

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENÓLICOS EN PULPA Y SEMILLAS DE CUATRO FRUTALES AMAZÓNICOS DE LA FAMILIA *Sterculiaceae*

Víctor Sotero^{1*}, Martha Maco¹, Jorge Vela¹, Claudia Merino¹, Éricka Dávila¹, Dora García²

RESUMEN

Las especies de la familia *Sterculiaceae* en estudio fueron: cacao (*Theobroma cacao* L.), cacahuillo (*Herrenia nitida*), copoazú (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng Schum) y macambo (*Theobroma bicolor* Humb & Bompl). La actividad antioxidante presenta los siguientes IC₅₀, mg/mL: cacao: 0,52; cacahuillo: 1,69; copoazú: 2,32 y macambo: 7,55. La mayor concentración de polifenoles se presentan en las semillas de cacao con 12101,46 mg/100g, de copoazú con 9691,94 mg/100g y en pulpa de macambo con 5738,81 mg/100g. Las mayores concentraciones de flavonoides fueron para las semillas de cacao y cacahuillo con 2037,16 y 1542,91 mg/100, respectivamente; por último, está la pulpa de macambo con 711,68 mg/100g; en antocianinas se obtuvo que la semilla del cacao presentó la mayor concentración con 638,02 mg/100g. Se cuantificó por HPLC ciertos flavonoides de los cuales se observó alta presencia de rutina trihidratada, tanto en semillas como en la pulpa de estos frutos, con valores de 7022, 0 a 10689,0 mg/100g para semillas de macambo y cacao, respectivamente. Alta concentración de quercitina en las semillas de copoazú con 18173,0 mg/100g y de cacahuillo con 17280,0 mg/100g. La epicatequina, fue encontrada en la semilla de cacahuillo que presenta 578,2 mg/100g.

Palabras clave: *Sterculiaceae*, antioxidantes, fenólicos

ANTIOXIDANT EVALUATION AND PHENOLIC COMPOUNDS IN PULP AND SEEDS OF FOUR FRUITS FROM THE *Sterculiaceae* FAMILY

ABSTRACT

Species of the *Sterculiaceae* family in study went: cacao (*Theobroma cacao* L.), cacahuillo (*Herrenia nitida*), copoazú (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng Schum) and macambo (*Theobroma bicolor* Humb & Bompl). The major concentration of polyphenols was presented in the seeds of cocoa with 12101,46 mg/100g, and copoasu with 9691,94 mg/100g, and pulp of macambo with 5738,81 mg/100g. Higher concentration of flavonoids were presented at the seeds of cocoa and cacahuillo with 2037,16 and 1542,91 mg/100g, respectively, consecutively is the pulp of macambo with 711,68 mg/100g and in anthocyanins it is obtained that seed of the cocoa presented the major concentration with 638,02 mg/100g, very distant to the pulps of copoazú and macambo with 81,62 and 51,84 mg/100g,

^{1*} Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. IIAP-Iquitos-Perú,
e-mail: vsotero@iiap.org.pe; proyectopalmeras@gmail.com

² Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. UNAP-Iquitos-Perú.

respectively. On those which were determined certain composites of flavonides by chromatography of HPLC. Higher presence is observed of rutin trihydrate so much in seeds as in the pulp of these fruits in values that go of 7022,0 to 10689,0 mg/100g for seed of macambo and cocoa respectively. High concentrations of quercetina in seed of copoazú with 18173,0 mg/100g and in seed of cacahuillo with 17280,0 mg/100g and the best concentration of epicatequina, was encountered in the seed of cacahuillo with 578,2 mg/100g.

Key words: Sterculiaceae, antioxidants, phenolic.

