



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ARAZÁ
(*Eugenia stipitata*)**

**DETERMINATION OF PROFILE OF PHENOLIC COMPOUNDS IN ARAZ
(*Eugenia stipitata*)**

EDNA A. ARIZA

Directora: Luz Patricia Restrepo

*Grupo de investigación Estudió de los Cambios Químicos y Bioquímicos de
Alimentos Frescos y Procesados. Facultad de Ciencias, Universidad
Nacional de Colombia, Bogotá D. C., Colombia*

Recibido Enero 20, 2012; E-mail: eaarizac@unal.edu.co

Resumen:

En este proyecto se realizó el estudio de los compuestos fenólicos presentes en la pulpa y la corteza del arazá en cuatro diferentes estados de maduración (verde, pintón, maduro y sobremaduro) provenientes de la región amazónica utilizando cromatografía líquida de alta resolución. Se identificaron ácidos fenólicos como el clorogénico, gálico y cafeico, encontrándose que el mayor contenido de estos fenoles responsables de la actividad antioxidante del arazá está en la corteza de este fruto, pero su concentración disminuye durante la etapa de senescencia, sin embargo, en la pulpa la concentración de ácidos fenólicos aumenta con la maduración. Adicionalmente se evaluó la concentración de aminoácidos libres totales presente en la pulpa del arazá, resultando ser esta parte del fruto una fuente importante de aminoácidos libres para la dieta, donde la concentración aumenta con la maduración del fruto y disminuye en la senescencia.

Abstract:

In this project were studied of phenolic compounds present in the mesocarp and epicarp of arazá in four different states of maturation (green, good looking, ripe and overripe) using high resolution liquid chromatography. Phenolic acids were identified as chlorogenic, gallic and caffeic, finding that the highest content of phenols is arazá in the cortex, but its concentration decreases during the senescence stage, however, in the pulp phenolic acid concentration increases during ripening.. Additionally was evaluated the concentration of total free amino acids present in pulp arazá, that part of the fruit is important source of free amino acids in the diet, where the concentration increases with fruit ripening and senescence decreases

1. INTRODUCCIÓN

El arazá (*Eugenia stipitata*) es cultivada en los países de Perú, Brasil, Ecuador, Colombia, Bolivia y Costa Rica. En Colombia, aunque no en grandes cultivos, se encuentra distribuida en los departamentos de Meta, Caquetá, Putumayo y Amazonas, así como se encuentran algunos reportes en Cundinamarca y el eje cafetero. (Minagricultura)

Estudios anteriores muestran el Arazá como una fuente importante de vitamina C y compuestos fenólicos, proyectándose como un fruto benéfico con un excelente potencial antioxidante. Sin embargo no hay estudios de la identidad química de dichos antioxidantes.

Los compuestos antioxidantes, presentes en forma natural en los alimentos, cada día cobran mayor importancia debido al papel que desempeñan en la salud puesto que previenen y eliminan aquellas sustancias potencialmente nocivas y generadoras de desórdenes y enfermedades en el ser humano (Vargas *et al* 2005). La protección que las frutas y los vegetales brindan contra las enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y sus propiedades antimutagénicas y antienvjecimiento ha sido atribuida a su alto contenido de diversos antioxidantes

Entre los antioxidantes más conocidos presentes en vegetales y frutas figuran los tocoferoles, el ácido ascórbico, los flavonoides, antocianinas, carotenoides, ácidos fenólicos (cafeico, gálico, clorogénico).

Los fenoles, además de poseer propiedades antioxidantes al neutralizar los radicales libres están relacionados con las características sensoriales como aroma y sabor. La composición de fenoles de las frutas varía ampliamente entre los diferentes cultivos de frutas y verduras, tipo de suelo del cultivo, estado de maduración e incluso la fertilización. (Waterman *et al.* 1994)

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución puede ser usada como herramienta para identificar la naturaleza química de los compuestos fenólicos presentes en el arazá. También es posible cuantificar los fenoles en los diferentes estados de maduración presentes tanto en la pulpa como en la corteza de arazá.

Algunas frutas tropicales aportan entre 10 y 26% de los requerimientos mínimos diarios de muchos de los aminoácidos esenciales/100 g de fruta fresca. También se ha encontrado que en determinadas condiciones fisiológicas o patológicas algunos aminoácidos se hacen esenciales. Glutamina y arginina, como compuestos fisiológicamente activos en la protección gastrointestinal. (Medina *et al.* 2004)

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiales.

Frutos de arazá

Se utilizaron muestras comerciales adquiridas en plazas de mercado locales. De acuerdo al color de la corteza (ver tabla 1), se seleccionaron los frutos en diferentes estados de maduración (verde, pintón, maduro y sobremaduro), éstos se limpiaron para eliminarles partículas extrañas y polvo de la superficie. Posteriormente se efectuó una desinfección en hipoclorito de sodio al 0.1% durante 20 min. (Mejía *et al.* 2006)

Una vez limpios y desinfectados los frutos de arazá, se sometieron a pelado y separación de semillas de forma manual. La pulpa y la corteza obtenida se homogenizaron de forma

separada. Luego, se liofilizaron cada una de las partes, para aumentar su vida útil y se almacenaron en bolsas de polietileno de baja densidad.

