

## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DEL CHOPÉ (*Gustavia augusta* L.)

D. E. García-Torres<sup>a</sup>, V. Sotero Solís<sup>b</sup>, D.A.P. Mancini<sup>c</sup>, R. P. Torres<sup>d</sup>, J. Mancini-Filho<sup>d</sup>

### RESUMEN

Los radicales libres aparecen como un caso promisorio para incrementar los fármacos para el tratamiento de varias patologías como cáncer, aterosclerosis, infecciones virales y oxidaciones lipídicas. La oxidación puede ser prevenida por la adición de antioxidantes. Existe un gran interés, en los compuestos fenólicos de las plantas debido a su importancia como antioxidantes naturales. El chopé (*Gustavia augusta* L.), fruta nativa de la región amazónica, la cual se consume como alimento en forma directa. Las muestras de chopé fueron secadas y sometidas a extracciones secuenciales con diferentes solventes. Los resultados demuestran actividad antioxidante en todos los extractos. Se identificó los siguientes compuestos fenólicos: ácidos salicílicos, trans-cinámico, hidroxibenzoico, vanílico, cafeico y sináptico. De los resultados obtenidos se asume que los extractos de chopé pueden ser utilizados muy bien como antioxidantes.

**Palabras clave:** chopé, antioxidantes, compuestos fenólicos, *Gustavia augusta*.

## ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM EXTRACTS OF CHOPE (*Gustavia augusta* L.)

### ABSTRACT

Free radical appears to constitute a particularly promising target for improving the drug treatment of various pathological conditions as cancer, atherosclerosis, and virus infections and in food lipids oxidations. The oxidation can be prevented by adding antioxidants. There is a great interest in plant phenolic compounds because of their potential role as natural antioxidants. Chopé (*Gustavia augusta* L.) is one fruit from Amazonian that is consumed as food. Chopé samples were dried and submitted to sequential extractions with different solvents. The results showed antioxidant activity in all extracts. Where were identified the following phenolic acids: salicylic, trans-cinamic, hydroxibenzoic, vanilic, cafeic and synaptic. The results obtained are suggesting that the chope extract can be used as antioxidant.

**Key words:** chopé, antioxidants, phenolic compounds, *Gustavia augusta* L.

### INTRODUCCIÓN

El chopé (*Gustavia augusta* L.) es un miembro de la familia lecitidaceae, nativo de la región amazónica. Sus nombres comunes son: chopé, en Perú; jeniparana y mucuraó, en Brasil;

<sup>a</sup> Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Av. Freyre N° 616-Iquitos, Loreto, Perú. e-mail: dora@usp.br ; doragato@gmail.com

<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Av Abelardo Quiñónez, km 2,5 -Iquitos

<sup>b</sup> División de Desarrollo Científico. Laboratorio de Virología, Instituto Butantã, São Paulo, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Ciencias de Alimentos y Nutrición Experimental, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580-Bloco 14, São Paulo, 05508-900, Brasil.

cócora, en Colombia, y tripa de pollo, en Ecuador. El fruto del chopé es un pixideo ovoide y alcanza hasta 6 cm. de diámetro. El fruto es de color marrón y presenta de dos a diez semillas, arregladas en serie alrededor de la pulpa, la cual es de color amarillo, es fibroso y tiene un olor característico. La pulpa del fruto es comestible, siendo consumida en su estado natural, pero también puede ser preparado en jugos y helados. La pulpa presenta una importante concentración de lípidos, cerca de 13%, siendo 68% insaturados y que pueden ser fácilmente oxidados<sup>1</sup>. Existen reportes de los extractos de la corteza del árbol de *G. augusta*, que poseen actividad antiinflamatoria, y utilizada por los nativos de la Guyana Francesa en el tratamiento de la leishmaniasis, y como principios activos se encontraron esferoides y triterpenos<sup>2</sup>.

