

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ARAZÁ (*Eugenia stipitata* Mc
Vaugh) DURANTE LA MADURACIÓN

RESEARCH OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF ARAZA (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh)
DURING THE RIPENING

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ARACÁ-BOI (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh)
DURANTE A MATURACAO

Fabio A. Cuellar. , Edna Ariza., Cecilia Anzola., Patricia Restrepo¹

Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Química.
Avenida 30 45-03 –Bogotá, Colombia

RESUMEN

El arazá es un fruto amazónico con buena capacidad antioxidante. En este trabajo se realizó, a partir del epicarpio y mesocarpio de la fruta en cuatro estados de madurez (verde, pintón, maduro y sobremaduro), la extracción de compuestos fenólicos (utilizando como solvente una mezcla de agua:acetona, (inicial 50:50 y posterior de 70:30)) y su análisis (método colorimétrico de Folin-Ciocalteu), y se identificaron parcialmente por HPLC en fase reversa, con arreglo de diodos, encontrando los ácidos clorogénico, gálico y caféico como fenoles mayoritarios responsables de la actividad antioxidante. El contenido de polifenoles en el mesocarpio es mayor en el estado verde (1200mg/1000g fruto BH) seguido del maduro (1100mg/1000g fruto BH), pintón (905 mg/1000g fruto BH) y sobremaduro (550mg/1000g fruto BH), mientras que en el epicarpio es mayor en estados maduro (170 mg/1000g fruto BH) y verde (295mg/1000g fruto BH) seguidos del pintón (100 mg/1000g fruto BH) y sobremaduro (50 mg/1000g fruto BH). La capacidad antioxidante fue determinada por métodos hidrofílicos (ABTS, DPPH y FRAP) encontrando que en el mesocarpio la capacidad antioxidante medida por todos los métodos es mayor en estado verde seguido del maduro, pintón y sobremaduro mientras en el epicarpio es mayor en maduro y verde seguido del pintón y sobremaduro. Se determinó la capacidad antioxidante por un método lipofílico (decoloración del β -caroteno) encontrando que en el mesocarpio es mayor en estados maduro (110 mg/1000g fruto BH) y pintón (90 mg/1000g fruto BH) seguido del sobremaduro (75mg/1000g fruto BH) y verde (26mg/1000g fruto BH) y en el epicarpio es mayor en sobremaduro (50 mg/1000g fruto BH) seguido del verde (45 mg/1000g fruto BH), maduro (55 mg/1000g fruto BH) y pintón (25 mg/1000g fruto BH). Finalmente se concluye que el fruto de arazá en los estados verde y maduro presenta la mayor capacidad antioxidante, siendo los ácidos fenólicos los principales contribuyentes.

ABSTRACT

The araza is a fruit native of the Amazon region, like other fruits of this region has some antioxidant components. This work was carried out the classification of the fruits of araza in four different states using as the index of maturity, then phenolic compounds were extracted using mixtures of solvents (methanol, acetone, water) and your content was determined by the spectrophotometric method Folin-Ciocalteu in the epicarp and mesocarp. Additionally, partially identified phenolic compounds by reversed phase HPLC with diode array, finding the phenolic acids such as chlorogenic, gallic and caffeic, such as phenols responsible for the majority of araza antioxidant activity. It was noted that araza mesocarp polyphenol content was higher in the green (1200 mg/1000g fruto BH) state followed by mature (1200 mg/1000g fruto BH), pinton (905 mg/1000g fruto BH) and over mature (550 mg/1000g fruto BH) while the epicarp was greater in states mature (170 mg/1000g fruto BH) and green (295 mg/1000g fruto BH) followed of the over-mature (50 mg/1000g fruto BH) and pinton (100 mg/1000g fruto BH) states. The antioxidant capacity was determined by three hydrophilic methods (ABTS, DPPH and FRAP) in the mesocarp found that the antioxidant capacity was higher in the green state followed by mature), pinton and over mature while the epicarp was higher in mature, green, pinton) and over-mature state. We also determined the antioxidant capacity by a lipophilic method (β -carotene bleaching) found that in the mesocarp was higher in states followed by mature (110 mg/1000g fruto BH), pinton (90 mg/1000g fruto BH) and green (26 mg/1000g fruto BH) while in the epicarp was higher in the over mature stage (50 mg/1000g fruto BH) followed by green states (45 mg/1000g fruto BH), mature (55 mg/1000g fruto BH) and sobre mature (25 mg/1000g fruto BH). Finally we conclude that the mature and green had the highest antioxidant capacity, phenolic compounds being present in the epicarp and mesocarp were the major contributors.

RESUMO

O araçá-boi é um fruto originário da região amazônica que, como outros frutos desta região, possui alguns componentes com capacidade antioxidante que são de grande interesse para a saúde dos seres humanos pela sua capacidade de diminuir os efeitos de radicais livres, produzidos durante o metabolismo normal da célula. Neste trabalho foi realizada a classificação dos frutos de araçá-boi em quatro estádios diferentes, utilizando como critério o índice de maturação; posteriormente, a partir do epicarpo e mesocarpo da fruta nos quatro estádios de maturação (verde, pintado, maduro e sobremaduro) foram extraídos os compostos fenólicos utilizando misturas de solventes (metanol, acetona, água) e foi determinado o seu conteúdo mediante o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Além disso, parcialmente identificados

compuestos fenólicos por HPLC de fase reversa con matriz de diodos, encontrando los ácidos fenólicos, tales como clorogénico, gálico y cafeico, tales como fenóis responsables por la mayoría de la actividad antioxidante. Fue observado que en el mesocarpo del arazá-boi el contenido de polifenoles es mayor en el estadio verde (1200mg/1000g fruto BH) seguido de los estados maduro (1100 mg/1000g fruto BH), pintado (905 mg/1000g fruto BH) y sobremaduro (550 mg/1000g fruto BH) mientras que en el epicarpo es mayor en los estadios maduro (170 mg/1000g fruto BH) y verde (295 mg/1000g fruto BH) seguido de los estadios pintado (100 mg/1000g fruto BH) y sobremaduro (50 mg/1000g fruto BH). La capacidad antioxidante fue determinada por tres métodos hidrofílicos (ABTS, DPPH y FRAP) y fue encontrado que en el mesocarpo la capacidad antioxidante es mayor en el estadio verde seguido de los estadios maduro, pintado y sobremaduro mientras que en el epicarpo es mayor en los estadios maduro y verde seguido de los estadios pintado y sobremaduro. También se determinó la capacidad antioxidante por un método lipofílico (descoloración del β -caroteno) y fue encontrado que en el mesocarpo es mayor en los estadios maduro (110 mg/1000g fruto BH) y pintado (90 mg/1000g fruto BH) seguido de los estadios sobremaduro (75 mg/1000g fruto BH) y pintado (26 mg/1000g fruto BH) y en el epicarpo es mayor en el estadio sobremaduro (50 mg/1000g fruto BH) seguido de los estadios verde (45 mg/1000g fruto BH), maduro (55 mg/1000g fruto BH) y pinto (25 mg/1000g fruto BH). Finalmente se concluyó que el fruto de arazá-boi en los estadios verde y maduro presenta la mayor capacidad antioxidante, siendo los compuestos fenólicos los principales contribuyentes.

PALABRAS CLAVE.

Arazá, capacidad antioxidante, ABTS, DPPH, FRAP, decoloración del β -caroteno, madurez.

KEYWORDS

Araza, antioxidant capacity, ABTS, DPPH, FRAP, β -carotene bleaching, ripening.

