

Antocianinas totales y capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* "Arándano"

Anthocyanins and antioxidant capacity in ethanolic extracts of Vaccinium corymbosum "Blueberry"

COSVALENTE BURGOS, Kevin Steve; RUIZ REYES, Segundo Guillermo;
GANOZA YUPANQUI, Mayar Luis

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la relación entre el contenido de antocianinas totales y la capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* "Arándano". Los extractos fueron elaborados por maceración de 24h, usando 10 g de fruto fresco y como solvente 50 mL de etanol de diferentes graduaciones (96, 70, 50 y 30°GL), pasado el tiempo de maceración los extractos fueron filtrados; y el fruto remanente triturado y macerado por 12h con los mismos menstruos. Finalmente los extractos se reunieron y completaron a volumen en matraces aforados con cada uno de los solventes. Para la cuantificación de antocianinas totales se usó el método de pH diferencial, con lectura espectrofotométrica a 520 nm y para la valoración de la capacidad antioxidante una solución etanólica 0.1 mM del radical libre 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), la cual se enfrentó a 100 µL de cada uno de los extractos, siendo la longitud de lectura; 517nm. La concentración de antocianinas totales (mg/mL) expresadas en cianidina-3-glucosido y su capacidad antioxidante fue de 0.030 \pm 0.002, 47.1%; 0.016 \pm 0.001, 43.5 %; 0.013 \pm 0.002, 41.5% y 0.008 \pm 0.001, 34.7 %, para los extractos de (96, 70, 50 y 30°GL) respectivamente. Se determinó que existe relación entre el contenido de antocianinas totales y la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* "Arándano" y que el mejor solvente para su extracción es el etanol de 96°GL.

Palabras clave: *Vaccinium corymbosum* "Arándano", antocianinas totales, y capacidad antioxidante.

ABSTRACT

The objective of the study was determine the relationship between the content of total anthocyanin and antioxidant capacity in vitro of ethanolic extracts of different grade of fruit of *Vaccinium corymbosum* "Blueberry". extracts was prepared by macerating 24h using 10 g of fresh fruit and as a solvent 50 mL of ethanol of different rates (96, 70, 50 and 30°GL), after that the extracts were filtered on Whatman N° 1 and stored in amber vials and refrigerated at 10°C; the remaining fruit was crushed and macerated for 12 h with the same menses. Finally, the extracts were combined and completed to volume flasks with each of the solvents. For quantification of total anthocyanins, pH differential method was used, with spectrophotometric reading at 520 nm and for evaluating antioxidant capacity, 0.1 mM ethanolic solution of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), the faced which 100 L of each of the extracts, the length of read; 517nm. The concentration of total anthocyanins (mg / mL) expressed as cyanidin-3-glucoside and its antioxidant capacity was 0,030 \pm 0,002, 47,1%; 0,016 \pm 0,001, 43,5%; 0,013 \pm 0,002 and 0,008 \pm 0,001 41,5% 0001 34,7% for extracts (96, 70, 50 and 30°GL) respectively. There is a relationship between the content of total anthocyanins and antioxidant capacity in vitro of the ethanolic extracts of different grade fruit of *Vaccinium corymbosum* "Blueberry" and that the best solvent for extraction is ethanol 96°GL.

Key words: *Vaccinium corymbosum* "Blueberry", total anthocyanins, and antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 carbonos. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (cianidina, malvidina, pelargonidina, petunidina, delfinidina y peonidina)^{1,2,3}. El interés por los pigmentos antociánicos e investigación se ha incrementado en los últimos años, debido no solamente al color que confieren a los productos que las contienen sino a su probable papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes y; a sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes^{4,5}.

Se denomina antioxidante a "cualquier sustancia que retarda, previene o elimina el daño oxidativo hacia una molécula" o bien, "a la capacidad que tienen determinados compuestos para neutralizar los radicales libres". En este sentido, se ha observado que los arándanos, comparados con otras frutas y vegetales, tienen una alta capacidad antioxidante debido particularmente a sus altas concentraciones de antocianinas y compuestos fenólicos⁶. Muchas de las propiedades atribuidas a las antocianinas para mejorar la salud están asociadas a esta capacidad de actuar como antioxidantes y secuestrar radicales libres en sistemas biológicos. Pueden donar hidrógenos o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática. Se ha demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y contra radicales peróxido, (ROO), superóxido (O₂), hidroxilo (-OH)

y oxígeno singulete (1O₂). El interés en los pigmentos de antocianina también se ha incrementado por su color, ya que se podrían utilizar como colorantes naturales.