Tabla 1. Escala de color del fruto de arazá durante su desarrollo y maduración (Hernández *et al.* 2007)

Estado	Color	Descripción
Verde	Verde mate	Color verde claro, le fruto no presenta brillo
Pintón	Verde- amarillo	Color verde con 50% de color amarillo
Maduro	Amarillo	Color amarillo en el 100% de la superficie del fruto
Sobremaduro	Amarillo oro	Color amarillo oscuro, fruto blando.



Figura 1. Color de la corteza de arazá según estado de maduración. (1) Verde (2) pintón (3) maduro y (4) sobremaduro (Hernández *et al.* 2007)

Estándares y Reactivos

Los estándares de fenoles (ácido gálico, ácido clorogénico y ácido cafeico) y aminoácidos empleados son marca Sigma -Aldrich con una pureza del 99.9%.

Para la determinación de aminoácidos libres en pulpa de arazá se empleó el Kit de aminoácidos libres Agilent ZORBAX Eclipse AAA. El acetonitrilo y metanol empleados son grado HPLC marca Merck y el Agua tipo mQ se obtuvo de un sistema MILLIPORE-Sinergy UV.

2.2. Extracción, identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos

Para este análisis se pesaron 200 mg de muestra (liofilizada) en un tubo plástico cónico, se adiciono 2 mL de una solución de metanol acidulado (80-19-1, metanol-agua mQ-HCl), se agitó a temperatura ambiente en un vortex durante 1min y luego se sonico durante 1h a 40°C. Se centrifugó a 6000 rpm por 15min. 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.

El métodos cromatográfico de compuestos fenólicos de desarrollo 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), 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 las tabla 2. Las demás condiciones cromatograficas se observan en la tabla 3

Tabla 2. Gradiente de elución Fenoles

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

Tabla 3. Condiciones cromatograficas de bomba y DAD

Método	Flujo	T° columna	Longitud de onda
Fenoles	1 mL/min	35°C	$\lambda_1 = 320$
			$\lambda_2 = 280$
			$\lambda_3 = 220$

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó con patrones de ácidos cafeico, clorogénico y gálico. La identificación de los compuestos fenólicos fue realizada por comparación con los patrones del tiempo de retención 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.

2.3. Extracción, identificación y cuantificación de los aminoácidos libres

Para este análisis se pesaron 250 mg de muestra de pulpa (liofilizada) en un tubo plástico cónico, se adiciono 5 mL agua mQ, se agitó a temperatura ambiente en un vortex durante 1min, se sónico durante 20 min a 90°C, terminado el tiempo se deja enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente (Wang *et al.* 2010). 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 aminoácidos libres.

Para la detección e identificación de aminoácidos se requiere una derivatización pre-columna con OPA (o-ftaldehido) para aminoácidos primarios y con FMOC (9-Fluorenilmetil cloroformato) para aminoácidos secundarios. Esta derivatización del extracto de aminoácidos se realizó en el inyector automático estándar 1260 Infinity del cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1260, mediante un programa de inyección. La separación de aminoácidos se obtuvo en una columna Agilent Zorbax AAA (150 x 4,6 mm, 5 μm). El gradiente empleado se describe en las tabla 4. Las demás condiciones cromatograficas se observan en la tabla 5.

Tabla 4 Gradiente de elución de aminoácidos

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
1.9	100	0
18.1	43	57
18.6	0	100
22.3	0	100
26	100	0

* Fase móvil aminoácidos: **(A)** Buffer de fosfato a pH 7.8; **(B)** ACN/MeOH/Agua (45/45/10)

Tabla 5 Condiciones cromatográficas de bomba y DAD

Método	Flujo	T° columna	Longitud de onda
Aminoácidos	2 mL/min	40°C	$\lambda_1 = 338$ $\lambda_1 = 262$

La cuantificación de cada uno de los aminoácidos libres presentes en la pulpa de arazá se realizó mediante interpolación en curvas de calibración realizadas con los patrones.

