueba de Tukey.

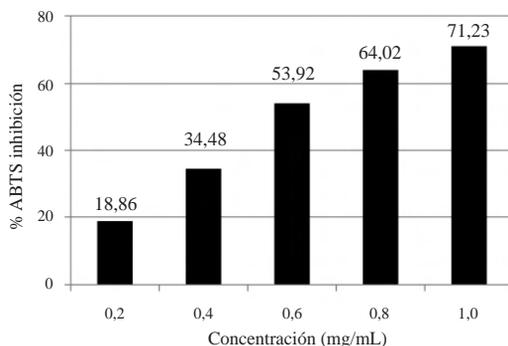


**Figura 2.** Actividad de secuestro de radical DPPH, por diferentes concentraciones del extracto de sachapapa morada.

En la tabla 2 observamos el coeficiente de inhibición IC<sub>50</sub> en función al radical DPPH. Otra especie como *Decalepis hamiltonii* Wight y Arn, que es una raíz, presenta un IC<sub>50</sub> de 0,29 en extracto acuoso y 0,36 en extracto metanólico. Sin embargo, la velocidad de secuestro del extracto de sachapapa morada es 0,029; otros recursos como la vitamina E (á-tocoferol) presenta 1,87, *Aronia melanocarpa* Elliot 0,70, BHA 0,42, *Prunus spinosa* L 0,20, BTH 0,05, *Fragaria X ananassa* Duch 0,03 y *Sambucus nigra* L 0,008 mg/mL<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, respectivamente<sup>23</sup>.

#### Ensayo ABTS

Las mediciones de la actividad de secuestro del catión ABTS<sup>•+</sup> por las diferentes concentraciones del extracto de sachapapa morada se observan en la figura 3, y en la tabla 3, observamos que la sachapapa presenta buena habilidad para atrapar a este radical (potencial anti-oxidante radical-trapping - TRAP), y que es mucho mayor que el ácido úrico, hipotaurina y á-tocoferol, pero mucho menos que el ácido ascórbico y la tirosina<sup>15</sup>. En la tabla 3 se muestra el valor de TEAC determinado mediante el ensayo ABTS<sup>•+</sup>. El coeficiente de inhibición IC<sub>50</sub> para este radical se muestra en la tabla 2.



**Figura 3.** Actividad de secuestro de radical ABTS, por diferentes concentraciones del extracto de sachapapa morada

**Tabla 2.** Valores de IC<sub>50</sub>, medidos por diferentes métodos

Método/radical	Parámetros cinéticos	
	IC50 (mg/mL)	Modelo matemático
DPPH	7,44	Y = 102,12e-0,0988X
ABTS	0,54	Y = 83,87X+0,9625
Anión superóxido	13,67	Y = 99,319e-0,0502X
TBARS	1,82	Y=27,0037+exp(-1,0703+2,3050 X)

**Tabla 3.** Valores de TEAC determinados mediante ABAP/ABTS

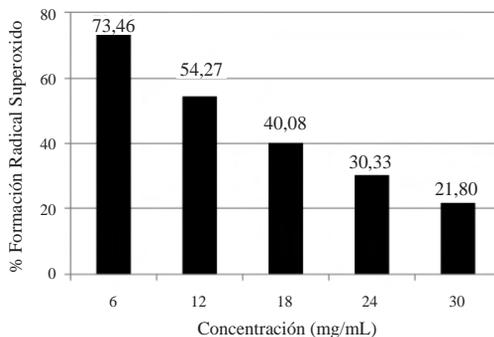
Recurso/componentes	Concentración (mg/mL)	TEAC (300 s)
Tirosina **	0,02	1,48
Ácido ascórbico **	0,02	1,34
Extracto de sachapapa *	1,00	1,23
Ácido úrico **	0,02	0,89
á-tocoferol **	0,04	0,80
Hipotaurina **	0,01	0,56

\* Dato experimental obtenido de interpolar a la curva ABTS<sup>+</sup> vs Trolox (Y = 49,766X - 1,5722), R<sup>2</sup> = 0,9979.

\*\* Datos obtenidos de Overveld *et al.* (2000).

### Ensayo anión superóxido

El anión superóxido es un radical libre inicial que juega un rol importante en la formación de otras especies reactivas del oxígeno (EROS) como peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo u oxígeno singlete en un sistema vivo. Éstos, a su vez, pueden reaccionar con óxido nítrico y formar peroxinitrito, el cual puede generar componentes tóxicos, tales como el radical hidroxilo y el dióxido nítrico<sup>17</sup>. En la figura 4, se muestra la capacidad de secuestro por las diferentes concentraciones del extracto de sachapapa morada sobre el radical anión superóxido usando un sistema de autooxidación de pirogalol, respectivamente. El coeficiente de inhibición IC<sub>50</sub>, se muestra en la tabla 2.