INTRODUCCIÓN

La familia *Sterculiaceae* abarca cerca de 69 géneros y cerca de 110 especies en el trópico y subtropico de ambos hemisferios y un par en regiones templadas. Entre éstas se encuentra los géneros *Theobroma* y *Herrania*, siendo el primero el de mayor relevancia. De acuerdo a la literatura¹, el género *Theobroma*, está confinado a los bosques húmedos del neotrópico y está constituido por 22 especies válidas. El género *Herrania* es de origen neotropical, extendiéndose a Sudamérica, desde Costa Rica hasta los andes del Perú.² Los frutos en estudio fueron el cacao (*Theobroma cacao* L.), cacahuillo (*Herrania nitida*), copoazú (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng Schum) y macambo (*Theobroma bicolor* Humb & Bompl). Se entiende como antioxidantes a las sustancias que, cuando presentes en bajas concentraciones en relación al sustrato oxidable, retardan o inhiben de forma significativa la oxidación del mismo.³ Existen numerosos compuestos que presentan actividades antioxidantes tanto naturales como sintéticas; en tal sentido se han realizado innumerables investigaciones para identificar a estas sustancias. Entre los principales antioxidantes, se encuentran los compuestos fenólicos con sus diferentes estructuras químicas^{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. Los compuestos fenólicos más característicos son los flavonoides, cumarinas, cromenos y benzofuranos. De éstos, los más característicos son los flavonoides, que son un grupo muy numeroso, y se conocen cerca de diez clases; todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C₆-C₃-C₆, en el cual los dos anillos aromáticos están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo (figura 1).

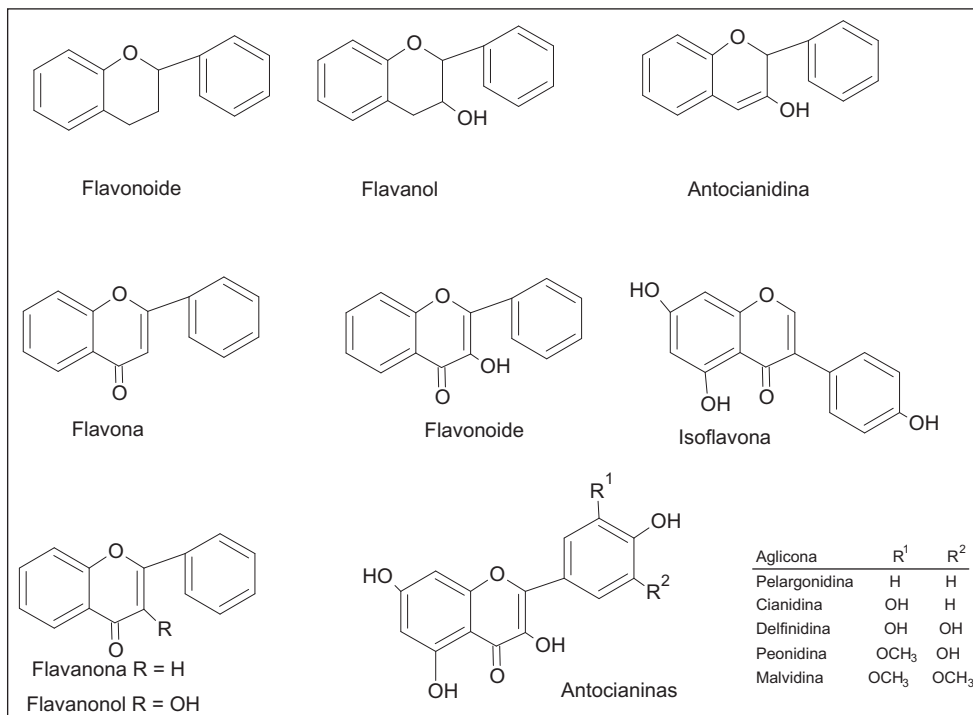


Figura 1. Estructura básica de flavonoides

En este grupo se encuentran las flavonas y flavononas que, generalmente, se encuentran en frutos cítricos; del mismo modo las antocianinas, responsables por el color rojo del vino, las catequinas en el té y procianidinas en la semilla de cacao. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, la ingestión media por día de algún tipo de flavonoide se estima en 23 mg/día. La concentración total de compuestos polifenólicos en vino varía de 1,8 a 4,0 g/L con un promedio de 2,54 g/L para el vino tinto y de 0,1 a 0,3 g/L con un promedio de 0,24 g/L para el vino blanco⁶⁻¹⁰.

