

# Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW)

[Antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation of mortiño fruits extracts (*Vaccinium meridionale* SW)]

Carlos GAVIRIA MONTOYA<sup>1</sup>, Clara OCHOA OSPINA<sup>1</sup>, Nelly SÁNCHEZ MESA<sup>1</sup>, Clara MEDINA CANO<sup>2</sup>, Mario LOBO ARIAS<sup>2</sup>, Paula GALEANO GARCÍA<sup>1</sup>, Ana MOSQUERA MARTÍNEZ<sup>1</sup>, Angélica TAMAYO TENORIO<sup>1</sup>, Yasmin LOPERA PÉREZ<sup>1</sup>, Benjamín ROJANO<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ciencia de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Universidad Nacional de Colombia

<sup>2</sup>CORPOICA "La Selva", Km 7 vía Rionegro Llanogrande, Antioquia, Colombia

## Abstract

Mortiño (*Vaccinium meridionale* fruits) is considered as a functional food. It is rich in polyphenolic compounds that have colorant and antioxidant properties, and these structures are potential health protectors. In this work phenol and anthocyanin contents were determined with values of  $201 \pm 10$  and  $609 \pm 39$  respectively; antioxidant activity was studied with the methodologies DPPH ( $2404 \pm 120$  TEAC values), ABTS ( $8694 \pm 435$  TEAC values) and FRAP ( $581 \pm 29$  AEAC values); all results are comparable or higher than the *Vaccinium* reported in other researches. The effects of anthocyanin extracts of mortiño were also studied over the lipidic peroxidation of corn oil, analyzing the evolution of conjugated diene (CD), the value of peroxides (PV) and the formation of reactive substances with 2-thiobarbituric acid, as indicators of oxidation, expressed as the inverse of the rate of oxidation ( $\Phi$ ) with values of  $3.0 \times 10^{-4} \pm 8.9 \times 10^{-6}$ ,  $8.0 \times 10^{-4} \pm 6.1 \times 10^{-5}$  y  $4.0 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-4}$ , respectively.

**Keywords:** peroxidation, mortiño, antioxidant, *Vaccinium*

## Resumen

El mortiño (o frutos del *Vaccinium meridionale*) se puede considerar como un alimento nutracéutico, porque es rica en compuestos polifenólicos que tienen la propiedad de ser colorantes y antioxidantes potencialmente protectoras de la salud. En este trabajo se determinó el contenido de antocianinas y fenoles con valores de  $201 \pm 10$  y  $609 \pm 39$  respectivamente; la actividad antioxidante se estudió por las metodologías DPPH ( $2404 \pm 120$  valores de TEAC), ABTS ( $8694 \pm 435$  valores de TEAC) y FRAP ( $581 \pm 29$  valores de AEAC), todos estos resultados son comparables o superiores a los *Vaccinium* reportados en otras investigaciones. Además, se estudiaron los efectos de los extractos antocianínicos del mortiño sobre la peroxidación lipídica de aceite de maíz, analizando la evolución de dienos conjugados, el valor de peróxidos y la formación de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico, como indicadores de la oxidación, expresados como el inverso de la tasa de deterioro ( $\Phi$ ) con valores de  $3,0 \times 10^{-4} \pm 8,9 \times 10^{-6}$ ,  $8,0 \times 10^{-4} \pm 6,1 \times 10^{-5}$  y  $4,0 \times 10^{-4} \pm 1,0 \times 10^{-4}$ , respectivamente.

**Palabras Clave:** peroxidación, mortiño, antioxidantes, *Vaccinium*

**Recibido | Received:** August 10, 2009.

**Aceptado en Versión Corregida | Accepted in Corrected Version:** October 30, 2009.

**Publicado en Línea | Published Online:** November 30, 2009

**Declaración de intereses | Declaration of interests:** Los autores no tienen conflicto de intereses declarados.

**Financiación | Funding:** Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) de Colombia, por el apoyo económico a través del proyecto número 2008L1363-333

**Cítenlo como | This article must be cited as:** Carlos Gaviria Montoya, Clara Ochoa Ospina, Nelly Sánchez Mesa, Clara Medina Cano, Mario Lobo Arias, Paula Galeano García, Ana Mosquera Martínez, Angélica Tamayo Tenorio, Yasmin Lopera Pérez, Benjamín Rojano. 2009. Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 8(6):519 – 528. {EPub November 30, 2009}.

\*Contactos | Contacts: [brojano@gmail.com](mailto:brojano@gmail.com)



## INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son sustancias que disminuyen o retardan las reacciones de oxidación sobre diferentes sustratos y pueden ser naturales o sintéticos. El butilhidroxianisol (BHA), y el butilhidroxitolueno (BHT) son los antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria de alimentos y farmacéutica; sin embargo, se han encontrado efectos secundarios, como el aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, entre otras (Fuchs, 1998; Bush and Taylor, 1998; Ito et al., 1983); debido a esto, y a la creciente importancia de los antioxidantes en la industria farmacéutica y alimenticia es necesaria la búsqueda de moléculas alternativas de origen natural con gran actividad y que no tengan efectos citotóxicos, ni genotóxicos (López et al., 2008; Rojano et al, 2008a, Rojano et al, 2008b).

