

Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante del arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) en diferentes estados de maduración.

Phenolic content and antioxidant activity of araza (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) in different stages of maturity.

Galeano P., M.Sc.¹; Paladines M.², Cuellar N.², Ortiz F.², Silva Y.², Velasquez H.²

¹ Docente Universidad de la Amazonia Florencia Caquetá., ² Estudiantes del Programa de Química, Universidad de la Amazonia.

*Autor para correspondencia: paulalg@uniamazonia.edu.co

Recibido: 2-3-2010. Aceptado: 3-6-2010

RESUMEN

El Arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh), despierta gran interés en diferentes ámbitos por las cualidades organolépticas del fruto y por el índice de producción de la planta. Con el objetivo de evaluar el potencial antioxidante del Arazá cultivado en el Departamento Caquetá, se evaluó la actividad de los extractos acuosos de la pulpa de Arazá en 5 diferentes estados de maduración (A1: Verde; A2: Verde maduro; A3: Pintón; A4: Maduro y A5: Sobre maduro), empleando las metodologías de DPPH y ABTS, y se cuantificó el contenido total de fenoles usando el ensayo de Folin-Ciocalteu acorde con el método desarrollado por Velioglu. Los resultados indican que la mayor actividad antioxidante la presentan las frutas de arazá en estado de maduración A3, con valores TEAC-DPPH de 81,9 $\mu\text{mol trolox}/100\text{ g extracto seco}$ y TEAC- ABTS de 241,8 $\mu\text{mol trolox}/100\text{ g extracto seco}$. En este mismo estado de maduración se encontró el mayor contenido de fenoles totales (1063,9 mg ácido ascórbico/100 g de extracto seco), por lo tanto, principalmente a estos compuestos fenólicos, puede ser atribuida la actividad antioxidante.

Palabras claves: *Eugenia stipitata*, DPPH, ABTS, Fenoles totales, Maduración.

ABSTRACT

The Arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh), arise interest in different fields by the fruit organoleptics properties and for the plant production index. With the aim of determinate to the Arazá antioxidant capacity cultivated in Caquetá region, there was evaluated the watery extracts activity of the Arazá flesh in 5 different ripeness conditions (1: Green; 2: Ripeness Green; 3: Pre ripeness; 4: ripeness and 5: post ripeness), using the methodologies of DPPH and ABTS, and the total phenolic content was quantified using Folin-Ciocalteu assay according to a method developed by Velioglu. The study indicated that the highest antioxidant capacity is found in the third (3) ripeness conditions with TEAC-DPPH of 81.9 $\mu\text{mol trolox}/100\text{ g dried extract}$ and TEAC- ABTS of 241.8 $\mu\text{mol trolox}/100\text{ g dried extract}$ values. In the same ripeness condition is found the highest phenolic content (1063.9 mg ascorbic acid/100 g of dried extract), therefore could be attributed these phenolic compounds to the antioxidant capacity.

Keywords: *Eugenia stipitata*, DPPH, ABTS, Total phenolic content, Ripeness.

INTRODUCCIÓN

La Amazonia colombiana cuenta con una enorme variedad de especies frutícolas nativas. El Arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh), es una fruta exótica y tradicional de la región amazónica, perteneciente a la familia Myrtáceae, es un arbusto o árbol pequeño que alcanza alrededor de los 2,50 m de altura. Las hojas son opuestas, enteras, elípticas con ápice acuminado, y medidas que se aproximan a 8-12 cm por 3-6cm (Pinedo *et al.*, 1981). Lo más notable de esta especie es el tamaño del fruto, cuya pulpa es amarilla, incluyendo el mesocarpio y los tejidos que rodean la semilla; es ácida y se prepara en refrescos y helados de sabor muy agradable. Es un frutal de valor, tanto por el

rendimiento del fruto, cosecha temprana y por su contenido de vitamina C. (León 2000).