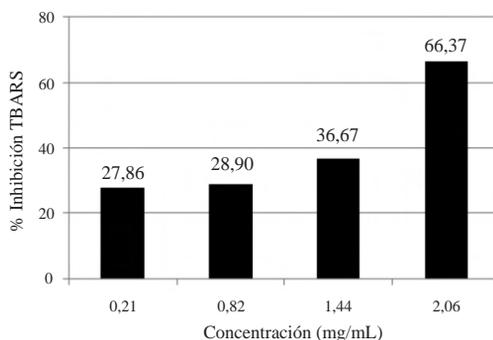


**Figura 4.** Formación de radical superóxido  $O_2^-$ , por diferentes concentraciones del extracto de sachapapa morada

Las concentraciones presentaron diferencia estadística a  $p < 0,01$ , según la prueba de Tukey. Jiao *et al.*<sup>17</sup> reporta una capacidad de secuestro de 90,78% para una concentración de 1,25 mg/mL para zarzamora. Sin embargo, la tendencia de la capacidad de secuestro entre los pigmentos de la sachapapa morada y zarzamora son similares, pero los % de secuestro son mayores para este último que para la sachapapa morada; esta variación puede deberse a que el contenido de antocianos es mucho mayor.

#### **Acción de los antocianos sobre la peroxidación de lípidos**

En la figura 5, se muestra capacidad de inhibición de las diferentes concentraciones de antocianinas de la sachapapa morada.



**Figura 5.** Capacidad de inhibición TBARS de las diferentes concentraciones de antocianinas de sachapapa morada en suero humano.

De los resultados mostrados en la figura 5, observamos que las antocianinas presentan la capacidad de inhibir la formación de lipoperóxidos. La peroxidación del suero humano fue acelerada notablemente cuando no presentó ningún anti-oxidante en la reacción (Datos no mostrados). Sin embargo, la peroxidación fue inhibida después de la adición de diferentes concentraciones de antocianinas. El rango de inhibición para el extracto fue entre 0,2 y 2 mg/mL. La actividad anti-oxidante de los extractos se incrementó, teniendo un máximo de inhibición sobre el suero humano de 66,37%. En la tabla 2 se muestra el coeficiente de inhibición al 50%, que indica la capacidad de secuestro para los radicales peroxilos. Otras fuentes de antocianinas como *Cornus alternifolia* y *Cornus controversa* inhibieron la

peroxidación de lípidos en un 56% y 53%, respectivamente, en una concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$ , la inhibición de peroxidación de lípidos por antocianinas aisladas como delfinidina-3-*O*-glucósido y delfinidina-3-*O*-rutinosido, fue de 71% y 68%, respectivamente, para una concentración máxima de 50  $\mu\text{g/mL}$ <sup>24</sup>. García-Alonso *et al.*<sup>25</sup>, reporta que la actividad anti-oxidante de algunos frutos que presentan un alto efecto anti-oxidante medido por  $\text{IC}_{50}$  provienen de fresa 50  $\mu\text{g/mL}$ , frambuesa roja 55  $\mu\text{g/mL}$ , cereza 74  $\mu\text{g/mL}$ , zarzamora 76  $\mu\text{g/mL}$ , uva blanca 78  $\mu\text{g/mL}$ , banana 1281  $\mu\text{g/mL}$ , kiwi 4487  $\mu\text{g/mL}$  y palta > 5000  $\mu\text{g/mL}$ ; lo importante de esto es que los frutos que presentan una mayor actividad anti-oxidante medido por TBARS son ricos en antocianinas, por lo que pueden contribuir a esta capacidad. La sachapapa morada no es ajeno a esta capacidad ya que presenta un  $\text{IC}_{50}$  de 1824  $\mu\text{g/mL}$ ; esto permite remarcar que los procesos de peroxidación de lípidos juegan un rol importante en la progresión de muchos desórdenes<sup>26</sup>, lo que nos permite demostrar que las antocianinas procedentes de la sachapapa morada pueden inhibir *in vitro* el daño producido por radicales libres; estos radicales pueden activar los procesos de peroxidación de lípidos y la cascada del ácido araquidónico, con la producción de eicosanoides y estimulando la proliferación celular<sup>7</sup>. Está demostrado que en animales de experimentación las antocianinas inducidas demostraron una disminución en el contenido de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS); por el contrario, hubo un incremento de los niveles anti-oxidantes y un incremento en la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx); las propiedades anti-oxidantes de las antocianinas son usadas en las terapias de enfermedades cardiovasculares, entre otros; las antocianinas disminuyen la cantidad de oxidación de LDL, inhiben la formación de radicales libres en el proceso de repercusión; también protegen los cardiomiocitos después de un proceso isquémico; las antocianinas son capaces de disminuir la actividad del óxido nítrico sintasa y los niveles de óxido nítrico<sup>27</sup>.