PALAVRAS CHAVE

Araçá-boi, capacidade antioxidante, ABTS, DPPH, FRAP, descoloração do β -caroteno, maturação.

INTRODUCCIÓN

Como parte normal del metabolismo las células producen compuestos con electrones libres conocidos como radicales libres. Dichos radicales son muy reactivos y, cuando no se controlan, pueden causar daño oxidativo a las moléculas de la célula (proteínas, ácidos nucleicos, entre otros), lo que origina un impacto negativo sobre el metabolismo celular. El exceso de radicales libres puede llevar a un estrés oxidativo que es responsable de enfermedades como Alzheimer, cáncer, aterosclerosis, entre otras. Los compuestos que pueden atrapar los radicales libres y así evitar su efecto sobre la célula se conocen como antioxidantes; estos antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas evitando la formación de un exceso de radicales libres y por tanto evitando los efectos de éstos en la célula.

El estudio de los compuestos con capacidad antioxidante que provienen de frutas y verduras es de gran interés debido a que son compuestos de origen natural, que no representan riesgos para la salud ya que algunos antioxidantes sintéticos pueden presentar efectos secundarios que no son deseables. La medida de la capacidad antioxidante de un fruto permite determinar qué tan útil puede ser éste para la salud humana y qué efectos positivos puede tener para la prevención de enfermedades causadas por el estrés oxidativo (1).

El arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) es un fruto originario de la región amazónica occidental, cultivado en países como Brasil, Perú, Ecuador, Bolivia y Colombia. La producción en nuestro país se concentra en las regiones cálidas y húmedas, especialmente en el sur, donde los principales productores están en los departamentos de Guaviare, Caquetá y en menor proporción en Putumayo. En la actualidad existen alrededor de 1200 hectáreas cultivadas con estos frutales amazónicos y a su explotación están vinculadas muchas familias de la región (2, 3).

El fruto de arazá se proyecta día tras día como un elemento productivo tendiente a mejorar la parte socioeconómica de la región amazónica occidental; sus características organolépticas lo hacen apetecible y sus componentes nutricionales prometen un beneficio para la salud de las personas que lo consuman dentro de su dieta regular (4). Garzón y col. encontraron que la pulpa de arazá es una fuente importante de vitamina C y compuestos fenólicos, por tanto la fruta puede tener un excelente potencial antioxidante beneficioso. Sin embargo, no hay estudios de la identidad química de estos compuestos fenólicos en arazá (5). El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad antioxidante e identificar los principales fenoles del epicarpio y mesocarpio del arazá en cuatro etapas de madurez, con el fin de conocer en qué estado de madurez y que parte del fruto son los más importantes para ser consumidos que produzcan una efectiva acción antioxidante

MATERIALES Y MÉTODOS.

Clasificación y procesamiento de los frutos. Los frutos fueron obtenidos de algunas centrales de abastos de la ciudad de Bogotá D.C. y fueron clasificados en cuatro estados de madurez (verde, pintón, maduro y sobremaduro), utilizando inicialmente como criterios de selección el color y la apariencia de los frutos. Después de desinfectados con solución de hipoclorito de sodio (0.01%), se procedió a la separación manual del epicarpio y el mesocarpio, en cada uno de los estados de madurez para posteriormente someterlos a un proceso de liofilización, con el fin de mantener las propiedades de cada estado estudiado, ya que el arazá por ser un fruto climatérico alcanza rápidamente la madurez fisiológica, dificultando el estudio del fruto sin ser procesado.

Sobre los liofilizados obtenidos se determinó directamente el índice de madurez en los cuatro estados, midiendo la cantidad de sólidos solubles totales y la acidez titulable (6, 7). Estas mediciones se realizaron por triplicado.

A partir de las partes de los frutos liofilizados se realizaron extracciones utilizando mezclas de solventes; para ello se pesó 1,000 g de arazá liofilizado en un tubo Falcon y se adicionaron 20.0 mL de una mezcla metanol:agua (50:50), agitando fuertemente en vórtex a 50 °C durante 30 min.. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante

20 min. recogiendo el sobrenadante y almacenándolo a -15 °C en la oscuridad; sobre el residuo se realizaron dos extracciones sucesivas adicionando en cada una 10.0 mL de una mezcla acetona:agua (70:30), agitando en vórtex durante 30 min. a 50 °C y centrifugando a 5000 rpm durante 20 min.. Finalmente se reunieron los tres sobrenadantes obtenidos y se almacenaron a -15°C en la oscuridad. Para cada estado de madurez se realizaron tres extracciones, siendo estos extractos las muestras que se sometieron a análisis posteriores (8).

Cuantificación de compuestos fenólicos libres. Para la cuantificación de los compuestos fenólicos libres se utilizó el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. En un tubo Falcon de 15 mL se adicionaron 1500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido al 10% con agua desionizada y 200 µL de soluciones de compuestos antioxidantes (patrón de ácido gálico de diferentes concentraciones y extractos de muestras diluidos 20 veces), incubando a temperatura ambiente por 5 min. Luego se adicionaron 1500 µL de una solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 6% en agua desionizada y se agitó fuertemente en vórtex. La mezcla se dejó en reposo durante 90 min. a temperatura ambiente en la oscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado. (9).

Cuantificación de la capacidad antioxidante total. La capacidad antioxidante del fruto de arazá fue determinada mediante los métodos ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfónico)), DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazilo), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) y decoloración del β-caroteno (10).

Método ABTS. Se preparó una solución de ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfónico) 7.0 mM y de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) 2.5 mM en agua desionizada y se dejó en agitación a 4 °C en la oscuridad durante 16 horas para generar el catión radical ABTS^{•+}. Luego la solución se diluyó cuidadosamente con metanol hasta obtener una absorbancia de 0.700 a 734 nm siendo esta la solución de trabajo (**ST**). En un tubo Falcon se adicionaron 2000 µL de **ST** y se incubaron por 5 min. a 30 °C, luego se adicionaron 20 µL de las soluciones de compuestos antioxidantes (extractos de muestras diluidos 12.5 veces en metanol) agitando en vórtex y se incubaron a 30 °C, tomando medidas de absorbancia a 734 nm cada 5 min. durante una hora hasta absorbancia constante. Para la curva de calibración se tomaron 2000 µL de **ST**, se incubaron por 5 min. a 30 °C, luego se adicionaron 20 µL de solución de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-ácido tetrametilcroman-2-carboxílico que es un análogo hidrosoluble de la vitamina E) en metanol de diferentes concentraciones agitando en vórtex; se incubaron por 6 min. a 30 °C y se midió la absorbancia a 734 nm. Todas las medidas se realizaron por triplicado. (11).

Método DPPH. Se preparó una solución de DPPH 0.1 mM en metanol y se ajustó la absorbancia en 1.100 a 515 nm usando metanol (**ST**). En un tubo Falcon se adicionaron 1950 µL de la solución de trabajo (**ST**) y se incubó por 7 min. a temperatura ambiente tomando la medida de absorbancia inicial a 515 nm. Luego se adicionaron 50 µL de cada extracto obtenido (diluido 5 veces en metanol), se mezcló en vórtex, se incubó a temperatura ambiente y se tomaron medidas de absorbancia a 515 nm cada 5 min. durante 2 horas. Para la curva de calibración se tomaron 1950 µL de **ST**, se incubaron por 7 min. y se midió la absorbancia inicial a 515 nm; luego se adicionaron 50 µL de la solución de Trolox en diferentes concentraciones, se mezcló

en vórtex y se incubó por 7 min. a temperatura ambiente; finalmente se midió la absorbancia a 515 nm. Todas las medidas se realizaron por triplicado (12).