Los estudios realizados en arazá se basan principalmente en la caracterización química por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) del aceite esencial de las hojas, encontrándose que está constituido por sesquiterpenos y monoterpenos; principalmente por α -pineno (14,1%), β -cariofileno (22,7%) y oxido de cariofileno (15,4%). Además, se reporta la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales frente *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*. (Medeiros 2003).

Estudios químicos en los procesos de crecimiento, desarrollo y maduración del fruto de arazá, demuestran que el ácido málico, es el principal ácido orgánico encontrado en la pulpa; la variación de este contenido puede ser un parámetro a tener en cuenta en la cosecha. (Hernández *et al*, 2006).

Por otro lado, se han realizado exploraciones de la actividad antioxidante durante la maduración del fruto de arazá, en períodos de almacenamiento de seis días, encontrándose que el contenido de ácido ascórbico y de compuestos fenólicos disminuye durante el almacenamiento. Pese a esto, los investigadores aseguran que la contribución del arazá en la dieta alimenticia es buena, en comparación con otros alimentos. (Vargas *et al*, 2005).

La actividad antioxidante se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación, entre los que se encuentran las especies reactivas del oxígeno, los iones metálicos y los radicales libres. (Arnao *et al*, 1999).

Muchas enfermedades como la inflamación, la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, han sido asociadas a los daños de las macromoléculas biológicas por el ataque de las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales generan un desbalance entre la producción de radicales y los sistemas atrapadores de esos radicales.

Existen numerosos métodos para evaluar la actividad antioxidante en alimentos, sin embargo, no existe un ensayo *in vitro* para determinar la actividad antioxidante que pueda considerarse como universal, debido a que la actividad anti-radicalaria depende fundamentalmente de la naturaleza del radical y del método de generación del mismo. La elección de un sistema químico para generar especies reactivas es un punto crítico en el desarrollo de cualquier ensayo antioxidante con el fin de obtener resultados relevantes. (Aruoma 2003)

Con el objetivo de evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos del fruto de Arazá (*Eugenia stipitata*) en diferentes estados de maduración, se emplearon las técnicas de actividad atrapadora de radicales (DPPH y ABTS⁺), así como la cuantificación por el método de Folin-Ciocalteu mediante espectrofotometría.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal:

Las frutas de arazá fueron colectadas en el centro de investigaciones CIMAZ- Macagual, ubicado en el kilómetro 20, vía Florencia- Colombia (Coordenadas geográficas 1°37'N y 75°36'W, 380 msnm). Las muestras fueron caracterizadas como (A1: Verde; A2: Verde maduro; A3: Pintón; A4: Maduro y A5: Sobre maduro), teniendo en cuenta su estado de madurez según los parámetros propuestos por Hernández *et al*., 2006.

La firmeza fue determinada con penetrómetro Bertuzzi Accuracy $\pm 1\%$ full scale a temperatura of 20°C.

Una vez removida la piel de la fruta, se tomaron 100 g de pulpa, se homogenizaron con agua destilada hasta agotamiento de la muestra y posteriormente fueron filtradas y almacenadas a -4°C.

Determinación de la concentración de los extractos.

Para ello se utilizaron cajas de petri previamente secas y pesadas, luego se les adicionó 1 mL de muestra y se pesó el conjunto. Posteriormente se llevó a secado en una estufa a 50°C durante 20 horas aproximadamente. Al cabo de este tiempo se pesó nuevamente la caja de petri y se determinó el peso del extracto seco.

Determinación de Fenoles Totales.

Se desarrolló la metodología propuesta por Singleton *et al* 1961. La mezcla de reacción constituida por 50 μ L del extracto de arazá, 425 μ L de agua destilada, 125 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y 400 μ L de una solución de

carbonato de sodio al 17% se dejó en reposo por 1 hora. Al cabo de este tiempo se leyó la absorbancia a 765 nm. El contenido total de fenoles se expresó como mg de Ácido gálico/100 g de extracto seco, teniendo en cuenta una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido gálico.

Reacción con el radical 2,2-difenil-1-Picril Hidrazilo (DPPH).