Las antocianinas son responsables del color atractivo de muchas frutas y verduras. Su intenso color rojo-púrpura es una fuente atractiva de colorante de alimentos naturales para la industria alimentaria y textil, constituyendo una alternativa a los colorantes alimentarios sintéticos. El estudio y el uso de colorantes naturales ha adquirido relevancia en los últimos años debido a que organizaciones internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), han cuestionado el uso de colorantes sintéticos por estar vinculados con el desarrollo de enfermedades degenerativas como algunos tipos de cáncer⁶. Las principales fuentes de antocianinas son los frutos, entre ellos tenemos al de *Vitis vinífera*, *Solanum melongena*, *Myrcianthes discolor*, *Vaccinium corymbosum*, etc. El arándano o mirtillo (*Vaccinium corymbosum*) es una planta originaria de Norte América, que pertenece a la familia de las *Ericáceas* y forma parte del grupo de las frutas denominadas comercialmente, como berries. La fruta de los arándanos es una baya esférica de color azul a negro, sabor agrídulce, muy jugoso y aromático⁷.

El principal objetivo de esta investigación fue determinar si existe relación entre el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* "Arándano".

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL: Se adquirió 500 g de frutos envasados de *Vaccinium corymbosum* "Arándano", Marca "El Huerto" comercializados por la cadena de Hiper-Mercados TOTTUS.

Cuantificación de antocianinas totales por pH diferencial^{8,9,10}.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO.

El método se fundamenta en la particularidad de los compuestos antociánicos de adoptar diferentes coloraciones y estructuras a determinados pH, siendo para este método la concentración de antocianinas totales proporcional a la diferencia entre las absorbancias a pH 1 y pH 4.5.

PREPARACIÓN DE BUFFERS

- **Buffer pH 4,5:** 40mL de acetato de sodio 1M más 24 mL de HCl 1N y 36 mL de agua destilada.
- **Buffer pH 1,0:** 12, 5 mL de KCl 0, 2 N más 38, 5 mL de HCl 0,2 N

El pH de los buffers fue ajustado para obtener valores de pH final de 1,0 y 4,5.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se elaboró extractos por maceración de 24h usando 10 g de fruto fresco y como solvente 50 mL de etanol de diferentes graduaciones (96, 70, 50 y 30°GL), pasado el tiempo de maceración los extractos fueron filtrados sobre papel whatman N°1 y guardados en frascos color ámbar y en refrigeración a 10°C; el fruto remanente fue triturado y macerado por 12h con los mismos menstruos para agotar la extracción. Finalmente los extractos se reunieron y completaron a volumen en matraces aforados con cada uno de los solventes. Posteriormente un volumen de 1mL de cada uno de los extractos se diluyó con 4 mL de buffer de pH 1,0 y pH 4,5 respectivamente. Se agitó y dejó en reposo por 20 min. La turbidez de la solución final fue corregida midiendo la absorbancia de la solución a 700 nm y sustrayendo esta del valor de la absorbancia a 520 nm.

La determinación del contenido de antocianinas se hizo mediante la siguiente fórmula:

$$C_{(mg/l)} = \frac{A}{\epsilon \cdot L} \cdot MW \cdot 10^3 \cdot \text{Factor de dilución}$$

Donde A corresponde a la *absorbancia* medida con un espectrofotómetro Hewlett Packard modelo 8452 A, ϵ corresponde a la *absorbancia molar*; una constante física para especies moleculares en un solvente a una determinada longitud de onda, C es la concentración molar (mg/L), L es la longitud de recorrido en la cubeta del espectrofotómetro (1cm) y MW peso molecular del pigmento.

Para el cálculo del contenido de antocianinas totales se utilizó el peso molecular y la absorbancia molar del cianidina -3- glucósido con valores de 449.2 y 26900 respectivamente.