### CONCLUSIONES

El contenido de polifenoles totales, flavonoides, taninos y antocianinas están alrededor de 166,10; 27,63; 9,62 y 21,59 mg/100g de materia seca, respectivamente. La capacidad de secuestro del radical DPPH, ABTS y anión superóxido, presentan un coeficiente de inhibición  $\text{IC}_{50}$  de 7,44; 0,537 y 13, 67 mg/mL respectivamente. La peroxidación de lípidos en suero humano fue de 1,824 mg/mL, lo que indica que los pigmentos extraídos de sachapapa morada presentan un buen efecto protector *in vitro*.

### AGRADECIMIENTO

Publicación financiada con la ayuda de la beca del Programa de Financiamiento para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT).

### BIBLIOGRAFÍA

1. Silva J, Espinoza A, Acosta L, Gonzáles O, Licea R, Meneses S. Resultados y perspectivas de la conservación *in vitro* de recursos fitogenéticos en la región oriental de Cuba. *Cuadernos de Biodiversidad* 2001; 7: 4–6.
2. Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 1995; 7: 1085–1097.
3. Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Esaka M. Expression of the flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci* 2006; 170: 61–69.

4. Lohachompol V, Szrednicki G, Craske J. The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *J Biomed Biotechnol* 2004; 2004(5): 248–252.
5. Murray RK, Granner DK, Mayes MA, Rodwell VW. Harper: Bioquímica ilustrada. 16ª edición. Editorial Manual Moderno. México (México) 2004, 751 p.
6. Estepas V, Ródenas S, Martín MC. Optimización de un método para la determinación de peroxidación lipídica en suero humano. *An. R. Acad. Nac. Farm* 2001; 67(3): 1–17.
7. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3(4): 276–285.
8. Rincón AM, Padilla FC, Tillett S. *Myrosima cannifolia*, chemical composition and physicochemical properties of the extracted starch. *J Sci Food Agric* 1999; 79: 532–536.
9. Gülçin Ý Oktay M, Kireççi E, Küfreviođlu ÖÝ Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. *Food Chem* 2003; 83: 371–382.
10. Kirca A, Cemeroglu B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chem* 2003; 81(4): 583–587.
11. Viswanathan P, Sriram V, Yogeewaran G. Sensitive spectrophotometric assay for 3-hydroxy-substituted flavonoids, based on their binding with molybdenum, antimony or bismuth. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48(7): 2802–2806.
12. Price ML, Butler LG. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric. Food Chem* 1977; 25(6): 1268–1273.
13. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol* 1995; 28: 25–30.
14. Yokozawa T, Dong E, Nakagawa T, Kashiwagi H, Nakagawa H, Takeuchi S, Chung HY. In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea. *J. Agric. Food Chem* 1998; 46: 2143–2150.
15. Overveld FWPC, Haenen GRMM, Rhemrev J, Vermeiden JPW, Bast A. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem.-Biol. Interact* 2000; 127(2): 151–161.
16. Bermúdez-Camps I, Reyes-Hernández I, León-Fernández OS. Evaluación de la actividad antioxidante del propóleos de la región de Manzanillo. Provincia Granma. Cuba. *IMBIOMED: Bioquímica* 2000; 25(3): 69–74.
17. Jiao Z, Liu J, Wang S. Antioxidant activities of total pigment extract from blackberry. *Food Technol. Biotechnol* 2004; 43(1): 97–102.
18. Sandoval M, Okuhama NN, Angeles FM. Técnicas de investigación para determinar la actividad antioxidativa y antiinflamatoria de plantas medicinales de la amazonía. 1st International Workshop. Iquitos (Perú) 2001, 27 p.
19. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem* 1999; 47(10): 3954–3962.
20. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci* 2006; 78(25): 2872–2888.
21. Vila H. Efecto del tiempo de maceración sobre el color, la composición tánica y la astringencia de vinos Cabernet-Sauvignon y Malbec. [Tesis Maestría]. Mendoza (Argentina): Universidad Nacional de Cuyo. 2002; pp 6–7.

22. Wang SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48: 140–146.
23. Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ, Gracia-Viguera C. Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48: 1588–1592.
24. Vareed SK, Reddy MK, Schutzki RE, Nair MG. Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. *Life Sci* 2006; 78: 777–784.
25. García-Alonso M, Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem* 2004; 84 (1): 13–18.
26. Panasenko OM, Osipova N, Chekanov AV, Arnhold J, Sergienko VI. Peroxyl radical is produced upon the interaction of hypochlorite with tert-butyl hydroperoxide. *Biochemistry* 2002; 67(8): 880–888.
27. Kowalczyk E, Krzesiński P, Kura M, Szmigiel B, B<sup>3</sup>aszczyk J. Anthocyanins in medicine. *Pol. J. Pharmacol* 2003; 55(5): 699–702.