Método FRAP. Inicialmente se preparó el reactivo de FRAP mezclando 5.0 mL de una solución de TPTZ (tripiridil-S-triazina) 10 mM en ácido clorhídrico (HCl) 40 mM con 5.0 mL de cloruro férrico (FeCl_3) 20 mM en agua. Al obtener una coloración azul de la mezcla se adicionaron 50.0 mL de buffer acetato 300 mM (pH=3.6). En un tubo Falcon se adicionaron 2700 μL del reactivo de FRAP y se incubaron a 37 °C por 4 min., luego se adicionaron 270 μL de agua desionizada y 90 μL de los extractos diluidos 10 veces en metanol o agua dependiendo de la curva de calibración usada. Se realizaron dos curvas de calibración utilizando en una Trolox y en otra sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Se tomaron 2700 μL del reactivo de FRAP y se incubaron por 4 min. a 37 °C, luego se adicionaron 270 μL de agua desionizada y 90 μL de las soluciones de Trolox o de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de diferentes concentraciones; se mezcló en vórtex incubando por 4 min. a 37 °C y se midió la absorbancia a 593 nm. Todas las medidas se realizaron por triplicado (13).

Decoloración del β -caroteno. En este método se mide la capacidad antioxidante lipofílica, por tanto, es necesario realizar una extracción diferente a la de los métodos anteriores. Para esto se pesaron 0.100 g de arazá liofilizado (epicarpio o mesocarpio) en un tubo Falcon, se agregaron 4.00 mL de acetona y se agitó el tubo en vórtex; luego se centrifugó a 5000 rpm por 15 min. y se repitió este proceso con 2.00 mL de acetona tres veces sobre el residuo. Los sobrenadantes obtenidos se reunieron y se almacenaron a -15 °C en la oscuridad (1).

En tubos Falcon se agregaron 500 μL de una solución de β -caroteno de concentración 0.4 mg/mL preparada en cloroformo, luego se adicionaron 20 μL de ácido linoléico, 200 μL de Tween 20 y 200 μL de solución patrón de Trolox o de las muestras según el caso. Se agitó fuertemente en vórtex y se adicionaron 50 mL de agua saturada con oxígeno; se repitió la agitación y se sometió el contenido del tubo a ultrasonido por 10 min. Luego se incubó a 50 °C con agitación constante y cada 10 min. se llevó a ultrasonido por 2 min., se tomaron medidas de absorbancia a 470 nm repitiendo este procedimiento durante dos horas. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Después de obtener las medidas planteadas anteriormente se realizó una prueba F en ANOVA para comprobar si existía alguna diferencia significativa entre las medias de cada grupo de datos y por medio de una prueba de rangos múltiples se determinó cuáles medias presentaban diferencias estadísticamente significativas unas de otras a un nivel de confianza del 95 %.

Identificación parcial de los compuestos fenólicos por HPLC

Extracción

Para este análisis se pesaron 200 mg de muestra (epicarpio o mesocarpio, liofilizado) en un tubo plástico cónico, se adicionaron 2 mL de una solución de metanol acidulado (80-19-1, metanol-agua -HCl), se agitó a temperatura ambiente en vórtex durante 1 min y luego se sonicó durante 1 h a 40°C. Se centrifugó a 6000 rpm por 15 min.. El sobrenadante obtenido se filtró a través de membranas PVDF de 13 mm de diámetro

y 0,22 μm de tamaño de poro y se inyectó en el cromatógrafo para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos.

Identificación parcial por HPLC en fase reversa-arreglo de diodos

El método para el análisis cromatográfico de compuestos fenólicos se desarrolló en un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1260 con bomba cuaternaria de presión máxima de 600 bares, inyector automático estándar 1260 Infinity para viales de 2 ml y volumen de inyección de 5 μL . La separación de fenoles se obtuvo en una columna Agilent Zorbax AAA (150 x 4,6 mm, 5 μm) en compartimiento termostatzado 1260 Infinity y detector de arreglo de diodos (DAD) 1260 Infinity. El gradiente empleado se describe en la tabla 1. Las demás condiciones cromatográficas se observan en la tabla 2.. Tanto el método de extracción, como el de análisis de fenoles por HPLC, se puso a punto en este trabajo

Tabla 1. Gradiente de elución de fenoles en HPLC de fase reversa

Tiempo (min)	(%) Agua mQ pH 2.5	(%) ACN
0	95	5
4	85	15
7	80	20
20	95	5

Tabla 2. Condiciones cromatográficas de bomba y DAD para el análisis de fenoles en HPLC de fase reversa

Método	Flujo	T° columna	Longitud de onda, nm
Fenoles	1 mL/min	35°C	$\lambda_1 = 324$ $\lambda_2 = 280$ $\lambda_3 = 220$

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó usando patrones de ácidos caféico, clorogénico y gálico. La identificación de los compuestos fenólicos fue realizada por comparación del tiempo de retención de los patrones y las longitudes de onda de máxima absorción (λ_1 , λ_2 y λ_3) de los espectros UV-VIS. La cuantificación se obtuvo mediante interpolación en curvas de calibración realizadas con los patrones (10-100 mg/ml).

Análisis de datos

Se empleó el promedio como medida de centralización. Para evaluar las diferencias específicas entre los valores de cada uno los parámetros evaluados se usó la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Gráficamente, letras diferentes indican diferencias significativas en los valores de las medidas realizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clasificación y procesamiento de los frutos. El índice de madurez es un parámetro fisicoquímico de gran importancia para la correcta clasificación de los frutos en diferentes estados de maduración. Por tanto, sobre los frutos liofilizados se midió este parámetro utilizando un refractómetro para determinar la cantidad de sólidos solubles totales expresados como °Brix y una titulación ácido-base con hidróxido sodio 0.1 M para determinar la acidez titulable (que se reporta como porcentaje de ácido málico por cada 100 g de fruto).

Tabla 3. Índice de madurez del fruto de arazá liofilizado, en diferentes estados de maduración.

Estado de madurez	Acidez titulable (% ác. málico)	Sólidos solubles (°Brix)	Índice de madurez (°Brix/% ác. málico)
Verde	6.82 ± 0.30	5.0 ± 0.1	0.73 ± 0.03
Pintón	5.55 ± 0.11	6.5 ± 0.1	1.17 ± 0.01
Maduro	4.64 ± 0.18	7.0 ± 0.2	1.51 ± 0.10
Sobremaduro	4.52 ± 0.06	7.5 ± 0.1	1.66 ± 0.05

La clasificación hecha inicialmente con base en el color y apariencia concuerda con los valores obtenidos para el índice de madurez (tabla 3) ya que se observan diferencias entre los valores obtenidos para los diferentes estados, aumentando durante el proceso de maduración. Estos no han sido reportados en la literatura hasta el momento, siendo más altos que los de otras frutas Tropicales como la guayaba (8), y la uva (9)

Cuantificación de compuestos fenólicos libres. La cuantificación de fenoles totales se determinó en los extractos obtenidos de epicarpio y mesocarpio de arazá liofilizado, utilizando el método de Folin-Ciocalteu. En la gráfica 1 se observa que el contenido de fenoles es mayor en el estado verde, tanto en epicarpio como en mesocarpio, seguido por el estado maduro, el estado pintón y finalmente el sobremaduro. Al aplicar la prueba estadística de rango múltiple entre muestras se encontró que en el mesocarpio del arazá los valores obtenidos para los estados pintón y maduro son estadísticamente iguales, indicando que el contenido de fenoles libres es igual en ambos estados a pesar de la diferencia en la madurez del fruto.