Los productos vegetales, son entonces una alternativa para usar como antioxidantes, porque poseen una variedad de compuestos como: antocianos, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico entre otros que pueden ser inocuos para la salud y que además, actúan a bajas concentraciones. Muchos antioxidantes son usados en la industria de alimentos por su capacidad conservadora; porque, retardan el proceso de rancidez, disminuyen la posibilidad de generación de compuestos tóxicos, evitan la decoloración de los pigmentos, no permiten los cambios en la textura, disminuyen la pérdida de valor nutricional causada por la degradación de los ácidos grasos esenciales y por la destrucción de las vitaminas A, E y D (Parr and Bolwell, 2008; Rojano et al., 2008a; y muchos de estos compuestos o sus fuentes naturales, se consideran como nutraceuticos.

La industria química en las aéreas farmacéuticas y de alimentos, consideran que el crecimiento del mercado de los antioxidantes requiere de la educación apropiada del consumidor y de investigaciones científicas pertinentes. Los estudios deben estar dirigidos a la búsqueda de compuestos puros o extractos activos como nuevas fuentes antioxidantes; y que a su vez, deben focalizarse hacia los beneficios que producen los antioxidantes en la salud de modo preventivo (Cornelli, 2009).

El género *Vaccinium* (Ericaceae) tiene cerca de 400 especies y los frutos han atraído el interés de muchos investigadores alrededor del mundo, debido al alto contenido de compuestos polifenólicos, tales como ácido cinámico, flavonoles, antocianinas y

antocianidinas (Parr and Bolwell, 2008; Kahkonen, 2001; Kalt et al., 2001; Prior et al., 1998). La actividad antioxidante de las bayas del género *Vaccinium* como: arándano (blueberry) y arándano rojo (lingonberry) se ha encontrado que está influenciada por el contenido de antocianinas y fenoles totales, los genotipos, la variación en las condiciones ambientales, el estado de madurez de las frutas y de las condiciones de almacenamiento en poscosecha. (Beccaro et al., 2006; Cho et al., 2004; Lohachoompol, 2008; Çelik, 2008; Conner et al., 2002a, 2002b; Kalt et al., 1999, 2003).

En la Zona alto Andina en América del Sur, se reportan 3 especies de *Vaccinium*: *V. corymbodendrum*, *V. floribundum* y *V. meridionale*; distribuidas desde Venezuela hasta Bolivia a una altitud entre 2600 a 4000 m. En Colombia la especie *Vaccinium meridionale* es conocida como “Mortiño” y la colecta se realiza de forma extractiva en los bosques, ocasionando daño a las poblaciones naturales debido a la gran demanda de los frutos. La agroindustria del mortiño en Colombia es incipiente y el fruto es transformado en diferentes productos como dulces, mermeladas y vinos.

Teniendo en cuenta el creciente interés en las propiedades nutraceuticas de los frutos del genero *Vaccinium* y la gran demanda de aditivos naturales en los mercados internacionales; en este trabajo, se estudian las propiedades antioxidantes del mortiño (*V. meridionale*), y se determina el contenido de compuestos polifenólicos; además, se evalúan los efectos de los extractos antocianicos sobre la conservación a la peroxidación lipídica de aceite de maíz; analizando la evolución de la formación de dienos conjugados, valor de peróxidos y la determinación del contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico, como indicadores de la oxidación. Todo esto, para señalar el uso potencial del mortiño, como alimento nutraceutico y aditivo conservante de la peroxidación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Los frutos evaluados fueron obtenidos de la colección de germoplasma de *Vaccinium*, ubicada en el Centro de Investigaciones “La Selva” de Corpoica, localizado en el municipio de Rionegro, Antioquia (Colombia) a 2120 msnm, a una temperatura promedio de 17 °C y humedad relativa media del 78%. El lugar experimental pertenece a la zona de

vida bosque húmedo Montano Bajo (bh-MB) y está ubicado a 06° 08' 06'' de latitud norte y 75° 25' 03'' de longitud oeste. El aceite de maíz es libre de aditivos proveniente de Industrias del Maíz, Cali, Colombia (libre de aditivos).

### Reactivos y equipos

El radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), fosfato ácido de sodio, MeOH, ácido acético, tricloruro de hierro, 2,4,6-tri (2-piridil) triazina (TPTZ) fueron comprados a Aldrich Chem. Co (Millwaukee, WI), ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), ácido tiobarbiturico (TBA), butilhidroxitolueno (BHT), 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO), ciclohexano, ácido clorhídrico, n-hexano, 2-propanol, 1-butanol, sulfato de hierro, cloruro de bario, tiosulfato de amonio y sulfato de bario fueron obtenidos de Merck (Alemania). El agua usada en los experimentos fue grado HPLC. Todos los experimentos se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Jenway 6405.

### Preparación de extractos para medir la actividad antioxidante

Los extractos se obtuvieron de la siguiente forma: 20 g. de cada una de las muestras fueron homogenizadas, usando como solvente de extracción metanol-HCl 1% en una relación (6:1 p/v). Este procedimiento se repitió hasta agotar la muestra. Los extractos fueron filtrados en papel Wathman No 4 y concentrados en un rotavapor a 40 °C. Los extractos se almacenaron a -20 °C durante el periodo de estudio.