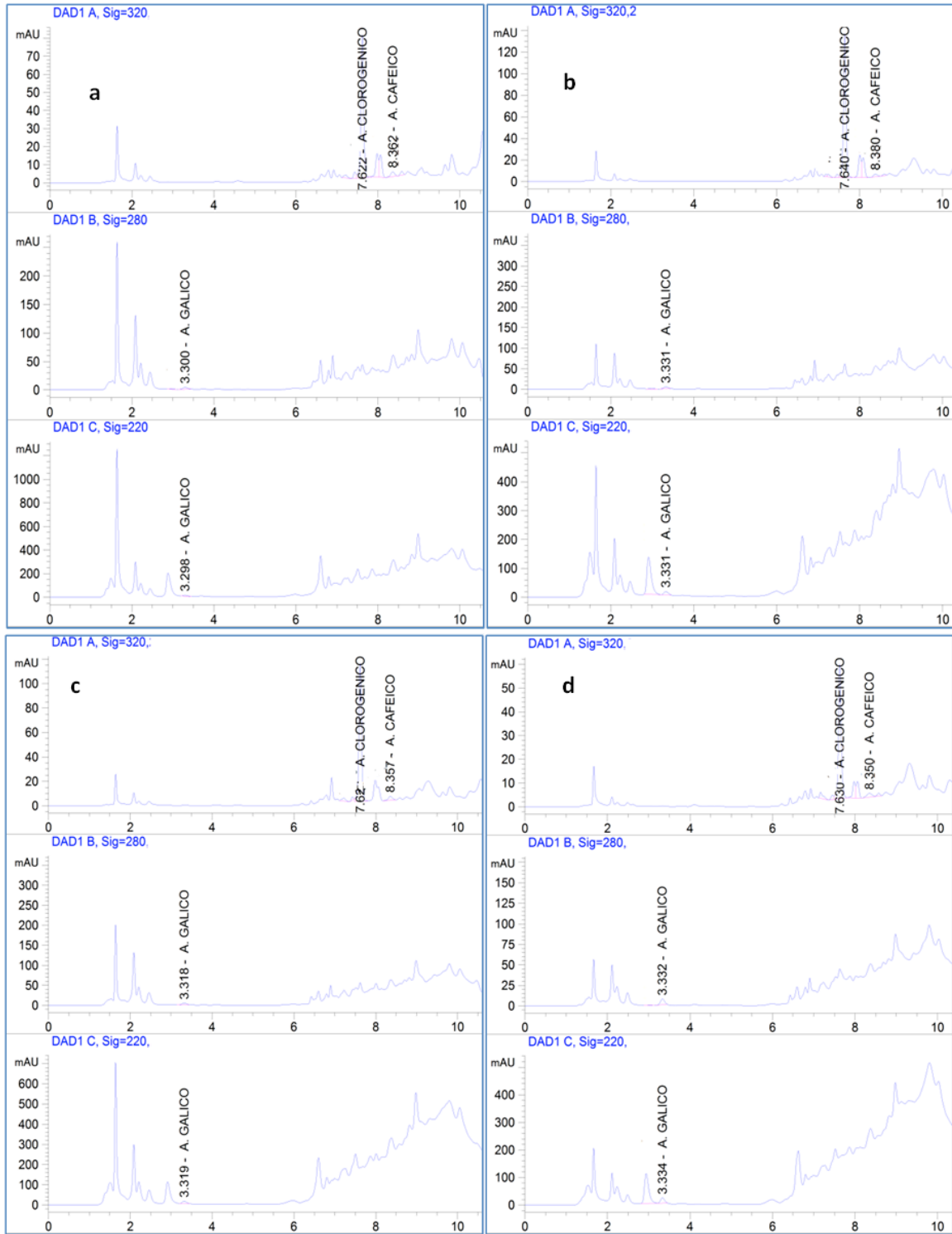
2.4 Análisis de datos

Para la determinación de fenoles todas las medidas fueron realizadas por triplicado, se empleo el promedio como medida de centralización. Para evaluar las diferencias específicas entre los valores de cada uno los parámetros evaluados se uso 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.

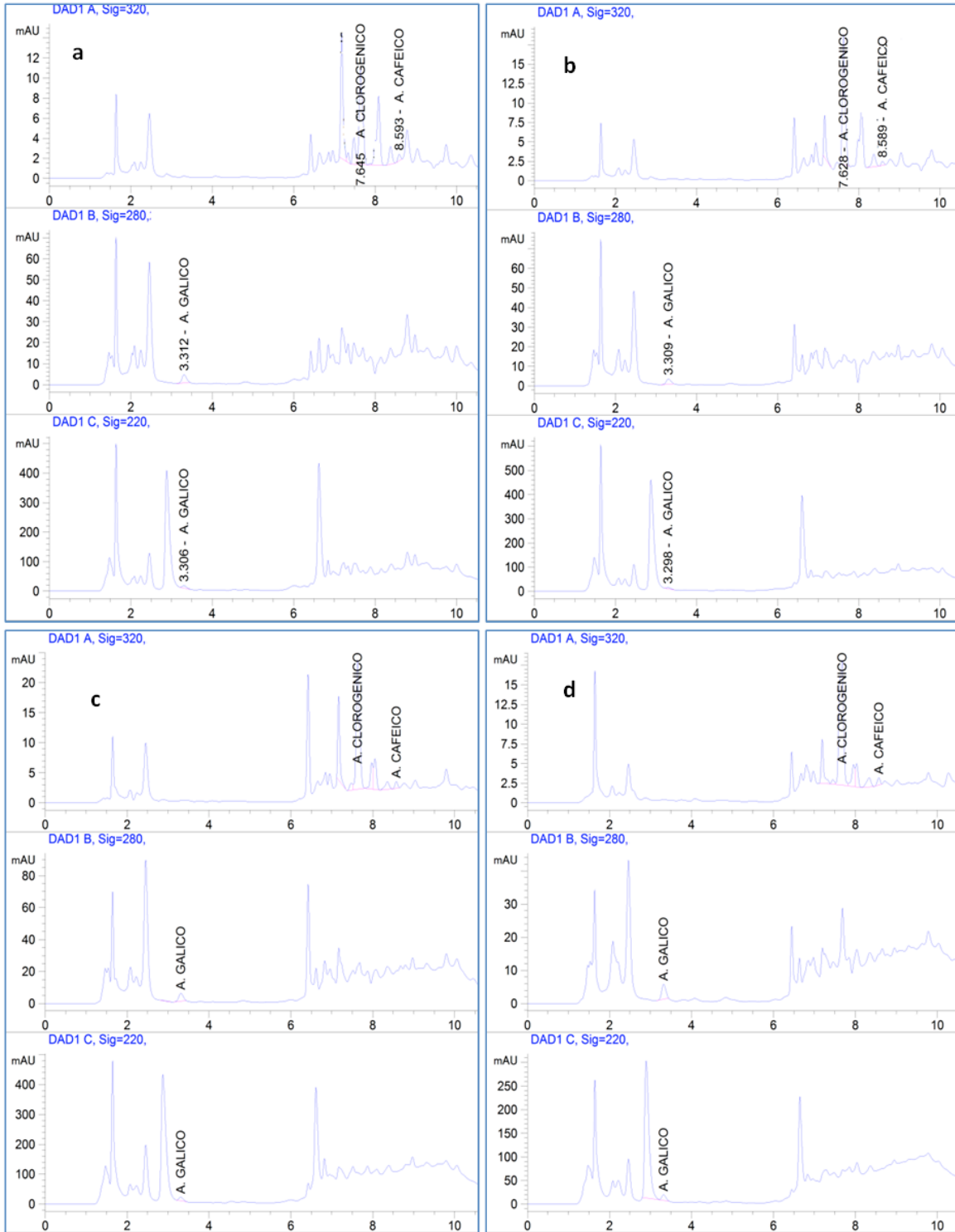
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación y cuantificación de los compuestos fenolicos en la corteza y pulpa del fruto arazá en diferentes estados de maduración