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antioxidante de cuatro especies comestibles de origen amazónico como son: cacao, cacahuillo, copoazú y macambo, de la familia *Sterculiaceae* y cuantificar los compuestos fenólicos presentes en estos frutos.

PARTE EXPERIMENTAL

Material y métodos

Material

El material vegetal de cacao se adquirió del mercado de Quillabamba (Cuzco) y las muestras de cacahuillo, copoazú y macambo se colectaron de la Estación Experimental del IIAP en la Reserva Allpahuayo- Mishana, en Iquitos.

Actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante se obtuvo extractos por maceración de las muestras secas en metanol y concentración en rotavapor. La actividad antioxidante se realizó por reducción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), con lecturas de la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm¹¹. Para calcular la capacidad de secuestro de radicales DPPH se utilizó 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.

Compuestos fenólicos

Para la extracción de los compuestos fenólicos se sigue la técnica de Valls¹⁰. 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 fórmico. El extracto se evapora hasta sequedad en un rotavapor a temperatura de 40°C. El residuo seco se redissuelve en una solución de metanol al 50% acidulado con una solución de ácido fórmico, y se lleva a un volumen de 10 mL. Se guarda en alícuotas para las otras determinaciones de:

- a) Antocianinas y flavonoides 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.¹²
- b) Compuestos fenólicos totales¹³: Para ello se tratan 40 µl de muestra con 0,5 mL de reactivo de Folin Ciocalteu y 2 mL de carbonato de sodio 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 catequina de concentraciones entre 0–100 mg/L.

Análisis de la estructura de los flavonoides: las soluciones metanólicas se analizan con un espectrofotómetro UV/vis⁶.

Compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Se realiza según el método indicado para investigaciones similares¹⁴. 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 mmol de NaF para inactivar las polifenol oxidasas y prevenir la degradación fenólica debido al oscurecimiento. Esta muestra se mantiene en hielo hasta ser centrifugada a 11500 rpm por 15 min a 2-5°C; el sobrenadante se recupera cuidadosamente y se mide el volumen. Se toma 1 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 las 24 horas. Los compuestos fenólicos fueron identificados en un equipo de HPLC marca Agilent technology, 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 agua nanopura: metanol grado HPLC (88:12), teniendo una razón de flujo isocrático de 1,5 mL/min. Se utilizó una columna LiChroart RP 18 (250x4,6 mm). Las muestras fueron comparadas con los estándares de ácido clorogénico, catequina, epicatequina, epigallocatequina, rutina trihidratada, quercitina, quercitina 3–D- galactósido y quercitina 3-β-D-glucosídico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se presentan los porcentajes de inhibición de las pulpas y semillas de los frutos en estudio. Se observa que las pulpas de cacao, cacahuillo y copoazú presentan mejor porcentaje de inhibición que sus semillas; en cambio, la semilla de macambo obtuvo mejores resultados que la pulpa.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición e IC₅₀ de las pulpas y semillas de cacao, cacahuillo, copoazú y macambo.

Muestra	Pulpa	Semilla					IC ₅₀	SD ±
		100 µg/ml	300 µg/ml	1000 µg/ml	3000 µg/ml	10000 µg/ml		
Cacao	30000 µg/ml							
Promedio;%	33,50	17,01	36,65	78,31	93,27	0,52	0,0021	
SD ±	1,87	1,76	1,77	1,60	0,28			
Cacahuillo	30000 µg/ml	300 µg/ml	1000 µg/ml	3000 µg/ml	10000 µg/ml	1,69	0,183	
Promedio,%	13,25	22,62	36,65	80,65	93,92			
SD ±	0,43	1,20	1,77	0,25	1,09			
Copoazú	30000 µg/ml	300 µg/ml	1000 µg/ml	3000 µg/ml	10000 µg/ml	2,32	0,019	
Promedio, %	13,48	9,98	23,17	63,72	93,33			
SD ±	0,08	0,62	1,78	1,19	2,40			
Muestra	Semilla	Pulpa						
Macambo,%	30000 µg/ml	1000 µg/ml	3000 µg/ml	10000 µg/ml	30000 µg/ml	7,55	0,25	
Promedio	31,76	13,93	30,07	60,78	83,75			
SD	0,24	0,79	0,02	1,73	1,07			

En la tabla 2, se presenta la concentración de polifenoles totales (mg/100g) de las cuatro especies en estudio. La mayor concentración se dio en la semilla de cacao con 12101,46 mg/100g, seguido de la semilla de copoazú con 9691,94 mg/100g y pulpa de macambo con 5738,81 mg/100g.