Cuantificación de la capacidad antioxidante total. Los distintos métodos utilizados para medir la capacidad antioxidante se deben a la alta capacidad que tienen los polifenoles como antioxidantes, donde cada método de medida es sensible a las distintas características redox del compuesto polifenólico. Los métodos ABTS y DPPH actúan sobre polifenoles donores de átomos de hidrógeno a radicales oxidantes, estabilizándolos y disminuyendo así su poder oxidante; el método FRAP actúa sobre los polifenoles capaces de donar electrones reduciendo intermediarios oxidados, mientras que el método de decoloración del β -caroteno actúa deslocalizando y estabilizando los electrones recibidos de un radical libre. Por tanto, para determinar la capacidad antioxidante total de un fruto, debe medirse la actividad antioxidante con cada uno de estos métodos para poder determinar tanto el efecto de neutralización de radicales libres, como su capacidad de reducción (14).

El primer método aplicado a los cuatro extractos obtenidos del fruto de arazá fue el método ABTS que permite medir la capacidad de los polifenoles, o moléculas con capacidad antioxidante, de captar radicales libres y que se sigue espectrofotométricamente a una longitud de onda de 734 nm. Los valores de actividad antioxidante obtenidos por este método utilizando el Trolox como patrón se observan en la gráfica 2 y muestran que en el epicarpio del fruto de arazá la capacidad antioxidante medida es mayor (y estadísticamente igual) en los estados verde y maduro mientras que en el mesocarpio la mayor capacidad antioxidante se presenta en el estado verde seguida de los estados pintón y maduro, que no presentan diferencias significativas entre sí, y finalmente el estado sobremaduro. Según estos datos la capacidad de captar radicales libres es mayor en el estado verde del fruto, y está relacionada con el contenido de fenoles ya que en este estado se presenta el mayor contenido de ellos.

El segundo método utilizado fue el método DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazilo). Al igual que el método ABTS, en este método se mide la capacidad de captar radicales libres por parte de los polifenoles y demás especies con capacidad antioxidante, siguiendo las reacciones por espectrofotometría a una longitud de onda de 515 nm. Al observar los datos obtenidos (gráfica 3), la capacidad antioxidante en el epicarpio del arazá es mayor en el estado maduro seguida de los estados verde, pintón y sobremaduro mientras que, en el mesocarpio el mayor valor se da en el estado verde, observando además que los estados pintón y maduro no presentan diferencias significativas entre sí y que el estado sobremaduro presenta la menor capacidad de captar radicales libres. Al comparar los métodos ABTS y DPPH hay concordancia en la medida de capacidad antioxidante en el mesocarpio del fruto de arazá y una ligera diferencia entre los valores obtenidos sobre el epicarpio en el estado maduro.

Los resultados obtenidos en los métodos ABTS y DPPH muestran que en todas las medidas el método DPPH arrojó resultados menores, lo que indica que los ensayos realizados con este método son menos específicos y selectivos como se reporta en la literatura (9).

A diferencia de los métodos anteriores, el método FRAP mide la capacidad de reducción de un antioxidante sobre el reactivo de FRAP por transferencia de un electrón (es decir el paso de Fe^{3+} a Fe^{2+} en el complejo $[\text{Fe}(\text{III})(\text{TPTZ})_2]^{3+}$), siguiendo el proceso por espectrofotometría a una longitud de onda de 593 nm. Para el método

FRAP se utilizaron dos compuestos como patrones, Trolox al igual que en los métodos anteriores y sulfato de hierro (FeSO_4). Utilizando Trolox como patrón se obtuvieron los resultados que se muestran en la gráfica 4 donde se observa que la capacidad antioxidante en el epicarpio del arazá es mayor en los estados verde y maduro seguido por la capacidad de los estados pintón y sobremaduro, mientras que en el mesocarpio la mayor capacidad de reducción se presenta en el estado verde seguida por los estados pintón y maduro (que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí) y finalmente el estado sobremaduro.

Al realizar la medida de la capacidad antioxidante por el método FRAP en los cuatro estados de maduración utilizando como patrón FeSO_4 (gráfica 5) se observa que la mayor capacidad antioxidante en el epicarpio del arazá se presenta en el estado verde seguida de los estados maduro, pintón siendo menor en el sobremaduro, mientras que en el mesocarpio la capacidad antioxidante es mayor en el estado verde seguida de los estados pintón y maduro (que son estadísticamente iguales) y menor en el estado sobremaduro. Las diferencias en el método FRAP al utilizar patrones diferentes se deben a la diferencia de los mecanismos de reacción que tiene el reactivo de FRAP con el Trolox y el FeSO_4 .

La capacidad antioxidante hidrofílica determinada por los métodos anteriores es debida a compuestos como polifenoles, vitaminas hidrosolubles como el ácido ascórbico y otros compuestos. Al relacionar el contenido de fenoles del arazá en sus cuatro estados de madurez con la medida de capacidad antioxidante se observa una correlación lineal con coeficientes de correlación cercanos a 1.00 (tabla 4). Este comportamiento permite atribuir la capacidad antioxidante hidrofílica a los compuestos polifenólicos presentes en dicha fruta, los cuales no han sido reportados en la literatura para el arazá.

Tabla 4. Coeficientes de correlación lineal entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante hidrofílica para el arazá.

Método	Epicarpio	Mesocarpio
ABTS	0.946	0.990
DPPH	0.888	0.985
FRAP (Trolox)	0.993	0.998
FRAP (FeSO_4)	0.983	0.998

El último método que se aplicó para realizar la comparación de la capacidad antioxidante fue el método de decoloración del β -caroteno. En este método se promueve la peroxidación térmica del ácido linoléico en presencia de O_2 para formar el radical peroxilo; este radical puede ser neutralizado por el β -caroteno ocasionando la

ruptura de su conjugación manifestándose en el proceso de decoloración que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 470 nm. Entre más capacidad antioxidante tenga el compuesto evaluado, menor será la decoloración del β -caroteno. Para este método se realizó una nueva extracción utilizando acetona en las partes comestibles del fruto en los cuatro estados de madurez. En la gráfica 6 se reportan los valores obtenidos para dicha actividad; en el caso del mesocarpio del arazá el estado sobremaduro al igual que el estado verde presentan la mayor capacidad antioxidante lipofílica seguido de los estados maduro y pintón mientras que en el epicarpio se observa que el estado maduro presenta la mayor capacidad antioxidante seguido de los estados pintón, sobremaduro y verde.

Si bien no es tan marcada la diferencia en la capacidad antioxidante hidrofílica en los estados verde y maduro, esta capacidad disminuye con el estado de madurez ya que los fenoles (que son los principales contribuyentes a esta capacidad) se oxidan de acuerdo al proceso respiratorio del fruto durante la maduración.

Los valores obtenidos por el método de decoloración del β -caroteno son diferentes a los encontrados por los métodos ABTS, DPPH y FRAP ya que estos últimos miden la actividad antioxidante de los componentes hidrofílicos del fruto (como fenoles o algunas vitaminas) mientras que el primero cuantifica la actividad antioxidante de compuestos lipofílicos como los carotenoides (5).

Cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos: La identificación preliminar de los compuestos fenólicos, presentes en la mesocarpio y la epicarpio del fruto de arazá en diferentes estados de maduración fue realizada mediante la técnica cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). En las graficas 7 y 8 se pueden observar los perfiles cromatográficos a 320, 280 y 220 nm de los extractos metanólicos de los compuestos antioxidantes obtenidos del fruto de arazá en epicarpio y mesocarpio respectivamente, en los estados verde (a), pintón (b), maduro (c) y sobremaduro (d).

