

Recibido: Agosto 27 de 2014. Aceptado: Septiembre 28 de 2014

Contenido total de fenoles y actividad antioxidante de pulpa de seis frutas tropicales

Resumen

Seis pulpas de frutas tropicales colombianas: *Passiflora tripartita* var. Mollissima, *Passiflora edulis* Sims, *Persea America* Mill, *Solanum quitoense* Lam., *Cyphomandra betacea* Sendt y *Physalis peruviana* L se emplearon para el estudio del contenido total de fenoles por el método de Folin Ciocalteu y la actividad antioxidante por los métodos químicos: DPPH y FRAP, y por los métodos biológicos oxidación de LDL e inhibición del estrés oxidativo sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. El extracto de *Passiflora tripartita* presentó el mayor contenido total de fenoles. En cuanto a los ensayos de actividad antioxidante el extracto de *Persea America* presentó mayor actividad por el método DPPH, mientras que el extracto de *Passiflora tripartita* presentó la mayor actividad por el método FRAP. En el ensayo de oxidación de LDL los extractos de *Passiflora tripartita* y *Physalis peruviana* presentaron la mayor capacidad de inhibición. En el ensayo de inhibición del estrés oxidativo sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* los extractos de *Persea America*, *Passiflora tripartita* y *Passiflora edulis* tuvieron el mayor efecto protector.

Palabras Clave: actividad antioxidante, DPPH, FRAP, oxidación LDL, levaduras, frutas tropicales.

Total phenolic content and antioxidant activity of pulp extracts of six tropical fruits

Abstract

Six pulp extracts of Colombian tropical fruits: *Passiflora tripartita* var. Mollissima, *Passiflora edulis* Sims, *Persea americana* Mill., *Solanum quitoense* Lam., *Cyphomandra betacea* Sendt., *Physalis peruviana* L. were used for studying the total phenolic content by the Folin Ciocalteu method and the antioxidant activity by the chemical methods: DPPH and FRAP, and by the biological methods oxidation of LDL and inhibition of oxidative stress on *Saccharomyces cerevisiae* growth. *Passiflora tripartita* showed the highest content of total phenolics. The *Persea America* exhibited the highest activity in the DPPH assay, whereas the banana *Passiflora tripartita* showed the highest antioxidant activity by the FRAP method. In the LDL oxidation assay the extracts from *Passiflora tripartita* and *Physalis peruviana* presented the greater inhibition ability. In the assay of inhibition of oxidative stress on *S. cerevisiae* the *Persea America*, *Passiflora tripartita*, and *Passiflora edulis* extracts exhibited the main protective effect.

Keywords: antioxidant activity, DPPH, FRAP, LDL oxidation LDL, yeast, tropical fruits.

Conteúdo total de fenóis e atividade antioxidante em alguns trechos da polpa de frutas tropicais

Resumo

Seis polpas de frutas tropicais colombianas *Passiflora tripartite* Mollissima var., *Passiflora edulis* Sims, Hass, *Persea América* Mill, *Solanum quitoense* Lam., *Cyphomandra betacea* Sendt, *Physalis Peruviana* L foram utilizados para estudar o conteúdo total de fenol pelo método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante por dois métodos químicos: DPPH e FRAP, e dois métodos biológicos a oxidação de LDL e a inibição de estresse oxidativo no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. O extrato de *Passiflora tripartita* apresentou o maior conteúdo total de fenóis. Nos ensaios da atividade antioxidante o extrato de *Persea America* apresentou a maior atividade pelo método DPPH, enquanto o extrato de *Passiflora tripartita* apresentou a maior atividade pelo método FRAP. No ensaio de oxidação de LDL os extratos de *Passiflora tripartita* e *Physalis peruviana* apresentaram a maior capacidade de inibição. No ensaio da inibição do estresse oxidativo no crescimento de *S. cerevisiae* os extratos de *Persea America*, *Passiflora tripartita* e *Passiflora edulis* tiveram o maior efeito protetor.

Palavras-chave: atividade antioxidante, DPPH, FRAP, a oxidação do LDL, o estresse oxidativo em leveduras, frutas tropicais.

Introducción

Colombia es un país con un gran potencial para el suministro de frutas y hortalizas ya que su posición geográfica y sus condiciones ambientales (altura y temperatura) permiten producir una gran variedad de estos productos percederos cuya producción, a nivel económico, genera una demanda considerable (1). Actualmente el consumo de frutas tropicales está relacionado con el aporte de nutrientes y de compuestos multifuncionales necesarios para mejorar la salud humana.

Las frutas tienen altos niveles de aceptación tanto frescas como procesadas debido a sus características sensoriales y nutricionales; además pueden considerarse como fuente de nuevas materias primas con potencial aplicación en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y agropecuaria (2).

Gracias a la descripción nutricional de las frutas se ha encontrado que estas contienen diversas clases de compuestos entre los que se encuentran antioxidantes como: ácidos fenólicos, antocianinas, carotenoides, flavonoides, vitamina C y vitamina E, por consiguiente la inclusión de una mayor proporción de estos productos alimenticios en la dieta permite la prevención enfermedades crónicas (3). Para determinar si un extracto es promisorio en términos de estos compuestos, inicialmente se evalúan extractos del material vegetal por ensayos de actividad antioxidante, para luego aislar e identificar en el extracto los fitoquímicos encargados de esta actividad (4). En el estudio de la actividad antioxidante se realizan diferentes ensayos con el fin de comparar y determinar los diferentes resultados con respecto a un extracto. Estos análisis experimentales son específicos para el tipo de compuestos con actividad antioxidante, hidrofílica o lipofílica.