### Preparación de las muestras para la peroxidación lipídica

A 50 g de aceite de maíz libre de aditivos, se adiciona el extracto antociánico mezclado con el agente emulsificante NP<sub>10</sub>, hasta obtener concentraciones finales de 250, 500 y 750 µg/mL. Como patrón se utilizó BHT a una concentración de 500 µg/mL y como blanco de muestra se preparó una muestra de aceite sin antioxidantes. Se almacenaron en recipientes de vidrio a una temperatura de 30 °C por 10 días. Los productos de oxidación se evaluaron determinando el Valor de Peróxido (PV), sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbiturico (TBARS) y la formación de dienos conjugados (DC).

### Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del DPPH

Se empleó el método de Brand-Williams et al (1995) con algunas modificaciones (Rojano et al, 2008a). El 1,1-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>), es un radical libre estable que presenta una coloración púrpura en medio metanólico, como consecuencia de la donación de un electrón o un protón por un compuesto con poder antioxidante la tonalidad desaparece. Este procedimiento se lleva a cabo utilizando 10 µL del compuesto estudiado y 990 µL de la solución metanólica de DPPH<sup>•</sup> (20 mg/L). Como referencia se usó la misma cantidad de DPPH y 10 µL del solvente de la muestra (DMSO). Luego de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad, se lee la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. Para cada muestra estudiada se calcula el porcentaje de inhibición del radical y los resultados se expresan como valores TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) mediante la construcción de una curva patrón usando varias concentraciones de antioxidante TROLOX®.

### Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>

La generación del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que más se ha utilizado para determinar la actividad antioxidante total de extractos, compuestos puros, mezclas acuosas y bebidas (Re et al., 1999). El radical es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 415 ó 732 nm y se genera por la reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio)) (3,5 mM) con persulfato de potasio (1,25 mM). Después de 24 h de reacción, se ajusta la absorbancia con PBS pH 7,4 hasta 0,70 unidades, a una longitud de onda de 732 nm. Para la evaluación se emplean 10 µL del compuesto y 990 µL de la solución del radical ABTS<sup>•+</sup>. Luego de 30 min de reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad, se lee el cambio en la absorbancia respecto a la referencia del reactivo. La referencia consiste 10 µL del solvente de la muestra y 990 µL de la solución del radical ABTS<sup>•+</sup>. Los resultados se expresan como valores TEAC mediante la construcción de una curva patrón usando diferentes concentraciones de TROLOX® (Arts et al., 2004).

### Evaluación de la capacidad reductora FRAP

El principio de este método está basado en el incremento en absorbancia debido a la formación del complejo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ)-Fe(II) en presencia de un agente reductor (Benzie and Strain, 1996). El reactivo es una disolución de TPTZ (10  $\mu$ M en HCl 40  $\mu$ M) y FeCl<sub>3</sub> 0,3  $\mu$ M en buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,4); la mezcla de reacción consistió en 900  $\mu$ L de ésta solución, 50  $\mu$ L de una solución del extracto en MeOH y 50  $\mu$ L de agua destilada. Luego de 7 min de reacción se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm. Los valores FRAP son expresados teniendo en cuenta una curva de referencia de ácido ascórbico como patrón primario; la actividad de cada muestra se expresó como valor FRAP (mg de ácido ascórbico por cada 100 g de antioxidante).

### Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles se realizó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). Se construye una curva patrón usando como estándar ácido gálico. Se diluye el extracto a una concentración en la cual el contenido de fenoles se encuentra dentro del intervalo de la curva patrón. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/100g de fruta fresca. Las lecturas se realizan a 760 nm.

### Determinación de antocianinas totales

Las antocianinas totales se determinaron mediante el método diferencial de pH (Gaviria et al., 2007). Las absorbancias fueron medidas a 530 nm y 700 nm en buffers de pH 1,0 y 4,5; usando la expresión  $A = [(A_{530} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{530} - A_{700})_{pH4.5}]$ , y el cianidin-3-glucósido con un coeficiente de extinción molar de 26900. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de cianidin-3-glucósido por 100 g de fruta fresca.

### Determinación de dienos conjugados (DC)

El contenido de DC se determinó por un procedimiento descrito previamente (Zuta et al., 2007), con algunas modificaciones: 10  $\mu$ L de muestra se mezclan con 2990  $\mu$ L de ciclohexano y se agita en un vortex por 10 s, luego se toman 500  $\mu$ L de la mezcla y se le adicionan 1500  $\mu$ L de ciclohexano. La absorbancia de los dienos conjugados se mide a 234 nm. Los resultados se expresaron como valores de dienos conjugados (DC), el BHT se uso como

referencia a una concentración de 500  $\mu$ g/mL. Los valores de dienos conjugados (DC, adimensionales) se calculan según la expresión:  $CD = A/C \cdot L$ , donde A: Absorbancia de la muestra a 234 nm, C: Concentración de la muestra (g/100 mL) y L: Longitud de la celda (cm) = 1 cm.