El valor "A" se obtuvo sustrayendo el valor corregido obtenido a pH 1 del valor corregido obtenido a pH 4,5:

$$A = (A_{510 \text{ nm pH } 1,0} - A_{700 \text{ nm pH } 1,0}) - (A_{510 \text{ nm pH } 4,5} - A_{700 \text{ nm pH } 4,5})$$

solución en un espectrofotómetro Hewlett Packard modelo 8452 A a 517 nm.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PROBLEMA.

De los extractos de diferente grado etanólico usados para la cuantificación de antocianinas totales se midieron 100, μL los cuales se enfrentaron a 10 mL de la solución de DPPH

0,1 mM.

Las lecturas se realizaron a 517 nm a los 30 minutos posterior a la exposición.

Las pruebas se realizaron por triplicado.

El porcentaje de captura del radical libre se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$X = \% \text{ de captura de radicales DPPH} = \frac{\text{Abs. control} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. control}} \times 100$$

CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)^{15,16}.

Con la ayuda de una jeringa, una alícuota de 3 mL de los diferentes extractos etanólicos se pasó a través de un filtro jeringa 0.22 μm de poro con la finalidad de eliminar todos los sólidos en suspensión presentes y se colectó 1.5 mL en un vial para el corrimiento cromatográfico. El rango de flujo fue de 0,8 mL/min; la fase móvil: A, ácido fórmico al 10% en agua grado HPLC; B, acetonitrilo y la gradiente a utilizada fue: 0-1 min 95% A y 5% de B; 2 min 90% A y 10% B; 20 min 80% A y 20% B y a los 25 min 95% A y 5% B. Las longitudes de detección fueron de 520, 320 y 280 nm.

RESULTADOS

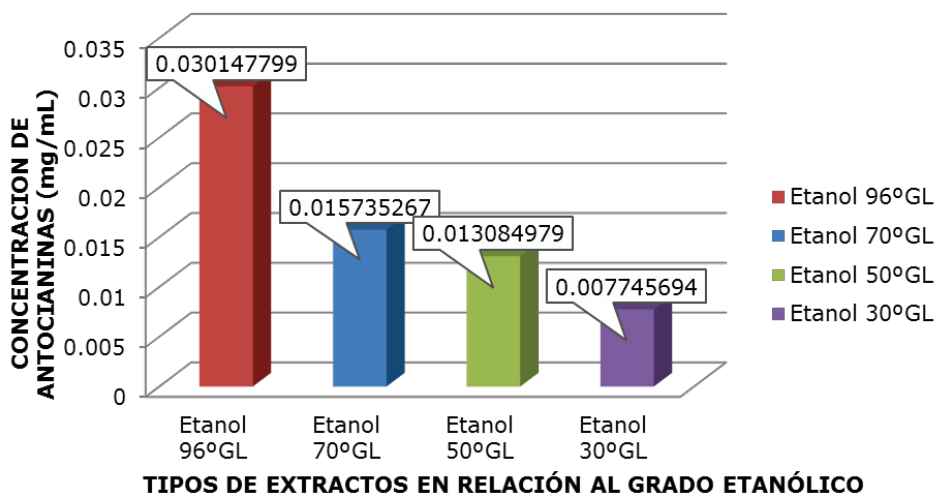


Figura 1: Concentración promedio de antocianinas totales (mg/mL) expresadas en cianidina-3-glucosido en extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum*.