En el presente estudio se realizó la evaluación de actividad antioxidante por los métodos químicos DPPH y FRAP y por métodos biológicos de oxidación de LDL y curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en extractos de curuba (*Passiflora tripartita* var. Mollissima), gulupa (*Passiflora edulis* var. Sims), aguacate variedad Hass (*Persea americana* var. Mill), lulo (*Solanum Quitoense* var. Lam), tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* var. Sendt) y uchuva (*Physalis peruviana* var. L). Se emplearon únicamente las pulpas de las frutas en estado maduro, pues, es en este estadio en el que las mismas presentan las mejores propiedades organolépticas para el consumidor; para determinar si la pulpa estaba madura se siguieron los lineamientos de la Norma Técnica Colombiana para análisis de frutas NTC-1291.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las frutas seleccionadas para el estudio fueron: curuba, gulupa, aguacate, uchuva, tomate de árbol y lulo. Su origen fue comercial y según su variedad se seleccionaron en estado maduro, el cual se evidenció inicialmente por las características organolépticas tales como color, tamaño, forma y consistencia. En todos los casos, excepto en la uchuva, fueron separadas las semillas y paredes duras para obtener la pulpa. Parte de la muestra fue utilizada inmediatamente para la determinación de índice de madurez y el material restante fue almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 días, luego fue liofilizado, molido y almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis de actividad antioxidante.

Determinación del índice de madurez

El procedimiento comprendió dos pasos fundamentales: determinación de la acidez titulable (AT) por el método descrito en la Norma Técnica

Colombiana 4623 y cuantificación de sólidos solubles totales de acuerdo a los lineamientos de la Norma Técnica Colombiana 4264. En los dos casos las medidas fueron realizadas por triplicado ($n=3$).

Extracción de compuestos con actividad antioxidante

Los extractos empleados para evaluar la actividad antioxidante fueron obtenidos de la siguiente manera: de cada fruta se pesaron 100 mg de pulpa liofilizada y se adicionaron 2 mL de etanol 50% v/v, esta mezcla se agitó durante 30 min a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se recuperó y fue almacenado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sobre el "pellet" obtenido de la centrifugación se adicionaron 2 mL de acetona 70% v/v, luego se agitó durante 30 min a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mezcló el sobrenadante con el extracto anterior. La mezcla resultante se almacenó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, este procedimiento se repitió tres veces (5). El extracto se agitó en vórtex por 30 s y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de los análisis de actividad antioxidante. Las extracciones se realizaron por triplicado para cada fruta ($n=3$).

Contenido total de fenoles por el método de Folin Ciocalteu

Para llevar a cabo la cuantificación del contenido total de fenoles se empleó el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu (1). Este método consistió en mezclar 750 μL del reactivo de Folin diluido al 10% v/v y 100 μL de cada una de las soluciones patrón de la curva de calibración de ácido gálico o de los extractos etanólicos diluidos 1:1 con agua, excepto el extracto de curuba, que se empleó diluido 4:1 v/v con agua destilada. La mezcla resultante se agitó en vórtex durante 30 s y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se adicionaron 750 μL de una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 6% p/v en agua, se agitó en vórtex durante 30 s y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 90 min. Finalmente se midió la absorbancia a 765 nm. La curva de calibración se realizó con ácido gálico en un rango de concentración final de 12 a 190 $\mu\text{g/mL}$. La concentración de fenoles se expresó como mg de ácido gálico/100 g de fruta B.H. El ensayo se realizó por triplicado ($n=3$) para cada uno de los extractos de frutas.

Ensayos de actividad antioxidante por métodos químicos

Método DPPH

Para llevar a cabo este ensayo se preparó una solución de DPPH 0,1 mM en etanol, 5 mL de esta solución se incubaron a temperatura ambiente durante 7 min y luego se midió la absorbancia a 515 nm. El valor obtenido correspondió a la absorbancia inicial. La curva de calibración se construyó adicionando 500 μL de soluciones patrón de Trolox en etanol en concentraciones de 2 a 70 μM , 870 μL de etanol y 130 μL de solución de DPPH (6). Estas soluciones se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 10 min y luego se midió la absorbancia de cada solución a 515 nm. Las muestras se analizaron de la misma manera utilizando 130 μL de solución de DPPH, 870 μL etanol y 500 μL del extracto etanólico. Cada una de estas soluciones se agitó en vórtex durante 30 s y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 h. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de UV-visible Thermo Scientific a 515 nm y los resultados de los extractos fueron interpolados en la curva de calibración. Los resultados se expresaron como μmol Trolox/100 g de fruta B.H. Las mediciones fueron realizadas por triplicado ($n=3$) para cada extracto de fruta.

Método FRAP

El reactivo FRAP se preparó de la siguiente manera: se mezclaron 2,5 mL de una solución de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y 2,5 mL FeCl₃ 20 mM en agua, se agitaron en vórtex hasta obtener una solución de color azul, posteriormente se adicionaron 25 mL de buffer de acetatos 300 mM pH 3,6. Se tomó 1 mL del reactivo FRAP, se incubó a 37 °C durante 5 min y se midió la absorbancia inicial del reactivo a 593 nm. Las curvas de calibración se realizaron utilizando Trolox en etanol en un rango de 2 a 50 µM, y el orden de adición de las soluciones fue el siguiente: 900 µL del reactivo FRAP, 90 µL de agua y 30 µL de las soluciones de la curva de calibración. La mezcla resultante se agitó en vórtex durante 1 min, se incubó a 37 °C durante 5 min y se midió la absorbancia final a 593 nm. Las muestras fueron procesadas de la misma forma adicionando 30 µL de la dilución al 50 % v/v de cada uno de los extractos, incubando a 37 °C durante 30 min y midiendo la absorbancia a 593 nm. La actividad antioxidante por este método se realizó por triplicado (n=3) y se expresó en µmol Trolox/100 g de fruta B.H. (1).