### Determinación del valor de peróxidos (PV)

El valor de peróxidos se determinó mediante el método descrito por Shanta & Decker (1994), con algunas modificaciones realizadas por Rojano et al. (2008c). Este método se fundamenta en la capacidad de los peróxidos lipídicos de oxidar el Fe<sup>2+</sup> hasta Fe<sup>3+</sup>. A 300  $\mu$ L de muestra, se adicionan 20 mL de hexano-2-propanol (3:2) y se agita por 10 segundos, luego se toma 1,5 mL de la mezcla y se adiciona 2,8 mL de una solución de metanol-1-butanol (2:1). De esta mezcla se toman 100  $\mu$ L y se adiciona 900  $\mu$ L de la solución estándar, preparada mediante la adición de NH<sub>4</sub>SCN 0,44 M al sobrenadante formado por la mezcla FeSO<sub>4</sub> 0,144 M y BaCl<sub>2</sub> en HCl 0,4 M, se agita y se incuba por un periodo de 20 min en la oscuridad. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados se expresaron como meq de peróxido/kg de muestra, mediante el uso de una curva estándar construida usando peróxido de cumeno, como patrón.

### Determinación del contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

La determinación del contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) se realizó mediante el procedimiento de Guzmán-Chozas et al. (1997), con algunas modificaciones realizadas por Rojano et al. (Guzmán-Chozas et al., 1997; Rojano et al., 2008c). En un tubo de ensayo se colocan 5 mL del reactivo de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico 0,7% en ácido acético glacial al 99,9%), y 0,4 g de muestra y se agita por 10 s y fueron llevados a un baño de agua a 90° C por 1 hora. Los tubos, enfriados en agua, se centrifugaron a 5000 rpm por 20 min tras lo cual se eliminó el sobrenadante. Una porción de la muestra se llevó a una cubeta de vidrio y su absorbancia fue leída a 532 nm. Los resultados se expresaron como mg de malonodialdehído/kg (MDA) de muestra usando una curva estándar. La curva estándar fue construida realizando diluciones apropiadas de una solución acuosa de 1,1,3,3 tetraetoxipropano  $1,0 \times 10^{-3}$  M. Estas soluciones fueron tratadas con el reactivo de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico 0,02 M en ácido acético

glacial al 90%) y la absorbancia fue medida a 532 nm.

### Análisis estadísticos

Las regresiones fueron calculadas con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ), usando el programa Statgraphics Plus versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de antocianinas totales expresados como mg eq de cianidin - 3- glicosido/100 g fruta fresca (Tabla 1), encontradas en los frutos del mortiño (*Vaccinium meridionale*), es alto ( $201 \pm 10$ ) comparado con los reportados para los frutos de otras especies. Prior et al. (1998), encontró que el contenido de antocianinas totales valores de 92 – 235 para el Northern Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*), 60 – 187 para el Rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) y 290 – 300 para Lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) (Prior et al., 1998; Kalt and Dufour, 1997; Capocasa et al., 2008). Wang & Ballington (2007), encontraron para el deerberry (*Vaccinium stamineum*) un contenido de 371 – 630. La coloración de la piel de los frutos de mortiño varía entre azul a rojo o azul intenso y depende de la presencia de antocianinas.

En los frutos del mortiño (*Vaccinium meridionale*), el contenido de fenoles totales (mg eq de ácido galico/100 g de fruta fresca) es bastante alto comparado con los frutos de otros *Vaccinium* e incluso de otras especies. El mortiño presenta un contenido de fenoles totales de  $609 \pm 39$ , él es comparable con el presentado por el Northern Highbush blueberry, Rabbiteye blueberry, Lowbush blueberry, los cuales son de 181 – 473, 230 – 457, 290 – 495, respectivamente y 151 – 246 para la uva (*Vitis vinifera*) (Prior et al., 1998; Kalt and Dufour, 1997; Capocasa et al., 2008; Wang & Ballington 2007).

Los métodos DPPH y ABTS, evalúan la capacidad de los extractos de mortiño para atrapar radicales libres en medios orgánicos y acuosos respectivamente. La actividad antioxidante del mortiño expresada por la metodología del radical DPPH, fue mucho menor a los valores obtenidos para el radical ABTS. Esto puede ser debido a que la fracción evaluada del fruto es un extracto metanólico acidificado, con una alta concentración de compuestos polares que presentan una mejor

solubilidad en los medios acuosos donde se realiza el ensayo con el radical ABTS.

Los frutos del género *Vaccinium*, se caracterizan por poseer una gran cantidad de diferentes compuestos con actividad antioxidante (Beccaro et al., 2006). La actividad antioxidante evaluada con el radical DPPH• de los frutos del *Vaccinium meridionale* Sw., presenta un valor de 2404 TEAC, ligeramente mayores a los reportados para blueberry (1035) y menores que los encontrados en *Andean blackberry* (4100 TEAC) (Prior et al., 1998; Kalt and Dufour, 1997; Capocasa et al., 2008; Wang & Ballington, 2007).

La actividad antioxidante evaluada con el radical ABTS•+ de los frutos del *Vaccinium meridionale* Sw., presenta un valor de 8694 TEAC; mucho mayor que los reportados para blueberry (*Vaccinium spp.* cv. Biloxi) 3945 TEAC, Rabbiteye blueberries (*Vaccinium ashei*) 1973 – 3829 TEAC, Southern highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L. Hybrids) 811-2645 TEAC y blackberries (*Rubus L.*) con un valor de 1804-2650 TEAC. (Netzel et al., 2007; Vasco et al., 2008; Sellappan et al., 2002).