La oxidación de los compuestos puede tener lugar durante condiciones patológicas de los organismos o en alimentos durante su almacenamiento, procesamiento y tratamiento por calor, proceso básico que causa deterioración total y rancidez. Los productos de la oxidación influyen en otros constituyentes celulares y también pueden causar cambios patológicos en las mucosas del tracto alimentario. Ellos pueden inhibir la actividad de las enzimas e incrementar el contenido de peróxidos en el plasma<sup>3</sup>. La oxidación y peroxidación pueden ser prevenidas por la adición de antioxidantes. Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar o prevenir el proceso de oxidación. Ellos pueden interferir con la oxidación reaccionando con los radicales libres, efectuando la quelación de los metales que actúan como catalizadores y también secuestrando el oxígeno. Atacar a los radicales libres ha incrementado la producción de fármacos para el tratamiento de los desordenes producidos por las especies reactivas al oxígeno que pueden participar en un gran número de patologías como cáncer, aterosclerosis, alteraciones neurovegetativas, alteraciones de los riñones e hígado, artritis, catarata e infecciones virales. Los compuestos naturales con propiedades antioxidantes han sido reportados a partir de fuentes vegetales, animales y microbianas<sup>4</sup>. Hoy en día existe un marcado interés en compuestos antioxidantes de origen natural, principalmente aquellos que se encuentran en las plantas debido a la tendencia mundial por la utilización de compuestos naturales en la prevención de procesos patológicos y en la conservación de alimentos<sup>5,6</sup>. Los antioxidantes naturales se encuentran en las plantas superiores y en todas sus partes. Ellos son generalmente compuestos fenólicos o polifenólicos. Las moléculas típicas de los antioxidantes son derivados o formas isoméricas de polifenoles, flavonas, isoflavonas, flavonoles, catequinas, cumarina, tocoferoles, ácido cinámico, fosfátidos, ácidos orgánicos polifuncionales y otros<sup>7</sup>.

El objetivo del presente estudio consistió en identificar los compuestos fenólicos de los extractos del chopé y evaluar su actividad antioxidante.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material

Los frutos de chopé fueron colectados de los alrededores de la ciudad de Iquitos – Loreto - Perú, secados, molidos y tamizados en malla de 32 mesh y esta harina almacenada a -18°C, hasta los análisis posteriores.

### Métodos

La harina fue sometida a extracción con éter, etanol y agua por 60 minutos con agitación a temperatura ambiente. Los extractos etéreo, alcohólico y acuoso fueron obtenidos en forma secuencial de 20 g de fruto, incrementando la polaridad del solvente. Cada extracto fue completado a 100 mL con su correspondiente solvente.

La cantidad de materia seca en cada extracto fue determinada gravimétricamente<sup>8</sup>. La

humedad, cenizas, proteína, fibra soluble e insoluble fue determinado de acuerdo a las normas del Instituto Adolfo Lutz<sup>9</sup>. Los carbohidratos fueron obtenidos por la diferencia de 100 menos la suma de los porcentajes de agua, proteína, grasa y ceniza. Los lípidos totales fueron extraídos de acuerdo al método de Folch *et al.*,<sup>10</sup> y determinados gravimétricamente después de la evaporación del solvente. Alícuotas de los extractos lipídicos fueron usados para preparar los ésteres metílicos de los ácidos grasos de acuerdo a Arriman y Lago<sup>11</sup>. Los análisis fueron realizados con un cromatógrafo gaseoso Shimadzu modelo 17-A, equipado con detector de ionización de llama y una columna capilar de 30m x 0.25 mm de diámetro interior (Carbowax 20). La temperatura para la operación fue inicialmente 150 °C, y programada para incrementarse hasta 210 °C a 3 °C/minuto. Se utilizó una mezcla de patrones estándar de metil ésteres de ácidos grasos para obtener los tiempos relativos de retención e identificar los ácidos grasos del fruto del chopé. Se utilizó helio como gas de arrastre a razón de 1mL/min.

En el fraccionamiento de los compuestos fenólicos, se obtuvieron tres fracciones con tetrahidrofurano: ácidos fenólicos libres, ésteres fenólicos solubles y ésteres fenólicos insolubles de acuerdo al método de Krygier *et al.*,<sup>12</sup>. Los análisis de los compuestos fenólicos fueron realizados por cromatografía gaseosa, en el equipo señalado líneas arriba.

La actividad antioxidante “*in vitro*” de los extractos del chopé fueron evaluados utilizándose como sustrato β-caroteno/ácido linoléico, preparado con 0,2 mL de β-caroteno + 0,8 mL de cloroformo + 20 mg de ácido linoleico y 3 gotas de Tween 60 como emulsificante; se evapora el solvente y adiciona agua tratada con O<sub>2</sub> por 30 minutos. Este sistema se mantiene a 50°C y las medidas espectrofotométricas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro Baush & Lomb, modelo Spectronic 20D, a 470 nm, cada 15 minutos, durante dos horas, siendo la primera lectura realizada a temperatura ambiente (24°C). Diferentes volúmenes de extractos y de las fracciones fenólicas de las muestras fueron medidos, de tal modo que al ser colocadas en 5 mL de solución de β-caroteno/ácido linoléico, alcancen una concentración de 50 y 100 ppm. Todas las determinaciones fueron realizadas con repetición y acompañadas por un control sin antioxidante y otro con solución de BHT en las mismas concentraciones. La evaluación del efecto sinérgico de la actividad antioxidante de los extractos y de las fracciones fenólicas fue realizada a través de la asociación con el antioxidante sintético BHT en la proporción de 1:1; el porcentaje de la inhibición de la actividad antioxidante se calcula de

$$\%AA = 100 - \frac{(\text{decaimiento de absorbancia de la muestra})}{(\text{decaimiento de la absorbancia del control})} 100$$