Tabla 2. Polifenoles totales en las pulpas y semillas de los frutos de cacao, cacahuillo, copoazú y macambo.

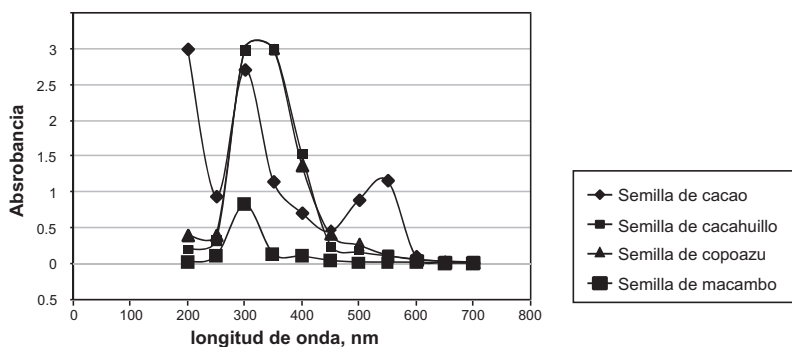
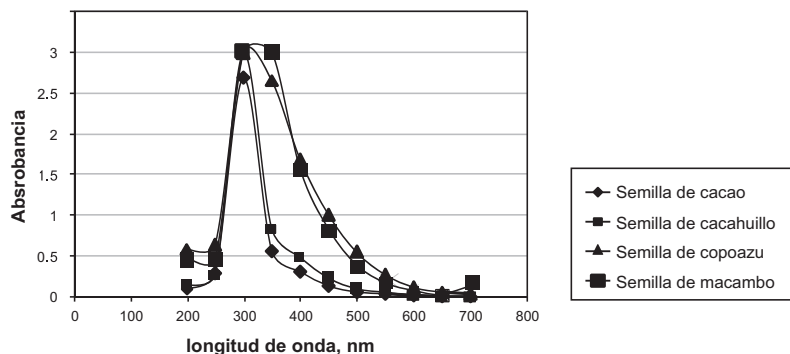
Muestra	Polifenoles mg/100g	SD ±
Semilla macambo	61,37	0,00
Semilla cacao	12101,46	0,14
Semilla cacahuillo	3043,15	0,12
Pulpa cacahuillo	5554,33	0,11
Pulpa copoazú	5057,37	0,09
Semilla copoazú	9691,94	0,55
Pulpa macambo	5738,81	0,10
Pulpa cacao	4083,99	0,15

Se presenta en la tabla 3, la concentración de flavonoides y antocianinas de los frutos en estudio. Se observa que las mejores concentraciones de los primeros en las semillas de cacahuillo y copoazú con 2037,16 y 1542,91 mg/100g, respectivamente; seguidamente está la pulpa de macambo con 711,68 mg/100g. Asimismo, se observa que en el contenido de antocianinas, destacan nitidamente la semilla del cacao con 638,02 mg/100g, muy distante a las pulpas de copoazú y macambo con 81,62 y 51,84 mg/100g, respectivamente.

Tabla 3. Flavonoides y antocianinas en las pulpas y semillas de los frutos de cacao, cacahuillo, copoazú y macambo.