Ensayos de actividad antioxidante por métodos biológicos

Ensayo de oxidación de LDL

La metodología empleada para evaluar esta actividad antioxidante se dividió en tres pasos fundamentales. El primero consistió en extraer las LDL de plasma sanguíneo (7): 25 mL de una muestra de sangre de una persona adulta que se encontraba en ayunas durante 12 h y que no tenía hipercolesterolemia se recogieron sobre tubos de vidrio con anticoagulante. Los tubos se agitaron y se llevaron a una temperatura de 2 °C durante 15 min, se volvieron a agitar y se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C durante 5 min, el sobrenadante que corresponde al plasma se transfirió volumétricamente a un tubo falcon de 15 mL autoclavado y se adicionó el reactivo precipitante en relación 2:1 v/v con el plasma obtenido. El reactivo precipitante correspondió a la mezcla de ácido fosfotúngstico 500 mM y cloruro de magnesio 500 mM. El reactivo precipitante y el plasma se agitaron durante 2 min en vórtex y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm a 4 °C durante 10 min, el precipitado correspondió a las LDL; este se llevó a un volumen de 100 mL con buffer de fosfatos 10 mM y 0,16 M de NaCl, pH 7,4. El segundo paso consistió en realizar diálisis sobre la solución anterior de LDL (aproximadamente 10 mg/mL), en buffer de fosfatos salino 10 mM pH 7,4 a 4 °C en la oscuridad durante 24 h (7). Seguidamente se llevó a cabo la oxidación de las LDL que consistió en tomar 115 µL de solución de LDL, 100 µL de extracto diluido (1:1) con buffer de fosfatos, 235 µL de buffer de fosfatos salino y 50 µL de CuSO₄ 100 µM, el cual actúa como oxidante de las LDL. La mezcla se agitó en vórtex durante 2 min y luego se incubó a 37 °C en agitación durante 24 h. El tercer paso consistió en detener la oxidación haciendo pasar las muestras por una columna de Sephadex G-25, para ello se tomaron 550 µL del eluido, se adicionaron 500 µL de ácido tricloroacético (ATA) 25% p/v preparado en ácido clorhídrico 0,1 M, luego se agitó la mezcla durante 1 min. Posteriormente se adicionaron 500 µL de ácido tiobarbitúrico 1% p/v preparado en NaOH al 0,3% p/v. Se agitó nuevamente en vórtex durante 1 min y se incubó a 95 °C por 1 h en oscuridad. Posteriormente se dejó enfriar durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C) y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Seguidamente se registraron las absorbancias a 532 nm. Se realizó una curva de calibración del método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y se utilizó como estándar 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) en concentraciones de 0,5 a 10 µM, este ensayo se realizó por triplicado para cada extracto de fruta (n=3), los resultados fueron expresados como µg TMP/100 g de fruta (B.H.) (8).

Ensayo de estrés oxidativo sobre *Saccharomyces cerevisiae*

Este ensayo busca evaluar la capacidad que tienen los compuestos presentes en los extractos para promover el crecimiento de la levadura cuando es sometida a estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno, para ello se llevó a cabo la siguiente secuencia experimental (9):

- Preparación del medio de cultivo:** el medio empleado para el crecimiento de la levadura tuvo la siguiente composición: extracto de levadura 1% p/v, peptona 2% p/v, D (+) glucosa 2% p/v y agua mQ estéril 95% p/v. Este medio de cultivo es conocido como YPD y fue esterilizado en autoclave durante 30 min a 121 °C y 103 kPa.
- Preparación del inóculo:** Una solución stock de *Saccharomyces cerevisiae* con una concentración celular de 4×10^4 células/mL fue preparada en 75% p/v de glicerol y 15% p/v de YPD estéril. Se realizó un pre-inóculo por repique en fase sólida con YPD-agar estéril y luego se incubó a 37 °C durante 12 h. Con un asa de platino esterilizada se extrajo una pequeña cantidad de células de la levadura y se inocularon en 8 mL de YPD estéril, se incubó a 37 °C en agitación durante 12 h. Pasado el tiempo de incubación se realizó una dilución 1:10 v/v del inóculo, se midió la densidad óptica (D.O.) a 595 nm y se halló el volumen óptimo de cultivo celular para inocular con los extractos a evaluar.
- Diseño experimental para evaluar la actividad antioxidante:** Se realizó el control positivo con ácido ascórbico, el negativo sin antioxidante y un blanco únicamente con levadura y medio de cultivo. Antes de iniciar las medidas de D.O. se dejó inocular la *S. cerevisiae* durante 17 h en agitación a 37 °C con 8 mL de medio cultivo YPD, 25 µL del stock de la levadura, 100 µL de ácido ascórbico (control positivo) y 80 µL de los extracto de las muestras. En el control negativo y blanco se inocularon únicamente 8 mL de YPD y 25 µL del stock de la levadura. Terminado este tiempo de incubación de la levadura en las diferentes condiciones se midió la D.O._{595nm}, esta fue de 0,300 aproximadamente y correspondió al punto inicial del periodo de latencia de la *S. cerevisiae*. Luego se adicionaron 160 µL de peróxido de hidrógeno 1 mM al control positivo, negativo y extractos a evaluar. Se incubó a 37 °C en agitación durante 9 h y se tomaron lecturas cada 30 min. Antes de cada lectura se agitaron los tubos de vidrio durante 10 s en vórtex para asegurar la homogeneidad de las células en el medio de cultivo, posteriormente se tomaron 100 µL de cada ensayo que luego se llevaron a placas de 96 pozos. Antes de cada lectura se realizó agitación orbital durante 20 s y se tomaron las lecturas de D.O._{595nm}.