Se llevó a cabo utilizando la metodología propuesta por Brand Williams et al., 1995; dónde se tomaron 10 L del extracto acuoso de arazá y 990 L de la solución metanólica de DPPH (20 mg/L). Como referencia se empleó la misma cantidad de DPPH y 10 L del solvente de la muestra. Luego de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. (Cavin *et al*, 1998). Los resultados fueron expresados como valores TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) mediante la construcción de una curva patrón usando varias concentraciones de antioxidante TROLOX®. Reacción con el radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS®).

Se realizó mediante la metodología propuesta por Re *et al*, (1999). Se tomaron 10 µL de extracto acuoso de arazá y 990 µL de la solución del radical ABTS⁺ ajustada con PBS pH 7,4 a 0,7 unidades de absorbancia a 732 nm, se dejó reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Luego se leyó la variación de la absorbancia respecto a la referencia del reactivo (Pannala *et al*, 2001, Re R. *et al*, 1999). Los resultados se expresaron como valores TEAC mediante la construcción de una curva patrón usando diferentes concentraciones de TROLOX®.

Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las regresiones fueron calculadas con un nivel de significancia del 95% (p<0.05), usando el programa Statgraphics Plus versión 5.0 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De varios árboles de arazá se colectaron frutos de diferentes estados de maduración. Se realizó la caracterización de la madurez del fruto, ubicando a las muestras de acuerdo a su coloración y características físicas: verde mate (A1), verde-amarillo claro (A2), verde: 25% amarillo (A3), 100% amarillo (A4) y amarillo oscuro (A5). (Ver figura 1, tabla 1).



Figura 1. Estados de Maduración de Arazá.

Tabla 1 Estado de maduración y descripción de las muestras utilizadas.

Muestra	Escala color	Estado	Color Valor	Descripción	Descripción	Firmeza
			coordenada			
A1	2	Verde maduro	L=54-57 C=38-41 H=101-105	Verde mate	Verde claro sin brillo	11
A2	3	Pintón	L=58-60 C=42-44 H=95-99	Verde amarillo	Verde claro sin brillo	8,5
A3	4	Pintón 3/4	L=61-64 C=45-48 H=89-94	Verde Amarillo	Verde con 10 25% amarillo	5,0
A4	5	Maduro	L=65-67 C=49-54 H=83-88	Amarillo	Amarillo 100% superficie del fruto	2,3
A5	6	Sobre maduro	L=58-61 C=55-59 H=80-84	Amarillo oscuro	Amarillo oscuro fruto blando	1,7

Contenido de compuestos fenólicos:

Los antioxidantes naturales presentes en plantas y en frutales son responsables de inhibir o prevenir el deterioro celular, consecuencia del estrés oxidativo. Los compuestos fenólicos actúan como agentes reductores y antioxidantes. Los fenoles encontrados en plantas han demostrado inhibición de la formación de radicales aniónicos superóxido generados por diferentes sistemas enzimáticos (Taubert *et al*, 2003).

El contenido de fenoles totales se muestra en la tabla 2. Éste contenido se evaluó en cada uno de los frutos en diferentes estados de maduración de arazá, el cual osciló entre $346,1 \pm 28$ y $1063,9 \pm 23$ mg ácido gálico por cada 100 gramos de extracto seco. El contenido de fenoles totales en los frutos de arazá sigue el orden: $A3 > A4 > A2 > A5 > A1$; mostrando que en estado pintón se presenta el mayor contenido de compuestos fenólicos (ver figura 2), aproximadamente 3 veces mayor que en A1 y A5 ($346,1$ y $383,5$ mg de Ac. gálico/100 g de extracto seco, respectivamente).