La identificación preliminar de los compuestos fenolicos presentes en la pulpa y la corteza del fruto de arazá en diferentes estados de maduración fue realizada mediante la técnica cromatografía liquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). En las graficas 1 y 2 se pueden observar los perfiles cromatograficos a 320, 280 y 220 nm de los extractos metanolicos de los compuestos antioxidantes obtenidos del fruto de arazá en corteza y pulpa respectivamente, en los estados verde (a), pintón (b), maduro (c) y senescente (d).

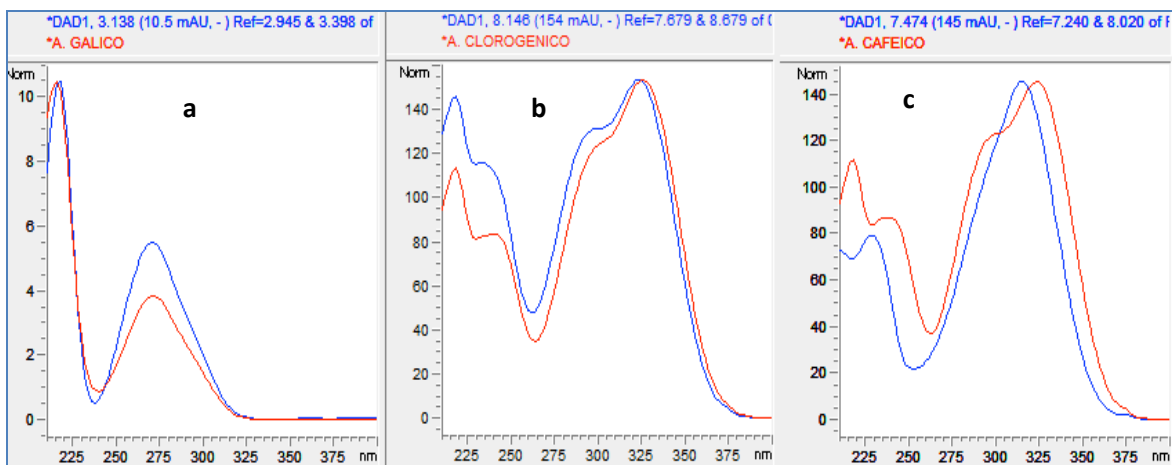


Gráfica 1. Perfiles cromatográficos HPLC-DAD a 320, 280 y 2200 nm de los compuestos fenólicos extraídos de la corteza del fruto de arazá en los estados de madurez verde (a), pintón (b), maduro (c) y sobremaduro (d).



Gráfica 2. Perfiles cromatográficos HPLC-DAD a 320, 280 y 220 nm de los compuestos fenólicos extraídos de la pulpa del fruto de arazá en los estados de madurez 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 3. Se observó que 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, cafeico y clorogénico.