Los ensayos fueron realizados en condiciones de esterilidad y los extractos fueron filtrados utilizando filtros de membranas de nylon estériles con un diámetro de poro de 0,45 µm. Finalmente para evaluar el efecto antioxidante de los extractos se realizaron curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en cada una de las condiciones. Cada ensayo se realizó por triplicado (n=3) y se compararon con respecto al control positivo y negativo para determinar si existían diferencias estadísticas entre las muestras.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se reportan como el promedio \pm la desviación estándar (DS). Se utilizó el programa Stat Graphics Plus 5.1 para analizar los datos por ANOVA de una sola vía. Para determinar las diferencias significativas entre las frutas se aplicó la prueba LSD ($p < 0,05$).

Resultados y discusión

Los resultados de la cuantificación del contenido total de fenoles por el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu se muestran en la Figura 1. Los extractos de las pulpas de las frutas fueron ordenados de mayor a menor concentración de contenido total de fenoles siendo el extracto de curuba el de mayor concentración con un valor de $638,48 \pm 18,48$ mg equivalentes de ácido gálico/100 g muestra B.H. Este resultado es comparable con lo encontrado por Contreras *et al.* (1), quienes reportan para esta fruta un contenido total de fenoles de $635,00 \pm 2,71$ mg equivalentes de ácido gálico/100 g muestra B.H. El aguacate también presentó un alto contenido total de fenoles, con un valor de $582,96 \pm 18,83$ mg equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra B.H., el cual es comparable con el valor de 490 ± 70 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra B.H., reportado previamente para el aguacate variedad Hass (10).

Los compuestos fenólicos cuantificados en los extractos de las frutas son de gran importancia debido a que constituyen un grupo de metabolitos secundarios que se consideran antioxidantes naturales con múltiples beneficios biológicos para el ser humano, tales como la prevención de enfermedades cardiovasculares y degenerativas (4). En frutas se ha encontrado que los principales compuestos presentes son, en su mayoría, ácidos fenólicos, flavonoides y taninos, no obstante también se han encontrado fitoquímicos como vitamina C (ácido ascórbico), ácido fólico (vitamina B) y β -carotenos (provitamina A), lo que permite establecer que el consumo de frutas incrementa la ingesta de compuestos bioactivos

con múltiples propiedades para la salud humana. Una de las frutas ampliamente consumida es la naranja en forma de jugo. La fracción hidrofílica de la naranja se compone principalmente de vitamina C y compuestos fenólicos, tales como ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico y ácido caféico) y flavonoides glicosilados, específicamente flavanonas (hesperidina y narirutina) (10, 11).

Los resultados de la medida de la actividad antioxidante por el método DPPH se pueden observar en la Figura 2. Este ensayo determinó que el extracto de aguacate tuvo la mayor capacidad antioxidante con un valor de $165,10 \pm 4,36$ $\mu\text{mol Trolox}/100$ g muestra B.H., seguido de la gulupa, uchuva, tomate de árbol, lulo, y curuba. En un estudio realizado para diferentes variedades de aguacate se encontró que la variedad Hass, tanto en pulpa como en residuos, tiene la mayor actividad antioxidante por DPPH, en cáscara se reporta un valor de $189,8 \pm 10,8$ $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$ B.H. y en semilla $164,6 \pm 5,1$ $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$ B.H. (12). Probablemente esto se debe a la presencia de compuestos de tipo lipofílico como los carotenoides, tocoferoles y tocotrienoles, los cuales están presentes en mayor proporción en la pulpa. El aguacate es una buena fuente de compuestos bioactivos tales como los ácidos grasos monoinsaturados: oleico, linoléico y palmítico y los esteroides como el β -sitosterol, estigmasterol y campesterol (12). La presencia de estos y de otros compuestos como α -tocoferol, carotenoides, clorofilas y flavonoides en el extracto de aguacate contribuye a la mayor estabilización del radical libre DPPH (10).

El método FRAP se empleó para evaluar la actividad antioxidante en función de la capacidad de los extractos para reducir el complejo [Fe

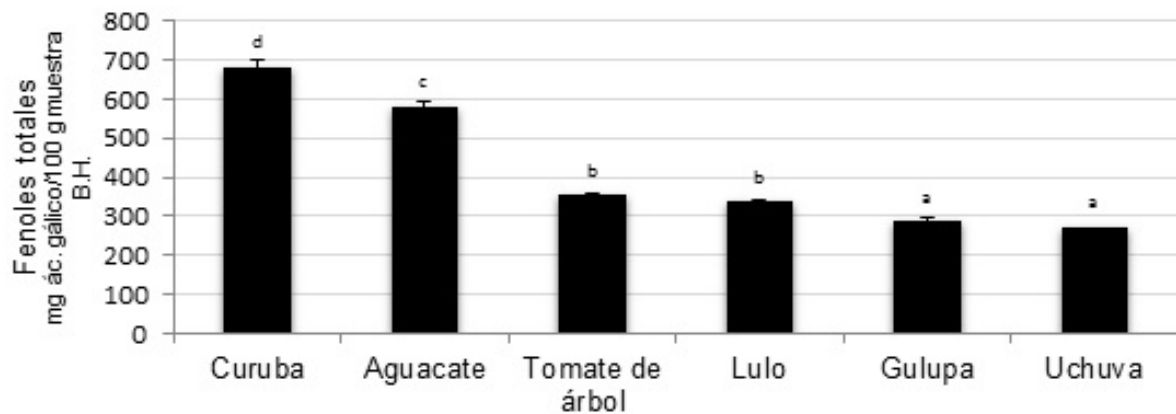


Figura 1. Contenido de total de fenoles en pulpa de las frutas. Los resultados representan el promedio ($n=3$) \pm desviación estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