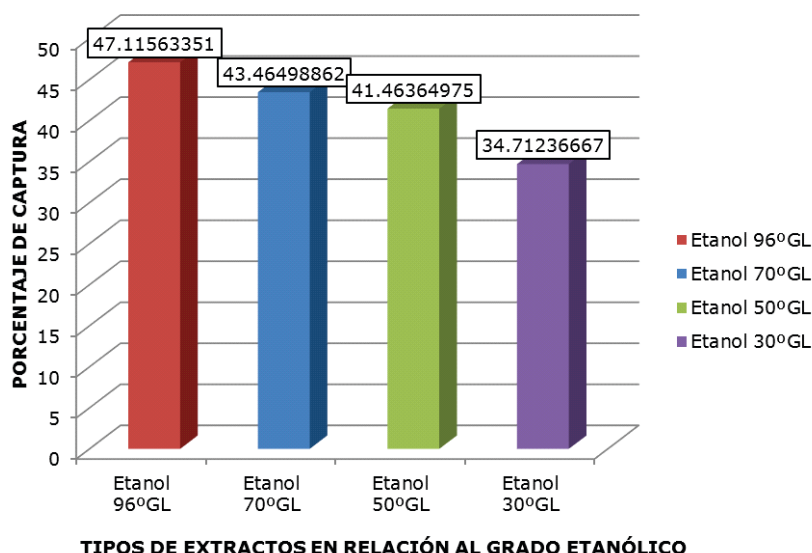


Figura 2: Porcentaje de captura promedio del radical libre DPPH de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum*.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, el contenido de antocianinas totales expresado como cianidina-3-glucósido encontrado en los diferentes extractos fue mayor en relación al aumento del grado etanólico del solvente de extracción (figura 1).

Las antocianinas son compuestos de polaridad intermedia que se extraen muy bien con solventes como el etanol de alta graduación además el proceso de extracción de estos metabolitos secundarios se puede optimizar acidificando el menstuo con un ácido mineral u orgánico.

Ruiz G (2014) en su trabajo: Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos de diferente grado alcohólico del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. mano de oso, concluye que a mayor grado alcohólico utilizado para la preparación del extracto mayor es el porcentaje de polifenoles extraídos¹⁷.

Es necesario investigar las propiedades antioxidantes de cualquier fármaco o sustancia natural antes de considerarlo un antioxidante y aunque los estudios *in vitro* no son necesariamente representatividad de la actividad antioxidante *in vivo* ayudan a tener una idea del poder que determinadas sustancias presentan al ser expuestas a los radicales libres.

La actividad antioxidante se evaluó mediante método indirecto que es lo más utilizado para cuantificar capacidad captadora de radicales libres, utilizando radicales libres coloreados y estables, que presenten una fuerte absorción en la región visible¹⁴. En la figura 2, se observa que a mayor grado etanólico del solvente utilizado para la extracción de antocianinas totales del fruto de *Vaccinium corymbosum* "Arándano" mayor es el porcentaje promedio de captura del radical libre DPPH, siendo esto atribuible directamente al contenido de antocianinas.

Las antocianinas se caracterizan por tener una deficiencia de electrones debido a su particular

estructura química, que las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo. Muchas de las propiedades atribuidas a las antocianinas para mejorar la salud están asociadas a la capacidad de actuar como antioxidantes y secuestrar radicales libres en sistemas biológicos. Pueden donar hidrógenos o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática. Se ha demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y contra radicales peróxido, (ROO), superóxido (O_2), hidroxilo (-OH) y oxígeno singulete ($1O_2$)⁶. Esta capacidad antioxidante atribuida a los compuestos polifenólicos se debe a su estructura altamente conjugada dentro del núcleo flavona y principalmente al radical hidrogenión liberado del hidroxilo en posición 4', que permite la captura del radical libre y su deslocalización estable dentro de la molécula¹⁸.

Se ha reportado la presencia de 13 tipos de antocianinas en el fruto de *Vaccinium myrtillus* identificadas por HPLC-MS/MS (espectro de masas tandem); delfinidina-3-glucósido en un 23,43%, delfinidina-3-rutinósido, en un 2,65%, cianidina-3-glucósido en un 10,16%, cianidina-3-rutinósido en un 3,75%, petunidina-3-glucósido en un 24,21%, petunidina-3-rutinósido en un 7,15%, peonidina-3-glucósido en un 1,12%, peonidina-3-rutinósido en un 0,94%, malvidina-3-glucósido en un 21,64% y malvidina-3-rutinósido en un 4,95%; todas ellas contribuyen a la capacidad antioxidante total tanto *in vitro* como *in vivo* de los extractos que las contienen¹⁵.

El extracto de mayor contenido de antocianinas totales (96°GL), presentó 15 compuestos posterior a su análisis por HPLC, se presume la sinergia de todos estos para la actividad antioxidante total del fruto de *Vaccinium corymbosum* "Arándano".