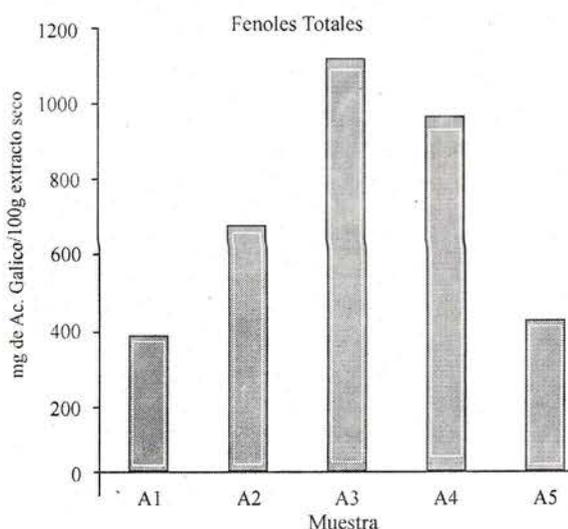


Figura 2. Contenido de fenoles totales para los frutos de Arazá en diferentes estados de maduración.

Actividad antioxidante:

Dado que la actividad antioxidante en alimentos está determinada por la mezcla de diferentes moléculas con distintos mecanismos de acción, e interacciones de tipo sinérgica, es necesario combinar más de un método, para determinar la actividad antioxidante de productos alimenticios por métodos *in vitro* (Pérez *et al*, 2008). Por lo tanto, se seleccionaron dos métodos para evaluar el potencial antioxidante del arazá en sus diferentes estados de maduración, los cuales involucran la medida de la desaparición del color por la acción de radicales libres (DPPH y ABTS) (Kuskoski *et al*, 2005), los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de Fenoles totales, ABTS y DPPH de las muestras evaluadas.

ENSAYO	FENOLES TOTALES	TEAC-DPPH	TEAC-ABTS
MUESTRA	mg de Ac. gálico / 100 g de extracto seco	($\mu\text{mol trolox} / 100$ g extracto seco)	($\mu\text{mol trolox} / 100$ g extracto seco)
A1	$346,1 \pm 28$	$23,5 \pm 3$	$52,5 \pm 3$
A2	$630,1 \pm 41$	$41,0 \pm 1$	$159,6 \pm 5$
A3	$1063,9 \pm 23$	$81,9 \pm 3$	$241,8 \pm 35$
A4	$916,2 \pm 18$	$28,7 \pm 1$	$150,0 \pm 12$
A5	$383,5 \pm 50$	$22,8 \pm 1$	$160,4 \pm 5$

La capacidad antioxidante expresada en valores TEAC- DPPH, osciló entre $22,8 \pm 1$ y $81,9 \pm 3$ $\mu\text{mol trolox}/100$ g extracto seco. El estado de maduración A3 presenta la mayor actividad atrapadora del radical DPPH de las muestras analizadas ($81,9$ $\mu\text{mol trolox}/100$ g extracto seco), aproximadamente 3.5 veces más alto que en el estado de maduración A1 y A5 ($23,5$ y $22,8$ $\mu\text{mol trolox}/100$ g extracto seco, respectivamente). Por otro lado, los valores TEAC-ABTS oscilaron entre $52,5 \pm 3$ y $241,8 \pm 35$ $\mu\text{mol trolox} / 100$ g extracto seco, donde el estado de maduración A3 presenta el mayor valor ($241,8$ $\mu\text{mol trolox}/100$ g extracto), 4.6 veces más alto que en A1 ($52,5$ $\mu\text{mol trolox}/100$ g extracto seco) y 1,6 veces mayor que A5 ($160,4$ $\mu\text{mol trolox}/100$ g extracto seco).

Según Vargas *et al*, 2005, durante la maduración en almacenamiento del arazá, el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos disminuyen, sin embargo, la actividad antioxidante tiene tendencia a aumentar; los autores atribuyen a que durante la maduración podrían generarse

productos de condensación o incremento en algunos compuestos fenólicos que aporten a una mayor actividad antioxidante.