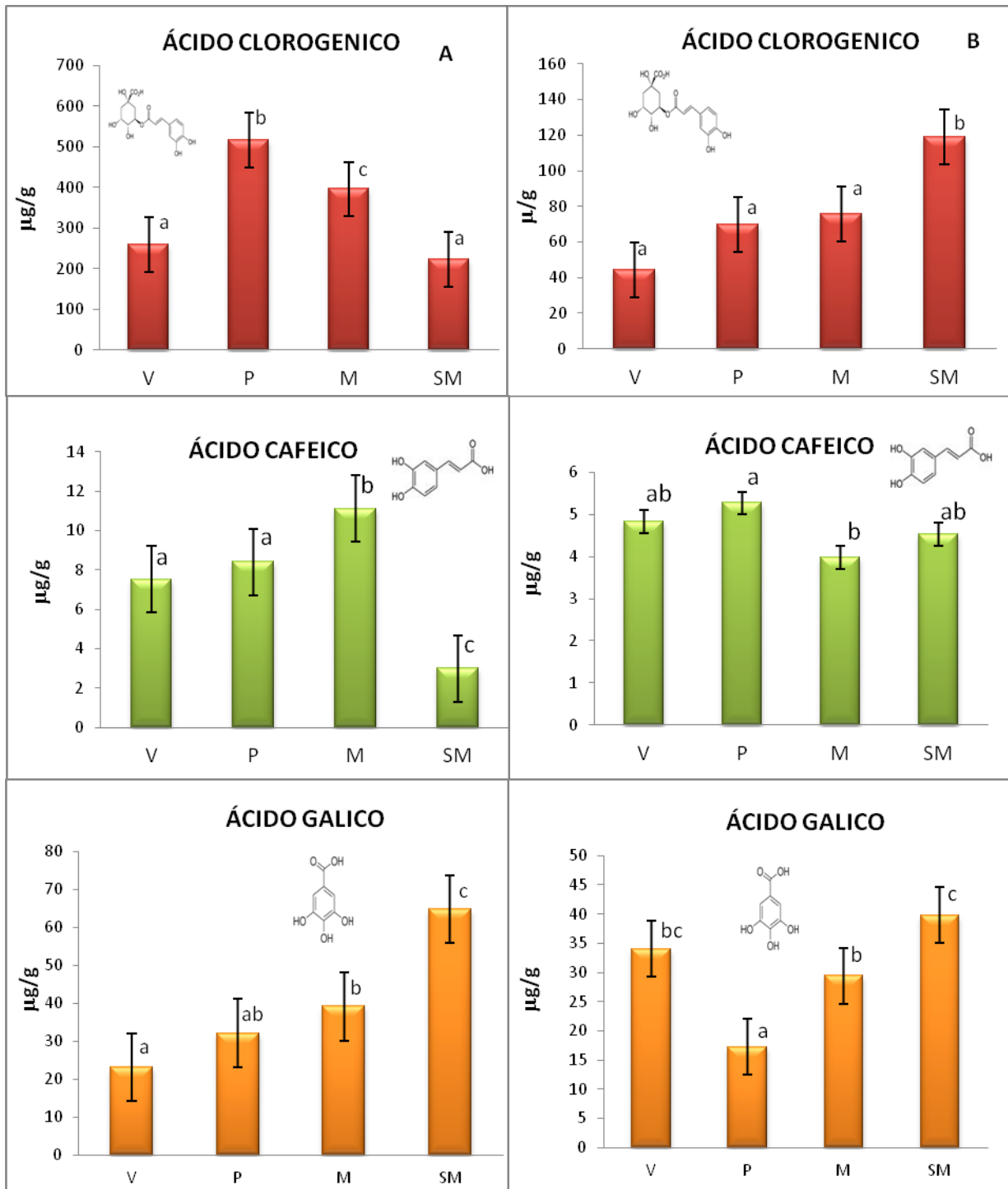


Gráfica 3. Espectros de absorción UV-VIS entre 200 y 400 nm de los compuestos fenólicos identificados preliminarmente por la técnica HPLC-DAD en la corteza y pulpa del fruto arazá. Los ácidos fenólicos identificados fueron ácido gálico (a), clorogénico (b), cafeico (c).

Una vez identificados los ácidos fenólicos presentes en la pulpa y la corteza de arazá, estos se cuantificaron mediante interpolación en curvas de calibración realizadas con los patrones. Las curvas para cada ácido fenólico se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Ecuaciones de las curvas de calibración empleadas para la cuantificación cromatográfica de los compuestos fenólicos

Compuesto	Longitud de Onda	Curva de calibración	R ²
Ácido Gálico	220nm	Y=29.30213X + 0.440870	0.99999
Ácido Clorogénico	320nm	Y=14.31127X - 0.158712	0.99998
Ácido Cafeico	320nm	Y=18.60603X + 0.908907	0.99997



Grafica 4. Cuantificación de los ácidos fenólicos por HPLC-DAD extraídos del arazá en diferentes estados de maduración. (A) Corteza y (B) pulpa. **V:** Verde; **P:** Pintón; **M:** Maduro; **SM:** Sobremaduro

Se observo que el acido clorogénico en la corteza logra un máximo en el estado pintón pero luego empieza decrecer, por el contrario este ácido en la pulpa aumenta su concentración conforme avanza la maduración del fruto. La concentración del ácido cafeico disminuye durante la etapa de senescencia, mientras que la concentración del acido gálico tuvo una tendencia a aumentar durante la maduración, tanto en la corteza como en la pulpa. También se puede observar que el acido clorogénico es el compuesto fenólico que presenta la mayor concentración, cerca de 500 μ g/g en el estado pintón y 500 μ g/g en el estado maduro en la corteza y aproximadamente 115 μ g/g en el estado sobremaduro y 75 μ g/g en el estado maduro en la pulpa, 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 el acido fenólico mas abundante en plantas y también el antioxidante más activo de este grupo de compuestos. (Durán *et al.* 1993)

Tabla 7. Contenido total de fenoles en fruto de arazá en base seca y en diferentes estados de maduración

PARTE	FENOLES TOTALES (μ g/g)			
	VERDE	PINTON	MADURO	SOBREMADURO
Corteza	289	557	446	290
Pulpa	83	92	109	163

El mayor contenido de ácidos fenólicos se obtiene en la corteza de arazá donde la relación en contenido con la pulpa es casi siempre el triple como se observa en la tabla 7. Al ser la pulpa la parte consumida del fruto de arazá, se puede concluir que el estado de madurez óptimo de consumo del fruto para aprovechar su máximo potencial antioxidante como alimento funcional es desde el estado maduro, lo cual es producto de la síntesis de los compuestos fenólicos durante la etapa de crecimiento y desarrollo del fruto.

En la corteza se observo una disminución del contenido de compuestos fenólicos totales en la etapa de senescencia debido a la oxidación de los compuestos fenólicos a su forma de quinonas, lo que ocasiona en esta parte del fruto una disminución en su calidad nutricional y funcional. Este decrecimiento se da en la corteza, puesto que esta parte del

fruto está expuesta al daño mecánico y a las condiciones ambientales que favorecen la oxidación enzimática de los fenoles.