Para confirmar la identidad de los compuestos, se realizó el análisis comparativo espectral UV-VIS con los compuestos patrones de cada uno de los picos, tal como se observa en la grafica 9, donde los picos de las muestras presentan los mismos máximos de absorción y la misma forma del espectro que los patrones correspondientes, permitiendo confirmar la identidad de los picos de ácido gálico, caféico y clorogénico, cuyos tiempos de retención fueron idénticos a los de los compuestos identificados (gráficas 7 y 8)

Una vez identificados los ácidos fenólicos presentes en el mesocarpio y epicarpio de arazá, estos se cuantificaron mediante interpolación en curvas de calibración realizadas con los patrones. Los datos de las curvas para cada ácido fenólico se observan en la tabla 5.

Tabla 5. Ecuaciones de las curvas de calibración empleadas para la cuantificación cromatográfica de los compuestos fenólicos presentes en arazá

Compuesto	Longitud de Onda	Curva de calibración	R ²
Ácido Gálico	220nm	Y=29.30X + 0.44	0.99
Aclorogénico	320nm	Y=14.31X - 0.16	0.99
Á. Caféico	320nm	Y=18.60X + 0.91	0.99

En la grafica 10 se observa que el acido clorogénico en la epicarpio logra un máximo en el estado pintón pero luego empieza decrecer; por el contrario este ácido en el mesocarpio aumenta su concentración conforme avanza la maduración del fruto.

La concentración del ácido caféico disminuye durante la etapa de senescencia, mientras que la concentración del acido gálico tuvo una tendencia a aumentar durante la maduración, tanto en la epicarpio como en el mesocarpio. También se puede observar que el acido clorogénico es el compuesto fenólico que presenta mayor concentración, cerca de 500 µg/g en el estado pintón y 500 µg/g en el estado maduro en el epicarpio y aproximadamente 115 µg/g en el estado sobremaduro y 75 µg/g en el estado maduro en el mesocarpio, siendo este el compuesto que podría presentar la mayor contribución a la capacidad antioxidante en el fruto de arazá, seguido por el acido gálico. Cabe resaltar que el acido clorogénico es el acido fenólico más abundante en plantas y también el antioxidante más activo de este grupo de compuestos (5).

CONCLUSIONES

El arazá presenta una mayor actividad antioxidante en el estado verde y disminuye con el grado de madurez, especialmente en el epicarpio.

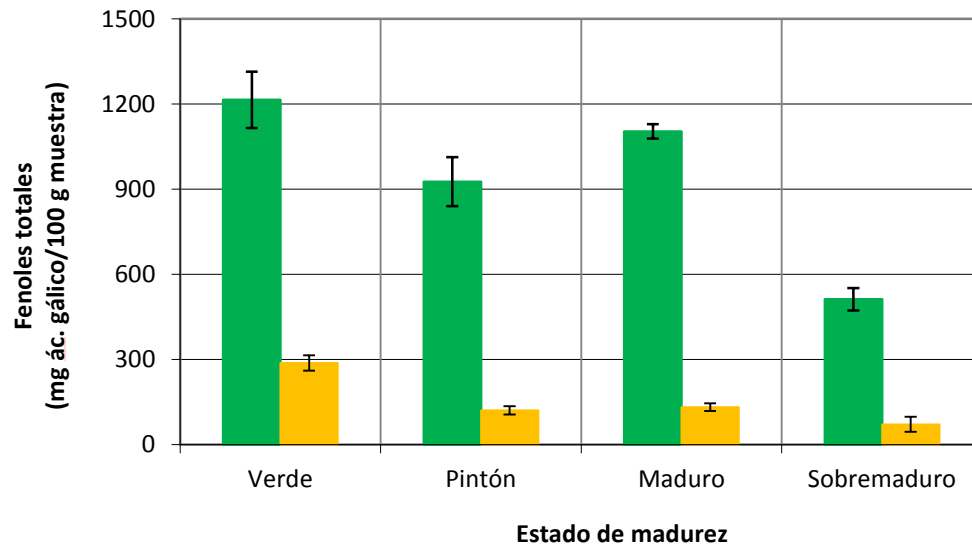
La capacidad antioxidante del arazá es principalmente de tipo hidrofílico.

La actividad antioxidante del arazá se debe principalmente a los compuestos fenólicos, mayoritariamente al ácido cafeico.

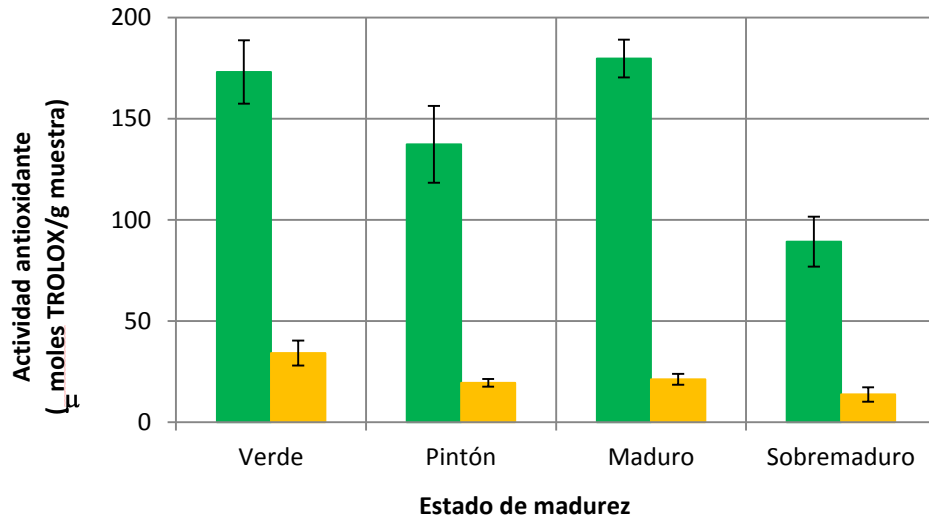
BIBLIOGRAFÍA

- (1) Velioglu Y, ; Mazza G, ; Gao L, ; Oomah B. Antioxidant Activity and Total Phenolics In Selected Fruits, Vegetables and Grain Products. J. Agric. Food Chem. 1998. **46**: 4113-4117.
- (2) Do Nascimento S, De Oliveira D, Wachter O. Araza (*Eugenia stipitata*) Cultivo y Utilización: Manual Técnico. Ed. Secretaria Pro Tempore, 1999.
- (3) Fernández-Trujillo, J.P. ; Carrillo, M.P. ; Barrera, J.A. ; Hernández, M.S.. Arazá. In: Yahia, E.M. (Ed.). Tropical fruit. Woodhead Publishing, Great Abington, Cambridge, UK, 2011. **2**, (6): 98-115.
- (4) Hernández M, Barrera J, Carrillo M. Arazá. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. 2006, p. 10-11.
- (5) Garzón A. ; Narváez C. ; Rache E. ; Kopec A. ; Barry M. ; Kenneth M. Determination of Carotenoids, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Araza (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh), an Amazonian Fruit. J. agric food chem. 2012. **60** (18): 4709-4717.