CONCLUSIONES

1. Se determinó que si existe relación entre el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vacciniumcorymbosum* "Arándano".
2. Se logró cuantificar las antocianinas totales expresadas como cianidina-3-glucósido en extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vacciniumcorymbosum* "Arándano", obteniendo que los extractos de (96, 70, 50 y 30°GL) presentaron concentraciones de 0.030 \pm 0.002, 0.016 \pm 0.001, 0.013 \pm 0.002 y 0.008 \pm 0.001 mg/mL respectivamente.
3. Se determinó la capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vacciniumcorymbosum* "Arándano" en relación al porcentaje de captura del radical libre DPPH, encontrando que los extractos de (96, 70, 50 y 30°GL) presentaron valores de 47.1%, 43.5 %,41.5% y 34.7 %, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vuarant C. "Optimización del proceso de secado de arándanos por infrarrojos". Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 2013
2. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ed. Ediciones Omega S.A. España. 2000.
3. Lock O. Investigación Fitoquímica. Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú. 1998.
4. Garzón G. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. Acta biol. Colomb., Vol. 13 N°. 3, 2008, 27 – 36
5. Garzón A. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta biol. Colomb. [serial on the Internet]. 2008 Dec [cited 2015 Jan 24]; 13(3): 27 - 36. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2008000300002&lng=en.
6. Zapata L. Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. Ciencia, docencia y tecnología. Argentina., Vol. 25, N°.49, 2014.
7. Cabezas M, Peña F. ESTIMACIÓN DEL ÁREA FOLIAR DEL ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum*) POR MEDIO DE UN MÉTODO NO DESTRUCTIVO. rev.udcaactual.divulg.cient. [serial on the Internet]. 2012 Dec [cited 2015 Apr 20]; 15(2):373-379. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000200015&lng=en.
8. Zari G., Boncun B., Ruiz G., Venegas E., Soto M., Cuéllar A., Cosavalente K. Guía de Prácticas de Farmacognosia II. Universidad Nacional de Trujillo-Facultad de Farmacia y Bioquímica. 2014.
9. Miranda M, Cuéllar A. Farmacognosia y Productos Naturales. 2ed. Ed Félix Valera. La Habana 2012.
10. Bautista S. "Cuantificación de antocianinas totales en el extracto acuoso de *Zea Mays* de cinco variedades nativas del Perú y su capacidad antioxidante In Vitro". Tesis para optar el grado de Químico Farmacéutico. 2010.
11. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm-Qwiss U, Technol. 1995; 28, 25-30.
12. Bartolo R., Chávez C. Determinación de la capacidad antioxidante in vitro del decocto de la coronta de *Zea mays* L. (variedad morado) del Distrito de Cajabamba, departamento de Cajamarca 2010. Tesis para optar el grado de Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú. 2010.
13. Rojas M y Rumay A. Determinación de la actividad antioxidante in vitro del extracto hidroalcoholico de las hojas de *Piper aduncum* procedente de la provincia de San Marcos. Departamento de Cajamarca. Tesis para optar el grado de Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú. 2009.
14. Diaz H y Rodriguez I. Capacidad Antioxidante in vitro de las Isoflavonas Totales Obtenidas de Semillas de *Glycine max* L. (Soya) Provenientes de la Provincia de Jaén-Cajamarca. 2010. Tesis para optar el grado de Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú. 2010.
15. Del Carpio C. Caracterización De Las Antocianinas De Los Frutos De Lechler. Food Science & Technology Department, The Ohio State University, 110 Parker Food Science & Technology, 2015 Fyffe Road, Columbus, OH 43210-1007.
16. Elejalde E. Extracción y caracterización de antocianos y procianidinas de distintas variedades de uva empleadas en la elaboración del txakoli tinto de Bizkaia. U n i v. del País Vasco. Fac. de Ciencias Dpto. de Química Org á n i c a. BIBLID [1137-4411 (1999), 5; 67-82].
17. Ruiz S, Venegas E, Ruidias D, Cosavalente K, Vásquez K, Guardia V. Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos de diferente grado alcohólico del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. mano de oso. Revista Farmaciencia Vol. 2 N° 2 (2014)
18. Celis M. "Caracterización Farmacognóstica; Cuantificación De Flavonoides Totales y Capacidad Antioxidante, de Las Flores de *Cordia Lutea* (Flor De Overo)". Tesis para optar el grado de Maestro en Farmacia y Bioquímica con mención en Productos naturales terapéuticos. Disponible en la biblioteca de la escuela de Post Grado de la Universidad Nacional de Trujillo.

Recibido: 10 abril 2016 | Aceptado: 25 junio 2016