Son pocos los reportes sobre el valor FRAP expresado como AEAC para el género *Vaccinium*, sin embargo los extractos de mortiño con un valor de 581 mg de ácido ascórbico por cada 100 g de fruta fresca son mejores reductores que la mayoría de las frutas reportadas, excepto la curuba y la mora (Botero et al., 2007).

### Peroxidación lipídica de aceite de maíz

En los alimentos con alto contenido de lípidos, la etapa más importante de la peroxidación, es la formación y descomposición de los hidroperóxidos; que generan una serie de compuestos oxidados como cetonas, aldehídos, alcanos y alquenos de bajo peso molecular y de alta volatilidad, que determinan el valor sensorial del alimento; proceso denominado rancidez oxidativa. Los antioxidantes pueden retardar la rancidez, pero nunca la detienen, porque la oxidación ocurre a bajas presiones de oxígeno y se hace inevitable, a pesar del uso de todas las metodologías de conservación, como frío, escaldado y empaque (Rodríguez et al., 2007; Nedyalka and Emma, 2001; Aubourg et al., 2004).

**Tabla 1.** Contenido de antocianinas, fenoles totales, porcentaje de sólidos extraíbles y actividad antioxidante.

<b>Antocianinas totales</b>	200,6 ± 10,2 mg eq de cianidin – 3-glicosido/ 100g fruta fresca
<b>Fenoles totales</b>	609 ± 31 mg eq de ácido gálico/ 100g de fruta fresca
<b>Rendimiento<sup>†</sup></b>	13,26 ± 0,34 %
<b>TEAC-DPPH</b>	2404 ± 120 µM de Trolox/ 100g de fruta fresca
<b>TEAC-ABTS</b>	8694 ± 435 µM de Trolox/ 100g de fruta fresca
<b>FRAP</b>	581 ± 29 mg de ácido Ascórbico/ 100g de fruta fresca

<sup>†</sup> base húmeda

Las muestras de aceite de maíz, se monitorearon por un periodo de 10 días midiendo los niveles de DC, PV expresado como meq de peróxido/kg. de muestra (meq/kg) y TBARS muestra). El proceso de oxidación se inhibió usando extractos metanólicos de mortiño como antioxidante a diferentes concentraciones metanólicas (250, 500, y 750 µg/mL), y BHT a 500 µg/mL, que es la concentración máxima permisible en alimentos.

### Dienos conjugados (DC)

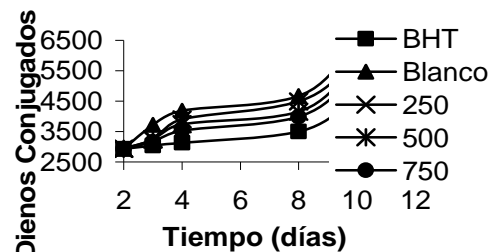
La formación de dienos conjugados (DC) ocurre durante las primeras fases de la oxidación lipídica. La evaluación del contenido de DC es un buen parámetro para la valoración del deterioro oxidativo de aceites, y a la vez indica la efectividad del antioxidante (Aubourg et al., 2004). La Fig. 1 muestra el incremento relativo del contenido de DC en las muestras de aceite de maíz con extracto antocianínico, BHT y blanco a una temperatura constante de almacenamiento de 30 °C, como una función del tiempo. Se observó un patrón regular de incremento para todas las muestras durante el tiempo de experimentación; hasta el día tres el incremento de DC en las muestras con antioxidante no fue apreciable, mientras que el blanco aumentó considerablemente hasta el día cuatro.

Las muestras con extractos de antocianinas presentaron un incremento entre el día tres y el día cuatro y a partir de allí todas ellas exhibieron un comportamiento aproximadamente constante. En el día ocho todas las muestras presentaron un incremento grande en el contenido de DC hasta el día diez. Los valores DC de todas las muestras estabilizadas fueron mucho menores que el blanco; indicando una buena actividad antioxidante de los extractos. Se observaron altos contenidos de DC para el blanco, indicando una intensidad considerable de

la oxidación, seguido por las muestras con extractos a las concentraciones de 250, 500, 750 µg/mL y BHT respectivamente. El contenido de DC de la muestra a la concentración de 250 µg/mL, fue el más alto de las muestras evaluadas, con valores menores que el blanco, durante todo el periodo de almacenamiento.

### Valor de peróxido (PV)

El valor de peróxido es un buen indicador del grado de oxidación inicial en aceites. La Fig. 2, muestra el incremento de VP para todas las muestras durante el tiempo de almacenamiento. El incremento del VP es debido a la formación de hidroperóxidos, productos de la oxidación primaria (Abdulkarim et al., 2007).

**Figura 1.** Efecto del extracto antocianínico a diferentes concentraciones y BHT en la formación de DC en aceite de maíz durante diez días de almacenamiento a 30 °C.

El incremento del VP fue aproximadamente constante durante los cuatro primeros días de experimentación, pero a diferentes gradientes según la concentración de extracto o del BHT. A partir del día cuatro el incremento en el VP del blanco y la concentración de 250 µg/mL de extracto fue mayor que el obtenido con las otras muestras. Los valores de peróxido estuvieron en el rango de 0,238 a 0,252 meq/kg para las muestras que contenían el extracto antocianínico, mientras que para el BHT fue de 0,235 meq/kg y 0,259 meq/kg para el blanco en el décimo día. El blanco presentó el contenido más alto de VP, seguido de 250, 500, 750 µg/mL y BHT, respectivamente. La velocidad de incremento de VP permaneció uniforme para 500 y 750 µg/mL durante todo el periodo de almacenamiento, sugiriendo una buena eficiencia de los extractos a 500 y 750 µg/mL para la estabilización del aceite de maíz (Abdulkarim et al., 2007).

**Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

La Fig. 3 muestra el efecto de las diferentes concentraciones del extracto antociánico, BHT y el blanco sobre la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en las muestras de aceite de maíz en el tiempo. Un incremento continuo de TBARS fue observado en todas las muestras durante el tiempo de almacenamiento. El blanco exhibió los valores más altos de TBARS en todas las etapas de análisis durante el almacenamiento. El aumento en la concentración de TBARS fue lento y similar para todas las muestras hasta el día 3, a partir del cual se aceleró la formación en el blanco y las concentraciones de 250 y 500 µg/mL hasta el último día. El incremento en el contenido de TBARS fue más intenso y de comportamiento lineal para el blanco y las muestras con 250 y 500 µg/mL de extracto antociánico. Las muestras de 750 µg/mL y BHT se comportaron igual entre el día 3 y el día 4, y a partir del cual mostraron un comportamiento exponencial, exhibiendo un mayor contenido de TBARS la muestra de 750 µg/mL, en especial entre los días 8 y 10 donde el incremento fue más pronunciado.

El comportamiento de la formación de DC, PV y TBARS en el tiempo, puede modelarse mediante regresiones exponenciales cuyas pendientes dependen de la concentración y de la naturaleza del antioxidante. Por esto, se hace necesario obtener un parámetro ( $\Phi$ ) que determine la acción antioxidante de cualquier compuesto en un proceso oxidativo en particular.

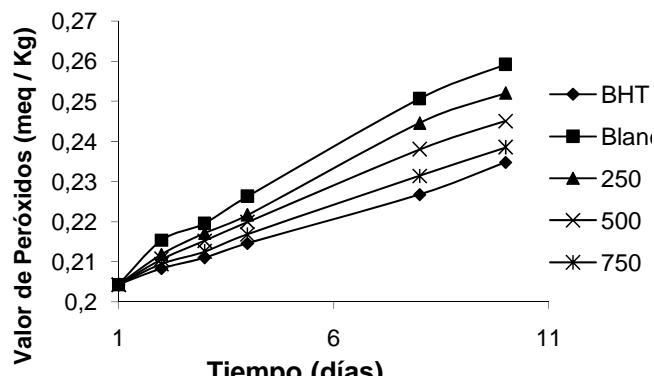
Para calcular el valor  $\Phi$  del compuesto en los ensayos DC, se realizó el siguiente procedimiento descrito por Rojano et al. (2008c): se determinó  $\phi_i$  que es la pendiente de la regresión exponencial de los DC contra el tiempo, para cada concentración. Con los valores de  $\phi_i$ , se calculó la relación  $\phi_0/\phi_i$ ; donde  $\phi_0$  es la pendiente del blanco. El valor de la pendiente de la regresión lineal de  $\phi_0/\phi_i$  contra la concentración es el valor de la constante  $\Phi$ , que en este caso particular, refleja el efecto total de las antocianinas como antioxidante, con respecto a la inhibición del proceso de oxidación del aceite de maíz, en la formación de DC. El cálculo de  $\Phi$ , se hizo a partir de la siguiente ecuación:

$$\phi_0/\phi_i = 0,0003(\text{mg/kg de muestra}) + 0,9413$$

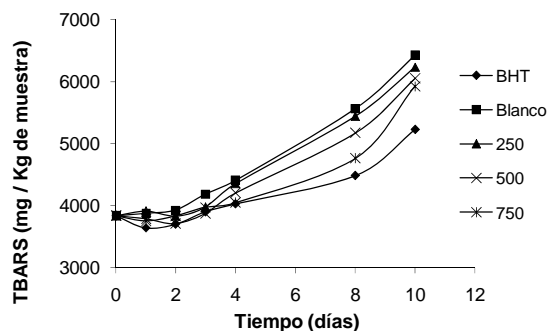
La constante global de inhibición ( $\Phi$ ) de la formación de DC en el aceite de maíz por efecto del

extracto antociánico es:  $\Phi = 3,0 \times 10^{-4} \pm 8,9 \times 10^{-6}$  mg/kg de muestra; con una  $r^2 = 99,93\%$ ,  $F = 1342,71$  y  $p = 0,0174$ .

**Figura 2.** Efecto del extracto antociánico a diferentes concentraciones y BHT en la formación de PV en aceite de maíz durante 10 días de almacenamiento a 30 °C



**Figura 3.** Efecto del extracto antociánico a diferentes concentraciones y BHT en la formación de TBARS en aceite de maíz durante diez días de almacenamiento a 30 °C.



De otro lado, a partir de los valores de  $\phi_0/\phi_i$  se pudo calcular el porcentaje de inhibición para cada concentración de antioxidante, expresado como:

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - \phi_0/\phi_i) * 100 \quad (1)$$

El BHT presentó mayor capacidad para inhibir los procesos oxidativos acelerados a 30 °C en aceite, en comparación con los extractos de antocianinas, porque a la concentración de 500 µg/mL inhibió un 37,7%, mientras que las antocianinas a 750 µg/mL, inhibieron solamente el 15,7%; estos resultados están acordes con diversos reportes bibliográficos (Abdulkarim et al., 2007).