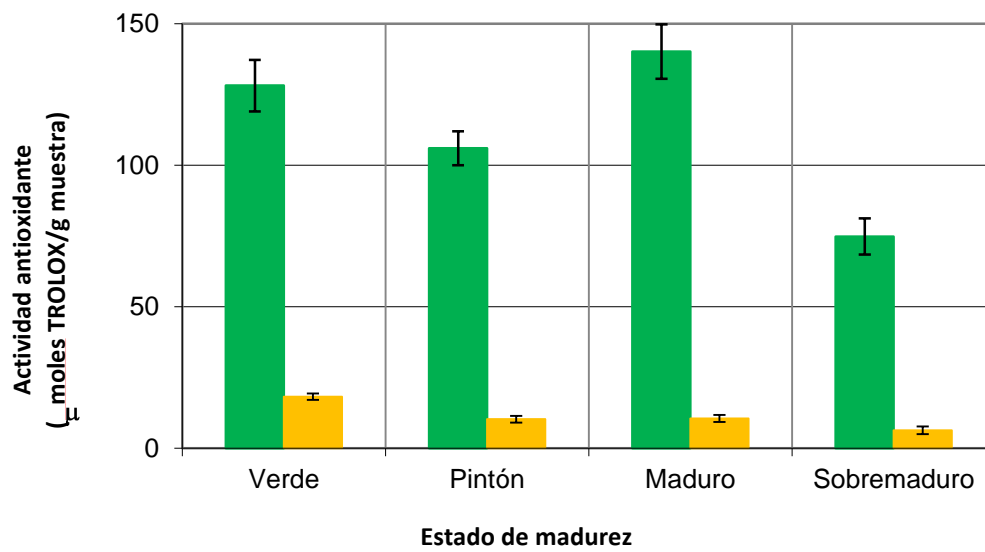
- (6) Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Productos de Frutas y Verduras. Determinación de Acidez Titulable. Bogotá: ICONTEC,1999.6p:il.(NTC 4623).
- (7) Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Jugos de Frutas y Hortalizas. Determinación del Contenido de Sólidos Solubles. Método refractométrico. Bogotá: ICONTEC,1999.9 p:il.(NTC 4624).
- (8) Espinal M. Capacidad Antioxidante y Ablandamiento de la Guayaba Palmira ICA I (*Psidium Guajava* L.) durante el Proceso de Maduración. Tesis Magister en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá, 201, p. 150.
- (9) Magalhaes L. Automatic Method for The Determination of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products. J. Agric. Food Chem. 2006. **54**: 5241-5246.
- (10) Huang D. ; Ou B. ; Prior R. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. J. Agric. Food Chem. 2005. **53**: 1841-1856.
- (11) Re R. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolouration Assay. Free Radic Biol Med. 1999. **26**: 1231-1237.
- (12) Sharma O. DPPH Antioxidant Assay Revisited. Food Chem. 2009. **13**: 1202-1205.
- (13) Benzie Iff. ; Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma as a Measure of “Antioxidant Power” The FRAP Assay. Anal. Biochem. 1996. **239**: 70-76.
- (14) Brand W. ; Cuvulier M. ; Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm. Wiss. Technol. 1995. **28**: 25-33.



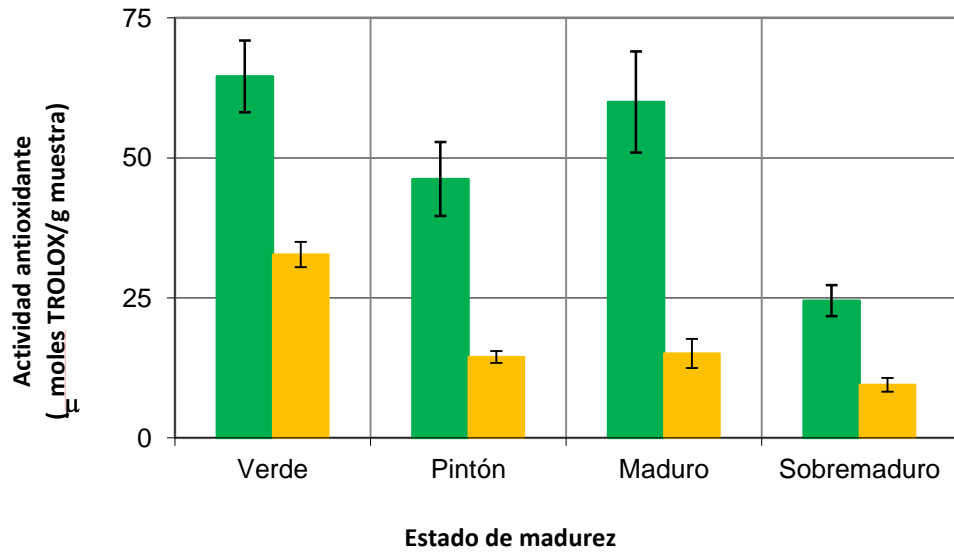
Gráfica 1. Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu en el fruto de arazá. ♦ Epicarpio ♦ Mesocarpio.



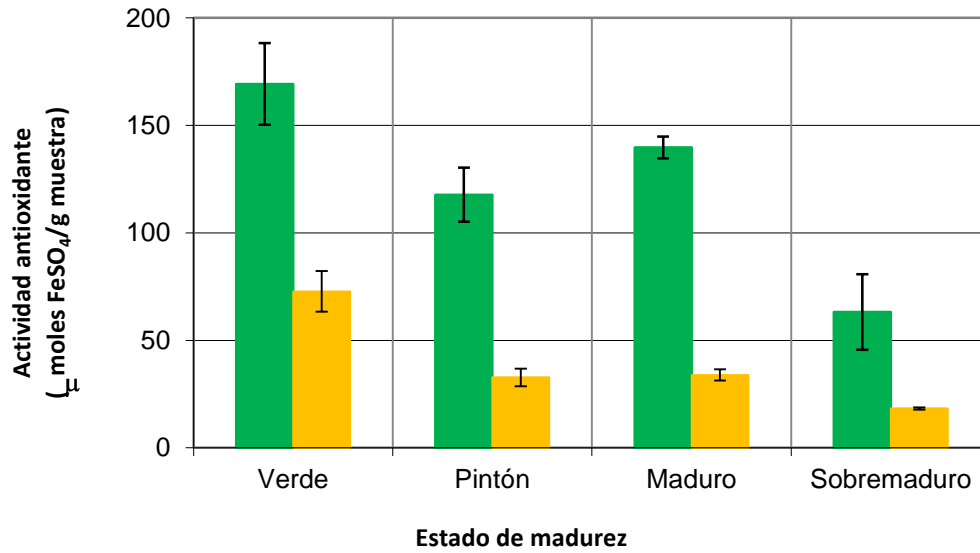
Gráfica 2. Medida de la actividad antioxidante por el método ABTS en el fruto de arazá. ♦ Epicarpio ♦ Mesocarpio.