Los resultados de esta investigación permiten observar que la actividad antioxidante de los frutos de arazá se intensifica a medida que aumenta la maduración del fruto (Ver figura 3 y 4), presentando el mayor contenido de fenoles totales y valores TEAC-DPPH y TEAC-ABTS en el estado pintón (A3), y a partir de este estado inicia un descenso en la actividad. Este comportamiento se debe a que la madurez influye directamente en el contenido de compuestos bioactivos, dado que se generan durante este procesos de biosíntesis que producen mayor contenido de carotenoides, compuestos fenólicos, ácido ascórbico entre otros, que contribuyen de manera significativa al aumento progresivo del potencial antioxidante; por otro lado, la disminución de la actividad antioxidante luego del estado de maduración pintón, puede asociarse a la degradación de estos compuestos por factores relacionados al estrés y a la alta producción de la planta.

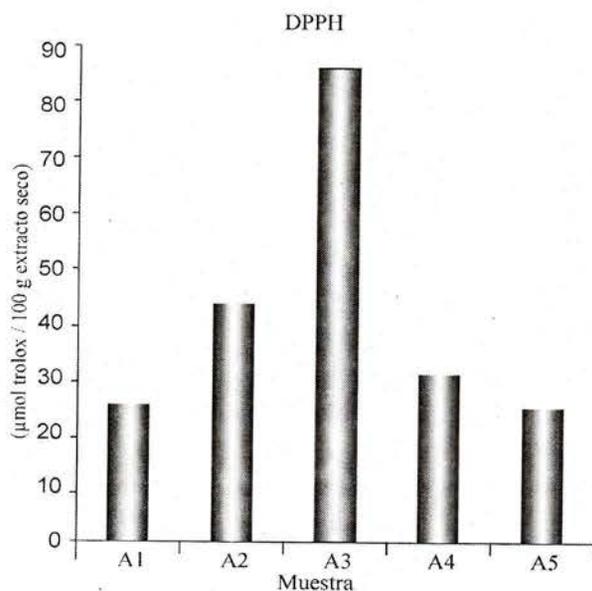


Figura 3. Actividad antioxidante de frutos de arazá en diferentes estados de maduración. Técnica DPPH.

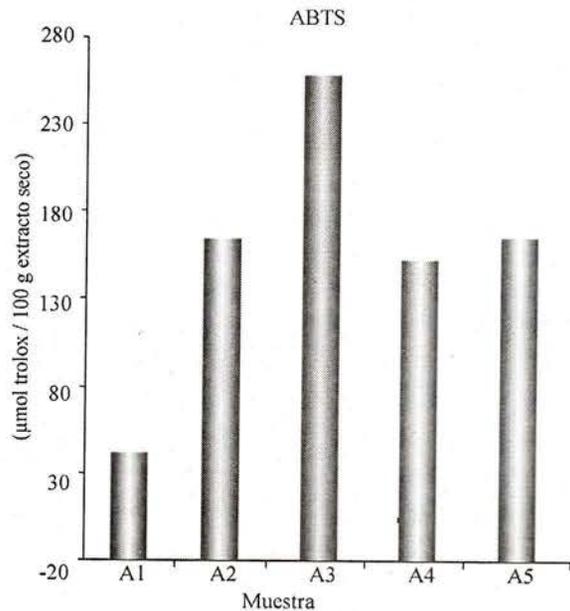


Figura 4. Actividad antioxidante de frutos de arazá en diferentes estados de maduración. Técnica ABTS

Correlación:

Teniendo en cuenta que los frutos de arazá presentan gran actividad antioxidante evaluada por los métodos DPPH y ABTS, y un alto contenido de compuestos fenólicos, se consideró pertinente realizar la correlación de Pearson para establecer la relación entre las variables.

El coeficiente de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante (expresada como TEAC - DPPH y ABTS), y el contenido de fenoles totales, se presenta en la tabla 3. La actividad antioxidante total para los ensayos DPPH ($R=0,62$; $P<<<0,005$), ABTS ($R=0,73$; $P<<<0,005$), indican que existe una buena correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante del arazá. Estos resultados son acordes con los encontrados en diferentes estudios donde reportan la relación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en diferentes frutas (Sreeramulu *et al*, 2010, Kumar *et al*, 2010, Becerra *et al*, 2011, Babbar *et al*, 2011, Arcan *et al*, 2009). En base a esto, se puede afirmar que la mayoría de compuestos antioxidantes presentes en las frutas de arazá atrapan los radicales libres mediante un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno.