Para calcular la constante ( $\Phi$ ) en los ensayos PV, se procede como en el caso anterior; se calculan los valores de  $\phi_0$ ,  $\phi_i$  y las relaciones de  $\phi_0/\phi_i$ ; se calcula el valor de la constante global  $\Phi$  para la inhibición de

formación de hidroperóxidos en el proceso de oxidación de aceite a 30 °C. El valor resultante es:  $\Phi = 8,0 \times 10^{-4} \pm 6,1 \times 10^{-5}$ ; con una  $r^2 = 99,45\%$ ,  $r = 0,995$ ,  $F = 181,8$  y  $p = 0,0471$ . Con los valores de  $\phi_0/\phi_i$  se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración de antioxidante, con la ecuación (1). Al comparar los resultados obtenidos para las muestras con contenido de antocianos y BHT se pudo observar una mayor capacidad de inhibición del proceso oxidativo para el BHT, porque la concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$  inhibió un 41,4 %, en comparación con un 34,1% obtenido con las antocianinas a 750  $\mu\text{g/mL}$ ; resultados que concuerdan con diversos reportes bibliográficos (Wanasundara and Shahidi, 1998).

Los tratamientos con el extracto antociánico de mortiño redujeron la oxidación del aceite de maíz durante la incubación a 30 °C, demostrando un efecto inhibitorio en la formación de TBARS e indicando una protección potencial de la oxidación para el aceite. Con los datos de la figura 3, se calcularon los valores de  $\phi_0$ ,  $\phi_i$  y las relaciones de  $\phi_0/\phi_i$ . De igual manera, que en el caso anterior se calculó el valor de la constante global  $\Phi$  para inhibir la formación de TBARS en el proceso de oxidación de aceite a 30 °C. El valor resultante fue  $\Phi = 4,0 \times 10^{-4} \pm 1,0 \times 10^{-5}$ , con una  $r^2 = 91,52 \%$ ,  $F = 10,80$  y  $p = 0,1881$ . De otro lado, a partir de los valores de  $\phi_0/\phi_i$  se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración de antioxidante, con la ecuación (1).

El BHT presentó mayor capacidad para inhibir el proceso oxidativo a 30 °C en aceite de maíz, en comparación con los extractos antociánicos, porque la concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$  inhibió un 37,2%, mientras que las antocianinas a 750  $\mu\text{g/mL}$ , inhibieron solamente el 19,6%; estos resultados están acordes con diversos reportes bibliográficos para otras estructuras químicas (Siriwardhana and Jeon, 2004; Rojano et al., 2008c).

## CONCLUSIONES

El mortiño (*Vaccinium meridionale* SW) es una fruta con alto contenido de compuestos polifenólicos, que se expresan a través de su alta capacidad antioxidante, con valores comparables o superiores a los diversos *Vaccinium* encontrados en diferentes latitudes del mundo; los cuales tienen índice alto de comercialización, como alimentos nutraceuticos o como fruta fresca. Una limitación de las técnicas usadas es que el comportamiento reductor de los extractos del mortiño se puede ver afectado por el

contenido de azúcares reductores y ácido ascórbico. Teniendo en cuenta esto, el extracto antociánico de mortiño, presentó una buena eficiencia inhibitoria de la peroxidación lipídica en comparación con el blanco, sin embargo el antioxidante sintético BHT mostró el mayor efecto inhibitorio de la oxidación lipídica. Por lo tanto, se puede concluir que el extracto antociánico, en las concentraciones estudiadas, es capaz de proteger el aceite de maíz contra la oxidación y se puede recomendar como una buena fuente de antioxidantes naturales para la estabilización de sistemas alimenticios, especialmente los aceites vegetales. Estos resultados están acordes con los conceptos sobre la paradoja polar planteada por Frankel et al. (1997); de tal manera, que en fase continua como los aceites, los antioxidantes hidrofílicos (extractos antociánicos) pueden ser efectivos por concentrarse en la interfase aire-aceite, que es donde ocurre el fenómeno oxidativo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) de Colombia, por el apoyo económico a través del proyecto número 2008L1363-333 y a la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias. Igualmente, se agradece el suministro de materiales por parte de CORPOICA, en el marco de un trabajo apoyado por Corantioquia.

## REFERENCIAS

- Abdulkarim SM, Long K, Lai OM, Muhammad SKS, Ghazali HM. 2007. Frying quality and stability of high-oleic *Moringa oleifera* seed oil in comparison with other vegetable oils. *Food Chem* 105:1382-1389.
- Arts M, Dallinga S, Voss H P, Haenen G, Bast A. 2004. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem* 88:567-570.
- Aubourg SP, Piñeiro C, González MJ. 2004. Quality loss related to rancidity development during frozen storage of horse (*Trachurus trachurus*). *JAACS* 81(7):671-678.
- Beccaro G, Mellano MG, Botta R, Chiabrando V, Bounous G. 2006. Phenolic and anthocyanin content and antioxidant activity in fruits of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and of highbush blueberry (*V. corymbosum* L.) cultivars in North Western Italy. *Acta Horticult* 715:553-558.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76.