En otros trabajos (Vargas et al. 2005) la medida de los compuestos fenólicos se hizo usando el reactivo de Folin-Ciocalteu y lectura espectrofotométrica a 765 nm, por lo que se cuantificaron todos los compuestos fenólicos totales libres presentes en el arazá y no solo los ácidos fenólicos; clorogénico, cafeico y gálico como se hizo en este estudio, en este se encuentra una disminución del contenido de los compuestos fenólicos durante la maduración. Sin embargo la contribución que hace el arazá en compuestos de carácter fenólico es buena al efectuar la comparación expresando el contenido de compuestos fenólicos como mg ácido gálico/g pulpa en la madurez sensorial del arazá (4,1 B.S. ó 0,64 B.H.), contra los contenidos en diversos vegetales como con "crowberry" (*Empetrum nigrum*) (50,8mg ácido gálico/g materia seca) y arveja (*Pisum sativum*) (0,4 mg ácido gálico/g materia seca) (Kähkönen et al. 1999).

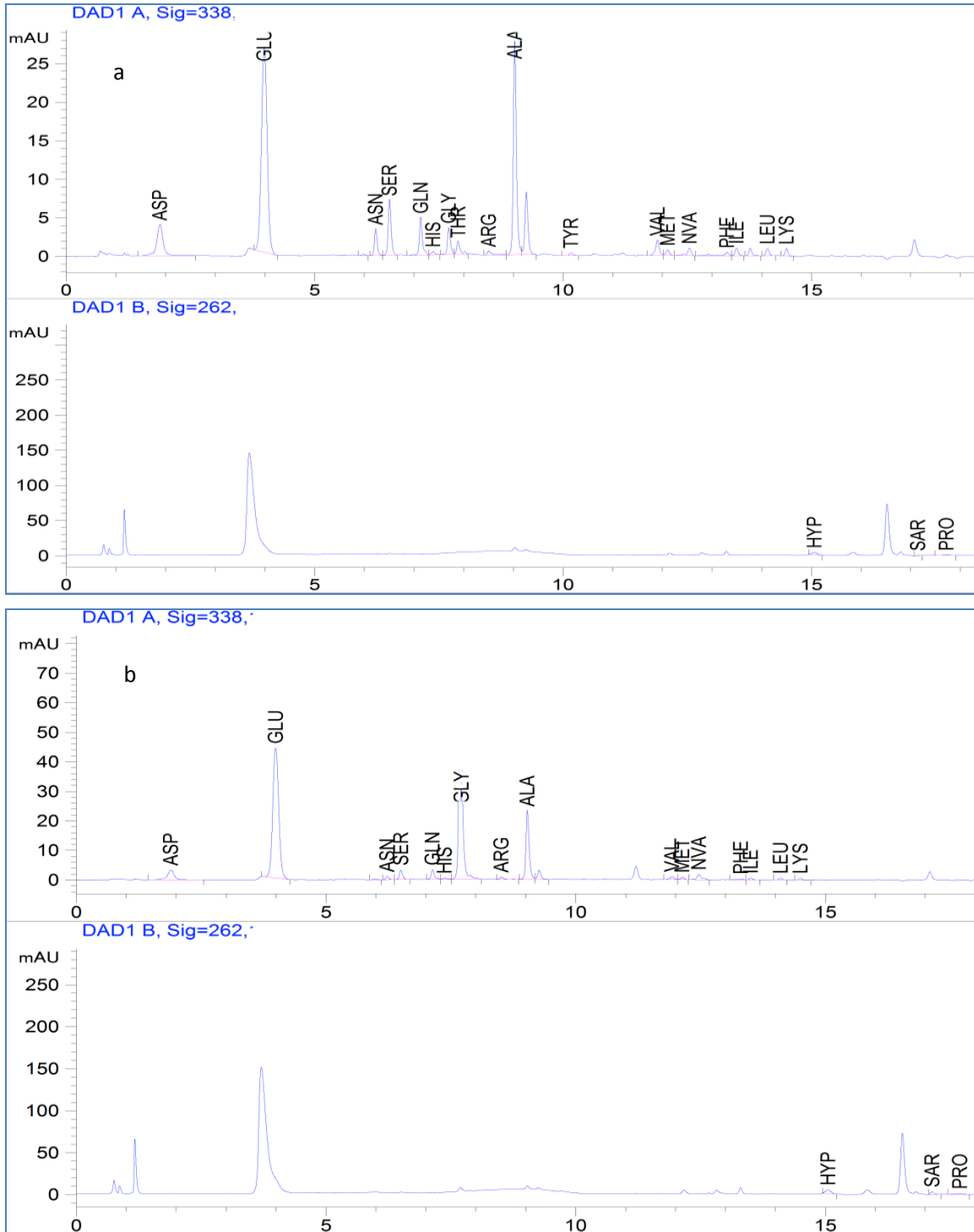
7.2 Cuantificación de aminoácidos libres en la pulpa del fruto arazá en diferentes estados de maduración

Un total de 16 aminoácidos libres fueron identificados y cuantificados en la pulpa de arazá en sus cuatro estados de maduración tal como se observa en las graficas 5 y 6. .