Tabla 3. Correlación entre Fenoles totales, DPPH y ABTS.

Fenoles Totales	
DPPH	0,62
ABTS	0,73

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El potencial antioxidante del arazá está íntimamente ligado a la variación del contenido de compuestos fenólicos, lo cual se puede observar por la correlación lineal entre las técnicas, enmarcando al arazá como una fruta benéfica que puede aprovecharse mejor si se consume en estado pintón.

Agradecimientos:

Los autores agradecen al programa “Semilleros de Investigación” de la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de la Amazonia, por la financiación del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

ARCAN, I. & YEMENICIOG˘LU, A. 2009. Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 184–188.

ARNAO, M. CANO, A. & ACOSTA, M. 1999. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Rad. Res.* 31, 89-96.

ARUOMA, O. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Res.* 523-524, 9-20.

BABBAR, N. SINGH, H. SINGH, D. & TUMADU, R. 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*. 44: 391–396.

BESERRA, M.M. MACHADO, P. CAMPOS, A.M. MATIAS, G. DE CARVALHO, G. ARRAES MAIA, G. & GOMES, T. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*. 44: 2155–215.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.

CAVIN A. HOSTETTMANN K, DYATMYKO W, POTTERAT O. 1998. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Med.* 64: 393-396.

COLE R. HABER W. SETZER W. 2007 Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica; USA. *Biochemical Systematics and Ecology* 35 (2007) 877e886

HERNÁNDEZ M. MARTÍNEZ O. FERNÁNDEZ J. 2006. Behavior of arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) fruit quality traits during growth, development and ripening, Bogotá Colombia. *Scientia Horticulturae* 111 (2007) 220–227.

HERNÁNDEZ MA, BARRERA JA, CARRILLO MP, FERNÁNDEZ JP. 2006. Arazá. Origen y fisiología de conservación. Editorial Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas- SINCHI Bogotá, Colombia.

KUMAR, C. SREERAMULU, D. & RAGHUNATH, M. 2010. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*. 43, 285–288.

KUSKOSKI, E. M. ASUERO, A. G. TRONCOSO, A. M. MANCINI-FILHO, J. & FETT, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25(4): 726–732.

LEÓN, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. Editorial Agroamérica del IICA San José Costa Rica.

MEDEIROS, J.R., 2003. Composition of the bioactive essential oils from the leaves of *Eugenia stipitata* McVaugh ssp. *sororia* from the Azores. *J. Essent. Oil Res.* 15, 293e295.

ORDUZ J. O; RANGEL M. 2002. Frutales tropicales potenciales para el piedemonte llanero. Editorial produmedios Villavicencio Colombia.

PANNALA AAS, CHAN TS, O'BIREN J, RICE-EVANS C. 2001. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 282:1161-1168.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. ARRANZ, S. TABERNERO, M. DÍAZ-RUBIO, E. SERRANO, J. & GOÑI, I. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*. 41(3): 274–285.

PINEDO M; RAMIREZ F; BIASCO M; 1981. Notas preliminares sobre el arazá (*Eugenia stipitata*), frutal nativo de la amazonia peruana. Publicación miscolánea N°229 Lima, Perú.

RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M. Y RICE-EVANS C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231–1237.

SINGLETON, VL., and ROSSI, JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144–158.

SREERAMULU, D. & RAGHUNATH, M. 2010. Antioxidant activity and phenolic content of roots, tubers and vegetables commonly consumed in India. *Food Research International*. 43: 1017–1020.

TAUBERT, D. BREITENBACH, T. LAZAR, A. CENSAREK, P. HARLFINGER, S. & BERKELS, R. 2003. Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. 35: 1599–1600.

VARGAS A. RIVERA A. NARVÁEZ C. 2005. Capacidad Antioxidante Durante La Maduración De Arazá (*Eugenia Stipitata Mc Vaugh*). *Revista Colombiana de Química*, volumen 34, no. 1 de 2005 Bogotá Colombia.