Donde % AA = porcentaje de inhibición de la oxidación

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición centesimal del fruto del chopé se muestra en la tabla 1 y destaca la concentración de lípidos y proteínas con 13,1% y 5,8%, respectivamente.

**Tabla 1.** Composición centesimal del fruto del chopé

Determinación	Contenido, %
Humedad	60,5 ± 0,15
Lípidos	13,1 ± 0,25
Cenizas	1,3 ± 0,02
Proteínas	5,8 ± 0,11
Fibra insoluble	12,7 ± 0,11
Fibra soluble	0,4 ± 0,11
Carbohidratos	6,2 ± 0,48

En la tabla 2, se presenta la composición en ácidos grasos presentes en la fracción lipídica: palmítico, 25,7%, heptadecenoico, 0,2%, esteárico, 5,6%, araquidónico, 0,3% oleico, 58,6%, linoleico, 6,2% y linolénico, 1,5%. Este trabajo presenta valores diferentes a los dados por otros autores<sup>14</sup> en cuanto a concentración, quienes indican una menor concentración de palmítico (7,32%), esteárico (3,05% y oleico (19,5%). El total de ácidos grasos insaturados fue de 66,3%. La elevada cantidad de ácidos grasos insaturados sugieren la existencia de algún mecanismo propio, de protección contra la oxidación.

**Tabla 2.** Composición en ácidos grasos de la grasa del chopé

Acido graso	Contenido, %
C16:0	25,7 ± 0,47
C17:0	0,2 ± 0,00
C18:0	5,6 ± 0,06
C20:0	0,3 ± 0,00
∑ Ácidos grasos saturados	31,8
C18:1	58,6 ± 0,61
C18:2	6,2 ± 0,13
C18:3	1,5 ± 0,03
∑ Ácidos grasos insaturados	66,3

Las fracciones con solubilidad específica, en solventes apolares y polares fueron obtenidas a través de procesos de extracción secuenciales. Al efectuar las extracciones con éter etílico, se obtendrán compuestos apolares, con etanol compuestos de polaridad intermedia y al realizarla con agua compuestos de alta polaridad<sup>8</sup>. El volumen final de cada extracto fue de 100 mL. La materia seca total fue de 44,0 mg/mL, 6,8 mg/ml y 25,3 mg/mL para los extractos etéreo, alcohólico y acuoso respectivamente (tabla 3). Ya Lun *et al.*<sup>15</sup>, trabajando con *Scutellaria rehderiana* obtuvo extractos con hexano, acetona y metanol por extracción secuencial y al comparar la actividad antioxidante de estos, observaron que los mejores resultados se obtuvieron con el extracto en acetona.

La actividad antioxidante fue evaluada con el sistema β-caroteno/ácido linoleico. Este método espectrofotométrico se basa en la habilidad de los diferentes extractos en proteger la oxidación del β-caroteno en una emulsión<sup>8</sup>. La actividad antioxidante de los extractos se muestran en la tabla 3. Los resultados de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso (100 ppm de materia seca) fueron de 56,01%, 52,91% y 79,22% respectivamente, mientras que el BHT puro a la misma

concentración presento 70,49%, 69,34% y 76,63% respectivamente. Moure *et al.*<sup>16</sup>, trabajaron con *Genuina avellana*, una semilla oleosa de origen chileno, utilizando solventes con diferentes polaridades para la extracción de los compuestos fenólicos totales; encontraron que el extracto alcohólico fue más activo en los ensayos en  $\beta$ -caroteno, mientras que los extractos etanólico y metanólico inhibieron mejor la eficiencia de la oxidación del aceite de soja a 70° y 80°C, respectivamente.

El efecto global cuando decrece la absorbancia medida a 470 nm. de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso fue utilizado para evaluar la actividad antioxidante de estos. Como se muestra en la tabla 3, la combinación de extractos (50 ppm) con BHT (50 ppm) presento una mejor actividad antioxidante que los extractos (100 ppm) o el BHT (100 ppm) puros.