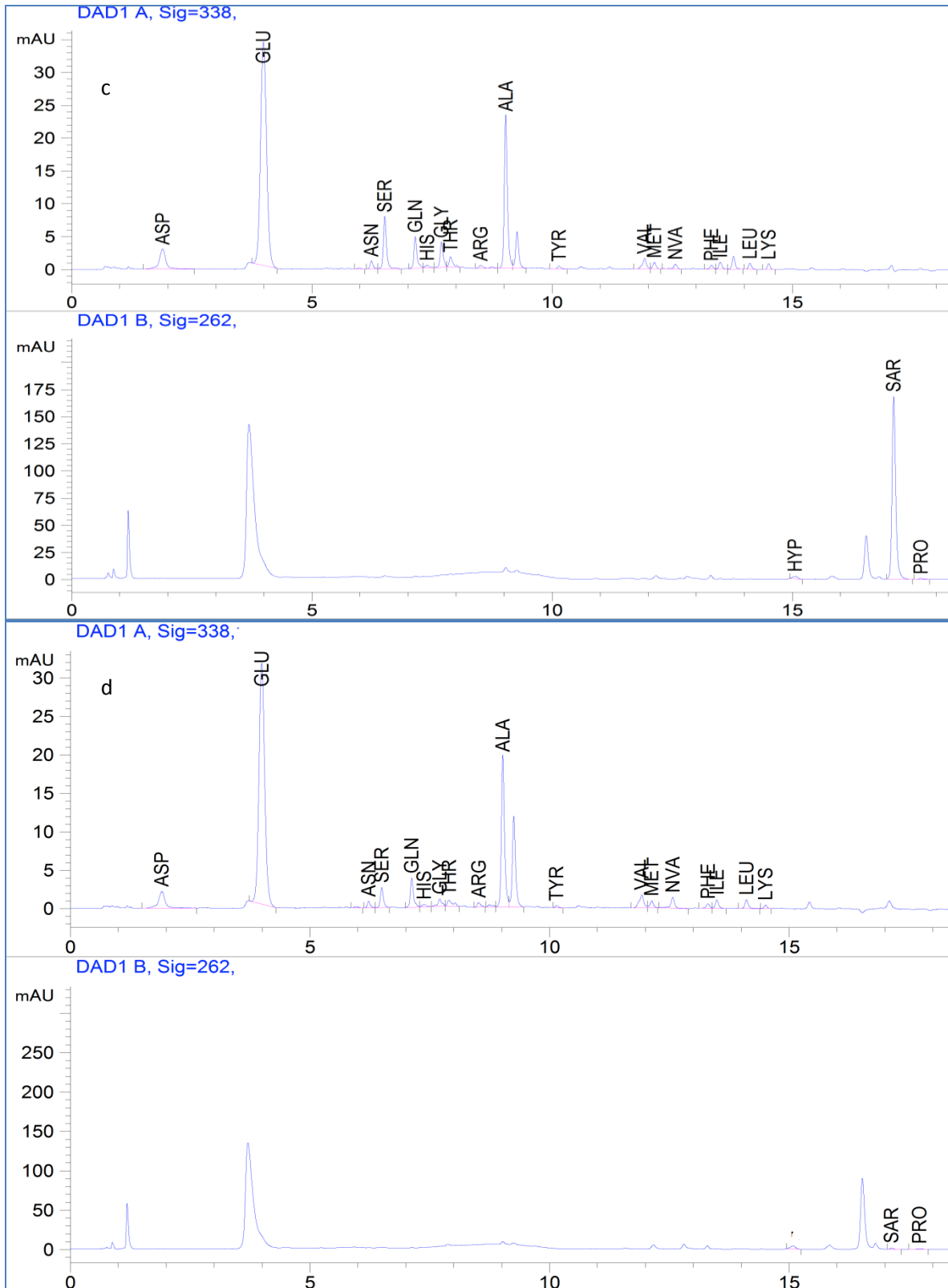
El fruto de arazá se caracterizó por un elevado contenido en ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, serina y alanina como se observa en la tabla 8. Los aminoácidos como valina y lisina resultan ser los más significativos dentro de los aminoácidos esenciales. Resultando ser la pulpa de arazá una fuente adicional de aminoácidos libres a la dieta.

Estudios de aminoácidos libres (Ovalles, et al. 2002) reportan un total de 11 aminoácidos libres en el agua de coco. Los aminoácidos libres encontrados en mayor proporción (>5mg/500mL) en el agua de coco, por unidad, fueron: serina, glicina, histidina, tirosina, fenilalanina, isoleucina y leucina. En otro estudio realizado (Wang L. et al. 2010) los resultados revelaron que la teanina es el aminoácido más abundante en el té y la flor de té cerca del 50% del total de aminoácidos, seguido por la histidina. Además el té verde (5802 µg/g) contiene a una mayor cantidad de aminoácidos que los té negro (2420 µg/g) y

el te oolong (1538 $\mu\text{g/g}$ té chino tradicional). Sin embargo la flor del té contiene mucho más aminoácidos libres (8089 $\mu\text{g/g}$ alrededor de 0.81%).



Gráfica 5. Perfiles cromatograficos HPLC-DAD a 338, y 262 nm de los aminoácidos libres extraídos de la pulpa del fruto de arazá en los estados de madurez verde (a) y pintón (b).