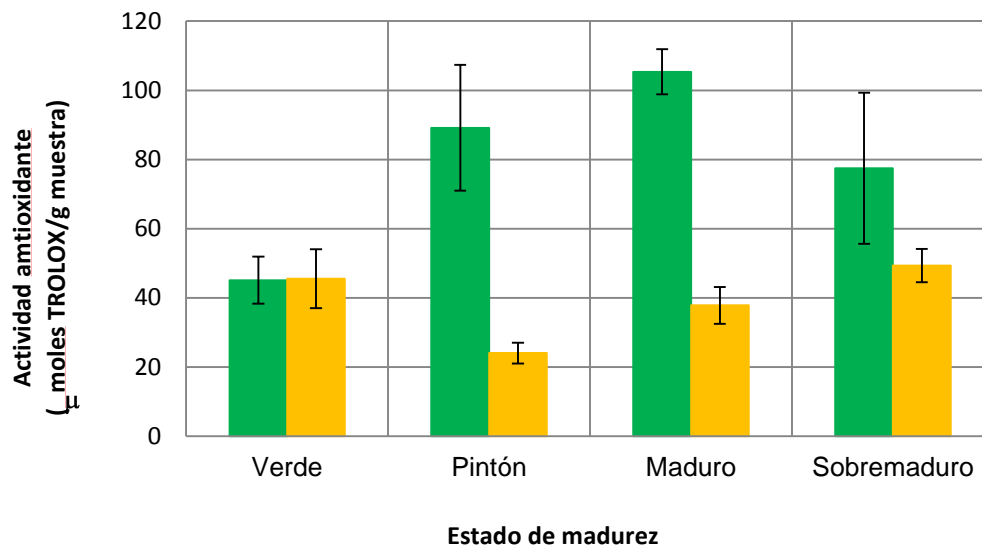
Gráfica 3. Medida de la actividad antioxidante por el método DPPH en el fruto de arazá. \blacklozenge Epicarpio \blacklozenge Mesocarpio.



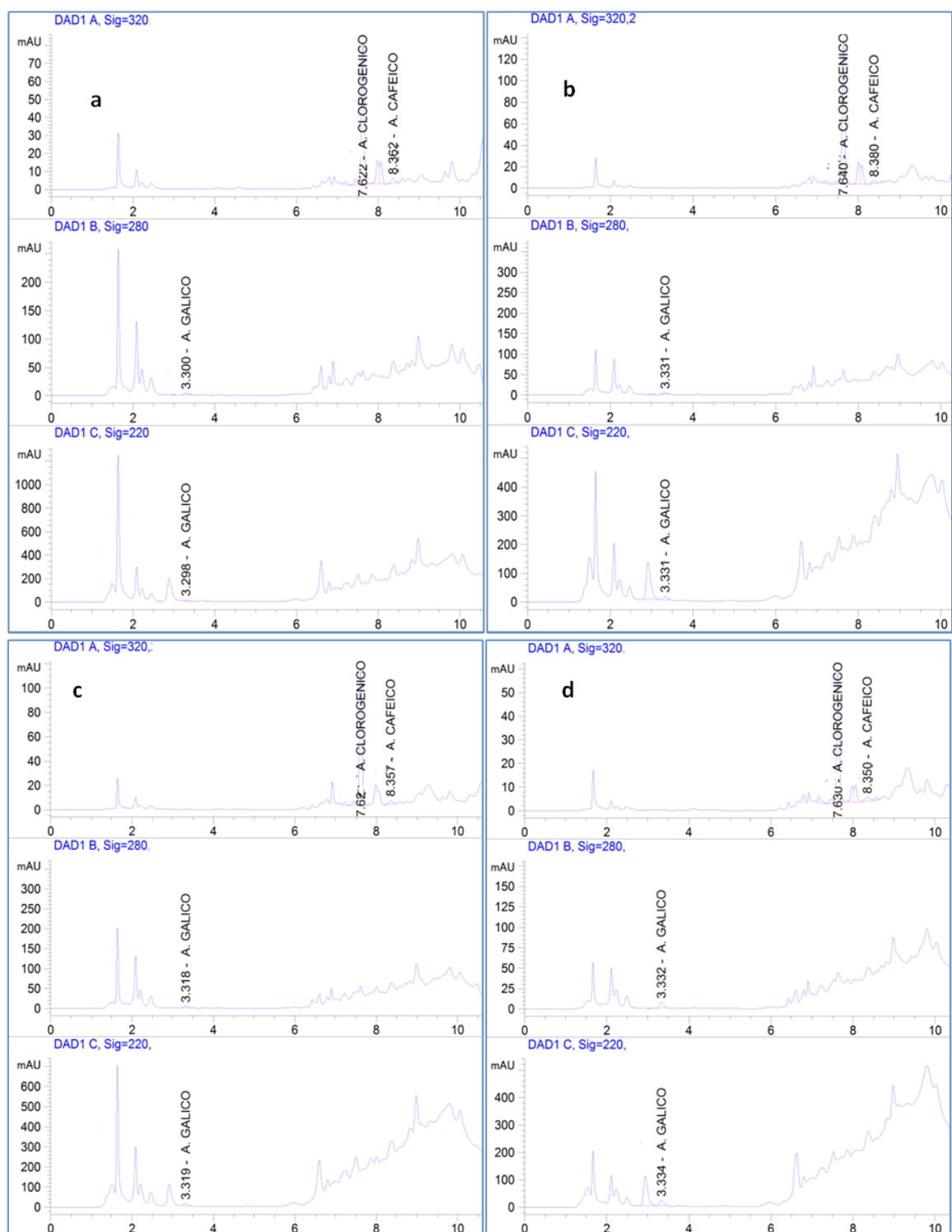
Gráfica 4. Medida de la actividad antioxidante por el método FRAP en el fruto de arazá usando Trolox como patrón. ♦ Epicarpio ♦ Mesocarpio.



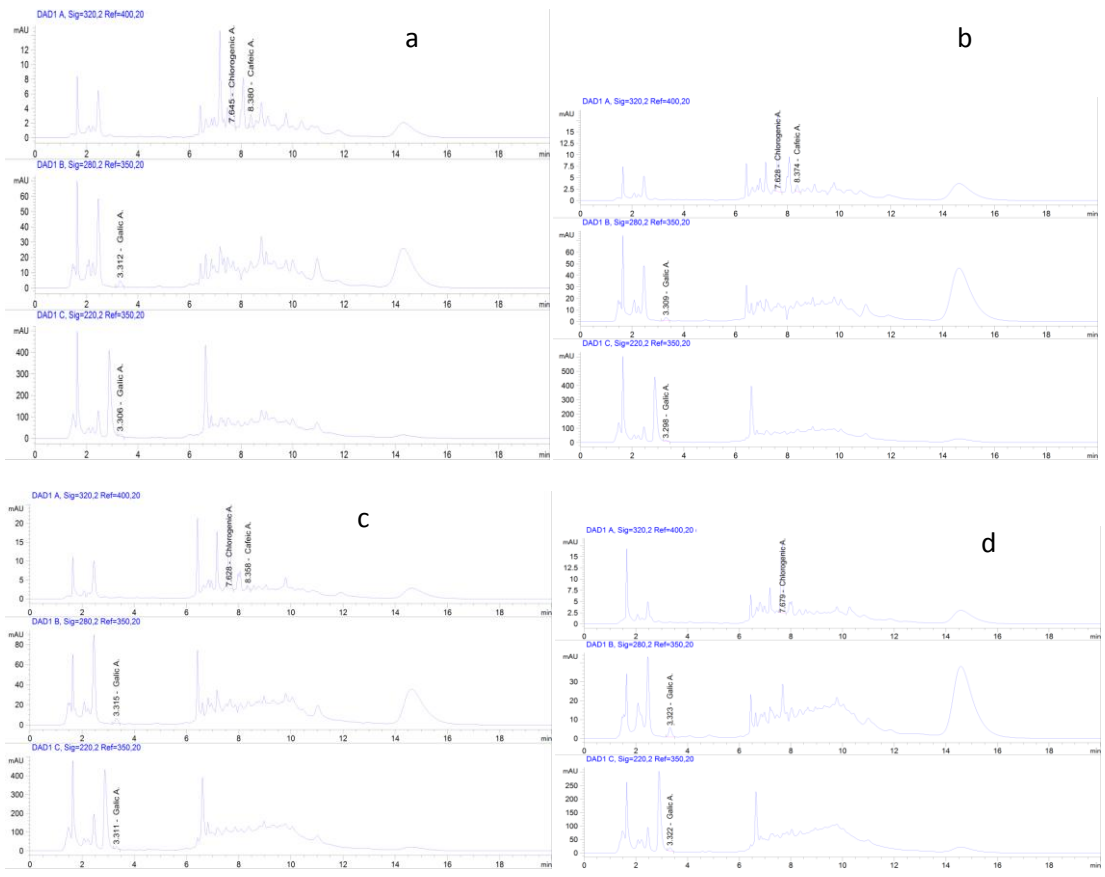
Gráfica 5. Medida de la capacidad antioxidante por el método FRAP en el fruto de arazá usando FeSO_4 como patrón. \blacklozenge Epicarpio \blacklozenge Mesocarpio.