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición de la oxidación de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso del chopé y los extractos combinados con BHT

<i>Extractos</i>	Extracto 50ppm	BHT 50ppm	Extr.+BHT 25 ppm+25ppm	Extracto 100ppm	BHT 100ppm	Extr.+BHT 50 ppm+50ppm	Matéria Seca (mg/mL)
Etéreo	43,54	65,94	73,39	56,01	70,49	80,72	44,0 ± 0,04
Alcohólico	40,64	63,60	64,57	52,91	69,34	75,13	6,8 ± 0,02
Acuoso	72,54	65,92	76,89	79,22	76,63	83,81	25,3 ± 0,02

Con las fracciones de los compuestos fenólicos que se realizaron con tetrahidrofurano se obtuvieron tres fracciones. La materia seca de ácidos fenólicos libres (FPA), los ésteres fenólicos libres (SPE) y ésteres fenólicos insolubles (IPE) fueron de 4,5 mg/mL, 28,3 mg/mL y 0,7 mg/mL, respectivamente como se muestra en la tabla 4. La actividad antioxidante de estas fracciones (100 ppm) de FPA, SPE e IPE muestran 88,3%, 75,74% y 79,18% de inhibición respectivamente, mientras que el antioxidante sintético BHT 100%, mostró 79,24%, 75,95% y 75,34% de inhibición respectivamente. Cada fracción fenólica (50 ppm), cuando asociada con BHT (50 ppm), mostraron efectos antioxidantes sinérgicos. Resultados anteriores demuestran que en cultivos de células disminuye el crecimiento del virus de la influenza por el uso de compuestos fenólicos<sup>17</sup>

**Tabla 4.** Porcentaje de inhibición de la oxidación de las fracciones fenólicas de chopé y de la fracción combinada con BHT y de la materia seca.

<i>Fracciones</i>	Fracción 50ppm	BHT 50ppm	Frac.+BHT 25 ppm+25ppm	Fracción 100ppm	BHT 100ppm	Frac.+BHT 50 ppm+50ppm	Matéria Seca (mg/mL)
FPA	89,07	71,96	91,20	88,35	79,24	85,74	4,5 ± 0,13
SPE	82,91	68,78	70,46	75,74	75,95	67,51	28,13 ± 0,60
IPE	87,30	67,05	73,68	79,18	75,34	77,10	0,7 ± 0,03

FPA: ácidos fenólicos libres

SPE: ésteres fenólicos solubles

IPE: ésteres fenólicos insolubles.

Los análisis por cromatografía de los ácidos fenólicos en las fracciones de ácidos fenólicos libres, ácidos fenólicos insolubles y ésteres fenólicos insolubles muestran la presencia de los siguientes ácidos fenólicos: salicílico, transcinámico, p-hidroxibenzoico, protocatequínico,

gálico, sináptico, vinílico y cafeico. La tabla 5, muestra que el ácido salicílico (5,8-24,02 mg/g) fue el de más alta concentración en todas las fracciones,. Este ácido es un componente de la aspirina y está asociado a la prevención de ciertas patologías como los problemas coronarios, cáncer del colon y del pulmón; se le encuentra presente como salicilatos en varias frutas, como es el caso en las uvas (0,04 – 0,07 mg/1000g)<sup>18,19</sup>. La presencia de compuestos fenólicos en el fruto del chopé está relacionado con su actividad antioxidante.

**Tabla 5** Ácidos fenólicos en las fracciones de los frutos del chopé

Ácidos fenólicos	Composición, mg/g		
	FPA	SPE	IPE
Salicílico	9,50	24,02	5,8
Trans-cinamico	0,02	0,06	0,06
p-hydroxibenzoico	0,03	0,06	ND**
Protocatequínico	ND	0,09	ND
Galico	0,05	0,33	0,03
Sináptico	0,20	0,05	0,03
Vinílico	ND	0,41	ND
Cafeico	0,01	ND	ND
NI*	1,88	1,01	0,25

FPA – Ácidos fenólicos libres

SPE – Ésteres fenólicos solubles

IPE – Ésteres fenólicos insolubles

\*NI – no identificados

\*\*ND – no detectados

La actividad antioxidante de los extractos dependen del solvente, la concentración del extracto y ensayo antioxidante. Diferencias muy altas en actividad se deben a diferencias en la partición relativa entre fases en diferentes sistemas polares. Las pruebas de actividad antioxidante por el método de  $\beta$ -caroteno mostró, como resultado principal, que a mayor concentración de extracto, mayor coeficiente de actividad<sup>17</sup>. Esta propiedad ha sido observada para varios antioxidantes por otros autores<sup>20,21,22</sup>.