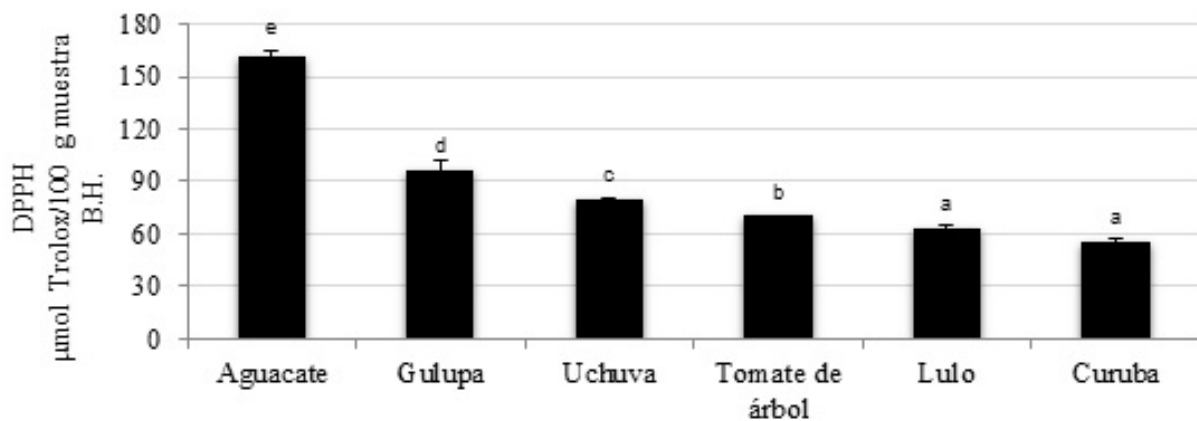


Figura 2. Actividad antioxidante por el método DPPH en los extractos de las frutas. Los resultados representan el promedio ($n=3$) \pm desviación estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

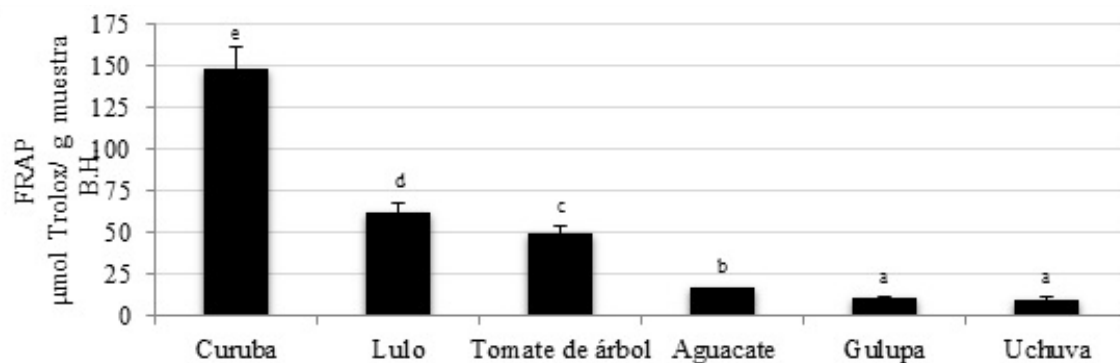


Figura 3. Actividad antioxidante por el método FRAP en los extractos de las frutas. Los resultados representan el promedio ($n=3$) \pm desviación estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

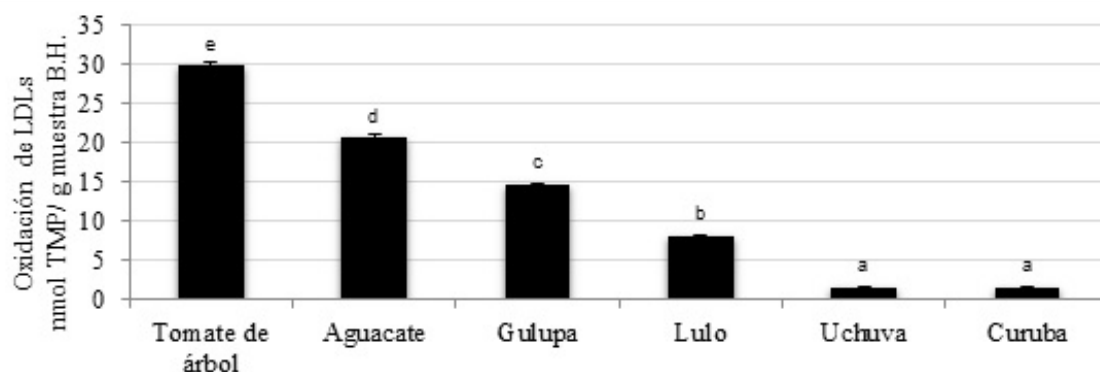


Figura 4. Resultados de TBARS en la oxidación LDL. Los resultados representan el promedio ($n=3$) \pm desviación estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