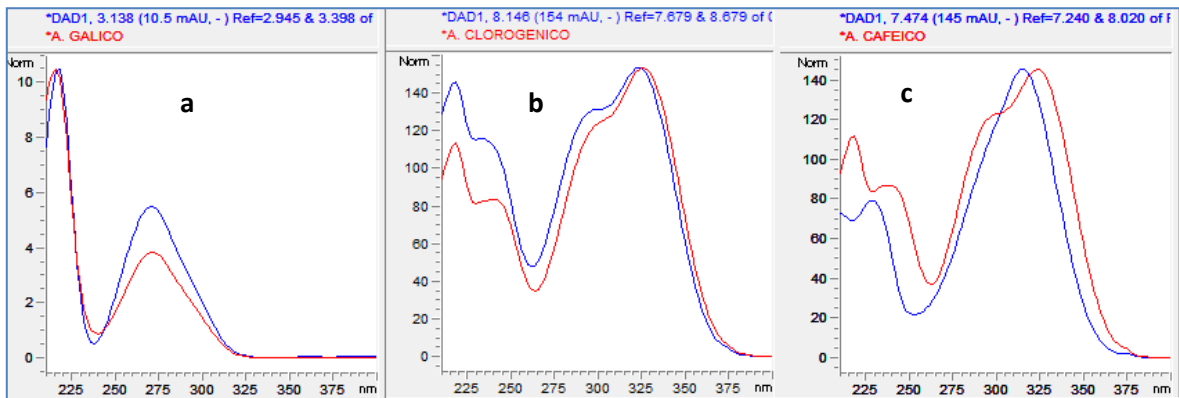
Gráfica 6. Medida de la actividad antioxidante por el método de decoloración del β -caroteno en el arazá. \blacklozenge Epicarpio \blacklozenge Mesocarpio.



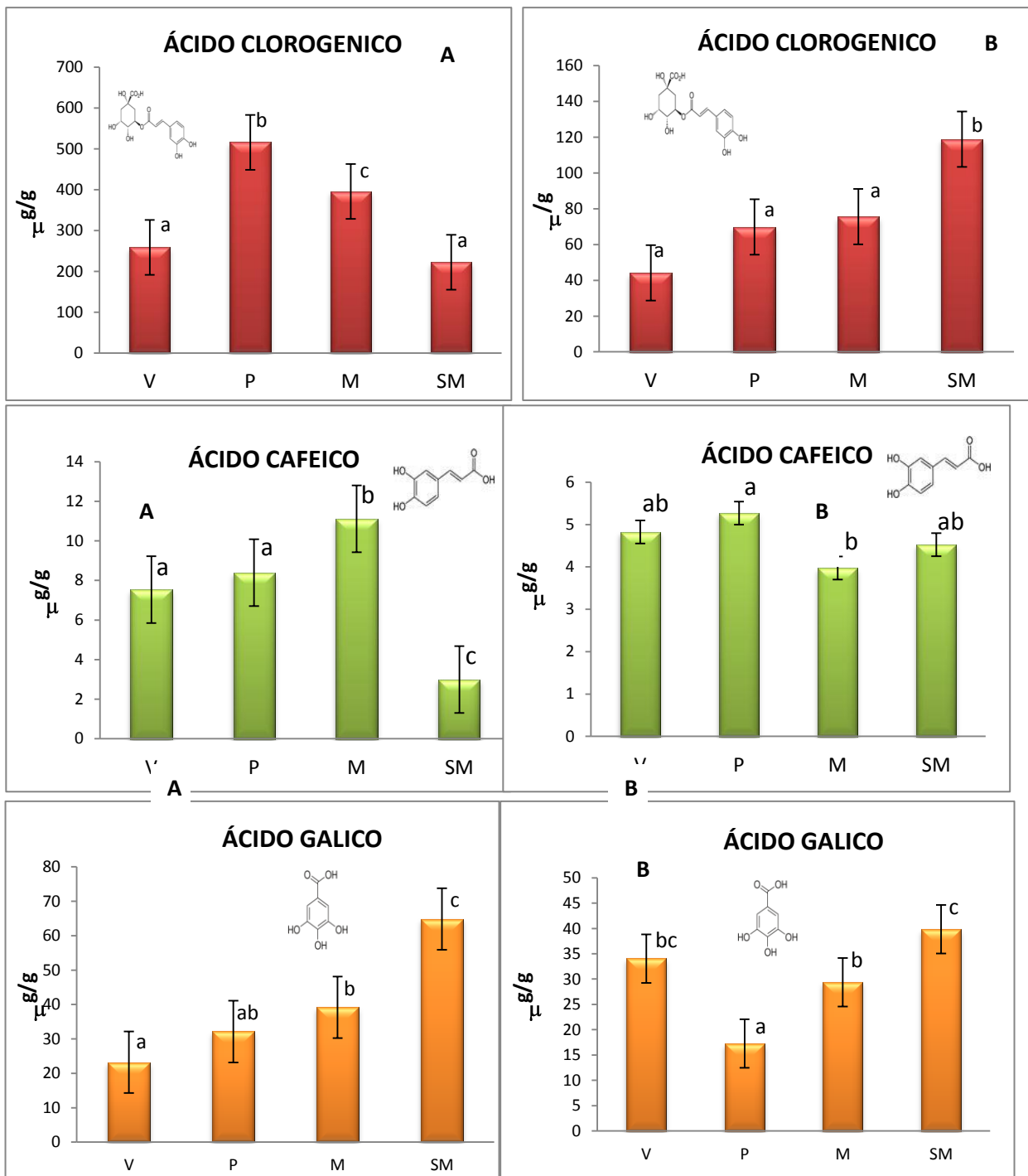
Grafica 7. Perfiles cromatográficos HPLC – DAD a 320, 280 y 220 nm de epicarpio de arazá: a. verde, b. pintón, c. maduro, d. sobremaduro.



Grafica 8. Perfis cromatográficos HPLC – DAD a 320, 280 y 220 nm de mesocarpio de açaí: a. verde, b. pintón, c. maduro, d. sobremaduro.



Gráfica 9. Espectros de absorción UV-VIS entre 200 y 400 nm de los compuestos fenólicos identificados preliminarmente por la técnica HPLC-DAD en la epicarpio y mesocarpio del fruto arazá. Los ácidos fenólicos identificados fueron ácido gálico (a), clorogénico (b), cafeico (c).



Grafica 10. Cuantificación de los ácidos fenólicos por HPLC-DAD extraídos del arazá en diferentes estados de maduración. (A) Epicarpio y (B) mesocarpio. G: Verde; P: Pintón; M: Maduro; SM: Sobremaduro