Muestras	Flavonoides, mg/100g	SD ±	Antocianinas mg/100g	SD ±
Semilla de macambo	30,30	2,30	7,47	0,64
Semilla de cacao	538,60	12,49	638,02	7,64
Semilla de cacahuillo	2037,16	4,37	28,25	1,42
Semilla de copoazú	1542,91	2,87	35,88	0,67
Pulpa de cacahuillo	201,10	2,40	15,35	1,03
Pulpa de copoazú	658,00	3,82	81,62	1,98
Pulpa de macambo	711,68	3,14	51,84	0,89
Pulpa de cacao	112,06	3,88	10,18	1,78

En las figuras 2 y 3 se presentan los espectros de absorción del barrido en longitud de onda de 200 a 800 nm, que comprenden la región UV/VIS, para soluciones metánolicas de las pulpas y/o semillas de las especies en estudio para identificación de compuestos fenólicos. De un análisis somero y comparando con los espectros indicados en la literatura,⁶ se puede deducir en forma preliminar lo siguiente:

**Figura 2.** Espectros de absorción de componentes fenólicos de semillas de cacao, copoazú, cacahuillo y macambo**Figura 3.** Espectros de absorción de componentes fenólicos de pulpas de cacao, copoazú, cacahuillo y macambo

En la figura 2, la semilla de cacao presenta un perfil definido entre 250 - 350 nm y otra curva entre 450 - 600 nm, lo cual indica en el primero la presencia de flavanonas y flavonoles y la segunda de antocianinas; esto último coincide con los resultados de la tabla 3. La semilla de cacahuillo y de copoazú coinciden en la región de 250 a 450 nm, alcanzando picos máximos entre 300 a 350 nm, indicando también la presencia de flavonoles. La curva de la semilla de macambo, se observa la absorción característica de flavononas.

En la figura 3, se observa que la pulpa de cacao y cacahuillo tienen absorbancias muy similares, entre 250 - 350 nm, indicando la presencia de flavanonas. Las pulpas de copoazú y macambo, alcanzan absorbancias mayores, entre 250 - 450 nm indicando posiblemente la presencia de flavonoles. Cabe notar que las curvas de absorción de semillas de cacahuillo y copoazú y las pulpas de macambo y copoazú son muy similares.

En la tabla 4 se presentan los principales compuestos fenólicos presentes en las pulpas y semillas de las especies en estudio. Se observa una importante presencia de rutina trihidratada, tanto en semillas como en la pulpa de estos frutos, en valores que van de 7022, 0 mg/100g para semilla de macambo, a 10689,0 mg/100g para semilla de cacao.

Tabla 4. Compuestos fenólicos obtenidos en pulpa y semilla de los frutos de cacao, cacahuillo, copoazú y macambo.

Muestras	quercitina 3 D-galactósido		quercitina 3 - β -D-glucosídico	
	mg/100g	SD \pm	mg/100g	SD \pm
Pulpa de macambo	0,518	0,005	3,755	0,232
Semilla de macambo	ND	ND	ND	ND
Pulpa de copoazú	0,717	0,087	0,625	0,168
Semilla de copoazú	0,381	0,007	ND	ND
Pulpa de cacao	0,118	0,001	0,280	0,001
Semilla de cacao	0,089	0,001	ND	ND
Pulpa de cacahuillo	0,236	0,002	ND	ND
Semilla de cacahuillo	ND	ND	ND	ND
Muestras	quercitina		rutina trihidratada	
	mg/100g	SD\pm	mg/100g	SD\pm
Pulpa de macambo	ND	ND	7986,0	0,844
Semilla de macambo	ND	ND	7022,0	0,005
Pulpa de copoazú	ND	ND	7952,0	0,075
Semilla de copoazú	18173,0	0,018	8607,0	0,056
Pulpa de cacao	ND	ND	9961,0	0,601
Semilla de cacao	ND	ND	10689,0	0,119
Pulpa de cacahuillo	ND	ND	8547,0	0,001
Semilla de cacahuillo	17280,0	0,006	8975,0	0,074
Muestras	epicatequina		epigallocatequina	
	mg/100g	SD\pm	mg/100g	SD\pm
Pulpa de macambo	ND	ND	ND	ND
Semilla de macambo	ND	ND	ND	ND
Pulpa de copoazú	ND	ND	ND	ND
Semilla de copoazú	ND	ND	ND	ND
Pulpa de cacao	ND	ND	ND	ND
Semilla de cacao	ND	ND	54,062	1,773
Pulpa de cacahuillo	ND	ND	ND	ND
Semilla de cacahuillo	578,2	0,915	ND	ND