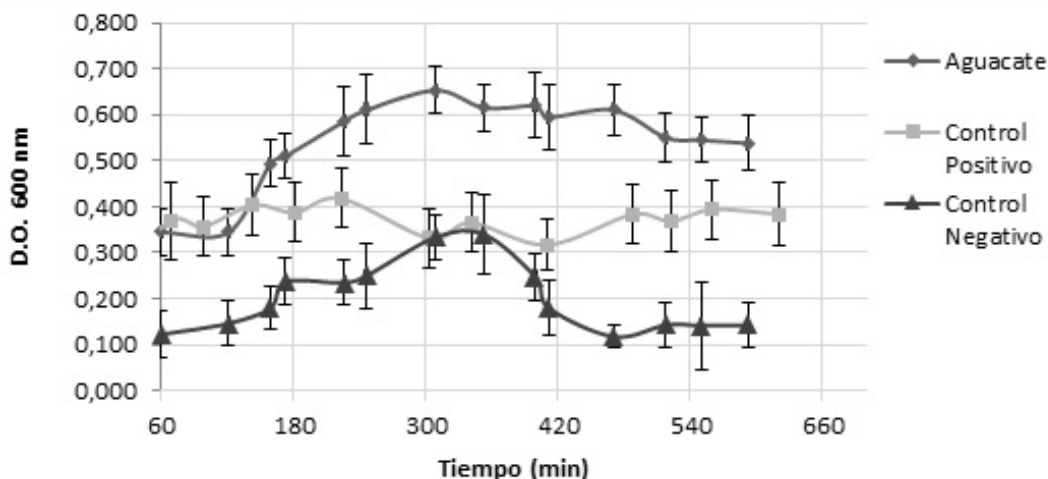


Figura 5. Perfil de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* con el extracto de aguacate. Cada resultado representa el promedio ($n=3$) \pm desviación estándar.

(III) $(TPTZ)_2^{3+}$; los resultados encontrados se observan en la Figura 3 donde se muestra que el extracto de la pulpa de curuba presentó la mayor actividad antioxidante por este método, con un valor de $148,07 \pm 12,07$ $\mu\text{mol Trolox/g muestra B.H.}$, cifra comparable con lo encontrado por otros autores en la misma variedad de curuba (1, 13). Adicionalmente estos resultados están directamente relacionados con el contenido total de fenoles presentes en esta fruta, el cual es mayor con respecto a las otras frutas analizadas.

Se encontró que los extractos de pulpas de frutas de mayor actividad antioxidante fueron diferentes: en el caso del DPPH es el aguacate y en

FRAP la curuba, debido a que la especificidad de los métodos es diferente, en el primer caso es lipofílica y en el segundo hidrofílica.

Los resultados obtenidos para el ensayo de oxidación de LDL se pueden observar en la Figura 4. Los extractos que permitieron mayor inhibición en la oxidación de las LDL fueron los extractos de curuba y uchuva, posiblemente debido a la presencia de compuestos fenólicos. Las posibles vías o mecanismos que permiten inhibir la oxidación de las LDL se dan a través de la captura de radicales libres o quelación de metales (9). Un aspecto de resaltar en este ensayo de actividad antioxidante es que estos compuestos también son capaces de inhibir la oxidación

de las LDL *in vivo* reduciendo la iniciación y propagación de radicales libres y por tanto minimizando el daño que se pueda generar a nivel cardiovascular (8, 15). Actualmente a nivel mundial se recomienda incluir el consumo de frutas dentro de la dieta ya que permiten prevenir enfermedades crónicas, inflamatorias y cardiovasculares, lo aconsejable por entidades especializadas en la nutrición es consumir al menos 5 porciones o 400 g de frutas y verduras al día (15).

En el ensayo de estrés oxidativo sobre *S. cerevisiae* se evaluaron los extractos para promover la supervivencia de la levadura cuando es sometida a estrés oxidativo con H_2O_2 . Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en las Figuras 5, 6 y 7, donde se muestran los perfiles de crecimiento de las levaduras. En este ensayo experimental se determinaron las principales fases de crecimiento que tuvo la levadura, la primera fue la etapa de latencia la cual está entre los 60 y 90 min, la segunda fue la etapa de crecimiento exponencial que se ubicó entre los 90 y 200 min aproximadamente y por último, la etapa estacionaria se presentó aproximadamente entre 200 y 600 min.

Se observó un comportamiento particular en la levadura sometida a estrés oxidativo sin adición de antioxidantes (control negativo). En este caso, la concentración celular no supera la alcanzada por la levadura sometida a estrés oxidativo con antioxidantes (control positivo); no obstante en el intervalo de 60 a 300 min hay un leve crecimiento exponen-

cial de la levadura y de los 300 a 420 min se evidencia una caída drástica en la concentración de células, para finalmente entrar en una etapa estacionaria donde no se evidencian cambios en el crecimiento. Este perfil de crecimiento permite deducir que el comportamiento de *S. cerevisiae* corresponde a una respuesta inminente de la levadura para sobrevivir cuando es sometida a estrés oxidativo, se promueve un crecimiento inicial pero con el transcurso del tiempo la supervivencia de la levadura es mínima. A pesar de que *S. cerevisiae* es un organismo eucariota que tiene en su sistema intracelular enzimas tales como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas, que disminuyen los niveles de especies reactivas de oxígeno y minimizan el daño oxidativo (16), el perfil de crecimiento encontrado, sin adicionar antioxidante, no fue superior en comparación con el control positivo y los extractos.

En la Figura 5 se muestra el perfil de crecimiento de la *S. cerevisiae* cuando se ha inoculado previamente con el extracto de aguacate. En este caso se puede evidenciar que hubo una mayor protección inducida por el extracto con respecto a la inducida por el control positivo y el negativo. En la fase de latencia la concentración de la cepa fue mayor en el control positivo con respecto al extracto que contiene aguacate, mientras que en la fase de crecimiento exponencial se evidenció que el extracto fue capaz de promover un crecimiento mayor, además logró mantener una concentración de células mayor con respecto a los con-