- Botero ML, Ricaurte S, Monsalve C, Rojano B. 2007. Capacidad reductora de 15 frutas tropicales. *Scientia Tech* 33:295-296.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss U Technol* 28:25-30.
- Bush RK, Taylor SL. 1998. Adverse reactions to food and drug additives, in *Allergy. Principles and Practice*, 5th ed. Mosby, St. Louis. 1183.
- Capocasa F, Scalzo J, Mezzetti B, Battino M. 2008. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. *Food Chem* 111:872-878.
- Çelik H, Özgen M, Serçe S, Kaya C. 2008. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Sci Hort* 117:345-348
- Cho MJ, Howard LR, Prior RL, Clark JR. 2004. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Sci Food Agr* 84(13):1771-1782.
- Conner AM, Luby JJ, Hancock JF, Berkheimer S, Hanson EJ. 2002a. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold temperature storage. *J Agr Food Chem* 50(4):893-898.
- Conner AM, Luby JJ, Tong CBS, Finn CE, Hancock JF. 2002b. Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. *J Am Soc Hort Sci* 127(1):89-97.
- Cornelli U. 2009. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol* 27:175-194.
- Frankel EN, Huang S-W, Aeschbach R. 1997. Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. *J Am Oil Chem Soc* 74:1039-1315.
- Fuchs J. 1998. Potentials and limitations of the natural antioxidants alpha-Tocopherol, L-Ascorbic Acid and Beta-Caroteno in cutaneous photoprotection. *Free Radic Biol Med* 25(7):848-873.
- Gaviria C, Cifuentes O, Monsalve C, Rojano B. 2007. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Attalea butyracea*. *Sci Tech* 33:297-299.
- Guzmán-Chozas M, Vicario I, Guillén-Sans R. 1997. Spectrophotometric profiles of off-flavor aldehydes by using their reactions with 2-thiobarbituric acid. *J Agr Food Chem* 45:2452-2457.
- Ito N, Fukushima S, Hasegawa A, Shibata M, Ogiso T. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 70:343-347.
- Kahkonen MP, Hopia AI, Heinonen M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agr Food Chem* 49:4076-4082
- Kalt W, Dufour D. 1997. Health functionality of blueberries. *Horttechnology* 7:216-221.
- Kalt W, Lawand C, Ryan DAJ, McDonald JE, Donner H, Forney CF. 2003. Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *J Am Soc Hort Sci* 128(6):917-923.
- Kalt W, McDonald JE, Ricker RD, Lu X. 1999. Anthocyanin content and profile within and among blueberry species. *Can J Plant Sci* 79(4):617-623.
- Kalt W, Ryan D, Duy J, Prior R, Ehlenfeldt M, Kloet V. 2001. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* Section *cyanococcus* spp.). *J Agr Food Chem* 49:4761-4767.
- Lohachoompol V, Mulholland M, Szrednicki G, Craske J. 2008. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chem* 111:249-256.
- López JB, Rojano B, Lasso C, Sánchez I. 2008. Evaluación genotóxica y citotóxica del isoespintanol en cultivos de linfocitos humanos. Tercer Congreso Colombiano De Biotecnología - Segundo Seminario Internacional de Bionegocios. Cartagena.
- Nedyalka VY, Emma MM. 2001. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *Eur J Lipid Sci Technol*. 103(11):752-767.
- Netzel M, Netzel G, Tian Q, Schwartz S, Konczak I. 2007. Native Australian fruits—a novel source of antioxidants for food. *Innov Food Sci Emerg Technol* 8:339-346.
- Parr AJ, Bolwell GP. 2008. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agr* 80:985-1012.
- Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien Ch, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G, Mainland CM. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J Agr Food Chem* 46(7):2686-2693.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237.
- Rodríguez A, Lozada V, Larraín MA, Quiral V, Vinagre J, Aubourg, SP. 2007. Development of lipid changes related to quality loss during the frozen storage of farmed coho salmon. *J Am Oil Chem Soc* 84:727-734.
- Rojano B, Gaviria C, Gil M, Saez J, Schinella G, Tournier H. 2008a. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae* 15(1):173-181.
- Rojano B, Saez J, Schinella G, Quijano J, Vélez E, Gil A. 2008b. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-Isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *J Mol Struct* 877:1- 6.

- Rojano B, Gaviria C, Saez J. 2008c. Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae* 15(2):1-9.
- Sellappan S, Akoh C, Krewer G. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J Agr Food Chem* 50(8):2432-2438.
- Siriwardhana N, Jeon Y. 2004. Antioxidative effect of cactus pear fruit (*Opuntia ficus-indica*) extract on lipid peroxidation inhibition in oils and emulsion model systems. *Eur Food Res Technol* 219: 369-376.
- Shanta NC, Decker EA. 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *JAOAC Int* 77:421-424.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158.
- Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem* 111: 816-823.
- Wanasundara UN, Shahidi F. 1998. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chem* 63(3):342-355.
- Wang SY, Ballington JR. 2007. Free radical scavenging capacity and antioxidant enzyme activity in deerberry (*Vaccinium stamineum* L.). *Food Sci Technol Today* 73:1352-1361.
- Zuta PC, Simpson BK, Zhao X, Leclerc L. 2007. The effect of  $\alpha$ -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. *Food Chem* 100(2):800-807.