Destaca, además, la presencia de quercitina en semilla de copoazú con 18173,0 mg/100g y en semilla de cacahuillo con 17280,0 mg/100g. El metabolito de más alta concentración, la epicatequina, fue encontrado en la semilla de cacahuillo que presenta 578,2 mg/100g; comparando, estos resultados son superiores a los obtenidos por otros investigadores¹⁴, quienes obtiene de 9,5 - 164,8 mg/100g en el fruto de durazno de diferentes cultivares. La rutina se usa en terapéutica¹⁵ como normalizador de la permeabilidad y resistencia de los capilares. También se utiliza como materia prima para la semi-síntesis de la trixerutina (trisetoxietil rutina), empleada con la misma finalidad, aunque con una acción más pronunciada. Del mismo modo¹⁶, se encontraron otros compuestos fenólicos en el macambo, como: salicílico, trans-cinámico, ácido p-hidroxibenzoico, protocatequina, ácido gálico, ácido sináptico, y también catequina y ácido clorogénico. Por otro lado¹⁷, indica que en el cacao se encuentra principalmente, compuestos flavan-3-ols, como epicatequina y procianidina.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis realizados se puede concluir que:

- Las semillas de cacao, cacahuillo, copoazú y la pulpa de macambo presentan una excelente actividad antioxidante y una importante concentración de compuestos fenólicos.
- De estos compuestos fenólicos la familia química de los flavonoides reporta una importante presencia en las cuatro especies en estudio
- La rutina trihidratada, se encontró en todas las especies en estudio y destaca la presencia de epicatequina en la semilla de cacahuillo.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a IIAP, por el apoyo técnico-económico otorgado para poder desarrollar esta investigación; a la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana por el apoyo para realizar parte del trabajo de laboratorio. Finalmente a la Sociedad Química del Perú por darnos la oportunidad de hacer realidad la publicación del artículo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cuatrecasas, J. Cacao and its allies: Taxonomic revision of the genus *Theobroma*, Bulletin of United States National Museum. Smithsonian Institution. Washington. DC. 1964; Vol 35. Part 6.
2. Hutchinson, J. The genera of flowering plants. Clarendon Press. Oxford. England. 1967. p.117
3. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 2.ed. Oxford: Clarendon, 1989. p.366-415.
4. Donnelly, J.K., Robinson, D.S.. Free radical in foods. *Free Radical Res.*, 22(2), 1995. p.47-76,
5. Nawar, W.W. Lipids. In: Fennema, O.R., ed. Food chemistry. 3.ed. New York: Marcel Dekker. 1996. p.189-244..
6. Lock O. Investigación Fitoquímica, PUC - Lima, 1988. p.103-104.
7. Martínez Valverde, I.; Perriago, M. y Ros, G.. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2000; 50(1): 5-18.

8. Dreosti, J.E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, 16: 692-694. 2000
9. Martínez-Flores, Gonzáles-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr.Hosp.* 2002, XVIII (6): 271-278.
10. Valls, J.; Lampreave, M.; Nadal, M.; Arola, L.; Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alimentación*, 2000; 119-124.
11. 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.
12. Lees, D.H.; Francis, F.J. Standardization of pigment analysis in cranberries. *Hort Science.* 1972; 71(1): 83-84.
13. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 1999. 299:152-178.
14. 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.
15. Sharapin, N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Santa Fé. Colombia: Quebecor-Inpresiones, 2000. p.247
16. García, D.E.G., Mancini, D.A.P., Torres, R.P., Mancini-Filho, J. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor*) extracts. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol* 2000. 104: 278-281.
17. Cros, L. Factores condicionantes de la calidad del cacao. Memorias del I Congreso del cacao y su industria, Maracay, Venezuela I Congreso venezolano del cacao y su industria. 2000. p. 16-36.