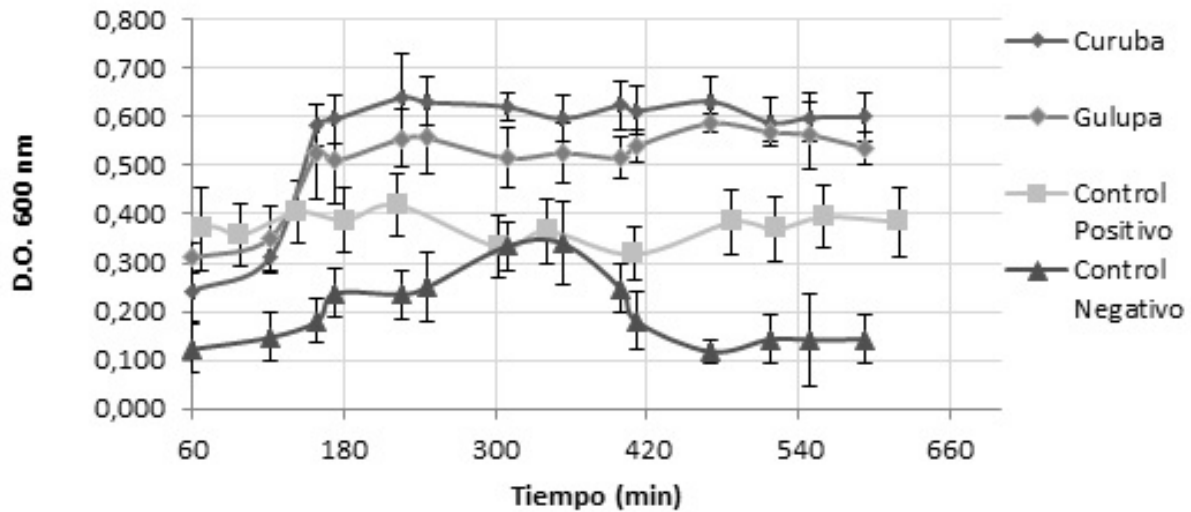


Figura 6. Perfil de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* con el extracto de curuba y gulupa. Cada resultado representa el promedio ($n=3$) \pm desviación estándar.

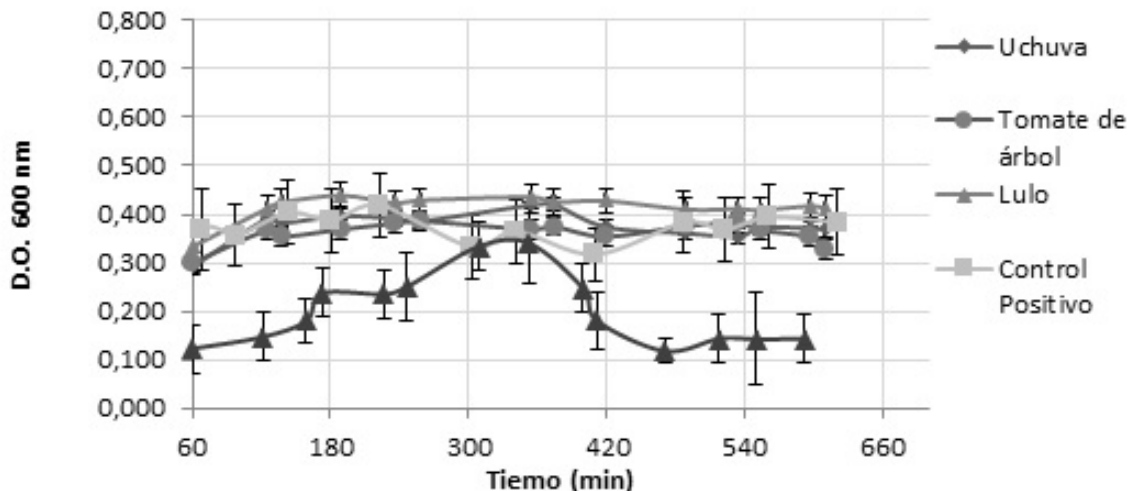


Figura 7. Perfil de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* con el extracto de uchuva, tomate de árbol y lulo. Cada resultado representa el promedio ($n=3$) \pm desviación estándar.

troles durante la etapa estacionaria. El comportamiento de la levadura se debe, posiblemente, a que en el extracto analizado hay compuestos fenólicos y vitamina C, sustancias capaces de proteger las células de la levadura del estrés oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno; en anteriores estudios ya se ha encontrado que hay una relación entre la composición del extracto y el comportamiento biológico sobre modelos celulares (14). Los principales compuestos presentes en la pulpa de aguacate son procianidinas, catequinas y ácidos hidroxicinámicos los cuales tienen un efecto antioxidante (12).

En la Figura 6 se pueden observar los perfiles de crecimiento de la levadura con los extractos de las frutas pasifloráceas (curuba y gulupa). Los extractos de ambas frutas promovieron un crecimiento mayor en comparación con el control positivo y negativo. En la etapa de latencia había una concentración celular mayor en el control positivo, pero a medida que se inició la etapa de crecimiento exponencial los extractos de estas frutas fueron capaces de promover una mayor protección sobre la levadura y la velocidad de crecimiento fue mayor, siendo más notorio en el extracto de curuba, lo que puede correlacionarse con su mayor contenido total de fenoles y su mayor actividad antioxidante (método FRAP). Finalmente en la etapa estacionaria se evidenció que estos extractos permitieron mantener una mayor concentración celular.

En el caso de las frutas de la familia de las solanáceas: lulo, tomate de árbol y uchuva, los perfiles de crecimiento se pueden evidenciar en la Figura 7. Se encontró que el crecimiento de las levaduras fue muy similar con respecto al control positivo. En la etapa de latencia el control positivo tuvo mayor concentración celular mientras que en la etapa de crecimiento exponencial el extracto de lulo sobresale levemente con respecto a los demás extractos y al control positivo, esto significa que aunque los extractos de estas frutas no promovieron un mayor crecimiento, tuvieron un efecto protector similar al control positivo.