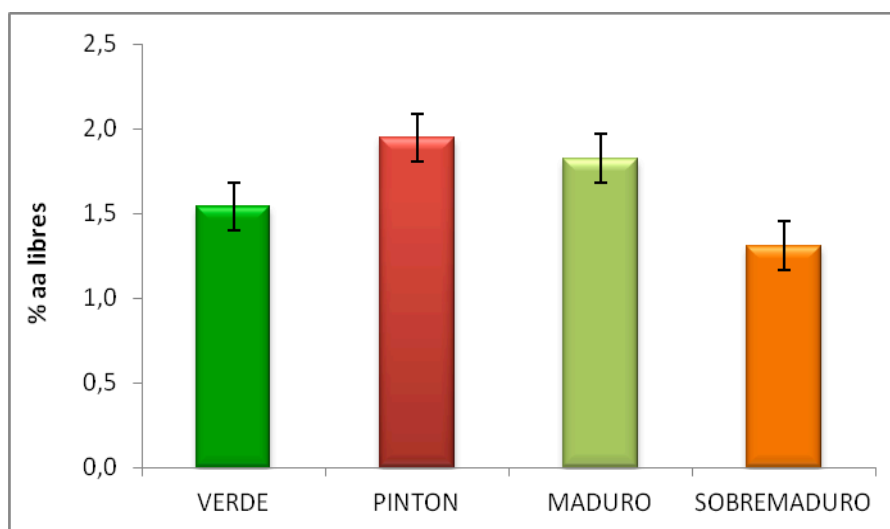


Gráfica 6. Perfiles cromatográficos HPLC-DAD a 338, y 262 nm de los aminoácidos libres extraídos de la pulpa del fruto de arazá en los estados de madurez maduro (c) y sobremaduro (d).

Tabla 8. Contenido de cada aminoácido en cada estado de madurez de la pulpa de arazá

% Aminoácido				
AA	Verde	Pintón	Maduro	Sobremaduro
ASP	0,11	0,10	0,09	0,06
GLU	0,82	1,39	1,14	0,99
SER	0,08	0,03	0,09	0,03
GLN	0,08	0,05	0,08	0,06
HIS	0,03	0,03	0,03	0,02
GLY	0,03	0,03	0,03	0,01
THR	0,02	0,00	0,03	0,02
ARG	0,01	0,02	0,02	0,01
ALA	0,24	0,21	0,21	0,00
VAL	0,03	0,02	0,02	0,00
MET	0,01	0,01	0,02	0,03
PHE	0,02	0,01	0,01	0,00
ILE	0,02	0,01	0,02	0,01
LEU	0,01	0,01	0,01	0,02
LYS	0,03	0,02	0,03	0,02
PRO	0,01	0,01	0,01	0,01
SUMA	1,54%	1,95%	1,82%	1,31%

Luego de hallar la concentración de cada uno de los aminoácidos, se sumo para hallar el contenido total de aminoácido libres presentes en la pulpa de arazá en los diferentes estados de maduración. En la grafica 7 se observa que la concentración de aminoácidos aumenta con la maduración del fruto y disminuye en la senescencia de este.

**Grafica 7.** Concentración de aminoácidos libres en pulpa de arazá

4. CONCLUSIONES

El ácido clorogénico es el principal compuesto fenólico del fruto de arazá tanto en su corteza como en la pulpa indicando que este compuesto, podría contribuir significativamente a la capacidad antioxidante del fruto de arazá.

El fruto de arazá en el estado maduro presenta altas concentraciones de ácidos fenólicos tanto en la pulpa como en la corteza, siendo este el estado de madurez óptimo de consumo del fruto para aprovechar su máximo potencial antioxidante como alimento funcional.

El contenido de aminoácidos libres en la pulpa de arazá resulta ser importante e interesante como otro beneficio adicional de este fruto además del contenido de antioxidantes fenólicos.

5. BIBLIOGRAFÍA

Ministerio de agricultura y desarrollo rural, República de Colombia, AGRONET Colombia (en línea) [consultado 4 de junio de 2011] <http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Aspectos%20generales%20del%20araza.pdf >

Vargas A. ; Rivera A. ; Narváez C., **2005**, Capacidad antioxidante durante la maduración de arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), *Revista Colombiana de Química*, 34, 57-65

Waterman PG, S Mole. **1994**. Analysis of phenolic plant metabolites. Waterman, P.G., Mole, S., Eds, Blackwell Scientific Publications Oxford, U.K

Medina M.L. Gallo M.A y Pagano F. **2004**. Identificación de aminoácidos libres por cromatografía de capa fina en la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo "criolla roja" *Revista Facultad de. Agronomía. (LUZ).*, 21 Supl. 1: 322-328

Mejía L.; Narváez C.; Restrepo L. P.; **2006**. Cambios físicos, químicos y sensoriales durante el almacenamiento congelado de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc)

Hernández M. **2007**. Manual de manejo de cosecha y postcosecha de frutos de Arazá (*Eugenia stipitata* Mc. Vaugh) en la amazonía colombiana. ed: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI, Ministerio del Medio Ambiente y TM edito ISBN: 958-8317-11-8 v. 0 pags. 64

Wang L. Xu R., Hu B, **2010**. Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 123, 1259-1266.

Duran R., Borja R. **1993**. Actividad antioxidante de los compuestos fenolicos. *Revista Grasa y Aceites*, 44, 10-106

Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J-P.; Pihlakja, K.; Kujala, T. S. Heinonen, M. **1999**. Antioxidant activity of plant extracts conteing phenolic compounds. *J Agric. Food Chem.* 47, 3954-3962.

Ovalles, J. F., León, L. A., Vielma, R. A., Medina, A.. **2002** Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y Revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco. *Revista de la facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida, R. B. de Venezuela.* 44.