### CONCLUSIONES

- De acuerdo a los datos reportados indican que los extractos etéreo, alcohólico y acuosos del chopé poseen actividad antioxidante que puede ser medido por el sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.
- Las fracciones de los compuestos fenólicos del fruto del chopé rindieron tres fracciones con actividad antioxidante. La combinación de éstos con BHT demostró un alto efecto en términos de actividad antioxidante.
- Las tres fracciones fenólicas contenían varios ácidos fenólicos, y el ácido salicílico estuvo presente en las tres fracciones en mayor cantidad que los otros componentes. Los ácidos fenólicos están relacionados con la actividad antioxidante del chopé.
- Los resultados sugieren que los extractos del fruto del chopé podrían servir como fuente de antioxidantes para ser utilizado como producto nutracéutico para prevenir algunos desórdenes en el organismo.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a FAPESP por el apoyo financiero al proyecto y a CAPES-PEC/PG por la beca concedida.

### REFERENCIAS

1. Flores Paytan, S. Cultivo de frutales nativos amazónicos: manual para el extensionista. Secretaría Pro Tempore, [Tratado de Cooperación Amazónica], p.105-107. 1997.
2. Souza, A.; Rocha, a.; Pinheiro, ML.; Andrade, H.; Galotta, A.L.; Santos, M do P.S. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae) *Quimica Nova*, 2001, 24:439-442
3. Kuresh, A.; Youdim, A.M.; James, A.J. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radical Biol.Med.*2000; 9:51-60.
4. Packer, L., Ong, A.S.H. Biological oxidants and antioxidants: molecular mechanisms and health. AOCS Press, 372p. 1998.
5. Amarowicz R, Naczek M, Shahidi F. J. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2000; **77**: 957-961.
6. Sanchez-Moreno, C., Satué-García, M.T., Frankel, E.N. J. Antioxidant activity of selected spanish wines in corn oil emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 5561- 5567.
7. Marinova, E.M, Yanisaleva, N.V. J. Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994; 71:427- 447.
8. Melo, M.O.S.O.M., Mancini-Filho, Antioxidantes naturaris da castanha do Brasil, *J. Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1991; 11: 263-271.
9. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2ed. São Paulo. . v.1, 371, 1976
10. Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids, *J. Biol. Chem.*, 1957. 226:497-505.
11. Hartman, L., Lago, B.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids, *Lab. Pract.*, 1973; 22:475 – 477..
12. Krygier, K, Sosulski, F.W., Hogge, L. J. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. I. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 1982; 30:330 - 334.
13. Marco, G.J.A. Rapid method for evaluation of antioxidants, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1968, 45: 594-598.
14. Garcia de Sotero, d.; Sotero, V.; Garcia, L; Díaz, P.; Reis, L.L. Composición química del mesocarpio y caracterización del aceite del chopé (*Gustavia augusta* L.), *Rev. Conoc*, 1998. 4: 99-112.
15. Ya-Lun, S., Lai, K.L., Yu-Rong, B., Huang, Y., Zhen-Y.C. Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Scutellaria rehdiana*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2000;77: 807-812
16. Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Lema, J.M.J.. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 2000;48:3890-3897,
17. Mancini, D.A.P., Dias, A.L.F., Pinto, J.R., Mancini-Filho. J. Antioxidant aqueous extract from cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*. Blume) as inhibitors of influenza virus. *Braz.J. Pharmaceutical Sciences.*; 1999; 35:155-160.

18. Blacklock CJ, Lawrence; Wiles, D. Salicylic acid in the serum of subjects not taking aspirin. Comparison of salicylic acid concentrations in the serum of vegetarians, non-vegetarians, and patients taking low dose aspirin. *J Clin Pathol.* 2001, 54:553-555.
19. Robertson, G.L. Salicylic acid in grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 1983. 34:142-143.
20. Aruoma, O.I., Spencer, J.P.E., Warren, D., Jenner, P., Butler, J., Halliwell, B. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary, and provencal herbs. *Food Chem. Toxicol.*, 1996, 34:449-456,.
21. Karamac, M, Amarowicz, R. Actividad antioxidante de BHA, BHT y TBHQ examinada con el test de Millar. *Grasas y Aceites*, 1997; 48:83-86..
22. Von Gadow, A, Joubert, E., Hansmann, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), - tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 1997; 45: 632-638