Aunque no se conoce con certeza cuáles son los mecanismos que lleva a cabo *S. cerevisiae* para promover su crecimiento en un medio de estrés oxidativo, se evidenció que los compuestos presentes en los extractos de las frutas estudiadas son capaces de estimular las células a seguir su ruta de crecimiento normal, lo cual quizás está relacionado con la capacidad de los extractos para activar o desactivar mecanismo fisiológicos asociados a la protección de la levadura o con la simple reducción de H_2O_2 (17, 18).

Se realizó un ANOVA de una sola vía con los valores obtenidos de D.O.₅₉₂ a 300 min, ya que a este tiempo los perfiles de crecimiento celular mostraron su valor máximo. Los extractos que presentaron mayor actividad antioxidante ($P < 0,05$), en términos de protección celular en *S. cerevisiae* fueron los extractos de curuba, gulupa y aguacate; estos no exhibieron diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Conclusiones

Los métodos empleados para evaluar la actividad antioxidante brindan un panorama general de los extractos de las frutas estudiadas. Los extractos más promisorios por los métodos químicos (DPPH y FRAP) son el de aguacate y el de curuba, los cuales también exhiben las mejores actividades antioxidantes por los métodos biológicos (inhibición de oxidación de LDL y curvas de crecimiento de levaduras). Además se encontró que los extractos de uchuva y de gulupa presentaron una buena actividad antioxidante por el ensayo de inhibición de oxidación de LDL y por el de curvas de crecimiento. De esta manera, se entiende que los extractos de aguacate, curuba, uchuva y gulupa son los más promisorios para estudiar la composición de compuestos con actividad antioxidante y realizar ensayos *in vivo* de tal manera que se determine su capacidad real en la protección celular.

Agradecimientos

Las autoras agradecen el apoyo brindado al grupo de investigación “Cambios químicos y bioquímicos de alimentos frescos y procesados” y al proyecto “Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales” (Financiación: Colciencias (Contrato: 0459-2013, Rifrutbio)) pertenecientes al Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Referencias

1. Contreras, J.; Calderón, L.; Guerra, E.; García, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*. 2011. **44**(7): 2047–2053.
2. Rodríguez, M.; Garzón, G.; Peña, C.; Huertas, B. Guía para la obtención de productos procesados de uchuva, tomate de árbol y granadilla. Corporación colombiana de investigación agropecuaria (Corpoica). Bogotá, Colombia. Primera Edición. pp. 5-16. 2012.
3. Charles, D. Sources of Natural Antioxidants and their activities. En: *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. Ed. Springer, New York. pp. 88-94. 2013.
4. Tijburg, L.; Wiseman, S.; Meijer, G.; Weststrate, J. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis*. 1997. **135**(1): 33-47.
5. Restrepo, D.; Narvaez, C.; Restrepo, L. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Artigo*. 2009. **32**(6): 1517–1522.
6. Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Cisneros, L.; Hawkins, D. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005. **36**(4): 254-257.
7. Ruiz, F.; Giacopini, M.; Landaeta de J. M.; Bosch, V. Susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad de plasma en escolares. *Anales Venezolanos de Nutrición*. 2006. **19**(1): 1-7.
8. Zhang, Z.; Chang, Q.; Zhu, M.; Huang, Y.; Ho, W.; Chen, Z. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2001. **12**: 144-152.
9. Alvarez, E.; De la Rosa, L.; Amarowicz, R.; Shahidi, F. Protective effect of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers against food lipid and human LDL cholesterol oxidation. *Food Chemistry*. 2012. **133**: 827–834.
10. Cruz, E.; Dueñas, M.; García, L.; Salinas, Y.; Santos, C.; García, C. Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalopi (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*. 2015. **70**: 151-157.
11. Stinco, C.; Baroni, M.; Naranjo, R.; Wunderlin, D.; Heredia, F.; Meléndez, A.; Vicario, I. Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015. **37**: 1-10.
12. Wang, W.; Bostic, T.; Gu, L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*. 2010. **122**(4):1193–1198.
13. Vasco, C.; Ruales, J.; Kamal, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*. 2008. **111**(4): 816–823.

14. Osorio D. E.; Montoya P. G.; Bastida, J. Caracterización fitoquímica de una fracción de biflanoides de *Garcinia madruno*: su inhibición de la oxidación de LDL humana y su mecanismo de estabilización de especies radicalarias. *Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*. 2009. **16**(3): 369–377.
15. Bresciani, L.; Calani, L.; Cossu, M.; Mena, P.; Sayegh, M.; Ray, S. (Poly)phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetable and berries. *PharmaNutrition*. 2015. **3**: 11-19.
16. Dembitsky, V. M.; Poovarodom, S.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Vearasilp, S.; Trakhtenberg, S.; Gorinstein, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*. 2011. **44**(7): 1671–1701.
17. Espinal Ruiz, M. Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba palmira ICA I (*Psidium guajava*). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia–Sede Bogotá. 2010.
18. Lin, C.; Chen, P.; Hsieh, Y.; Chu, S. Koelreuteria formosana extract impedes in vitro human LDL and prevents oxidised LDL-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Food Chemistry*. 2014. **146**: 299–307.
19. Valérico, E.; Vilares, A.; Campos, A.; Pereira, P.; Vasconcelos, V. Effects of microcystin-LR on *Saccharomyces cerevisiae* growth, oxidative stress and apoptosis. *Toxicon*. 2014. **90**: 191

Article citation:

Moreno, E.; Ortiz, B. L.; Restrepo, L. P. Contenido total de fenoles y actividad antioxidante de pulpa de seis frutas tropicales. *Rev Colomb Quim*. 2014. **43**(3): 41-48. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v43n3.53615>